



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Διδακτορική Διατριβή

**«ΤΑ ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΕ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ
ΣΥΛΛΟΓΕΣ ΠΟΙΚΙΛΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ»**

ΥΠΟ

ΙΩΑΝΝΗ ΣΑΡΡΗΓΕΩΡΓΙΟΥ

Πτυχιούχου Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2025

© 2025 ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΑΡΡΗΓΕΩΡΓΙΟΥ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΑΡΡΗΓΕΩΡΓΙΟΥ - ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

~ 2 ~

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η έναρξη εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής του βιοχημικού Ιωάννη Σαρρηγεωργίου ορίσθηκε στις 21/06/2019 (Αρ. Πρωτ. 3946) στη Πνευμονολογική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το θέμα της διδακτορικής διατριβής ορίσθηκε ως εξής: «Τα Φυσικά Αντισώματα σε Υπεζωκοτικές Συλλογές ποικίλης αιτιολογίας».

Η τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή ορίσθηκε στις 19/06/2019 (Συνεδρία αριθμ. 16) και αποτελείται από τους:

1. Δρ. Κ. Γουργουλιάνη, Καθηγήτριά του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, (Επιβλέπτων)
2. Δρ. Ζ. Δανιήλ, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Δρ. Π. Λυμπέρη, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Η εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Τμήμα Ανοσολογίας, Εργαστήριο Ανοσολογίας, υπό τη διεύθυνση της Δρ. Λυμπέρη Πηγής.

Ο υποψήφιος έλαβε μια υποτροφία κατόπιν αξιολόγησης:

- Υποτροφία Νόστος Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, για το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023.

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (25^η 2024-2025/16-07-2025 Συνέλευση του Τμήματος):

- | | |
|---|--|
| 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων) | Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας |
| 2^{ος} Εξεταστής | Δρ. Ζωή Δανιήλ
Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας |
| 3^{ος} Εξεταστής | Δρ. Πηγή Λυμπέρη
Ερευνήτρια Α', Εργαστήριο Ανοσολογίας, Ελληνικό
Ινστιτούτο Παστέρ |
| 4^{ος} Εξεταστής | Δρ. Σωτήριος Ζαρογιάννης
Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας |
| 5^{ος} Εξεταστής | Δρ. Χρυσή Χατζόγλου
Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 6^{ος} Εξεταστής | Δρ. Αναστάσιος Γερμενής
Ομότιμος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 7^{ος} Εξεταστής | Δρ. Ερασμία Ρούκα
Επ. Καθηγήτρια Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών στη
Νοσηλευτική, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας |

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	8
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	13
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	16
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	18

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Φυσική Αυτοανοσία και Φυσικά Αντισώματα.....	21
1.1 Φυσική Αυτοανοσία και η Ανακάλυψη των Φυσικών Αντισωμάτων.....	21
1.2 Χαρακτηριστικά των ΦΑ.....	23
1.3 Κύτταρα που παράγουν ΦΑ.....	25
1.3.1 B-1 λεμφοκύτταρα.....	26
1.3.2 B-2 λεμφοκύτταρα.....	27
1.3.3 MZ-B λεμφοκύτταρα.....	28
1.4 Βιολογικός ρόλος των ΦΑ.....	29
1.4.1 Απομάκρυνση προϊόντων καταβολισμού.....	30
1.4.2 Δράση έναντι παθογόνων παραγόντων.....	31
1.4.3 Ανοσορρύθμιση.....	32
1.4.4 Κυτταροδιείσδυση.....	33
1.5 ΦΑ και παθολογικές καταστάσεις.....	35
2. Εφαρμογές των ΦΑ στη Βιοϊατρική.....	37
2.1 Προκλήσεις για την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων.....	37
2.2 Τα ΦΑ στη πρόγνωση και διάγνωση ασθενειών.....	38
2.3 Τα ΦΑ στη θεραπεία.....	39
2.3.1 Πολυκλωνικά ΦΑ.....	40
2.3.2 Μονοκλωνικά ΦΑ.....	41
3. Ορογόνες Κοιλότητες.....	42
3.1 Περικαρδιακή Κοιλότητα.....	43
3.2 Περιτοναϊκή Κοιλότητα.....	44
3.3 Υπεζωκοτική Κοιλότητα.....	46
4. Υπεζωκοτικές Συλλογές.....	47

4.1 Διαγνωστική Προσέγγιση ΥΣ.....	48
4.2 Επιδημιολογία ΥΣ.....	52
4.3 Διαχείριση ΥΣ.....	53
4.3.1 Διαχείριση Διδρωματικών ΥΣ.....	55
4.3.2 Διαχείριση Λοιμωδών ΥΣ.....	56
4.3.3 Διαχείριση Κακοήθων ΥΣ.....	58
4.4 Αυτοαντισώματα σε ΥΣ.....	61
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
5. ΥΛΙΚΑ	66
5.1 Αναλώσιμα Συσκευές και Όργανα.....	66
5.2 Διαλύματα-Χημικά.....	67
5.3 Αντιγόνα.....	68
5.4 Αντισώματα και συζεύγματα.....	69
5.5 Πρότυπα δείγματα (standarts).....	69
6. ΜΕΘΟΔΟΙ	69
6.1 Δειγματοληψία.....	69
6.2 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA).....	70
6.3 Μέτρηση ολικών ανοσοφαιρινών με Νεφελομετρία.....	71
6.4 Στατιστική ανάλυση.....	72
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
7.1 Διερεύνηση των επιπέδων των ΦΑ και των χαρακτηριστικών τους σε ασθενείς με ΥΣ ποικίλης αιτιολογίας.....	74
7.1.1 Σύγκριση επιπέδων ΦΑ σε υπεζωκοτικό υγρό και ορό	76
7.1.2 Σύγκριση επιπέδων ΦΑ σε υπεζωκοτικό υγρό μεταξύ των ομάδων ασθενών με ΥΣ ποικίλης αιτιολογίας.....	79
7.2 Διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων των ΦΑ και των επιμέρους ανοσολογικών και βιοχημικών παραμέτρων των ΥΣ.....	83
7.2.1 Ανάλυση των συγκεντρώσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη στο υπεζωκοτικό υγρό και ορό.....	84

7.2.2 Διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων των ΦΑ και της συγκέντρωσης των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη	87
7.2.3 Διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων των ΦΑ, της συγκέντρωσης των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη και των βιοχημικών παραμέτρων των ΥΣ.....	89
7.3 Διερεύνηση της τοπικής παραγωγής των ΦΑ στην υπεζωκοτική κοιλότητα..	95
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	98
8.1 Τα ΦΑ στις ΥΣ.....	98
8.2 Εκτίμηση της φυσικής αυτοανασίας στις ΥΣ.....	100
8.2.1 ΦΑ έναντι ενδογενών αντιγόνων.....	101
8.2.2 ΦΑ έναντι εξωγενών αντιγόνων.....	103
8.3 Αντιγόνα σχετιζόμενα με διαφορετικές παθοφυσιολογικές εκφάνσεις των ΥΣ.....	104
8.3.1 ΦΑ έναντι LPS.....	105
8.3.1 ΦΑ έναντι Υαλουρονιδάσης.....	107
8.3.1 ΦΑ έναντι Καρβονικής Ανυδράσης.....	109
8.4 Συμπεράσματα – Μελλοντικές κατευθύνσεις.....	111
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	113

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά

1. Fotou E, Moulasioti V, Kyriakou D, Boti M E, Moussis V, Papadami M, Tellis C, Patsias A, **Sarrigeorgiou I**, Papadopoulos G A, Lymberi P, Tsiouris V, Tsikaris V, Demokritos T. (2024). Effect of dietary supplementation with oregano oil premix on the antioxidant status, performance, and meat quality in slow-growth broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 23(1), 1741–1751. doi: [10.1080/1828051X.2024.2425740](https://doi.org/10.1080/1828051X.2024.2425740)
2. Jagirdar RM, Rouka E, Pitaraki E, **Sarrigeorgiou I**, Kotsiou OS, Sinis SI, Papazoglou ED, Marnas P, Malami Z, Lymberi P, Giannou AD, Hatzoglou C, Gourgoulisanis KI, Zarogiannis SG. Effects of patient pleural effusion fluids on the BBSome components expression of human benign mesothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2025 Jan 1;328(1):L105-L112. doi: [10.1152/ajplung.00373.2023](https://doi.org/10.1152/ajplung.00373.2023)
3. Tellis C, **Sarrigeorgiou I**, Tsinti G, Patsias A, Fotou E, Moulasioti V, Kyriakou D, Papadami M, Moussis V, Boti ME, Tsiouris V, Tsikaris V, Tsoukatos D, Lymberi P. Pasture vs. Coop: Biomarker Insights into Free-Range and Conventional Broilers. *Animals (Basel)*. 2024 Oct 24;14(21):3070. doi: [10.3390/ani14213070](https://doi.org/10.3390/ani14213070)
4. **Sarrigeorgiou I**, Tsinti G, Kalala F, Germenis A, Speletas M, Lymberi P. Levels of Natural Antibodies Before and After Immunoglobulin Replacement Treatment Affect the Clinical Phenotype in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2024 Sep 21;45(1):13. doi: [10.1007/s10875-024-01805-7](https://doi.org/10.1007/s10875-024-01805-7)
5. Eliadis P, Mais A, Papazisis A, Loxa EK, Dimitriadis A, **Sarrigeorgiou I**, Backovic M, Agallou M, Zouridakis M, Karagouni E, Lazaridis K, Mamalaki A, Lymberi P. Novel Competitive ELISA Utilizing Trimeric Spike Protein of SARS-CoV-2, Could Identify More Than RBD-RBM Specific Neutralizing Antibodies in Hybrid Sera. *Vaccines (Basel)*. 2024 Aug 13;12(8):914. doi: [10.3390/vaccines12080914](https://doi.org/10.3390/vaccines12080914)
6. Fotou E, Moulasioti V, Papadopoulos G A, Kyriakou D, Boti M E, Moussis V, Papadami M, Tellis C, Patsias A, **Sarrigeorgiou I**, et al. Effect of Farming System Type on Broilers' Antioxidant Status, Performance, and Carcass Traits: An Industrial-Scale Production Study. *Sustainability* 2024, 16, 4782. doi: [10.3390/su16114782](https://doi.org/10.3390/su16114782)
7. **Sarrigeorgiou I**, Rouka E, Kotsiou OS, Perlepe G, Gerovasileiou ES, Gourgoulisanis KI, Lymberi P, Zarogiannis SG. Natural antibodies targeting

- LPS in pleural effusions of various etiologies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2024 Jun 1;326(6):L727-L735. doi: [10.1152/ajplung.00377.2023](https://doi.org/10.1152/ajplung.00377.2023)
8. Iatrou A, Gounari M, Sofou E, Zaragoza-Infante L, Markopoulos I, **Sarrigeorgiou I**, Petrakis G, Pechlivanis N, Roumeliotou-Dimou M, Panayiotidis P, Stamatopoulos B, Gkanidou M, Sandaltzopoulos R, Degano M, Koletsa T, Lymberi P, Psomopoulos F, Ghia P, Agathangelidis A, Chatzidimitriou A, Stamatopoulos K. N-Glycosylation of the Ig Receptors Shapes the Antigen Reactivity in Chronic Lymphocytic Leukemia Subset #201. *J Immunol*. 2023 Sep 1;211(5):743-754. doi: [10.4049/jimmunol.2300330](https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300330)
 9. Rouka E, Jagirdar RM, **Sarrigeorgiou I**, Pitaraki E, Sinis SI, Varsamas C, Papazoglou ED, Kotsiou OS, Lymberi P, Giannou A, Hatzoglou C, Gourgoulisanis KI, Zarogiannis SG. Changes in expression of mesothelial BBS genes in 2D and 3D after lithium chloride and ammonium sulphate induction of primary cilium disturbance: a pilot study. *Pharmacol Rep*. 2023 Oct;75(5):1230-1239. doi: [10.1007/s43440-023-00513-0](https://doi.org/10.1007/s43440-023-00513-0)
 10. Tsitsami E, **Sarrigeorgiou I**, Tsinti M, Rouka EC, Zarogiannis SG, Lymberi P. Natural autoimmunity in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2023 May 3;21(1):44. doi: [10.1186/s12969-023-00823-w](https://doi.org/10.1186/s12969-023-00823-w)
 11. **Sarrigeorgiou I**, Stivarou T, Tsinti G, Patsias A, Fotou E, Moulasioti V, Kyriakou D, Tellis C, Papadami M, Moussis V, Tsiouris V, Tsikaris V, Tsoukatos D, Lymberi P. Levels of Circulating IgM and IgY Natural Antibodies in Broiler Chicks: Association with Genotype and Farming Systems. *Biology (Basel)*. 2023 Feb 14;12(2):304. doi: [10.3390/biology12020304](https://doi.org/10.3390/biology12020304)
 12. Stivarou T, Papaioannou L, **Sarrigeorgiou I**, Avgoustakis K, Lymberi P. Human monoclonal natural IgG antibodies can penetrate MDA-MB-231 cells and transport intracellularly paclitaxel-loaded gold nanorods. 2023 Volume 80;10(4):109. doi: [10.1016/j.jddst.2022.104109](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104109)
 13. **Sarrigeorgiou I**, Moschandreu D, Dimitriadis A, Tsinti G, Sotiropoulou E, Ntoulaki E, Eliadis P, Backovic M, Labropoulou S, Escriu N, Pouliakis A, Giannopoulou G, Gaitanarou E, Lazaridis K, Mentis A, Mamalaki A, Grouzi E, Lymberi P. Combined monitoring of IgG and IgA anti-Spike and anti-Receptor binding domain long term responses following BNT162b2 mRNA vaccination in Greek healthcare workers. *PLoS One*. 2022 Nov 21;17(11):e0277827. doi: [10.1371/journal.pone.0277827](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277827)

Δημοσιευμένες Περιλήψεις σε Πρακτικά Επιστημονικών Συνεδρίων

1. **Sarrigeorgiou I**, et al. ELISA Based Quantification of Chicken Specific Troponin-T Peptide in Skeletal Muscle TCA Extracts. (2022) 36th European Peptide Symposium. doi: [10.17952/36EPS/36EPS.2022.301](https://doi.org/10.17952/36EPS/36EPS.2022.301)
2. Gerousi M, Iatrou A, Kotta K, **Sarrigeorgiou I**, Lymberi P, Chatzidimitriou A, Stamatopoulos K. "Changes in N-Glycosylation Induced By Somatic Hypermutation Modulate the Antigen Reactivity of the Immunoglobulin Receptors in CLL Stereotyped Subset #201". Blood (2019) 134 (Supplement_1):1733. doi: [10.1182/blood-2022-168728](https://doi.org/10.1182/blood-2022-168728)
3. **Sarrigeorgiou I**, Kotsiou O, Rouka E, Perlepe G, Gourgoulialis K, Lymberi P, Zarogiannis S. Measurement of Natural antibodies (NAbs) against actin, DNA and trinitrophenol in the fluid of pleural effusion patients with various etiologies. (2020) European Respiratory Journal 56:1137. doi: [10.1183/13993003.congress-2020.1137](https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2020.1137)
4. Ntoufa S, Gounari M, Papakonstantinou N, Binou D, Tyritidis I, Stivarou T, **Sarrigeorgiou I**, Iatrou A, Stavroyianni N, Anagnostopoulos A, Lymberi P, Stamatopoulos K. "Detailed Functional Characterization of Splenic Marginal Zone Lymphoma: Uncovering Links between the Epigenetic and the Signaling Machinery". Blood (2019) 134 (Supplement_1):1512. doi: [10.1182/blood-2019-127909](https://doi.org/10.1182/blood-2019-127909)

Παρουσιάσεις σε Διεθνή Επιστημονικά Συνέδρια

1. 3rd International and 12th National Animal Science Conference, 2021 "Development Of A Sensitive ELISA For The Quantification Of A Chicken Specific Troponin-T Peptide EPAPPPEEKPRIKLTAPKIPPE In Skeletal Muscle TCA Extracts". **Sarrigeorgiou I**, Stivarou T, Fotou E, Moulasioti V, Tellis C, Moussis V, Tsikaris V, Tsiouris V, Tsoukatos D, Lymberi P. Turkey, November 27-28, 2021.
2. 3rd International and 12th National Animal Science Conference, 2021. "Growth performance, antioxidant status, and organoleptic characteristics in conventional vs slow-growing broiler chicks" Moulasioti V, Fotou E, Tellis C, Kyriakou D, Papadami M, Patsias A, Moussis V, **Sarrigeorgiou I**, Lymberi P, Tsikaris V, Tsiouris V, Tsoukatos D. Turkey November 27-28, 2021.
3. 3rd International and 12th National Animal Science Conference, 2021 "Comparison of the antioxidant status of conventional and free-range poultry production systems in industrial-scale production". Fotou E, Moulasioti V, Tellis C, Kyriakou D, Papadami M, Patsias A, Moussis V, Boti M E, **Sarrigeorgiou I**, Lymberi P, Tsikaris V, Tsiouris V, Tsoukatos D. Turkey November 27-28, 2021.

4. Stivarou T, Papaioannou L, **Sarrigeorgiou I**, Avgoustakis K and Lymberi. International Conference on Advances in Cancer Science and Technology, (oral) "Use of Natural, Human Monoclonal IgGs Exhibiting Cell-penetrating Capacity as Anti-neoplastic Agents and as Intracellular Transporters of Gold Nanoparticles Loaded with Paclitaxel". Rome, Italy, October 18-19, 2021.

Παρουσιάσεις σε Εθνικά Επιστημονικά Συνέδρια

1. 11^ο Συνέδριο Helani. Γουσουάζης Β, **Σαρρηγεωργίου Ι**, Τσιφιντάρης Μ, Μάρκογλου Ν, Αναγνωστούλη Μ, Λυμπέρη Π, Γιαννακάκης Α, Probert L. "Concurrent COVID-19 Infection and Epstein-Barr Virus Reactivation at the First Clinical Episode in a Greek Cohort of Multiple Sclerosis Patients", Θεσσαλονίκη, 12-15 Δεκεμβρίου 2024. **Βραβείο καλύτερης προφορικής παρουσίασης.**
2. 29ο Ιατρικό Συνέδριο Ένοπλων Δυνάμεων. Τα επίπεδα των φυσικών αντισωμάτων πριν και μετά τη θεραπεία υποκατάστασης με ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη επηρεάζουν τον κλινικό φαινότυπο στην κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια. **Σαρρηγεωργίου Ι**, Τσιντή Γ, Καλαλά Φανή, Γερμενής Α, Σπελέτας Μ, Λυμπέρη Πηγή. Θεσσαλονίκη, 28/11-01/12 2024
3. 32^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, ΕΑΕ 2021. "Ορολογική Ανοσιακή Απόκριση μετά από Εμβολιασμό με το mRNA Εμβόλιο BNT162b2 για την COVID-19: Αποτελέσματα 6μηνου" Μοσχανδρέου Δ, **Σαρρηγεωργίου Ι**, Δημητριάδης Α, Λαζαρίδης Κ, Σωτηροπούλου Ε., Μπαλάφας Α, Σπηλιόπουλος Α, Κουτσοβασίλη Α., Ηλιάδης Π, Λαμπροπούλου Β, Μεντής Α, Μαμαλάκη Α, Γρουζή Ε, Λυμπέρη Π. Αθήνα, Νοέμβριος 12-14, 2021.
4. 28^ο Πανελλαδικό συνέδριο Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας. "Μέτρηση επιπέδων φυσικών αντισωμάτων έναντι Ακτίνης, DNA και Τρινιτροφαινόλης σε υπεζωκοτικό υγρό ασθενών με υπεζωκοτικές συλλογές ποικίλης αιτιολογίας". **Σαρρηγεωργίου Ι**, Κώτσιου Ο, Ρούκα Ε, Γουργουλιάνης Κ, Λυμπέρη Π, Ζαρογιάννης Σ. Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 2019.

Συμμετοχές σε Ερευνητικά Προγράμματα

1. ΕΣΠΑ 2014-2020: Δράση ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ, Κωδικός Έργου: Τ1ΕΔΚ-03939, Τίτλος Έργου: Πρωτοποριακοί Ιχνηλάτες ως Νέοι Δείκτες Ορισμού Συστημάτων «Ελεύθερης Βοσκής».
2. ΕΣΠΑ 2014-2020: Επιχειρησιακό Πρόγραμμα "Ήπειρος", Κωδικός Έργου: ΗΠ1ΑΒ-00178, Τίτλος Έργου: Ανάπτυξη Πρότυπης Μονάδα Βιομηχανικής Πτηνοτροφικής Εκτροφής.
3. Εθνικό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας: ΟΒΙ, Αριθμός: 1010640, «Εφευρέτης». Τίτλος Διπλώματος: Μέθοδοι διάκρισης-πιστοποίησης κοτόπουλων «Ελευθέρας Βοσκής» με τη χρήση ποσοτικών Βιοχημικών και Ανοσολογικών Δεικτών.

Συμμετοχή σε Εκπαιδευτικά Προγράμματα/ Σεμινάρια

- 2022: IUBMB/FEBS Advanced Course: «Molecular Targets for Anti-aging Interventions»
- 2022: Certificate in Laboratory Animal Science. Department of Animal Models for Biomedical Research, HPI

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής αποτελεί για μένα ένα σημαντικό ορόσημο, που δεν θα ήταν δυνατό χωρίς τη συμβολή πολλών ανθρώπων στους οποίους οφείλω ειλικρινείς ευχαριστίες.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον επιβλέποντά μου, καθηγητή Πνευμονολογίας και Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, ο οποίος υπήρξε υποδειγματικός στην καθοδήγηση του εγχειρήματός μου. Μου προσέφερε τη δυνατότητα να διευρύνω τις ερευνητικές μου αναζητήσεις στον τομέα της Πνευμονολογίας, στον οποίο η μελέτη των φυσικών αντισωμάτων αποτέλεσε για μένα μια ευχάριστη και γόνιμη διαδικασία, που ενίσχυσε το ενδιαφέρον μου για την έρευνα. Η άψογη διαχείριση των διδακτορικών φοιτητών και η συνέπεια στην πρόοδο και συνέχιση του έργου μας είναι χαρακτηριστικά που θαύμασα από την πρώτη στιγμή, και παρότι καθυστέρησα να ακολουθήσω... αποτέλεσαν για μένα καθοριστικά στοιχεία στη διαμόρφωσή μου.

Βαθύτατες ευχαριστίες στον καθηγητή Φυσιολογίας Σωτήρη Ζαρογιάννη γιατί με εμπιστεύτηκε και με ενεθάρρυνε να αναλάβω την εκπόνηση διατριβής στο τόσο ενδιαφέρον πεδίο της Πνευμονολογίας, ανοίγοντάς μου τον ορίζοντα της ενασχόλησης με την επιστημονική έρευνα, καθώς επίσης για την επιστημονική βοήθεια, τις συμβουλές και τις πολύτιμες παρατηρήσεις του. Η απλότητα, η ευθύτητα και παράλληλα η σοβαρότητα και ο επαγγελματισμός που τον χαρακτηρίζουν μας οδήγησαν σε όμορφες και ενδιαφέρουσες επιστημονικές αλλά

και φιλικές περιπτώσεις. Νιώθω τυχερός που οι συνθήκες το έφεραν ώστε αυτός ο άνθρωπος να βρεθεί στο σωστό σημείο, την κατάλληλη στιγμή, για να μου δώσει εκείνα τα “λίγα”, αλλά ξεχωριστά, που με βοήθησαν να κάνω το επόμενο βήμα.

Στην καθηγήτρια μου Δρ. Πηγή Λυμπέρη, που υπήρξε για μένα ένα από τα πιο απρόοπτα συμβάντα στη ζωή μου και που καθόρισε την όλη μου ερευνητική πορεία, νιώθω πως όσα λόγια και να γράψω δεν θα μπορέσω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και το ευχαριστώ. Όταν με δέχτηκε για την πτυχιακή μου εργασία, σε μια περίοδο όπου ήμουν χαμένος και αναζητούσα κάτι να με εμπνεύσει, ήταν το σημείο αφετηρίας για όσα ακολούθησαν. Σχεδόν μια δεκαετία μετά, έχουμε περάσει από όλες τις φάσεις. Η εμπιστοσύνη που έδειξε στις δυνατότητές μου, η επιστημονική καθοδήγηση, οι εύστοχες παρατηρήσεις και το αμείωτο ενδιαφέρον της για την πρόοδό μου αποτέλεσαν πηγή έμπνευσης και σταθερό σημείο αναφοράς. Αλλά και πέραν του επιστημονικού, όλα αυτά τα χρόνια αυτός ο άνθρωπος κατάφερε να λειτουργήσει πάνω μου όπως οι γονείς μου και με αυτόν τον ιδιαίτερο τρόπο με έκανε να ξεπεράσω τον εαυτό μου, τα όριά μου και όλα αυτά που θεωρούσα ακατόρθωτα και ήταν εκεί και στα καλά και στα άσχημα και κάπως “μαγικά” τα λύναμε όλα! Δεν υπάρχουν λόγια ούτε ευχαριστώ... Όπως επίσης και για την ευκαιρία που μου δόθηκε μέσα από εκείνη να γνωρίσω τον καθηγητή Στράτη Αβραμέα από τον οποίο αποκόμισα τόσο δυνατές σκέψεις και ιδέες που χαραχτήκαν στο μυαλό μου, αλλά και άλλους όπως ο καθηγητής Αναστάσιος Γερμενής που θαυμάζω και σέβομαι και είμαι ευτυχής που συναντήθηκαν οι δρόμοι μας.

Ευχαριστώ την καθηγήτρια Δρ. Ζ. Δανιήλ, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, την Επίκουρη Καθηγήτρια Έρη Ρούκα, τον Ρατζ, καθώς και όλους τους συναδέλφους και τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του ΠΘ για την πολύτιμη συνεργασία και τις όμορφες στιγμές. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του ΕΙΠ, αλλά και τα παιδιά που πέρασαν από εκεί όλα αυτά τα χρόνια, με τα οποία συναντήθηκαν οι δρόμοι μας. Μέσα από την καθημερινή επαφή, τις συζητήσεις, τις κοινές προσπάθειες αλλά και τις στιγμές αμφιβολίας ή κόπωσης, οικοδομήθηκε ένα κλίμα συνεργασίας, αλληλοσεβασμού και φιλίας, που εκτιμώ βαθύτατα. Η συμβολή όλων ήταν καθοριστική, όχι μόνο για την επιστημονική μου εξέλιξη, αλλά και για την ανθρώπινη αντοχή που απαιτείται σε ένα τόσο μακροχρόνιο εγχείρημα.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένειά μου. Τους γονείς μου, που μου έδωσαν τις βάσεις και τις αξίες για να συνεχίσω με πίστη και επιμονή παραμένοντας πάντα ο εαυτός μου που ανιδιοτελώς αποδέχονται. Αυτά τα αγαπημένα μου πρόσωπα και την αδερφή μου, που ήταν παρόντα ακόμα και όταν η απόσταση, ο χρόνος ή η πίεση της δουλειάς με απομάκρυναν. Η υπομονή, η κατανόηση, τα ενθαρρυντικά λόγια και, πάνω απ' όλα, η αγάπη τους, μου έδωσαν και μου δίνουν τη δύναμη να συνεχίσω. Χωρίς αυτά δεν θα ήμουν τίποτα από όσα είμαι σήμερα και είμαι περήφανος για την οικογένειά μου.

Σας ευχαριστώ θερμά που σταθήκατε δίπλα μου με υπομονή, συνέπεια και ειλικρίνεια, όχι μόνο ως επιστήμονες, αλλά και ως άνθρωποι. Σε όλους εσάς, αφιερώνω ένα μεγάλο μέρος αυτής της προσπάθειας.

Ιωάννης Σαρηγεωργίου

ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΑΡΗΓΕΩΡΓΙΟΥ - ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

~ 15 ~

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΦΑ: φυσικά αντισώματα

mAbs: μονοκλωνικά αντισώματα

Ig: ανοσοσφαιρίνη

BCR: υποδοχέας B κυττάρων

CDR: συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές

IVIg: ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη

ANCA: κυτταροπλασματικά αντιγόνα ουδετερόφιλων

SLE: συστηματικός ερυθματώδης λύκος

CA: καρβονική ανυδράση

TNP: τρινιτροφαινόλη

LPS: λιπο-πολυσακχαρίτης

ΥΣ (PE): υπεζωκοτική συλλογή (pleural effusion)

ΥΥ (PF): υπεζωκοτικό υγρό (pleural fluid)

S: Ορός (serum)

CHFPE: υπεζωκοτική συλλογή λόγω οξείας καρδιακής ανεπάρκειας

NIPE: μη λοιμώδεις υπεζωκοτική συλλογή

PPE: παραπνευμονική υπεζωκοτική συλλογή

MPE: κακοήθεις υπεζωκοτική συλλογή

ADA: αδενοσινοδεαμινάση

LDL: γαλακτική Δευδρογενάση

VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

**ΤΑ ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΕ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ
ΠΟΙΚΙΛΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ»**

ΙΩΑΝΝΗ ΣΑΡΡΗΓΕΩΡΓΙΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης (Επιβλέπων)** Καθηγητής Πνευμονολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **Ζωή Δανιήλ** Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
3. **Πηγή Λυμπέρη** Ερευνήτρια Α΄, Εργαστήριο Ανοσολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο
Παστέρ

Περίληψη

Η φυσική αυτοανοσία αποτελεί έναν φυσιολογικό μηχανισμό του ανοσιακού συστήματος κατά τον οποίο η αυτοαναγνώριση συντελεί στην ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης έναντι του ξένου καθώς και στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Οι κύριοι τελεστές της αυτοαναγνώρισης είναι τα Φυσικά Αντισώματα (ΦΑ), τα οποία παράγονται από διακριτούς υποπληθυσμούς Β λεμφοκυττάρων, όπως τα Β1-κύτταρα, που εδρεύουν κυρίως σε υδαρείς κοιλότητες, όπως το περιτόναιο και ο υπεζωκότας. Τα ΦΑ δεν αποτελούν προϊόν ανοσοποίησης και τα επίπεδά τους διατηρούνται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού μέσω της αυτοανανέωσης των Β1-κυττάρων. ΦΑ έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί και παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά: εμφανίζουν πολυδραστικότητα αναγνωρίζοντας συντηρημένες δομές (DNA, πρωτεΐνες και απτένια) και συχνά κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς με ελάχιστες ή καθόλου μεταλλάξεις. Ο βιολογικός ρόλος των ΦΑ φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την πολυδραστική φύση τους μέσω της οποίας αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με τις δομές που αναγνωρίζουν σχηματίζοντας ένα εκτενές και πολύπλοκο δίκτυο. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως τα επίπεδα των ΦΑ μεταβάλλονται με την πάροδο της ηλικίας αλλά και στην παθολογική κατάσταση. Πιο συγκεκριμένα, έχει φανεί πως τα επίπεδα των ΦΑ με προστατευτικό ρόλο είναι μειωμένα σε κάποιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, υποδηλώνοντας την σημασία της απουσίας τους στην εκδήλωση και εδραίωση της ασθένειας. Εστιάζοντας το ενδιαφέρον μας στις Υπεζωκοτικές Συλλογές (ΥΣ), παρόλο που η ύπαρξη των Β1-κυττάρων στον υπεζωκότα έχει

τεκμηριωθεί, η ανίχνευση και η μελέτη των ΦΑ παραμένει ελλιπής και περιορισμένη στη βιβλιογραφία. Η ανίχνευση ΦΑ ενδεχομένως να οδηγήσει σε συμπεράσματα σχετικά με τη διαφοροποίηση των επιπέδων τους στις ΥΣ διαφορετικής αιτιολογίας και στην ανάδειξη νέων βιοδεικτών.

Με βάση τα παραπάνω, στη παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τα επίπεδα των ΦΑ σε ΥΣ ποικίλης αιτιολογίας με σκοπό την ανίχνευσή τους στις ΥΣ και σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα του ορού ανα ασθενή και μεταξύ των ομάδων ασθενών. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν 63 ασθενείς με ΥΣ (7 διιδρωματικές και 56 εξιδρωματικές ΥΣ) καθώς και των αντίστοιχων ορών από τους ασθενείς, ως προς την παρουσία ΦΑ τάξεων IgM, IgG, IgA, έναντι ενός αριθμού συντηρημένων αντιγόνων του εαυτού (DNA, ακτίνη, καρβονική ανυδράση, κ.α.) και του ξένου (όπως το απτένιο Τρινιτροφαινόλη, TNP), με ELISA. Ο λόγος των επιπέδων των ΦΑ του ορού προς αυτά στις ΥΣ αξιολογήθηκε με κατάλληλη στατιστική ανάλυση ανά ομάδα ελέγχου και μεταξύ των ομάδων. Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή παρέχει σημαντική επιστημονική γνώση τόσο σε επίπεδο βασικής έρευνας στο τομέα της φυσικής αυτοανοσίας όσο και σε επίπεδο εφαρμοσμένης κλινικής έρευνας στο εν λόγω πεδίο. Η προσπάθεια ανεύρεσης ικανοποιητικών βιοδεικτών για την διαφοροποίηση της αιτιολογίας των ΥΣ αποτελεί πεδίο εντατικής έρευνας στην πνευμονολογία τα τελευταία χρόνια, ενώ η μελέτη των ΦΑ στις ΥΣ είναι ελλιπής και κρίνεται αναγκαία για τη κατανόηση της ανοσιακής λειτουργίας στον υπεζωκότα.

Γενικό Μέρος

1. Φυσική Αυτοανοσία και Φυσικά Αντισώματα

1.1 Φυσική Αυτοανοσία και η ανακάλυψη των Φυσικών Αντισωμάτων

Από το 1900 ήταν γνωστό ότι το σώμα διαθέτει αμυντικό σύστημα βασισμένο στην παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών. Ο Καρλ Λαντστάινερ (Karl Landsteiner) εισήγαγε το 1901 τον όρο "αντισώματα", ενώ το 1926 οι Λόιντ Φέλτον (Lloyd D. Felton) και Τζ. Χ. Μπέιλι (G. H. Bailey) απέδειξαν ότι αυτά είναι πρωτεΐνες. Το 1934, ο Τζον Ρ. Μάρακ (John R. Marrack) εξήγησε την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος μέσω της θεωρίας της δικτύωσης, η οποία ανέφερε ότι, τόσο το αντιγόνο όσο και το αντίσωμα έχουν περισσότερες από μία θέσεις δέσμευσης, ώστε ένα μόριο αντισώματος να μπορεί να δεσμευτεί σε περισσότερα από ένα μόρια αντιγόνου και το αντίστροφο.¹ Το 1955, ο Νιλς Γερν (Niels Jerne) διατύπωσε τη "θεωρία της φυσικής επιλογής", ενώ το 1974 παρουσίασε τη "θεωρία του Δικτύου" (Νόμπελ 1984), περιγράφοντας την ιδιοτυπική-αντι-ιδιοτυπική αλληλεπίδραση ως μηχανισμό αυτορρύθμισης του ανοσιακού συστήματος.^{2,3} Το 1959-61, οι Ρόννι Πόρτερ (Rodney R. Porter) και Τζέραλντ Έντελμαν (Gerald Edelman) διευκρίνισαν τη δομή των αντισωμάτων.^{4,5} Το 1957, ο Φρανκ ΜακΦάρλεϊν Μπέρνιτ (Frank MacFarlane Burnet) διατύπωσε τη "θεωρία της κλωνικής επιλογής", προτείνοντας ότι η αποτυχία της ανοσολογικής ανοχής οδηγεί σε αυτοάνοσα νοσήματα.⁶ Η θεωρία αυτή, επηρεασμένη από τον Πόλ Έρλιχ (Paul Ehrlich) και το "Horror autotoxicus", στιγμάτισε για χρόνια την ανοσολογία.

Το 1977, η ομάδα του Στράτη Αβραμέα (Stratis Avrameas) ανακάλυψε αντισώματα με φυσική αυτο-αντιδραστικότητα χωρίς προηγούμενη ανοσοποίηση. Το 1981 απομονώθηκαν IgG, IgM και IgA φυσικά αντισώματα (ΦΑ) από ανθρώπινο ορό, αναγνωρίζοντας αυτοαντιγόνα όπως η τουμπουλίνη, η ακτίνη, η θυρεοσφαιρίνη και το κολλαγόνο.⁷ Πειράματα σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες έδειξαν ότι κάποιες μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες είναι ΦΑ.⁸ Το 1982, ο Στρατής Αβραμέας πρότεινε ότι τα ΦΑ δημιουργούν ένα εκτεταμένο δίκτυο συμβάλλοντας στην ομοιόσταση.⁹ Το 1982, ο Χ. Ο. Λουτς (H. U. Lutz) αναγνώρισε ΦΑ κατά της σπεκτρίνης, ενώ το 1988-89 ο Α. Λ. Νότκινς (A. L.

Notkins) χαρακτήρισε τα Β λεμφοκύτταρα (CD5+ Β-κύτταρα) που εκκρίνουν ΦΑ.^{10,11} Το 1989, ο Τσαρλς Τζάνεγουεϊ (Charles Janeway) πρότεινε τη θεωρία της φυσικής ανοσίας, συνδέοντάς την με την επίκτητη ανοσιακή απόκριση. Το 1991, ο Αβραμέας διατύπωσε τη θεωρία "γνώθι σαυτό", σύμφωνα με την οποία η αναγνώριση του "εαυτού" προηγείται της ανοσολογικής απόκρισης στο "ξένο".¹² Έτσι, η παρουσία των ΦΑ στον ορό υγιών οργανισμών καθιερώθηκε και προσδιορίστηκαν τα κύρια χαρακτηριστικά τους, όπως η πολυδραστικότητα, δηλαδή η ικανότητά τους να αλληλοεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία μορίων, δομών και αλληλουχιών. Εκτός από τον ορό υγιών ατόμων, η παρουσία φυσικών αντισωμάτων στον ορό ασθενών δείχθηκε επίσης.¹³

Μέχρι σήμερα, η παρουσία αυτοαντιδραστικών Β λεμφοκυττάρων στον ορό υγιών ανθρώπων και ζώων έχει περιγραφεί καλά και μελετηθεί σε βάθος. Τα IgM αντισώματα ανιχνεύονται σε όλα τα ζώα, από ασπόνδυλα έως σπονδυλωτά, υποδεικνύοντας ότι είναι ο αρχαιότερος ισότυπος ΦΑ. Στα ανώτερα θηλαστικά υπάρχουν επίσης IgG, IgA και IgE ΦΑ.¹⁴ Για πολλά χρόνια, οι επιστήμονες πίστευαν ότι η παραγωγή ΦΑ ήταν κυρίως αποτέλεσμα διασταυρούμενων αντιδράσεων με εξωγενή, περιβαλλοντικά αντιγόνα, ή από μη ειδικούς μηχανισμούς που συνοδεύουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Σήμερα υπάρχουν αποδείξεις ότι η αναγνώριση των αυτοαντιγόνων και η παραγωγή αντισωμάτων εναντίον τους αποτελεί μέρος της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσιακού συστήματος.¹⁵ Μελέτες έδειξαν ότι πάνω από το 60% των IgM στον άνθρωπο είναι πολυδραστικά. Συγκριτικές αναλύσεις σε καρχαρίες και ανθρώπους αποκάλυψαν ότι, παρά τα 450 εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης, τα αντιγόνα αναγνωρίζονται με τις ίδιες αρχές, διατηρώντας τη ρύθμιση της ανοσιακής απόκρισης και την ομοιόσταση του οργανισμού.¹⁶ Αυτός ο συνδυαστικός χαρακτήρας έχει προσφέρει στο ανοσιακό σύστημα των σπονδυλωτών ένα πλήρες ρεπερτόριο αναγνώρισης και την ικανότητα να αλλάζει για να προσαρμόζεται, να ρυθμίζει και να αντιμετωπίζει μια ποικιλία μικροβιακών εισβολέων, καθώς και να εξασφαλίζει την ομοιόσταση του οργανισμού. Η

συνύπαρξη έμφυτης και επίκτητης ανοσιακής απόκρισης οδήγησε σε ένα εμφανές πλεονέκτημα για την άμυνα του σώματος ενάντια στις λοιμώξεις.

1.2 Χαρακτηριστικά των ΦΑ

Η παραγωγή των ΦΑ αρχίζει νωρίς κατά την οντογένεση χωρίς προηγούμενη εξωτερική αντιγονική διέγερση γεγονός που αποδείχθηκε από την παρουσία τους σε νεογνή ποντικούς και σε ποντικούς που αναπαρήχθησαν υπό στείρες συνθήκες περιβάλλοντος και τροφής.¹⁷ Τα ΦΑ αναγνωρίζουν πολλαπλά αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων αυτοαντιγόνων και ξένων αντιγόνων, όπως πρωτεΐνες (π.χ., κυτταροσκελετός), νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), φωσφολιπίδια, πολυσακχαρίτες και απτένια (π.χ., TNP-τρινιτροφαινόλη), μέσω τρισδιάστατων δομών ή φορτίου, παρά μέσω γραμμικών επιτόπων.¹⁸ Όλα τα αντιγόνα φέρουν συντηρημένες δομές ενώ το ρεπερτόριο και το πρότυπο δραστηριότητας των ΦΑ παραμένει εξαιρετικά σταθερό τόσο εντός του ίδιου είδους όσο και μεταξύ των ειδών, ως αποτέλεσμα της εξελικτικής διατήρησής τους αλλά και του δομικού τους ρόλου στην φυσιολογική λειτουργία του ανοσιακού συστήματος.¹⁹ Αρχικά, απομονώθηκαν από ανθρώπινο ορό χρησιμοποιώντας εννέα αντιγονικούς ανοσοπροσροφητές, με κάποια αντισώματα να παρουσιάζουν πολυδραστικότητα και άλλα εξειδίκευση.⁹ Αναγνωρίζουν αντιγόνα ενδοκυτταρικά, στην επιφάνεια των κυττάρων, καθώς και κυκλοφορούντα μακρομόρια, τα οποία χαρακτηρίζονται από φυλογενετική σταθερότητα.^{20,21,22,23}

Τα ΦΑ ανήκουν σε όλες τις τάξεις των ανοσοσφαιρινών, ανευρίσκονται στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά, ενώ στον άνθρωπο, στον ποντικό και στον αρουραίο, είναι κατά κύριο λόγο IgM (70-80% των ΦΑ στην κυκλοφορία) που κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς με ελάχιστες ή καθόλου μεταλλάξεις ενώ, υπάρχουν πολλές αναφορές για IgG, IgA και IgE-ΦΑ με επιπλέον μεταλλάξεις και πιο εξειδικευμένες ειδικότητες.²⁴ Η πολυδραστικότητα των ΦΑ και η αυθόρμητη έκκρισή τους αποτελούν τις βασικές τους διαφορές σε σχέση με τα επαγόμενα αντισώματα τα οποία αποτελούν προϊόντα υπερανοσοποίησης με ένα αντιγόνο.²⁵ Η βιβλιογραφία περιέχει αντικρουόμενες πληροφορίες για τα γονίδια που κωδικοποιούν τα πολυδραστικά αντισώματα

(ΦΑ) και την αιτιολογία της πολυδραστικότητάς τους.²⁶ Η τάξη της βαριάς αλυσίδας επηρεάζει την ειδικότητα και τη συνάφεια.²⁷ Τα IgM πολυδραστικά ΦΑ κωδικοποιούνται από γονίδια με ελάχιστες μεταλλάξεις, ενώ τα IgG και IgA εμφανίζουν μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία. Επιπλέον, η CDR3-VH συμβάλλει στην πολυδραστικότητα, καθώς πολυδραστικά ΦΑ έχουν μεγαλύτερες, ευέλικτες CDR-H3 περιοχές με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση με αρνητικά φορτισμένα αντιγόνα. Στα μονοκλωνικά ΦΑ εκφράζονται κυρίως τα γονίδια VH3 και VH4, με τα DP47 και DP49 της οικογένειας VH3 να αποτελούν πάνω από το 70% των VH γονιδίων.^{28,29} Τα ΦΑ που αναγνωρίζουν ερυθρά αιμοσφαίρια χρησιμοποιούν VH11, VH12 και Q52, ενώ όσα στοχεύουν φωσφατιδυλοχολίνη VH11 και VH12.^{30,31} Ο περιορισμός αυτός ισχύει και για τα VL γονίδια, με ομοιότητα 97,2%-100% με τη βλαστική σειρά.¹⁴ Τα μονοειδικά αντισώματα εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα μεταλλάξεων στη VH-CDR περιοχή.^{32,33,34,35} Τέλος, τα B-1α κύτταρα συσσωρεύουν μεταλλάξεις με την ηλικία.³⁶

Η πολυδραστικότητα των ΦΑ συνδέεται με τη δομή της μεταβλητής περιοχής τους, που μπορεί να τροποποιηθεί μέσω φυσικοχημικών επεξεργασιών. Συνεπώς, η πολυδραστικότητα φαίνεται να εξαρτάται από τη συνολική δομή και τα χαρακτηριστικά της μεταβλητής περιοχής του αντισώματος.³⁷ Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί για να εξηγήσουν το φαινόμενο της πολυδραστικότητας των ΦΑ:³⁸ 1) η ελαστικότητα-πλαστικότητα του παρατόπου, όπου η περιοχή σύνδεσης του αντιγόνου αλλάζει διαμόρφωση για να αναγνωρίσει διαφορετικά αντιγόνα. Κρυσταλλογραφικές μελέτες δείχνουν ότι τα πολυδραστικά ΦΑ έχουν μεγαλύτερη δομική προσαρμοστικότητα και είναι πιο ευαίσθητα σε θερμοκρασία και αποδιατακτικούς παράγοντες. 2) Πολλαπλές περιοχές σύνδεσης, όπου ο παράτοπος έχει διαφορετικές περιοχές για διαφορετικούς επίτοπους και αν το ΦΑ καταληφθεί πλήρως από ένα αντιγόνο, μπορεί να λειτουργήσει ως μονοειδικό αντίσωμα. 3) «Δημόσιοι επίτοποι» (*public epitopes*), όπου πολυδραστικά ΦΑ αναγνωρίζουν επίτοπους με χαρακτηριστικά όπως κατάλοιπα προλίνης και 4) Μοριακή μίμηση, όπου δομικά παρόμοια αντιγόνα (π.χ. πρωτεΐνη M

στρεπτόκοκκου, μυοσίνη, οι α-ελικοειδείς πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες) αναγνωρίζονται από το ίδιο αντίσωμα. Αυτή η υπόθεση αναφέρεται σε λιγότερο ευέλικτες και πιο συγκεκριμένες περιοχές της μεταβλητής περιοχής του αντισώματος.

Τέλος, η γλυκοζυλίωση στην περιοχή δέσμευσης αντιγόνου είναι αυξημένη στα πολυδραστικά μονοκλωνικά αντισώματα, επηρεάζοντας τη στόχευση και συμβάλλοντας στη μεταβλητότητα της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.³⁹ Αυτό μπορεί να αποτελεί εναλλακτική εξήγηση για τον υψηλότερο βαθμό μεταβλητότητας στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος που παρατηρείται στα πολυδραστικά αντισώματα σε σύγκριση με τα μονοδραστικά.⁴⁰

Η πολυδραστικότητα, σε συνδυασμό με την αυτοδραστικότητα, συνεισφέρει στην αναγνώριση ενός άπειρου αριθμού από εαυτά και ξένα αντιγόνα, μια θεμελιώδης ιδιότητα για την ενεργειακά οικονομική λειτουργία του ανοσιακού συστήματος. Η διαταραχή των επιπέδων των ΦΑ, κυρίως η μείωση των IgM-ΦΑ, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων όσο και σε μειωμένη προστασία από λοιμώξεις και προκαρκινικές αλλοιώσεις.⁴¹

Η αυτοδραστικότητα στο αίμα του ομφάλιου λώρου αντανακλά το φυσικό ρεπερτόριο αυτοανοσίας, το οποίο εξελίσσεται κατά την ανάπτυξη. Μελέτες σε IgM και IgG αυτοαντισώματα μητέρων και νεογνών έδειξαν υψηλή συσχέτιση IgG μεταξύ μητέρας-παιδιού, ενώ το ρεπερτόριο των IgM στα νεογνά ήταν πιο καθολικό αλλά διέφερε από των μητέρων τους. Έτσι, το φυσικό ρεπερτόριο αυτοδραστικότητας στον άνθρωπο δείχνει σχετικά μικρή οργάνωση κατά τη γέννηση, αλλά, έως την πρώιμη ενήλικη ζωή, διαμορφώνεται μέσω διακριτών δραστηριοτήτων σχετιζόμενων με τα περιβαλλοντικά αντιγόνα στα οποία εκτέθηκε ο οργανισμός.⁴²

1.3 Κύτταρα που παράγουν ΦΑ

Η παραγωγή των ΦΑ γίνεται από συγκεκριμένες υποομάδες B-κυττάρων που έχουν χαρακτηριστεί μεν, ωστόσο το φαινόμενο δεν είναι πλήρως ξεκάθαρο. Συνολικά, φαίνεται ότι τα ΦΑ, ανάλογα με τον ισότυπο στον οποίο ανήκουν, μπορεί να προέρχονται από διαφορετικές υποομάδες B-λεμφοκυττάρων.⁴³ Η

ομάδα του Notkins, αναλύοντας τα Β λεμφοκύτταρα που φέρουν πολυδραστικούς υποδοχείς-πολυδραστικά αντισώματα, έδειξε ότι αυτά τα κύτταρα είναι ευρέως διανεμημένα σε διάφορους λεμφικούς ιστούς, όπως τις πλάκες του Peyer, το χόριο του εντέρου, στη ζώνη του σπλήνα (περιθωριακή ζώνη) και τον θύμο αδένα.⁴⁴ Αν και τα κύτταρα που εκκρίνουν ΦΑ δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, η πλειοψηφία των επιστημόνων φαίνεται να συγκλίνει σε τρεις κύριες υποπληθυσμούς: (1) τα Β1 λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι τα πιο μελετημένα, φέρουν επιφανειακά CD5+ και εκκρίνουν κυρίως IgM ΦΑ, (2) τα Β2 λεμφοκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται επιφανειακά ως CD5-, B220+ και εκκρίνουν κυρίως IgG και συχνά IgA ΦΑ, και (3) τα ΜΖ-Β λεμφοκύτταρα (Marginal zone B-cells), τα οποία χαρακτηρίζονται επιφανειακά ως επιφανειακά CD5-, B220+, CD21+, και όπως τα Β1 λεμφοκύτταρα, εκκρίνουν IgM ΦΑ.⁴⁵ Οι διαφορετικές υποομάδες αυτών των Β λεμφοκυττάρων διαφέρουν όσον αφορά το σημείο/όργανο προέλευσης, την ωρίμανση, τον εντοπισμό τους σε συγκεκριμένα σημεία του οργανισμού, την ικανότητα μετανάστευσης και την εξάρτηση από τα Τ κύτταρα για την ενεργοποίησή τους. Έχει προταθεί ότι και οι τρεις υποομάδες μπορούν να προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών και στη συνέχεια να μετακινούνται στον σπλήνα για διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, οι υποομάδες ΜΖ-Β και Β-1 προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του εμβρυϊκού ήπατος και μετακινούνται στον σπλήνα για περαιτέρω επεξεργασία. Τα Β-1 λεμφοκύτταρα εντοπίζονται κυρίως στην περιτοναϊκή και υπεζωκοτική κοιλότητα, τα συμβατικά Β-2 λεμφοκύτταρα βρίσκονται στην κυκλοφορία, στα θυλάκια των λεμφαδένων και στη περιθωριακή ζώνη του σπλήνα, ενώ τα ΜΖ-Β λεμφοκύτταρα είναι εγκατεστημένα στην περιθωριακή ζώνη του σπλήνα. Τα Β1 κύτταρα διαφέρουν από τα Β2 λεμφοκύτταρα ως προς την ικανότητά τους για αυθόρμητη παραγωγή αντισωμάτων, την αδυναμία αυτοανανέωσης για κλωνική επέκταση και τη χαμηλή σωματική υπερμετάλλαξη.⁴⁶

1.3.1 Β-1 λεμφοκύτταρα

Η πλειονότητα των γνώσεων για την υποομάδα Β-1 λεμφοκυττάρων προέρχεται από μελέτες σε ποντίκια, και αντιπροσωπεύουν το 5% όλων των Β

λεμφοκυττάρων. Μια ποικιλία επιφανειακών δεικτών αντιστοιχεί στο φαινότυπο B-1, IgM^{hi}, IgD^{lo}, B220^{lo}, Mac-1^{hi}, CD23^{lo}, με τον πιο χαρακτηριστικό να είναι το CD5⁺ (Ly-1).⁴⁷ Ένα υψηλό ποσοστό κυττάρων που εκκρίνουν ΦΑ εκφράζει τους επιφανειακούς δείκτες των B-1 και παράγει κυρίως IgM ΦΑ χωρίς εξωτερική διέγερση. Αυτά τα αντισώματα παράγονται από περιορισμένο ανασυνδυασμό των γονιδίων V, D, J (Variable, Diversity, Joining).⁴⁸ Τα B-1 λεμφοκύτταρα παράγονται νωρίς στην ανάπτυξη από πρόδρομα εμβρυϊκά ηπατικά κύτταρα και επομένως πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από τα T κύτταρα. Η έκφραση του ρυθμιστικού μορίου CD5 αποτρέπει την ενεργοποίηση των αυτοαντιδραστικών B-1 κυττάρων από αδύναμα ερεθίσματα, αυξάνοντας έτσι το όριο ενεργοποίησής τους. Οι υποδοχείς Toll-like διέπουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των ιντεγκρινών, των τετρασπανινών και των υποδοχέων χημειοκινών που απαιτούνται για τη μετανάστευση των B-1 κυττάρων.⁴⁹

1.3.2 B-2 λεμφοκύτταρα

Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια που παράγουν πολυδραστικά ΦΑ κωδικοποιημένα από γονίδια της γενετικής γραμμής (VH, V_H1) έδειξαν ότι τα B κύτταρα υπεύθυνα για την παραγωγή τους ήταν CD5⁻ και συνεπώς διέφεραν από τα γνωστά B-1 (CD43⁻, sIgD⁺ και CD23^{hi} CD69⁻, B7.2^{hi}, CD79b^{lo}). Βρέθηκαν στα θυλάκια του σπλήνα και των λεμφαδένων και μερικά από αυτά κυκλοφορούσαν στο περιφερικό αίμα.⁵⁰ Ανεξάρτητα από την αυτοαντιδραστικότητα αυτών των κυττάρων, πέρασαν από θετική επιλογή στο μυελό των οστών και βρέθηκαν σε μεγάλους αριθμούς στους λεμφαδένες στην περιφέρεια.

Τα B-2 κύτταρα παράγουν IgM, IgG ή IgA ΦΑ (τα πιο ανανεώσιμα B λεμφοκύτταρα) και παράγονται από πρόδρομα λεμφικά κύτταρα στον μυελό των οστών κατά τη διάρκεια της ζωής και απαιτούν τη συνεισφορά των T λεμφοκυττάρων για κλωνική επέκταση και μετάβαση από IgM σε κατηγορία IgG ή IgA.⁵¹ Μετά την ανάπτυξή τους στον μυελό των οστών, αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν ως ανώριμα B λεμφοκύτταρα στους λεμφαδένες. Έως και το 75% των πρώιμων ανώριμων B λεμφοκυττάρων στον μυελό των οστών παράγουν αυτοαντιδραστικά αντισώματα και επομένως

υφίστανται αυστηρούς ελέγχους - μηχανισμούς ανοχής. Η ενεργοποίηση των B κυττάρων οδηγεί σε κλωνική επέκταση και εξαρτάται επίσης από τα T λεμφοκύτταρα. Υπάρχουν επίσης αναφορές για B-2 κύτταρα που βρίσκονται στην περιθωριακή ζώνη (MZ) του σπλήνα χωρίς να ανήκουν στα MZ-B κύτταρα.

1.3.3 MZ-B λεμφοκύτταρα

Αυτή η υποομάδα B λεμφοκυττάρων βρίσκεται στην οριακή ζώνη του σπλήνα. Παρόμοια με τα B-1 λεμφοκύτταρα, τα MZ-B λεμφοκύτταρα είναι κύτταρα της έμφυτης ανοσίας και έχουν επομένως σχετικά περιορισμένο ρεπερτόριο και περιορισμένη ικανότητα παραγωγής IgM αντισωμάτων. Τα MZ-B λεμφοκύτταρα, λόγω του εντοπισμού τους στον σπλήνα, είναι ιδανικοί αγωνιστές ενάντια στα αντιγόνα που μεταφέρονται μέσω του αίματος, αλλά αναγνωρίζουν επίσης αυτοαντιγόνα και μπορούν να ενεργοποιηθούν πολύ γρήγορα, ανεξάρτητα από τη βοήθεια που παρέχεται από τα T λεμφοκύτταρα.⁵² Έχουν επίσης εμπλακεί στην εξαρτώμενη από τα T κύτταρα ανοσία μέσω παρουσίασης αντιγόνων στα θυλακοειδή B και T λεμφοκύτταρα.⁵³ Για να διαφοροποιηθούν, τα MZ-B λεμφοκύτταρα χρειάζονται την αλληλεπίδραση του BCR με το σήμα Notch2. Επιπλέον, τα MZ-B λεμφοκύτταρα μπορούν επίσης να αποτελέσουν μια σημαντική πηγή παραγωγής ΦΑ, καθώς τα B λεμφοκύτταρα με χαμηλή αυτοαντιδραστικότητα ή αντιβακτηριακή δραστηριότητα βρίσκονται κυρίως στην περιθωριακή ζώνη.⁵⁴

Αν και αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την παραγωγή ΦΑ από πολλές υποομάδες B κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των B-1 και B-2, τα ΦΑ έχουν αποδειχθεί ότι παράγονται κυρίως από τα B-1 CD5⁺ κύτταρα, ενώ τα κύρια IgG και IgA αντισώματα παράγονται από τα B-2 κύτταρα - τα οποία έχουν την ικανότητα ανασυνδυασμού των γονιδίων - ενώ υπάρχουν επίσης αναφορές για IgE.^{18,20,22} Το αν τα B-κύτταρα που παράγουν ΦΑ είναι η πηγή των παθολογικών αντισωμάτων που παράγονται μετά από ωρίμανση της συγγένειας μέσω ενός αντιγόνου, παραμένει αναπάντητο. Σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα, έχει αποδειχθεί ότι οι μολυσματικοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε ειδική ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν ΦΑ. Επιπλέον, σε χρόνιες

λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες έχουν περιγραφεί πολυδραστικές μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες που δεν φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια που τις κωδικοποιούν. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα παθολογικά αντισώματα δεν προκύπτουν από προϋπάρχοντα αυτοαντιδραστικά αντισώματα αλλά μάλλον μετά από μια διαδικασία επαγωγής αντιγόνου μέσω σωματικών υπερμεταλλάξεων στην μεταβλητή περιοχή τους. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία.

1.4 Βιολογικός ρόλος των ΦΑ

Το έμφυτο ανοσιακό σύστημα αναγνωρίζει δομές που εκφράζονται από διάφορους μικροοργανισμούς και αποτελούν τα μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs). Οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRR) είναι μια ομάδα διαλυτών και κυτταρικών συστατικών της έμφυτης ανοσίας που είναι ικανοί να αναγνωρίζουν τα PAMPs. Το έμφυτο ανοσιακό σύστημα αναγνωρίζει επίσης μόρια από κατεστραμμένα και νεκρά κύτταρα, που ονομάζονται μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με βλάβες (DAMPs). Τα αποπτωτικά κύτταρα περιέχουν οξειδωμένα λιπίδια και πρωτεΐνες, που αναγνωρίζονται ως DAMPs από τα φυσικά αντισώματα IgM.⁵⁵ Η πολυδραστικότητα, στενά συνδεδεμένη με την αυτοαντιδραστικότητα, είναι μια ιδιαίτερα διατηρημένη ιδιότητα του ανοσιακού συστήματος κατά την εξέλιξη. Οι T κυτταρικοί υποδοχείς είναι γνωστό ότι μπορούν να αναγνωρίσουν περισσότερα από 1 εκατομμύριο διαφορετικά πεπτίδια. Οι πολυαντιδραστικοί B υποδοχείς στα κύτταρα και τα αντισώματα που εκκρίνονται από αυτά συμμετέχουν σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις κυρίως με ενδογενείς αλλά και με εξωγενείς παράγοντες. Αυτό δημιουργεί ένα δυναμικό δίκτυο που εξασφαλίζει την ομοιόσταση του ανοσιακού συστήματος και επομένως, συνεισφέρει στην ομοιόσταση ολόκληρου του οργανισμού. Η συμμετοχή των ΦΑ στην ομοιόσταση του οργανισμού υποδηλώνει τη συμμετοχή τους σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα φαίνεται ότι ο κύριος ρόλος τους είναι να απομακρύνουν μεταβολικά υποπροϊόντα, να δρουν ενάντια σε λοιμώξεις παθογόνων ως πρώτη γραμμή άμυνας, και να συμμετέχουν

στην ανοσορρύθμιση, στην ομοιόσταση, στην επιλογή του ρεπερτορίου και στη μεταφορά και λειτουργική διαφοροποίηση βιομορίων.⁵⁶

1.4.1 Απομάκρυνση προϊόντων καταβολισμού

Μία από τις εξειδικευμένες ικανότητες των ΦΑ είναι η απομάκρυνση των καταβολικών προϊόντων, των γηρασμένων κυττάρων και των κυτταρικών υπολειμμάτων, ρόλος που προτάθηκε από τον Pierre Grabar το 1975.⁵⁷ Αντί να είναι απλώς μηχανισμός άμυνας, το ανοσοποιητικό σύστημα λειτουργεί ως ρυθμιστής μεταβολικών και καταβολικών ουσιών. Σε περιπτώσεις μαζικής καταστροφής ιστών, τα αυτολυτικά ένζυμα μπορεί να ανασταλούν από την υπερβολική ποσότητα υποστρωμάτων, οδηγώντας στην ενεργοποίηση κυττάρων που παράγουν αυτοαντισώματα για να διευκολύνουν τη φαγοκυττάρωση. Ο ίδιος μηχανισμός ισχύει και για ξένες ουσίες που δεν διασπώνται από τα ένζυμα.⁵⁸

Τα ΦΑ συμμετέχουν στην απομάκρυνση μη λειτουργικών πρωτεϊνών πλάσματος, όπως αλλοιωμένες μορφές αλβουμίνης και πρώιμα αμυλοειδή, συμβάλλοντας πιθανώς σε παθήσεις όπως το Αλτσχάιμερ.^{9,59} Επιπλέον, εμπλέκονται στην απομάκρυνση γηρασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω της αναγνώρισης συμπλεγμάτων Ζώνης 3, ενεργοποιώντας το συμπλήρωμα και προκαλώντας φαγοκυττάρωση.⁶⁰ Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης στην προστασία από την αθηροσκλήρωση, καθώς IgM ΦΑ δεσμεύουν οξειδωμένους επίτοπους, αποτρέποντας την εναπόθεση της LDL στις αθηρωματικές πλάκες.⁶¹

Η απομάκρυνση καταβολικών προϊόντων πρέπει να είναι αποτελεσματική ώστε να αποτρέπεται η παρουσίαση εσωτερικών κυτταρικών στοιχείων στο ανοσιακό σύστημα. Τα IgM ΦΑ, λόγω της πολυμερούς φύσης τους, έχουν 1000 φορές ισχυρότερη σύνδεση με το συμπλήρωμα από τα IgG, προσελκύοντας μακροφάγα μέσω της ενεργοποίησης του C1q. Για παράδειγμα, τα IgM ΦΑ που συνδέονται σε αποπτωτικά κερατινοκύτταρα ενεργοποιούν το συμπλήρωμα μέσω οφονοποίησης εξωκυττάρων ινών κερατίνης.⁶² Η πρόσληψη αποπτωτικών κυττάρων από μακροφάγα μειώνεται 3-4 φορές απουσία των IgM ΦΑ, δείχνοντας τον κρίσιμο ρόλο τους στη διαδικασία.⁶³ Παράλληλα, τα αποπτωτικά κύτταρα

μπορούν να αναγνωριστούν και από τη λεκτίνη που δεσμεύει τη μαννόζη (MBL), η οποία συνδέεται με τα φυσικά IgM μέσω N-γλυκανών.⁶⁴

1.4.2 Δράση έναντι παθογόνων παραγόντων

Τα πολυδραστικά φυσικά αντισώματα (ΦΑ) συμβάλλουν στην απομάκρυνση βακτηρίων και ιών, διευκολύνοντας τη στόχευση, επεξεργασία και παρουσίασή τους στα μακροφάγα.⁶⁵ Η διασταυρούμενη αντίδρασή τους με ξένα αντιγόνα τα καθιστά κρίσιμα στην έμφυτη άμυνα του ξενιστή, προστατεύοντας τους ιστούς και επιταχύνοντας την ανοσιακή απόκριση.⁵⁷ Μετά την είσοδο λοιμογόνων παραγόντων, το δίκτυο των ΦΑ αναπροσαρμόζεται, καθώς αυτά δεσμεύουν «δημόσιους επίτοπους» με υψηλή συνάφεια, ενεργοποιώντας κυρίως τα Β-κύτταρα που φέρουν IgM ΦΑ, επιτρέποντας τη φαγοκυττάρωση και την απομάκρυνση παθογόνων μέσω του συμπληρώματος.^{24,63,66}

Ο κύριος μηχανισμός δράσης των ΦΑ είναι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, αν και αναφέρονται και μηχανισμοί ανεξάρτητοι από αυτό. Μελέτες σε ποντίκια που δεν εκκρίνουν IgM έδειξαν αυξημένη ευαλωτότητα σε λοιμώξεις. Σε περίπτωση παρατεταμένης λοίμωξης, τα πολυδραστικά ΦΑ υφίστανται σωματικές μεταλλάξεις, αυξάνοντας την ειδικότητα της ανοσιακής απόκρισης.⁶⁶ Αυτός ο μηχανισμός παρατηρείται και σε ψάρια που διαθέτουν μία μόνο τάξη ανοσοσφαιρινών. Τα ΦΑ επιταχύνουν την ανοσιακή απόκριση έναντι ιών όπως VSV, γρίπη και βακτηρίων όπως *Listeria*, ενώ σε μεταλλαγμένα ποντίκια χωρίς IgM, οι λοιμώξεις προχωρούσαν περισσότερο ή καθυστέρουσε η ανοσιακή αντίδραση.⁶⁷

Πέρα από το συμπλήρωμα, τα IgM ΦΑ προστατεύουν μέσω δέσμευσης στην επιφάνεια μολυσμένων κυττάρων, ρυθμίζοντας την έκκριση ιντερφερόνης. Πολυκλωνικά ΦΑ προστατεύουν ινοβλάστες από ροταϊούς και βιρναϊούς. Στον δάγκειο πυρετό, τα IgG ΦΑ περιορίζουν τον ιό και ενεργοποιούν το συμπλήρωμα μέσω C1q. Παρόμοια χαρακτηριστικά παρατηρούνται σε λοιμώξεις από HIV, Epstein-Barr και ηπατίτιδα C, με πολυδραστικά αντισώματα να εξουδετερώνουν τον HIV μέσω ευέλικτων παρατόπων που αυξάνουν την εντροπία σύνδεσης.⁶⁸ Η διαθεσιμότητα τέτοιων πολυδραστικών αντισωμάτων θα μπορούσε να συμβάλλει

στην κατανόηση της λοίμωξης από HCV και την ανάπτυξη στρατηγικών για τον έλεγχο της ανοσίας.⁶⁹ Στην ηπατίτιδα C, τα πολυδραστικά αντισώματα στοχεύουν συντηρημένους επίτοπους της E2 γλυκοπρωτεΐνης, παρέχοντας πληροφορίες για την ανοσία και την ανάπτυξη θεραπειών. (Mancini et al., 2009). Στον κυτταρομεγαλοϊό (CMV), τα εξουδετερωτικά αντισώματα παρουσιάζουν αυξημένη δράση στα επιθηλιακά κύτταρα, στοχεύοντας ιικές γλυκοπρωτεΐνες που απαιτούνται για την προσκόλληση και είσοδο των παθογόνων στα κύτταρα, αποτρέποντας τη μόλυνση.⁷⁰

1.4.3 Ανοσορρύθμιση

Τα ΦΑ ρυθμίζουν την ανοσιακή απόκριση μέσω διαφόρων μηχανισμών. Τα ανοσοσυμπλέγματα με αντιγόνα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους υποδοχείς Fc στα B κύτταρα, επηρεάζοντας τη σηματοδότηση του BCR.⁷¹ Τα πολυδραστικά ΦΑ αναγνωρίζουν τόσο ξένα όσο και αυτολογικά αντιγόνα, ενώ οι ιδιότυποί τους μπορούν να “κρυφτούν” μέσω αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων, εμποδίζοντας την αναγνώριση επίτοπων. Πράγματι, η χορήγηση αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων έχει δείξει ότι μπορεί να αναστείλει αυτοάνοσα φαινόμενα, όπως στη Μυασθένεια Gravis και τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο.^{72,73}

Τα ΦΑ επηρεάζουν τη ρύθμιση των κυτταροκινών, δεσμεύοντας αυτές ή τους υποδοχείς τους, τροποποιώντας την ένταση της ανοσιακής απόκρισης.⁷⁴ Η αναγνώριση των ΦΑ που συνδέονται με κυτταροκίνες ή τους υποδοχείς τους υποδεικνύει ότι αυτά τα κυκλοφορούντα αντισώματα μπορεί να συμμετέχουν στη μεταφορά τους, να επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής τους και να ρυθμίζουν/τροποποιούν τη λειτουργία τους. Παράλληλα, συμμετέχουν στη ρύθμιση των T και B κυττάρων, μειώνοντας την παραγωγή B κυττάρων στον μυελό των οστών και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό ενεργοποιημένων T κυττάρων, ενώ συμμετέχουν επίσης στη μεταφορά και παρουσίαση αντιγόνων.^{9,13} Ενδιαφέρον είναι ότι η ρύθμιση της παραγωγής B κυττάρων από τα ΦΑ εξαρτάται από την μεταβλητή περιοχή τους, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η αφαίρεση των κλώνων B κυττάρων οφείλεται σε ιδιοτυπικές αλληλεπιδράσεις, υποδεικνύοντας τον ρόλο των ΦΑ στην επιλογή του ρεπερτορίου.²¹

Άλλοι ρόλοι των ΦΑ περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση με υποδοχείς IgE, οπιοειδών και το νευροενδοκρινικό σύστημα, υποδεικνύοντας ρυθμιστική σύνδεση μεταξύ ανοσιακού και νευρικού συστήματος. Επιπλέον, αντισώματα από υγιείς ανθρώπους έχουν δείξει ότι παρουσιάζουν πολυδιάστατη υδρολυτική δραστηριότητα, σε σύγκριση με αντίστοιχες δραστηριότητες των αντισωμάτων από ασθενείς με αυτοανοσία.⁷⁵

Η ομοιοστατική ισορροπία των ΦΑ είναι κρίσιμη. Διαταραχές μπορεί να οδηγήσουν είτε σε προστατευτική ανοσιακή απόκριση είτε σε παθολογικές καταστάσεις. Σε νεογνά, όπου οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί είναι ανώριμοι, η ανοσοποίηση με αυτοαντιγόνα μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοσες αντιδράσεις. Συνολικά, η κατανόηση των ΦΑ παραμένει ενεργό πεδίο έρευνας με προοπτικές στη θεραπεία.

1.4.4 Ικανότητα κυτταροδιείσδυσης σε ζώντα κύτταρα

Είναι ευρέως αποδεκτό, κυρίως από μελέτες που διεξήχθησαν από το 1978 έως το 2001, ότι τα αντισώματα κατά των πυρηνικών συστατικών, κυρίως του DNA, που εντοπίζονται συχνά στους ορούς ασθενών με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο ή μικτή νόσο συνδετικού ιστού και ποντικών με προδιάθεση για Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο μπορούν να διεισδύσουν σε ζωντανά κύτταρα (αντισώματα που διεισδύουν σε κύτταρα (Cell Penetrating Antidodies, CPAbs) και να συσσωρεύονται κυρίως στον πυρήνα.^{76,77} Τα CPAbs μπορούν να εισέλθουν σε ένα ευρύ φάσμα τύπων κυττάρων και να προκαλέσουν λειτουργικές αλλαγές.^{78,79} Αυτά τα αντισώματα εμφανίζουν πολυδραστηριότητα, η οποία φαίνεται να συνεισφέρει στην ικανότητά τους να διασχίζουν τη μεμβράνη του κυττάρου, πιθανώς μέσω αλληλεπιδράσεων με διάφορα μόρια που εκτίθενται στην επιφάνεια του κυττάρου.^{80,81,82} Ο ακριβής τρόπος εισόδου τους παραμένει ασαφής, με αντιφατικά ευρήματα να υποστηρίζουν μια εξαρτώμενη από την ενδοκυττάρωση διαδικασία, αλλά και μια ανεξάρτητη από την ενέργεια διαδικασία.^{83,84} Η ερευνητική ομάδα της Δρ. Πηγής Λυμπέρη παρήγαγε μια σειρά CPAbs από ποντίκια με προδιάθεση για λύκο και έδειξε ότι η αλληλεπίδρασή τους με συμπλέγματα DNA-ιστονών, που είναι άφθονα στον Συστηματικό

Ερυθματώδη Λύκο, αύξησε σημαντικά την ικανότητά τους να εισέρχονται στα κύτταρα και τροποποίησε την αναγνώριση των ενδοκυτταρικών συστατικών τους.⁸⁵ Αυτά τα CPAbs που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της νόσου μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά όπως η πολυδραστικότητα και η κωδικοποίησή τους από τη βλαστική σειρά, με τα ΦΑ που υπάρχουν σε υγιή άτομα.¹⁸ Παρά τις ομοιότητες αυτές, η ύπαρξη και οι ιδιότητες των φυσικά εμφανιζόμενων CPAbs, μέχρι το 2015, δεν είχαν ποτέ αξιολογηθεί άμεσα σε φυσιολογικούς ορούς. Οι ομάδες των Borghetti και Bazin ανέφεραν την κυτταροδιείσδυση της IVIg σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων (ενδοθηλιακά, δένδριτικά και Β κύτταρα).^{86,87} Η κυτταροδιείσδυση των αντισωμάτων που υπήρχαν στην IVIg συνέβη είτε μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από την ενδοκύτωση είτε αυθόρμητα μέσω άγνωστου μηχανισμού, ακολουθούμενη από τροποποίηση της αντιφλεγμονώδους απόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων ή τροποποίηση της παρουσίας του αντιγόνου του κυττάρου του κύριου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τάξης II αντίστοιχα.^{66,88} Η ομάδα της Δρ. Λυμπέρη εξέτασε την παρουσία και τις ιδιότητες των CPAbs στην IVIg και παρατηρήθηκε διείσδυση των αντισωμάτων της IVIg σε διάφορες κυτταρικές σειρές και σε ιστούς από διάφορα όργανα ποντικών μετά από ενδοφλέβια θεραπευτική δόση.⁸⁹ Σε όλους τους τύπους κυττάρων που εξετάστηκαν *in vitro* και *in vivo*, ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των αντισωμάτων σημειώθηκε στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με των CPAbs που σχετίζονται με τη νόσο και συσσωρεύονται στον πυρήνα. Τα αντισώματα της IVIg βρέθηκε ότι εισέρχονται στα κύτταρα γρήγορα μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από την ενέργεια (παθητικός μηχανισμός). Επιπλέον, ο υποπληθυσμός των CPAbs (~2% της IVIg), απομονώθηκε από το σκεύασμα της IVIg και παρουσίασε δραστηριότητα κατά των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών συστατικών καθώς και ανασταλτική επίδραση στην ενεργοποίηση των σπληνικών κυττάρων. Σε μονοκλωνικό επίπεδο, η ίδια ομάδα μελέτησε μονοκλωνικά ανοσοσώματα (mAbs) από ορούς ασθενών με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες (πολλαπλό μυέλωμα G) που είναι γνωστό ότι εκδηλώνουν συχνά χαρακτηριστικά των ΦΑ και απέδειξε ότι ένα μέρος τους εξέφραζε ικανότητα διείσδυσης σε κύτταρα.⁹⁰

Υποστηρίζοντας την παρουσία ΦΑ με ικανότητα διείσδυσης σε κύτταρα, η ομάδα παρήγαγε και μελέτησε μονοκλωνικά ΦΑ που προήλθαν από ενήλικα ποντίκια BALB/c. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα mIgs που εμφάνιζαν ικανότητα διείσδυσης σε κύτταρα, διείσδυσαν σε πολλές ζωντανές σειρές κυττάρων και εντοπίστηκαν στο κυτταρόπλασμα. Τελευταίες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν πως τα CPAbs θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν με απώτερο σκοπό τη χρήση τους ως θεραπευτικά εργαλεία στη βιοϊατρική, ως φορείς για την παράδοση φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα.⁹¹

1.5 ΦΑ και παθολογικές καταστάσεις

IgG αυτοαντισώματα απαντώνται σε όλους τους ανθρώπινους ορούς και επηρεάζονται από ηλικία, φύλο και ασθένειες.⁹² Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων σχετίζονται με την παρουσία και σοβαρότητα αυτοάνοσων νοσημάτων, ενώ σε άλλες δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ υγιών και ασθενών. Επιπλέον, οι τίτλοι και το προφίλ αντίδρασης των ΦΑ ποικίλλουν και σε μη ανοσολογικές ασθένειες. Π.χ., ασθενείς με Alzheimer και Parkinson έχουν μειωμένα επίπεδα αυτοαντισωμάτων, ενώ σε SLE ασθενείς με anti-dsDNA IgG ανιχνεύονται υψηλότερα επίπεδα ΦΑ κατά της συνθάσης του κιτρικού οξέος.^{93,94}

Επιπρόσθετα, ο αριθμός των B-1 κυττάρων δεν είναι σταθερός κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου.⁹⁵ Από τη νεογνική περίοδο μέχρι την εφηβεία, τα B-1 κύτταρα αυξάνονται αλλά με το πέρασμα της ανάπτυξης μειώνονται με την ηλικία. Έτσι, η αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις στους ηλικιωμένους μπορεί, εν μέρει, να οφείλεται στη μείωση του αριθμού των B-1 κυττάρων και στη μείωση των επιπέδων των ΦΑ. Απουσία IgM ΦΑ έναντι της γρίπης, παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην εξαρτώμενη από T κύτταρα IgG2a απόκριση και αυξημένη θνησιμότητα στα ποντίκια, γεγονός που υποδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο των ΦΑ στη ρύθμιση της ειδικής ανοσοαπόκρισης.⁹⁶

Τα ΦΑ σχετίζονται με την ανοσοπαθολογία, ιδιαίτερα μετά από λοιμώξεις, που μπορούν να τροποποιήσουν τη δικτύωσή τους και να διαταράξουν την επικοινωνία B και T λεμφοκυττάρων.⁹⁷ Έτσι, βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις μπορεί να οδηγήσουν σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπου εμπλέκονται τα ΦΑ.

Σημαντικές αλλαγές στο ρεπερτόριο και τους ισότυπους των ΦΑ έχουν καταγραφεί σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως διαβήτης τύπου 1, αιμολυτική αναιμία και αυτοάνοση ηπατίτιδα, ενώ σε RA και SLE, δεν αλλάζει το ρεπερτόριο των ΦΑ, αλλά αυξάνονται τα επίπεδα συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων.^{98,99,100,101} Αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι τα ΦΑ μπορεί να ρυθμίζουν ή ακόμα και να καταστέλλουν την αυτοανοσία. Σε ποντίκια, η απουσία εκκρινόμενης IgM αυξάνει την ευαισθησία στην αυτοανοσία, ενώ σε ανθρώπους, χαμηλά επίπεδα IgM σχετίζονται με την ανάπτυξη SLE.^{102,103}

Τα ΦΑ διαδραματίζουν επίσης ρόλο σε ασθένειες του ΚΝΣ. Έχει βρεθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη αξόνων και επαναμυελίνωση, ενώ μπορούν να μειώσουν το φορτίο των πλακών και να επιβραδύνουν τη γνωστική πτώση σε Alzheimer.¹⁰⁴ Τα επίπεδα ΦΑ κατά του β-αμυλοειδούς σχετίζονται αντίστροφα με την ατροφία του εγκεφάλου, ενώ *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι προλαμβάνουν τον κυτταρικό θάνατο ή διαθέτουν ενζυματική δραστηριότητα υδρόλυσης του αμυλοειδούς.^{105,106,107}

Στην αθηροσκλήρωση, τα IgM ΦΑ δρουν προστατευτικά μειώνοντας τη φλεγμονή και την εξέλιξη της νόσου.¹⁰⁸ IgM ΦΑ που αναγνωρίζουν οξειδωμένα λιπίδια προωθούν την απομάκρυνσή τους, ενώ IgG ΦΑ έχουν πιο σύνθετο ρόλο, καθώς συνδέονται τόσο με προστασία όσο και με επιδείνωση της αθηροσκλήρωσης μέσω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και της προσέλκυσης φλεγμονωδών κυττάρων.¹⁰⁹ Τα ΦΑ είναι επίσης σημαντικά για την εξάλειψη των αποπτωτικών κυττάρων και των κυττάρων που βρίσκονται υπό στρες.¹¹⁰ Η αποτυχία αυτής της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσες νόσους και φλεγμονώδεις καταστάσεις. Φαίνεται πως η ικανότητα των ΦΑ να αναγνωρίζουν επίτοπους σε νεκρά και αποπτωτικά κύτταρα, καθώς και σε οξειδωμένα λιπίδια, είναι ιδιαίτερα σημαντική στις πρώιμες φάσεις της αθηροσκλήρωσης, όπου τέτοιου είδους επίτοποι αυξάνονται δραματικά.

Στις κακοήθειες, τα ΦΑ αναγνωρίζουν ανώμαλα γλυκολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας στον θάνατό τους.¹¹¹ Συγκεκριμένα, πολυδραστικά αντισώματα IgM από ασθενείς με γαστρικό

καρκίνωμα βρέθηκε να συνδέονται με μια τροποποιημένη δομή του υποδοχέα CFR-1 που τροποποιείται μετά την μεταγραφή και να προκαλούν απόπτωση.¹¹² Άλλα ΦΑ αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των κασπασών και μείωσης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης.^{113,114,115} Επιπλέον τα IgM ΦΑ έναντι των όγκων φαίνεται να ασκούν την κυτταροτοξικότητά τους μέσω της ικανότητάς τους να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα.¹¹⁶

2. Εφαρμογές των ΦΑ στη Βιοϊατρική

2.1 Προκλήσεις για την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων

Στη βιοϊατρική έρευνα, τα ΦΑ αξιοποιούνται σε διάφορους τομείς, όπως η κατανόηση των μηχανισμών αυτοανοσίας, η αναγνώριση βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση νοσημάτων και η ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων που στοχεύουν σε φυσικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς. Ωστόσο, η χρήση τους για την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων παρουσιάζει σημαντικές προκλήσεις που οφείλονται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ΦΑ. Πιο συγκεκριμένα, καθώς τα ΦΑ, λόγω της πολυδραστικής τους φύσης, μπορούν και αναγνωρίζουν πολλαπλά αντιγόνα και καθώς τα επιπεδά τους διαφοροποιούνται μεταξύ των ατόμων και μεταξύ παθολογιών, αυτό μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία και την ειδικότητα των ελέγχων σε διάφορες διαγνωστικές εφαρμογές. Σ' αυτό επιπλέον μπορεί να συνεισφέρει αρνητικά και η χαμηλή συγγένεια που παρουσιάζουν *in vitro* σε σύγκριση με τα επαγόμενα mAb, η οποία μπορεί να επηρεάσει με την σειρά της την αξιοπιστία των διαγνωστικών εργαλείων. Τέλος η φυσική ποικιλομορφία των ΦΑ καθιστά δύσκολη την τυποποίηση και την ακριβή ποσοτικοποίησή τους, επηρεάζοντας την αναπαραγωγιμότητα και τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων.

Η ανάπτυξη νέων βιοδεικτών που βασίζονται σε ΦΑ απαιτεί την αντιμετώπιση θεμάτων όπως η αξιοπιστία και η ακρίβεια, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται σε πλατφόρμες ανοιχτής καινοτομίας. Καθώς δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα εργαλεία για την άμεση ποσοτικοποίηση των επιπέδων των ΦΑ σε βιολογικά

υγρά, αναγκαίος σε κάθε ανάλυση κρίνεται ο υπολογισμός του κατώτατου ορίου θετικότητας (cut-off point) με τη χρήση υγείων μαρτύρων που φέρουν παρόμοια χαρακτηριστικά ως κατανομή με αυτήν των εξεταζόμενων ατόμων. Διαδικασίες βελτιστοποίησης των συνθηκών, όπως η συγκέντρωση του αντιγόνου στόχου, των δευτερογενών αντισωμάτων και οι αραιώσεις των δειγμάτων, είναι αναγκαίο να προσαρμόζονται ανάλογα με το υλικό και τον σκοπό της μελέτης, γεγονός που καθιστά πολλές φορές, πρακτικά και οικονομικά ασύμφορη την παραγωγή τους σε ευρεία εμπορική διαθεσιμότητα.

2.2 Τα ΦΑ στη πρόγνωση και διάγνωση ασθενειών.

Ενώ έχει φανεί ότι τα ΦΑ εμπλέκονται σε μια πληθώρα παθολογιών στα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία, η χρήση τους στη κλινική διάγνωση βρίσκει σήμερα εφαρμογή σε μια περιορισμένη ομάδα νοσημάτων. Τα επίπεδα των αυτοδραστικών ΦΑ σε υγιείς πληθυσμούς μπορεί να προμηνύουν μελλοντικές αυτοάνοσες ασθένειες, όπως υποστηρίζεται από αυξημένα αντι-DNA αντισώματα πριν την κλινική εμφάνιση του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου (SLE) και αυτοαντισώματα κατά του ρευματοειδούς παράγοντα IgM ή του αντι-κυκλικού κίτρουλλινωμένου πεπτιδίου (anti-CCP) πριν την εμφάνιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.¹¹⁷ Επιπλέον, η χρήση μικροσυστοιχιών μπορεί να βοηθήσει στην ανακάλυψη διακριτών προφίλ αυτοδραστικών ΦΑ και έχουν ήδη αποδειχθεί σημαντικοί διαγνωστικοί βιοδείκτες για τα αυτοάνοσα νοσήματα όπως η πολλαπλή σκλήρυνση.¹¹⁸ Η ανίχνευση τέτοιων αντισωμάτων μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή ασθενών με προκλινική πορεία και στην εκτίμηση κινδύνου για αυτοάνοσα νοσήματα.¹¹⁹

Στον καρκίνο του μαστού, τόσο τα IgM ΦΑ όσο και επαγόμενα αντισώματα αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα, διευκολύνοντας την πρώιμη διάγνωση. Υψηλά επίπεδα IgM ΦΑ που στοχεύουν ανώμαλα γλυκοζυλιωμένα μόρια στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την πρώιμη ανίχνευση της νόσου, ακόμη και αρκετά χρόνια πριν από την κλινική εκδήλωση της.^{120,121}

Στα καρδιαγγειακά νοσήματα τα ΦΑ έναντι της Ox-LDL, της Μαλονδιαλδεϋδης-LDL (MDA-LDL) και της φωσφορυλοχολίνης βρίσκουν χρησιμότητα στην εκτίμηση της προδιάθεσης για αθηροσκλήρωση και της βαρύτητας της νόσου.¹²² Πιο συγκεκριμένα, τα υψηλά επίπεδα IgM ΦΑ έναντι αυτών των στόχων συνδέονται με προστασία από την αθηροσκλήρωση σε υπερτασικούς ανθρώπους, ενώ αντίθετα τα υψηλά επίπεδα IgG ΦΑ κατά της OxLDL αποτελούν προ-αθηροματικούς δείκτες.¹²³

Στις ανοσοανεπάρκειες, μετρήσεις των επιπέδων των ΦΑ έναντι της α-γαλακτοσιδάσης (a-Gal) έχουν αξιοποιηθεί τόσο για διαγνωστικούς σκοπούς όσο και ως προγνωστικοί δείκτες της ανταπόκρισης/ ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος κατά τον εμβολιασμό τόσο σε ασθενείς με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες (PADs) όσο και σε ασθενείς με δευτεροπαθή ανοσοανεπάρκεια ύστερα από λοίμωξη του HIV.^{124,125}

2.3 Τα ΦΑ στη θεραπεία

Το προφίλ των επιπέδων των ΦΑ φαίνεται να έχει προγνωστική αξία σχετικά με την αποτελεσματικότητα θεραπειών που βασίζονται σε βιολογικά συστατικά, όπως διάφορες μορφές ανοσοθεραπείας.¹²⁶ Προϋπάρχοντα ΦΑ στους ασθενείς μπορεί να αναγνωρίσουν και να εμποδίσουν τη λειτουργία του βιολογικού φαρμάκου. Για παράδειγμα, η θεραπεία με TNFα περιλαμβάνει τη χορήγηση εξανθρωποποιημένου μονοκλωνικού αντισώματος που αναγνωρίζει το TNFα σε ασθενείς με RA και άλλες αυτοάνοσες ασθένειες.¹²⁷ Η αποτυχία της θεραπείας με αντι-TNFα έχει συσχετιστεί με την παρουσία αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τον μονοκλωνικό αντι-TNFα παράγοντα.¹²⁸ Επιπλέον, προϋπάρχοντα ΦΑ έχουν συσχετισθεί με την αποτυχία του εμβολίου κατά του *S. Aureus* και η ανίχνευσή συγκεκριμένων προφίλ ΦΑ στον ορό μπορεί να αξιοποιηθεί για την κατάλληλη επιλογή εμβολίου στους λήπτες.¹²⁹

Ένα άλλο παράδειγμα παρεμβολής των ΦΑ με την αποτελεσματικότητα θεραπευτικού παράγοντα είναι η γονιδιακή θεραπεία. Η επεξεργασία του γονιδιώματος *in vivo* με συστήματα CRISPR-Cas9 έχει ευρεία ερευνητική εφαρμογή στις μέρες μας. Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπων διαθέτει ΦΑ

που στοχεύουν τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες παραλλαγές Cas9 πριν από τη θεραπεία. Η αναγνώριση της Cas9 από αυτά τα ΦΑ οδηγεί στην εξουδετέρωσή της, μειώνοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα.¹³⁰ Τα προϋπάρχοντα ΦΑ σε θεραπευτικά mAb ή σε καψίδια ιών που σχετίζονται με αδενοϊούς, τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως στη γονιδιακή θεραπεία, μπορεί να αποδειχθούν σημαντικά στο μέλλον ως προγνωστικοί παράγοντες για την αποτελεσματικότητα αυτών των θεραπειών.¹³¹

Βασισμένο στον σημαντικό ανοσορρυθμιστικό και προστατευτικό ρόλο των ΦΑ, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στη χρήση τους για θεραπευτικές εφαρμογές. Αν και υπάρχουν αναφορές για θεραπευτικές εφαρμογές μονοκλωνικών ΦΑ, η πιο συχνή χρήση τους αφορά σκευάσματα που περιέχουν πολυκλωνικά ΦΑ, τα οποία είναι ευρέως γνωστά ως σκευάσματα ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (intravenous immunoglobulin -IVIg).¹³²

2.3.1 Πολυκλωνικά ΦΑ

Χρειάστηκε μια μακρά πορεία άνω των 100 ετών από την ανακάλυψη των ανοσοσφαιρινών (Igs) μέχρι την εκτεταμένη χρήση της πολυκλωνικής φυσιολογικής IgG σε διάφορες ανθρώπινες παθήσεις. Τα οφέλη της θεραπείας με IVIg στις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες (primary immunodeficiencies - PIDs) ενίσχυσαν επίσης το ενδιαφέρον για την πιθανή εφαρμογή του σε διάφορες λοιμώδεις νόσους, ιδιαίτερα σε ασθενείς με μειωμένη ανοσία.^{133,134}

Αν και οι κλινικές δοκιμές έχουν επιβεβαιώσει τη θεραπευτική αξία του IVIg σε πολλές αυτοάνοσες νόσους, για πολλές από αυτές δεν υπάρχουν ακόμα επαρκείς μελέτες. Καθώς περίπου 60–70% της τρέχουσας προμήθειας IVIg χρησιμοποιείται για μη εγκεκριμένες (off-label) ενδείξεις, η προτεραιοποίηση της χρήσης του για τις PID και για καταστάσεις με καθιερωμένη κλινική ένδειξη είναι σημαντική.¹³⁵

Η επιτυχία του IVIg στην κλινική πράξη ενέπνευσε επίσης τη διερεύνηση των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων άλλων υποκλάσεων των φυσιολογικών Igs, ιδιαίτερα των IgA και IgM. Η προκλινική αξιολόγηση των συνδυασμένων IgA και IgM

(παρόμοια με το IVIg) παρείχε ενδείξεις ότι μπορούν επίσης να στοχεύσουν τη φλεγμονή και, ως εκ τούτου, αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω σε κλινικό επίπεδο.^{136,137}

Παράλληλα, η ταυτοποίηση των διασυνδέσεων σιαλικού οξέος μέσω του τμήματος Fc των Igs ως ενός από τους μεσολαβητές της αντιφλεγμονώδους δράσης του IVIg οδήγησε στη σύλληψη ανασυνδυασμένων Fc τμημάτων που περιέχουν επιπλέον περιοχές σύνδεσης σιαλικού οξέος και στην ανάπτυξη νέων τροποποιημένων θεραπευτικών σκευασμάτων IVIg.^{138,139} Αν και παραπάνω μηχανισμοί δεν αναπαράχθηκαν από άλλες ερευνητικές ομάδες (100), οι μελέτες αυτές παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η θεμελιώδης έρευνα στην ανοσολογία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων ανοσοθεραπειών.^{140,141}

2.3.2 Μονοκλωνικά ΦΑ

Η χρήση των μονοκλωνικών ΦΑ ως θεραπευτικών εργαλείων περιλαμβάνει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα μονοειδικά mAb που παράγονται μετά από υπερανοσοποίηση με ένα αντιγόνο: (1) Τα ΦΑ είναι οικονομικά αποδοτικά, καθώς απομονώνονται άμεσα από εθελοντές δότες, (2) η πολυδραστικότητά τους υποδηλώνει τη χρήση τους στη θεραπεία πολλαπλών ασθενειών, (3) καθώς παράγονται φυσικά, ενδέχεται να παρουσιάζουν λιγότερες θεραπευτικές παρενέργειες. Το πιο επιτυχημένο παράδειγμα εφαρμογής μονοκλωνικού ΦΑ στη θεραπεία είναι το ανθρώπινο IgM rHIgM22, το οποίο προάγει την επαναμυελίνωση και βρίσκεται σε κλινική δοκιμή Φάσης II για ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση (MS).¹⁴² Αυτό το IgM ΦΑ ανιχνεύθηκε και απομονώθηκε από ανθρώπινο ορό ύστερα από ελέγχους διαλογής έναντι του αντιγόνου της μυελίνης σε βιοψίες ιστού του ΚΝΣ και στην επιφάνεια ζωντανών ολιγοδενδροκυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια.

Ένα άλλο παράδειγμα μονοκλωνικού ΦΑ που έχει ήδη εισέλθει σε κλινικές δοκιμές Φάσης I είναι το aducanumab.¹⁴³ Το Aducanumab είναι ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 υψηλής συγγένειας, το οποίο στοχεύει το β-αμυλοειδές και προέρχεται αρχικά από υγιείς ηλικιωμένους δότες. Οι

πρώτες μελέτες παρείχαν ενδείξεις υψηλής αποτελεσματικότητας του aducanumab στα πρώιμα στάδια της νόσου Alzheimer.

Τέλος, το MABp1 είναι ένα μονοκλωνικό ΦΑ που απομονώθηκε από υγιή άτομο και το οποίο στοχεύει την ιντερλευκίνη-1α (IL-1α), έναν μεσολαβητή της χρόνιας φλεγμονής.¹⁴⁴ Η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη κακοήθων όγκων, προάγοντας την αγγειογένεση, την εισβολή όγκων, τις μεταστάσεις και την καχεξία. Στη κλινική μελέτη φάσης Ι, το MABp1 χορηγήθηκε σε ενήλικες με μεταστατικό καρκίνο, παρουσιάζοντας καλή ανοχή χωρίς τοξικότητες που περιορίζουν τη δόση ή ανοσογονικότητα. Τα φαρμακοκινητικά δεδομένα έδειξαν σταθερότητα σε όλες τις δόσεις, χωρίς συσσώρευση ή αυξημένη απομάκρυνση του MABp1. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της IL-6 στο πλάσμα και αύξηση της άλιπης μάζας σώματος σε ορισμένους ασθενείς. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το MABp1, το πρώτο μονοκλωνικό ΦΑ έναντι κυτταροκινών, μπορεί να προσφέρει οφέλη σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο, απαιτώντας περαιτέρω έρευνα για την αποτελεσματικότητά του.

3. Ορογόνες κοιλότητες

Οι ορογόνες κοιλότητες, όπως η υπεζωκοτική (pleural), η περιτοναϊκή (peritoneal) και η περικαρδιακή (pericardial), αποτελούν εξειδικευμένα ανατομικά διαμερίσματα που επενδύονται από μεσοθηλιακά κύτταρα και λειτουργούν όχι μόνο ως λιπαντικές επιφάνειες μεταξύ των σπλάγχχνων και των τοιχωμάτων του σώματος, αλλά και ως ανοσολογικά ενεργές περιοχές. Σε αντίθεση με τους βλεννογόνιους ιστούς, όπως ο εντερικός, ο ρινοφαρυγγικός, ο αναπνευστικός και ο ουρογεννητικός, που περιέχουν εξειδικευμένες ανοσολογικές δομές που ονομάζονται συλλογικά MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue), οι ορογόνες κοιλότητες δεν διαθέτουν δομημένες λεμφοειδείς περιοχές, αλλά Λεμφοειδείς Συστάδες που Σχετίζονται με τις Ορογόνες Μεμβράνες (Serosa-Associated Lymphoid Clusters - SALC) που υποστηρίζουν τη λειτουργία της διάχυτης λεμφοειδούς ανοσίας.¹⁴⁵

Οι SALC λειτουργούν ως σημεία πρώτης γραμμής άμυνας στις ορογόνες κοιλότητες, επιτρέποντας την ταχεία ανίχνευση και απόκριση σε παθογόνα. Η παρουσία τους στις περιοχές αυτές υποδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο τους στη διατήρηση της ανοσολογικής ομοιόστασης και στην προστασία από λοιμώξεις. Αυτές οι δομές λειτουργούν ως δευτερογενή λεμφοειδή όργανα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην τοπική ανοσολογική απόκριση.¹⁴⁶ Οι SALC είναι επαγώγιμες δομές που υποστηρίζουν ταχείες έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις από Β-κύτταρα στις ορογόνες κοιλότητες. Φιλοξενούν πληθυσμούς Β λεμφοκυττάρων, όπως τα Β1 κύτταρα τα οποία διαφέρουν από τα συμβατικά Β2 λεμφοκύτταρα τόσο ως προς την προέλευση όσο και ως προς τη λειτουργία τους και τα έμφυτα λεμφοκύτταρα τύπου 2 (ILC2).¹⁴⁷ Σε πειραματικά μοντέλα έχει φανεί πως κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών καταστάσεων, όπως λοιμώξεις ή αλλεργικές αντιδράσεις, στρωματικά κύτταρα των SALC παράγουν IL-33 η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τα ILC2, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή IL-5 και ενεργοποίηση των Β1 κυττάρων.¹⁴⁸ Η κατανόηση της λειτουργίας των SALC μπορεί να προσφέρει νέες προοπτικές για θεραπευτικές παρεμβάσεις σε παθήσεις που επηρεάζουν τις ορογόνες κοιλότητες.

3.1 Περικαρδιακή κοιλότητα

Η περικαρδιακή κοιλότητα αποτελεί δυνητικό χώρο μεταξύ των δύο στρωμάτων του περικαρδίου, α) το ινώδες περικάρδιο, εξωτερικά, που αποτελεί ένα παχύ, ινώδες στρώμα που προστατεύει και σταθεροποιεί την καρδιά μέσα στο μεσοθωράκιο και β) το ορογόνο περικάρδιο, εσωτερικά, που υποδιαιρείται στο τοιχωματικό πέταλο που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια του ινώδους περικαρδίου και στο σπλαγχνικό πέταλο (επικάρδιο) που καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια της καρδιάς. Η περικαρδιακή κοιλότητα βρίσκεται ανάμεσα στα δύο ορογόνα πέταλα και υπό φυσιολογικές συνθήκες περιέχει 15-50 mL ορώδους υγρού. Και τα δύο πέταλα επενδύονται από μονοστρωματικό μεσοθηλιακό επιθήλιο (μεσοθηλιακά κύτταρα), το οποίο, παρέχει φραγμό έναντι παθολογικών παραγόντων και εκκρίνει λιπαντικό υγρό και παράγοντες ανοσορύθμισης, συμμετέχοντας σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις και επούλωση μέσω παραγωγής

κυτταροκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων. Το υγρό προέρχεται από διήθηση πλάσματος μέσω των τριχοειδών αγγείων του επικάρδιου και του τοιχωματικού περικαρδίου ενώ, η απορρόφηση γίνεται κυρίως μέσω των λεμφικών αγγείων που αποχετεύουν το υγρό προς τους βρόγχο-μεσοθωρακικούς λεμφαδένες και δευτερευόντως, με διαπερατότητα προς τα φλεβικά αγγεία. Η ισορροπία μεταξύ υδροστατικής πίεσης (προάγει τη διήθηση) και κολλοειδωσμωτικής πίεσης (αντισταθμίζει την απώλεια υγρού) εξασφαλίζει ότι ο όγκος του υγρού παραμένει σταθερός.¹⁴⁹

Η περικαρδιακή κοιλότητα περιέχει φυσιολογικά μικρή ποσότητα υγρού, απαραίτητη για τη λίπανση και τη διευκόλυνση της καρδιακής κίνησης. Η παθολογική συσσώρευση περικαρδιακού υγρού, γνωστή ως περικαρδιακή συλλογή, μπορεί να προκληθεί από ποικίλα αίτια που διαταράσσουν την ισορροπία μεταξύ παραγωγής και απορρόφησης υγρού.¹⁵⁰ Φλεγμονώδεις διεργασίες, όπως οι ιογενείς, βακτηριακές, μυκητιασικές ή παρασιτικές λοιμώξεις, αποτελούν συχνές αιτίες περικαρδιακής συλλογής. Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι λοιμώξεις από ιούς *Coxsackie*, *Echo* και κυτταρομεγαλοϊό, καθώς και η φυματίωση σε ενδημικές περιοχές. Αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, μπορούν επίσης να προκαλέσουν φλεγμονή του περικαρδίου. Κακοήθεις διεργασίες, πρωτοπαθείς ή δευτεροπαθείς από μεταστατικούς όγκους (ιδίως του πνεύμονα, του μαστού και τα λεμφώματα), συχνά συνοδεύονται από περικαρδιακή συλλογή. Επιπλέον, μεταβολικά αίτια όπως η ουραιμία λόγω νεφρικής ανεπάρκειας και ο υποθυρεοειδισμός εμπλέκονται στη συσσώρευση υγρού. Τραυματικοί παράγοντες, περιλαμβανομένων θωρακικών κακώσεων και ιατρογενών επεμβάσεων όπως η καρδιοχειρουργική και ο καθετηριασμός, συνιστούν άλλες σημαντικές αιτίες. Τέλος, φαρμακευτικές ουσίες (όπως η υδραλαζίνη και η ισονιαζίδη) καθώς και η ακτινοθεραπεία μπορούν να προκαλέσουν τοξική ή ανοσολογική περικαρδιακή φλεγμονή οδηγώντας σε συλλογή υγρού.¹⁵¹

3.2 Περιτοναϊκή κοιλότητα

Η περιτοναϊκή κοιλότητα είναι η μεγαλύτερη από τις ορογόνες κοιλότητες του ανθρώπινου σώματος.¹⁵² Αποτελεί το χώρο ανάμεσα στο τοιχωματικό περιτόναιο που επενδύει τα εσωτερικά τοιχώματα της κοιλιάς και της πυέλου και το σπλαχνικό περιτόναιο που καλύπτει τα ενδοκοιλιακά και ορισμένα πυελικά όργανα. Φυσιολογικά, περιέχει 50-100 mL υγρού, το οποίο λιπαίνει τα όργανα και διευκολύνει την κινητικότητά τους. Το περιτόναιο καλύπτεται από μονοστρωματικό μεσοθηλιακό επιθήλιο (μεσοθηλιακά κύτταρα), που παράγει ορώδες υγρό και παίζει ρόλο στην ανοσολογική επιτήρηση, συμμετέχοντας στην αναγνώριση μικροβίων και κακοήθων κυττάρων.¹⁵³ Ρυθμίζει τη φλεγμονώδη απόκριση και συμβάλλει στην επούλωση μετά από τραυματισμό ή φλεγμονή. Το υγρό παράγεται μέσω διήθησης πλάσματος από τριχοειδή του περιτοναίου και από εκκρίσεις των σπλαχνικών οργάνων ενώ η κύρια οδός απορρόφησης είναι τα λεμφικά στόμια (stomata) του τοιχωματικού περιτοναίου, ιδιαίτερα στο διάφραγμα, που επικοινωνούν με τα υποκείμενα λεμφαγγεία και δευτερευόντως, η απορρόφηση μπορεί να γίνει από το αγγειακό δίκτυο του περιτοναίου. Η ισορροπία παραγωγής και απορρόφησης ρυθμίζεται από τις πιέσεις στο μικροκυκλοφορικό σύστημα (υδροστατική και κολλοειδωσμητική), καθώς και από την ακεραιότητα του μεσοθηλίου και των λεμφικών αγγείων.

Η περιτοναϊκή κοιλότητα φιλοξενεί φυσιολογικά μικρή ποσότητα υγρού που διασφαλίζει την ομαλή κινητικότητα των κοιλιακών οργάνων και παρέχει προστατευτικές και ανοσολογικές λειτουργίες. Η υπερβολική συσσώρευση υγρού, γνωστή ως ασκίτης, αντανακλά συνήθως υποκείμενες συστηματικές ή τοπικές παθολογικές διεργασίες.¹⁵⁴ Η πιο συχνή αιτία είναι η πυλαία υπέρταση λόγω ηπατικής κίρρωσης, η οποία αυξάνει την υδροστατική πίεση στα σπλαχνικά τριχοειδή και μειώνει την απορρόφηση υγρού. Συστηματικά νοσήματα όπως η καρδιακή ανεπάρκεια και το νεφρωσικό σύνδρομο συμβάλλουν επίσης στην ανάπτυξη ασκίτικου υγρού μέσω μεταβολών της υδροστατικής και κολλοειδωσμητικής πίεσης. Κακοήθειες, είτε πρωτοπαθείς (π.χ. μεσοθηλίωμα) είτε δευτεροπαθείς (μεταστάσεις από ωοθήκες, στομάχι, παχύ έντερο και πάγκρεας), μπορούν να προκαλέσουν ασκίτη λόγω

περιτοναϊκής καρκινωμάτωσης ή απόφραξης λεμφικών αγγείων. Λοιμώξεις όπως η φυματιώδης και η βακτηριακή περιτονίτιδα αποτελούν σημαντικά αίτια, ιδιαίτερα σε ασθενείς με κίρρωση ή σε περιοχές με υψηλή ενδημικότητα.¹⁵⁵ Επιπλέον, η παγκρεατίτιδα, μέσω της διαρροής παγκρεατικών ενζύμων ή της δημιουργίας συριγγίων, μπορεί να οδηγήσει σε περιτοναϊκή συλλογή. Η απόφραξη λεμφικών αγγείων ή η λεμφαγγειεκτασία προκαλούν χυλώδη ασκίτη, ενώ σπανιότερες αιτίες περιλαμβάνουν αυτοάνοσα νοσήματα, υποθυρεοειδισμό (μυξοιδηματικός ασκίτης) και ιατρογενείς παράγοντες όπως η περιτοναϊκή κάθαρση.¹⁵⁶

3.3 Υπεζωκοτική κοιλότητα

Η υπεζωκοτική κοιλότητα είναι ο χώρος μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα, του περισπλάχνιου που περιβάλλει τον πνεύμονα και του τοιχωματικού που επενδύει το θωρακικό κλωβό και το διάφραγμα.¹⁵⁷ Στην υπεζωκοτική κοιλότητα εντοπίζεται συνεχώς μικρή ποσότητα υγρού με παρόμοια με το πλάσμα χαρακτηριστικά που βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία, δηλαδή παράγεται και απορροφάται συνεχώς. Αυτό το υγρό ονομάζεται υπεζωκοτικό υγρό (ΥΥ) και οι διαφορές που παρουσιάζει σε σχέση με το πλάσμα είναι ότι το ΥΥ είναι ότι είναι περισσότερο αλκαλικό (με μεγαλύτερη συγκέντρωση διττανθρακικών κατά 25%), με 3-5% λιγότερο νάτριο και 6-9% περισσότερο χλώριο. Σε κυτταρικό επίπεδο το ΥΥ περιέχει 75% μακροφάγα, 23% λεμφοκύτταρα και 1-2% μεσοθηλιακά κύτταρα. Ενδιαφέρον είναι ότι σε καπνιστές εντοπίζονται και λίγα ουδετερόφιλα. Ο υπεζωκότας αποτελείται από μία μονοστιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων που επικάθονται σε βασική μεμβράνη υπό της οποίας εντοπίζεται η υπο-υπεζωκοτική ζώνη που αποτελείται από μια στοιβάδα ελαστικού ιστού και από χαλαρό συνδετικό ιστό τον οποίο διαπερνούν αγγεία, λεμφαγγεία, νεύρα και υπάρχουν σποραδικοί ινοβλάστες.¹⁵⁸

Στον άνθρωπο ο όγκος του ΥΥ είναι περίπου 0.26 ml/Kg και το πάχος του 20 μm. Το υγρό αυτό διευκολύνει την ομαλή ολίσθηση των πνευμονικών λοβών κατά την αναπνοή και συμβάλλει στη μηχανική σταθερότητα του πνεύμονα. Τόσο ο σπλαχνικός όσο και ο τοιχωματικός υπεζωκότας παίζουν σημαντικό ρόλο στην διακίνηση του ΥΥ. Η παραγωγή του ΥΥ γίνεται από τη διήθηση του πλάσματος

από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα, ενώ η απορρόφηση του γίνεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα μέσω διαδικασιών απορρόφησης ύδατος συζευγμένου με διαλυμένες ουσίες αλλά και ενδοκυττάρωσης, μέσω δυνάμεων Starling προς τον περισπλάχνιο υπεζωκότα και μέσω των λεμφαγγειακών στομάτων του τοιχωματικού υπεζωκότα. Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις μπορεί να υπάρξει συσσώρευση υγρού τέτοια ώστε να μην είναι δυνατή η διατήρηση της δυναμικής ισορροπίας διακίνησης του. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ΥΥ είτε σε μειωμένη απορρόφηση ΥΥ. Η συσσώρευση υγρού ονομάζεται Υπεζωκοτική Συλλογή (ΥΣ) και απαιτεί κλινική διαχείριση στις περισσότερες των περιπτώσεων καθώς επηρεάζει την μηχανική της αναπνοής.¹⁵⁹

4. Υπεζωκοτικές Συλλογές

Οι εκδηλώσεις της ΥΣ καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από την υποκείμενη νόσο.¹⁶⁰ Πολλοί ασθενείς δεν παρουσιάζουν συμπτώματα που να σχετίζονται αποκλειστικά με την ίδια την συλλογή. Τέτοια συμπτώματα, εάν υπάρχουν, αντικατοπτρίζουν φλεγμονώδη απόκριση του υπεζωκότα, περιορισμό της μηχανικής του πνεύμονα ή διαταραχή της ανταλλαγής αερίων. Όταν υπάρχει αυξημένη ποσότητα υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα, ο όγκος του πρέπει να αντισταθμιστεί με έναν από τους εξής τρόπους: α) αύξηση του μεγέθους της θωρακικής κοιλότητας, β) μείωση του μεγέθους του πνεύμονα, γ) μείωση του μεγέθους της καρδιάς, ή έναν συνδυασμό αυτών των αλλαγών.¹⁶¹ Επειδή η θωρακική κοιλότητα, οι πνεύμονες και η καρδιά είναι όλα ελαστικά όργανα, ο όγκος καθενός εξαρτάται από τη διαφορά μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής πίεσης. Η αυξημένη παρουσία ΥΥ αυξάνει την πίεση στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Καθώς η διατατική πίεση του θωρακικού τοιχώματος καθορίζεται από την ατμοσφαιρική πίεση μείον την υπεζωκοτική πίεση, μια αύξηση της υπεζωκοτικής πίεσης θα οδηγήσει σε αύξηση της διατατικής πίεσης και, κατά συνέπεια, σε αύξηση του όγκου της θωρακικής κοιλότητας. Αντίστοιχα, η διατατική πίεση των πνευμόνων είναι η πίεση μέσα στις κυψελίδες μείον την υπεζωκοτική πίεση και επομένως αύξηση της υπεζωκοτικής πίεσης θα οδηγήσει

σε μείωση του όγκου των πνευμόνων και παρομοίως θα υπάρξει μείωση του όγκου της καρδιάς (η διατατική πίεση της καρδιάς είναι η ενδοκαρδιακή μείον την υπεζωκοτική πίεση). Η παροχέτευση του πλεονάζοντος υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα αποκαθιστά σε ικανοποιητικό βαθμό τις άνω μεταβολές που έχουν λειτουργική σημασία. Είναι περίπλοκο να προσδιοριστούν οι ακριβείς επιπτώσεις μιας ΥΣ στην αναπνευστική λειτουργία. Αυτό συμβαίνει επειδή πολλές παθήσεις που προκαλούν συλλογή ΥΥ, όπως η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, ο καρκίνος, η πνευμονία και η πνευμονική εμβολή, επηρεάζουν ταυτόχρονα και τον ίδιο τον πνευμονικό ιστό. Ως εκ τούτου, συχνά είναι δύσκολο να διαχωριστεί ποιο μέρος της αναπνευστικής δυσλειτουργίας οφείλεται στην παρουσία του υγρού και ποιο στην υποκείμενη ασθένεια.¹⁶²

Το πιο συχνό σύμπτωμα που προκύπτει από φλεγμονώδη απόκριση του υπεζωκότα είναι ο πλευριτικός πόνος, ο οποίος διαμεσολαβείται από τον τοιχωματικό υπεζωκότα (ο σπλαχνικός υπεζωκότας δεν περιέχει αισθητικούς υποδοχείς ή ίνες). Ο πόνος συνήθως γίνεται αισθητός στην περιοχή όπου εντοπίζεται η παθολογική κατάσταση και συχνά συνδέεται με τον αναπνευστικό κύκλο. Ένα από τα πιο συχνά συμπτώματα της ΥΣ είναι η δύσπνοια. Η σοβαρότητα της δύσπνοιας εμφανίζει μέτρια συσχέτιση με το μέγεθος της συλλογής. Η ταχεία κλινική βελτίωση της δύσπνοιας μετά από παροχέτευση της ΥΣ πιθανώς αντανάκλα τη μετάβαση σε μια πιο ευνοϊκή καμπύλη μήκους-τάσης των αναπνευστικών μυών, ιδιαίτερα του διαφράγματος.¹⁶³ Μερικοί ασθενείς εμφανίζονται ξηρό βήχα, που μπορεί να εξηγηθεί ως εκδήλωση φλεγμονής του υπεζωκότα ή συμπίεσης του πνεύμονα λόγω μεγάλης συλλογής. Οι ΥΣ μπορούν επίσης να επηρεάσουν σημαντικά την ποιότητα του ύπνου.¹⁶⁴

4.1 Διαγνωστική διερεύνηση ΥΣ

Το πρώτο βήμα στη διαγνωστική διερεύνηση οποιασδήποτε ΥΣ είναι η διάκριση μεταξύ διιδρώματος και εξιδρώματος.¹⁶⁵ Οι πρώτες εμφανίζονται ως αποτέλεσμα διαταραχών εξωϋπεζωκοτικών και οι δεύτερες ως αποτέλεσμα ενδοϋπεζωκοτικών διαταραχών. Οι διιδρωματικές συλλογές αναπτύσσονται κυρίως λόγω ανισορροπίας μεταξύ της υδροστατικής πίεσης και της

κολλοειδωσμοτικής πίεσης εντός των τριχοειδών του σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα. Αύξηση της υδροστατικής πίεσης ή μείωση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης, οδηγούν σε παθητική διακίνηση υγρού από το αγγειακό διαμέρισμα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα. Η μεμβράνη των τριχοειδών του τοιχωματικού υπεζωκότα παραμένει ακέραια επιτρέποντας τη διαφυγή υγρού που χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και κύτταρα, χωρίς ουσιαστική αύξηση της διαπερατότητας ή ενεργή συμμετοχή φλεγμονωδών μηχανισμών.¹⁶⁶ Αντίθετα, οι εξιδρωματικές συλλογές προκύπτουν από την αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών του τοιχωματικού υπεζωκότα λόγω τοπικών ενδοϋπεζωκοτικών διεργασιών. Η ενεργοποίηση φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), η ιντερλευκίνη-1 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α), προκαλεί διαταραχή των συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας. Το αποτέλεσμα είναι η έξοδος όχι μόνο υγρού αλλά και πρωτεϊνών, ανοσοκυττάρων και ενίοτε κυττάρων του όγκου στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Επιπλέον, η καταστροφή μεσοθηλιακών κυττάρων μπορεί να συμβάλλει περαιτέρω στην αύξηση της διαπερατότητας και τη συσσώρευση εξιδρώματος.¹⁶⁷

Η διάκριση μεταξύ διδρωματικών και εξιδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα στη διαγνωστική προσέγγιση των ασθενών με υγρό στην πλευρική κοιλότητα. Αυτή η διαφοροποίηση βοηθά στον περιορισμό του εύρους των πιθανών αιτιών που τη δημιουργήσαν και καθοδηγεί την περαιτέρω διερεύνηση και θεραπεία. Οι ΥΣ διακρίνονται σε διδρωματικές και εξιδρωματικές σύμφωνα με τα κριτήρια του Light.¹⁶⁸ Μια συλλογή θεωρείται εξιδρωματική εάν πληροί ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Λόγος πρωτεϊνών υπεζωκοτικού υγρού προς τις πρωτεΐνες του ορού > 0,5
2. Λόγος γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH) υπεζωκοτικού υγρού προς LDH ορού > 0,6
3. LDH υπεζωκοτικού υγρού > τα 2/3 του ανώτερου φυσιολογικού ορίου της LDH ορού

Οι συλλογές που δεν πληρούν κανένα από αυτά τα κριτήρια θεωρούνται διιδρωματικές. Αυτά τα κριτήρια έχουν ευαισθησία 98% για τον εντοπισμό εξιδρωμάτων.¹⁶⁹ Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις όπου τα κριτήρια του Light μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένη ταξινόμηση, και σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να απαιτηθεί περαιτέρω αξιολόγηση, όπως η μέτρηση της διαφοράς αλβουμίνης ορού-υπεζωκοτικού υγρού. Αυτό είναι ιδιαίτερα συχνό σε ασθενείς που λαμβάνουν διουρητικά ή που έχουν αιματηρό ΥΥ, ενώ ο ηπατικός υδροθώρακας συχνά ταξινομείται λανθασμένα ως εξίδρωμα.^{170,171}

Οι συνηθέστερες αιτίες διιδρωματικών συλλογών περιλαμβάνουν τις: α) Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, β) Κίρρωση ήπατος, γ) Νεφρωσικό σύνδρομο, δ) Πνευμονική εμβολή, και ε) Υποθυρεοειδισμό.

α) Η Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί την πιο συχνή αιτία διιδρωματικής ΥΣ. Η ανεπάρκεια της αριστερής κοιλίας οδηγεί σε αυξημένη πίεση πλήρωσης των πνευμονικών φλεβών και, κατ' επέκταση, σε αύξηση της υδροστατικής πίεσης στα τριχοειδή του πνευμονικού κυκλοφορικού. Αυτή η πίεση προάγει τη διήθηση υγρού στον διάμεσο χώρο και τελικά στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Παράλληλα, η μειωμένη καρδιακή παροχή μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης και κατακράτηση υγρών, επιδεινώνοντας την υπεζωκοτική συλλογή. **β) Κίρρωση ήπατος.** Η κίρρωση οδηγεί σε πυλαία υπέρταση και υπολευκωματιναιμία. Η πυλαία υπέρταση αυξάνει την υδροστατική πίεση στο σπλαγχνικό κυκλοφορικό, προάγοντας τη δημιουργία ασκίτη. Μέσω διαφραγματικών ελαττωμάτων ή λεμφαγγειακών διαύλων, το ασκитικό υγρό μπορεί να μεταναστεύσει στην υπεζωκοτική κοιλότητα (συχνότερα δεξιά), δημιουργώντας ηπατογενή υδροθώρακα. Η υπολευκωματιναιμία μειώνει την κολλοειδωσμωτική πίεση στο πλάσμα, διευκολύνοντας περαιτέρω τη διήθηση υγρού. **γ) Νεφρωσικό σύνδρομο.** Το νεφρωσικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από βαριά πρωτεϊνουρία, υπολευκωματιναιμία και κατακράτηση νατρίου και ύδατος. Η μείωση της κολλοειδωσμωτικής πίεσης λόγω υπολευκωματιναιμίας οδηγεί σε μετακίνηση υγρού από τα τριχοειδή προς το διάμεσο χώρο και τις σωματικές κοιλότητες,

όπως η υπεζωκοτική. Η υποογκαιμία διεγείρει περαιτέρω το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, προκαλώντας επιπλέον κατακράτηση υγρών. **δ) Πνευμονική εμβολή.** Η πνευμονική εμβολή μπορεί να προκαλέσει είτε διίδρωμα είτε εξίδρωμα. Στις περιπτώσεις όπου η εμβολή δεν συνοδεύεται από σημαντική φλεγμονή ή έμφραγμα, παρατηρείται αύξηση της υδροστατικής πίεσης στην πνευμονική κυκλοφορία λόγω απόφραξης των αγγείων. Αυτό οδηγεί σε διήθηση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Αντίθετα, όταν υπάρχει έμφρακτο ή φλεγμονώδης αντίδραση, το υγρό είναι εξιδρωματικού τύπου. **ε) Υποθυρεοειδισμός.** Στον υποθυρεοειδισμό, η παθοφυσιολογία της ΥΣ δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά θεωρείται ότι σχετίζεται με αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών και μειωμένη απορρόφηση λεμφικού υγρού. Η υπολευκωματιναιμία που παρατηρείται σε προχωρημένες μορφές μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της κολλοειδωσμητικής πίεσης. Επίσης, η συσσώρευση βλεννοπολυσακχαριτών στο διάμεσο χώρο μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη κατακράτηση υγρού.

Οι κύριες αιτίες εξιδρωματικών συλλογών περιλαμβάνουν: α) Πνευμονία και άλλες λοιμώξεις του πνεύμονα, β) Φυματίωση, γ) Πρωτοπαθείς ή μεταστατικοί κακοήθεις, δ) Πνευμονική Εμβολή, ε) Αυτοάνοσα νοσήματα, στ) Παγκρεατίτιδα, ζ) Φαρμακευτικές ουσίες.

α) Πνευμονία και άλλες λοιμώξεις του πνεύμονα. Η φλεγμονή του πνευμονικού παρεγχύματος αυξάνει τη διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων, επιτρέποντας τη διήθηση πρωτεϊνών και κυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Σε περιπτώσεις παραπνευμονικών συλλογών, το υγρό μπορεί να εξελιχθεί σε εμπύημα. Χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα LDH, χαμηλό pH (<7.2), χαμηλή γλυκόζη και κυτταρολογική εικόνα με κυριαρχία ουδετερόφιλων. **β) Φυματίωση.** Η φυματιώδης υπεζωκοτική συλλογή προκαλείται από ανοσολογική αντίδραση υπερευαισθησίας τύπου IV σε αντιγόνα του *Mycobacterium tuberculosis*, οδηγώντας σε λεμφοκυτταρική φλεγμονή και αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών. Στο υπεζωκοτικό υγρό κυριαρχούν λεμφοκύτταρα, υψηλή αδενοσίνη δεαμινάση (ADA), χαμηλή γλυκόζη και pH. **γ) Πρωτοπαθείς ή μεταστατικές**

κακοήθειες. Η διήθηση του υπεζωκότα από κακοήγη κύτταρα αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων και μειώνει την απορρόφηση του υγρού, οδηγώντας σε συσσώρευση εξιδρωματικού υγρού με παρουσία κακοήθων κυττάρων, χαμηλό pH και γλυκόζη, υψηλή LDH. **δ) Πνευμονική Εμβολή.** Η απόφραξη των πνευμονικών αγγείων προκαλεί ισχαιμία και φλεγμονώδη αντίδραση, αυξάνοντας τη διαπερατότητα των τριχοειδών και οδηγώντας σε εξιδρωματική συλλογή, συχνά αιμορραγική, με κυριαρχία ουδετερόφιλων. **ε) Αυτοάνοσα νοσήματα** όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα προκαλούν φλεγμονή του υπεζωκότα μέσω ανοσολογικών μηχανισμών, οδηγώντας σε εξιδρωματική συλλογή με κυριαρχία λεμφοκυττάρων, χαμηλή γλυκόζη και pH ενώ έχει αναφερθεί η παρουσία αυτοαντισωμάτων. **στ) Παγκρεατίτιδα.** Η οξεία ή χρόνια παγκρεατίτιδα μπορεί να προκαλέσει διαρροή παγκρεατικών ενζύμων στην υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω συριγγίων ή λεμφικών διαύλων, οδηγώντας σε φλεγμονή και εξιδρωματική συλλογή, με υψηλή αμυλάση, συχνά αιμορραγική, με χαμηλό pH. **ζ) Φαρμακευτικές ουσίες.** Ορισμένα φάρμακα μπορούν να προκαλέσουν υπεζωκοτική φλεγμονή μέσω άμεσης τοξικότητας ή ανοσολογικών μηχανισμών, οδηγώντας σε εξιδρωματική συλλογή, συχνά με παρουσία ηωσινοφίλων, ή/και χωρίς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Ορισμένα φάρμακα που έχουν ταυτοποιηθεί ως αιτίες ΥΣ περιλαμβάνουν τη νιτροφουραντοΐνη, την δαντρολένη, την μεθουσεργίδη, την αμιοδαρόνη, την ιντερλευκίνη-2, την προκαρβαζίνη, τη μεθοτρεξάτη, την κλοζαπίνη, τη φαινυτοΐνη και τους βήτα-αναστολείς.¹⁷²

4.2 Επιδημιολογία ΥΣ

Οι λίγες επιδημιολογικές μελέτες που έχουν δημοσιευθεί για την ΥΣ είναι κυρίως αναδρομικές, μονοκεντρικές και βασισμένες στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Η ετήσια επίπτωση των υπεζωκοτικών παθήσεων (ΥΣ και αυτόματου πνευμοθώρακα) εκτιμάται σε 350–360 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους, και αυτές οι οντότητες συνδέονται με υψηλό κόστος υγειονομικής περίθαλψης.¹⁷³ Αν και υπάρχουν περισσότερες από 60 αναγνωρισμένες αιτίες ΥΣ, τέσσερις αιτιολογίες ευθύνονται για περίπου το 75% των περιπτώσεων:

καρδιακή ανεπάρκεια, καρκίνος, πνευμονία και φυματίωση, κατά σειρά συχνότητας.¹⁵⁴ Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η δημιουργία ΥΥ μπορεί μερικές φορές να οφείλεται σε δύο ή περισσότερες συνυπάρχουσες ασθένειες σε έναν συγκεκριμένο ασθενή.¹⁵² Ένα άλλο, πολύ σπανιότερο φαινόμενο είναι η αμφοτερόπλευρη ΥΣ με διαφορετική αιτία σε κάθε ημιθωράκιο, γνωστή στη βιβλιογραφία ως σύνδρομο Contarini.¹⁷⁴ Ο καρκίνος είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία ΥΣ και, αν και η πρόγνωση αυτής της διάγνωσης είναι κακή, η θνησιμότητα που σχετίζεται με καλοήγη ΥΣ είναι εξίσου σημαντική, όπως δείχνει μια προοπτική μελέτη 356 ασθενών, στην οποία η ΥΣ που συνδέεται με καρδιακές, νεφρικές και ηπατικές παθήσεις είχε ετήσιο ποσοστό θνησιμότητας 50%, 46% και 25% αντίστοιχα.¹⁴⁸

4.3 Διαχείριση των ΥΣ

Οι ΥΣ έχουν ως διάφορες αιτίες που αναφέρθηκαν παραπάνω και μια καθυστερημένη διάγνωση μπορεί να σχετίζεται με σημαντικά υψηλότερη νοσηρότητα και θνησιμότητα, π.χ., αν ο ασθενής αναπτύξει πνευμονικό εμπύημα ως αποτέλεσμα της καθυστερημένης διάγνωσης μιας επιπλεγμένης παραπνευμονική συλλογής. Η προγνωστική σημασία μιας ΥΣ κυμαίνεται από ελάχιστη (όπως όταν μια ΥΣ είναι ένα συνοδευτικό ακτινολογικό εύρημα σε ασθενή με ιογενή πνευμονία) έως πολύ σοβαρή (όπως στην περίπτωση πνευμονικής εμβολής με δευτερογενή συλλογή, μια διάγνωση που δεν είναι σπάνια).

Η λήψη λεπτομερούς κλινικού ιστορικού είναι καθοριστική για τη διάγνωση και την αξιολόγηση της υπεζωκοτικής συλλογής.¹⁷⁵ Ο ασθενής θα πρέπει να ερωτηθεί για πρόσφατες λοιμώξεις, πυρετό, απώλεια βάρους και συνυπάρχοντα νοσήματα, ενώ ιδιαίτερη σημασία έχει η χρονική πορεία των συμπτωμάτων. Επιπλέον, το ιστορικό καρδιακών παθήσεων και η λήψη φαρμάκων μπορεί να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες. Η φυσική εξέταση περιλαμβάνει την ακρόαση των αναπνευστικών ήχων, την εκτίμηση της παρουσίας πλευριτικού τριψίματος και την αξιολόγηση της αμβλύτητας στην επίκρουση. Ο συνδυασμός ιστορικού και φυσικής εξέτασης βοηθά στη διάκριση μεταξύ διιδρώματος και

εξιδρώματος, καθοδηγώντας περαιτέρω διαγνωστικές εξετάσεις, όπως η ακτινογραφία θώρακα, που αποτελεί το πρώτο απεικονιστικό βήμα για την ανίχνευση της συλλογής.

Οι προηγμένες απεικονιστικές τεχνικές, όπως ο υπέρηχος και η αξονική τομογραφία, συμβάλλουν στην ακριβέστερη εκτίμηση της ΥΣ και στη διάγνωση πιθανών υποκείμενων παθολογιών.¹⁷⁶ Ο υπέρηχος θώρακα διευκολύνει την παρακέντηση μειώνοντας τον κίνδυνο επιπλοκών, ενώ η αξονική τομογραφία μπορεί να αποκαλύψει μη εμφανείς αλλοιώσεις στις απλές ακτινογραφίες.^{177,178} Η θωρακοκέντηση είναι απαραίτητη όταν η αιτία της ΥΣ παραμένει αδιευκρίνιστη ή όταν απαιτείται θεραπευτική παρέμβαση λόγω μεγάλης συλλογής που επηρεάζει την αναπνευστική λειτουργία.¹⁷⁹ Σε ασθενείς με γνωστά αίτια, η αντιμετώπιση της υποκείμενης νόσου είναι η κύρια προτεραιότητα.¹⁸⁰ Η χρήση υπερήχου κατά την παρακέντηση και η σωστή χρονική επιλογή της διαδικασίας μειώνουν τον κίνδυνο επιπλοκών, ενώ η παρακολούθηση του ασθενούς μετά την επέμβαση εξασφαλίζει την έγκαιρη ανίχνευση πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών.¹⁸¹

Οι μη κακοήθεις ΥΣ συχνά είναι δείκτες κακής πρόγνωσης σε ασθενείς με καρδιακή, νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια, με ετήσια θνησιμότητα 57%, 46% και 25% αντίστοιχα.¹⁸² Ορισμένες σπανιότερες ασθένειες μπορεί να σχετίζονται με ΥΣ, σχεδόν πάντα εξιδρωματικού τύπου. 30–50% των ασθενών με SLE παρουσιάζουν ΥΣ (“πολυορογονίτιδα”). ΥΣ παρατηρείται επίσης συχνά σε ασθενείς που πάσχουν από κοκκιωμάτωση με πολυαγγειίτιδα (νόσος του Wegener), ρευματοειδή αρθρίτιδα και κοκκιωμάτωση από κύτταρα του Langerhans.¹⁸³ Το 21% των ασθενών που πάσχουν από ιδιοπαθή και οικογενή πνευμονική υπέρταση (iPAH και fPAH) έχουν ΥΣ, κυρίως μονομερή.¹⁸⁴

Μία από τις πιο κοινές αιτίες αδιάγνωστης ΥΣ είναι η πνευμονική εμβολή. Το 20–55% των ασθενών με πνευμονική εμβολή έχουν ΥΣ. Η συχνότητα της ΥΣ στην πνευμονική εμβολή συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της εμβολής και με την εμφάνιση πνευμονικού έμφρακτου. Κλινικά, αυτοί οι ασθενείς χαρακτηρίζονται

από μια εμφανή μεταβλητότητα μεταξύ του όγκου της συλλογής, που συχνά δεν είναι πολύ μεγάλος, και της σοβαρής συνοδού δύσπνοιας.¹⁸⁵

Συνήθως γίνεται προσπάθεια να εντοπιστεί μια ανεξήγητη ΥΣ σε μία μόνο αιτία. Ενόψει της γήρανσης του πληθυσμού και της αντίστοιχης αύξησης της πολυνοσηρότητας, πραγματοποιήθηκε μια προοπτική παρατηρητική μελέτη για να διερευνηθεί το ζήτημα της μονο-αιτιολογίας των ΥΣ. Ο Bintcliffe και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι το 70% των ασθενών (n=126) με ΥΣ είχαν όντως μία μόνο αιτία για αυτήν, αλλά το 30% είχαν περισσότερες από μία αιτίες. Η πολυπαραγοντική ΥΣ μπορεί να παρουσιάσει διαγνωστικές και θεραπευτικές προκλήσεις.¹⁸⁶

4.3.1 Διαχείριση διδρωματικών ΥΣ

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι η συχνότερη αιτία ΥΣ, σε ποσοστό που μπορεί να υπερβαίνει το 35% σε ορισμένες περιπτώσεις.¹⁸⁷ Η μέτρηση του NT-proBNP στο ΥΥ για τη διάγνωση της καρδιακής ανεπάρκειας έχει διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα 94% και 91%, αντίστοιχα.¹⁸⁸ Σε γενικές γραμμές, η ΥΣ εξαφανίζεται στο 89% των περιπτώσεων μετά από 2 εβδομάδες θεραπείας με διουρητικά, αλλά μπορεί να παραμείνει ανθεκτική σε ορισμένους ασθενείς. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η θεραπευτική θωρακοκέντηση μπορεί να είναι μια ικανοποιητική λύση, αλλά αν απαιτούνται περισσότερες από 1-2 διαδικασίες το μήνα, θα πρέπει να εξεταστούν πιο οριστικές επιλογές, όπως η πλευροδεσία με τάλκη ή η εισαγωγή παραμένων υπεζωκοτικού καθετήρα (IPC).¹⁸⁹

Ο ηπατικός υδροθώρακας είναι μια σπάνια επιπλοκή της κίρρωσης του ήπατος.¹⁹⁰ Σε γενικές γραμμές, η παρουσία ηπατικού υδροθώρακα συνδέεται με κακή πρόγνωση και ποσοστό επιβίωσης ενός έτους για το 43% των περιπτώσεων. Η πιο συχνή επιπλοκή είναι το αυτόματο βακτηριακό εμπύημα, που παρατηρείται στο 15% των κίρρωτικών ασθενών με ΥΣ.¹⁹¹ Περιστασιακά, το ΥΥ σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος μπορεί να είναι χυλοθώρακας. Αν ο ΗΥ είναι ανθεκτικός στη βέλτιστη θεραπεία, η μεταμόσχευση ήπατος είναι η κύρια θεραπεία.¹⁹² Αν η μεταμόσχευση αντενδείκνυται και η ΥΣ επανεμφανίζεται, μια εναλλακτική λύση είναι η εμφύτευση διασφαγειακού ενδοηπατικού

πυλαιοσυστηματικού shunt (TIPS) ή η χειρουργική επιδιόρθωση του διαφράγματος. Αν η ΥΣ συνεχίζει να επανεμφανίζεται, μπορεί να επιχειρηθεί η πλειοδεσία με τάλκη ή η εισαγωγή IPC.¹⁹³

Η φλεγμονή του υπεζωκοτικού χώρου μπορεί να εξελιχθεί σε «παγιδευμένο πνεύμονα», μια ινώδης μεμβράνη στο σπλαχνικό υπεζωκότα που εμποδίζει την έκπτυξη του πνεύμονα και αυξάνει την αρνητική πίεση στον υπεζωκοτικό χώρο, παράγοντας ΥΣ. Σε αυτή την περίπτωση, το ΥΥ, από βιοχημικής άποψης, θα ήταν διίδρωμα, αν και σε αρχικό στάδιο, στο οποίο η νόσος είναι ακόμη ενεργή και οι πρωτεΐνες μπορεί να βρίσκονται στο εύρος των εξιδρωμάτων.¹⁹⁴

Ένα μικρό ποσοστό κακοήθων ΥΣ συμπεριφέρεται ως διίδρωμα, πιθανότατα επειδή το ΥΥ συσσωρεύεται λόγω μπλοκαρισμένης λεμφικής αποχέτευσης. Η εφαρμογή προβλεπτικών μοντέλων που περιλαμβάνουν κλινικές, ακτινολογικές και εργαστηριακές παραμέτρους θα βοηθήσει στον εντοπισμό διιδρωμάτων που απαιτούν κυτταρολογικό έλεγχο για να αποκλειστεί το κακοήθες ΥΥ.¹⁹⁵

Τα διιδρώματα μπορούν επίσης να εμφανιστούν σε λιγότερο συνήθεις καταστάσεις, όπως σε ασθενείς που λαμβάνουν περιτοναϊκή κάθαρση και έχουν επίσης υποβληθεί σε θεραπεία με IPC.¹⁹⁶

4.3.2 Διαχείριση λοιμωδών ΥΣ

Η παραπνευμονική ΥΣ (PPE) είναι συλλογή που σχετίζεται με λοίμωξη των πνευμόνων, συνήθως πνευμονία, απόστημα ή μολυσμένη βρογχεκτασία.¹⁹⁷ Όταν δεν σχετίζεται με λοίμωξη των πνευμόνων, αναφέρεται ως λοιμώδης ΥΣ. Έως και το 54% των πνευμονιών που μελετήθηκαν με υπερηχογράφημα θώρακα συνοδεύονται από PPE κατά την κλινική τους πορεία, και περίπου το 40% από αυτές είναι επιπλεγμένες PPE ή εμπύημα.¹⁹⁸

Οι απλές PPE είναι εξιδρωματικές ΥΣ και ανταποκρίνονται θετικά στη θεραπεία μόνο με αντιβιοτικά. Οι επιπλεγμένες PPE είναι ινωδοπυώδεις ΥΣ και παρουσιάζουν προβλήματα όπως θολό ΥΥ με κυρίως πολυμορφοπύρηνα κύτταρα και μικροοργανισμούς, pH <7,20, χαμηλή γλυκόζη και υψηλή LDH, και την παρουσία ινώδους διαφραγμάτων στον υπεζωκοτικό χώρο. Αυτές οι

λοιμώδεις ΥΣ απαιτούν όχι μόνο θεραπεία με αντιβιοτικά αλλά και παροχέτευση θώρακος ή χειρουργική επέμβαση για την επίλυσή τους. Τέλος, το οργανωμένο εμπύημα, που ορίζεται από την παρουσία πύου στον υπεζωκοτικό χώρο, απαιτεί πάντοτε παροχέτευση. Η κλινική βαθμολογία RAPID, η οποία βασίζεται στην αρχική ουρία ορού, την ηλικία του ασθενούς, την πυκνότητα του ΥΥ, την πηγή της λοίμωξης και την αλβουμίνη ορού, είναι χρήσιμη για την εκτίμηση του κινδύνου θανάτου σε τρεις μήνες και τη διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο σε ασθενείς με PPE και για τον εντοπισμό των δυνητικά επιπλεγμένων PPE, αλλά δεν εφαρμόζεται στο εμπύημα. Πιο πρόσφατα, η πιλοτική μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς χαμηλού κινδύνου (βαθμολογία RAPID 0–2) είχαν ποσοστό θνησιμότητας σε τρεις μήνες 2,3%, οι ασθενείς μεσαίου κινδύνου (βαθμολογία RAPID 3–4) 9,2%, και οι ασθενείς υψηλού κινδύνου (βαθμολογία RAPID 5–7) 29,3%.¹⁹⁹ Το ποσοστό απομόνωσης μικροοργανισμών ποικίλλει ευρέως και μπορεί να βελτιωθεί με την ενσωμάτωση τεχνικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), την καλλιέργεια υπεζωκοτικού υγρού σε φιάλες καλλιέργειας αίματος (BACTEC) και την καλλιέργεια από βιοψία υπεζωκότα.²⁰⁰

Ασθενείς με πνευμονία που αναπτύσσουν επιπλέον PPE έχουν υψηλότερη θνησιμότητα. Το ίδιο ισχύει σε ακόμη μεγαλύτερο βαθμό για το εμπύημα του υπεζωκότα, μια κατάσταση της οποίας η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται. Η θνησιμότητα των νοσοκομειακών υπεζωκοτικών λοιμώξεων είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή των λοιμώξεων που αποκτώνται στην κοινότητα (47% έναντι 17%).²⁰¹ Οι καθυστερήσεις στη διάγνωση ενός εμπυήματος και οι καθυστερήσεις στη σωστή θεραπεία αποστράγγισης είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες. Αυτά τα μέτρα πρέπει να ληφθούν χωρίς καθυστέρηση μετά την έναρξη της αντιβιοτικής θεραπείας σύμφωνα με τις υπάρχουσες κατευθυντήριες γραμμές.²⁰²

Η κατάλληλη θεραπεία του PPE περιλαμβάνει εμπειρικά αντιβιοτικά με κάλυψη των αναερόβιων, που πρέπει να ξεκινούν άμεσα και να προσαρμόζονται σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων και το προφίλ ευαισθησίας του ΥΥ.²⁰³ Τα θωρακικά σωληνάρια ενδείκνυνται σε όλες τις περιπτώσεις επιπλεγμένων PPE ή εμπυήματος.²⁰⁴ Αν υπάρχουν διαφράγματα

στην υπεζωκοτική κοιλότητα και στο εμπύημα, η ενδοπλευρική ενζυμική θεραπεία θα πρέπει να ξεκινήσει νωρίς. Οι ινωδολυτικοί παράγοντες σπάνε τα ινώδη διαφράγματα, διευκολύνουν την παροχέτευση του ΥΥ και προλαμβάνουν το σχηματισμό διαφραγμάτων στην υπεζωκοτική κοιλότητα.²⁰⁵ Σε ασθενείς με επιπλεγμένη PPE ή εμπύημα, η ενδοπλευρική ινωδολυτική θεραπεία συσχετίστηκε με μειωμένη ανάγκη για χειρουργική επέμβαση και λιγότερες συνολικές αποτυχίες θεραπείας, αλλά δεν παρατηρήθηκε επίδραση στη θνησιμότητα.²⁰⁶

Η Φυματιώδης ΥΣ (TBPE) είναι η πιο κοινή εξωπνευμονική εκδήλωση της φυματίωσης μετά την εμπλοκή των λεμφαδένων.²⁰⁷ Συνήθως, η TBPE είναι εξιδρωματική με αριθμό πυρηνωδών κυττάρων που κυμαίνεται στις περισσότερες περιπτώσεις από 1000 έως 6000 κύτταρα/mm, συνήθως με περιεχόμενο κυρίως λεμφοκυττάρων >50% (μερικές φορές ακόμα και >90%) ή λόγο λεμφοκυττάρων/ουδετερόφιλων >0.75. Η απαμινάση της αδενοσίνης (ADA) παραμένει ο πρωταρχικός βιοδείκτης για την TBPE με συνολική ευαισθησία 92% και ειδικότητα 90%.²⁰⁸ Επιπλέον, η ιντερφερόνη γάμμα (INF-γ) είναι μια βασική κυτταροκίνη στην ανοσοπαθογένεση της μυκοβακτηριακής λοίμωξης εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και η ειδικότητα για τη διάγνωση της TBPE, με ορισμένες μελέτες να αναφέρουν τιμές άνω του 85% και 95% αντίστοιχα.²⁰⁹ Για την αποφυγή περαιτέρω εξετάσεων, η συνδυασμένη χρήση παραμέτρων έχει επίσης αποδειχθεί ότι βελτιώνει τη διάγνωση της TBPE.²¹⁰ Η οριστική διάγνωση της TBPE βασίζεται στην ταυτοποίηση του *Mycobacterium tuberculosis* σε πτύελα, υπεζωκοτικό υγρό ή δείγματα βιοψίας.²¹¹ Η τυπική θεραπεία πρώτης γραμμής είναι η ίδια με αυτή της πνευμονικής φυματίωσης, ενώ η χρήση αντιφλεγμονωδών, όπως τα κορτικοστεροειδή συνιστάται μόνο σε ασθενείς που παραμένουν πολύ συμπτωματικοί μετά από εβδομάδες θεραπείας.²¹² Παρά την καλή ανταπόκριση στην αντιφυματική θεραπεία, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η πρόοδος μπορεί να είναι κακή και να αναπτυχθούν επιπλοκές όπως το φυματιώδες πύο, που απαιτεί χειρουργική θεραπεία.²¹³

4.3.3 Διαχείριση κακοήθων ΥΣ

Η κακοήθης ΥΣ (ΜΡΕ) είναι το αποτέλεσμα της άμεσης διήθησης του υπεζωκότα από νεοπλασματικά κύτταρα. Η παρακακοήθης ΥΣ συνδέεται με τον πρωτογενή όγκο, αλλά τα καρκινικά κύτταρα δεν διηθούν άμεσα τον υπεζωκότα.²¹⁴ Τα καρκινώματα του πνεύμονα και του μαστού αντιπροσωπεύουν έως και το 75% όλων των ΜΡΕ, ενώ το μεσοθηλίωμα αντιπροσωπεύει το 10%.²¹⁵

Η απεικονιστική τεχνική επιλογής είναι η αξονική τομογραφία (CT) με αντίθεση. Υπάρχουν κάποια ευρήματα CT που μπορεί να υποδεικνύουν την κακοήγη προέλευση της συλλογής με ευαισθησία άνω του 88%, όπως η περιφερειακή πάχυνση της επιφάνειας του υπεζωκότα, η οζώδης πάχυνση της επιφάνειας του υπεζωκότα, η εμπλοκή του μεσοθωρακικού υπεζωκότα ή η παρουσία πρωτογενούς όγκου.²¹⁶ Η οριστική διάγνωση της ΜΡΕ βασίζεται στην ανίχνευση νεοπλασματικών κυττάρων στο υγρό και/ή στον υπεζωκοτικό ιστό. Η διαγνωστική απόδοση της κυτταρολογίας του ΥΥ κυμαίνεται από 49% έως 91% ενώ η επανάληψη της κυτταρολογικής μελέτης περισσότερες από δύο φορές δεν βελτιώνει την απόδοση, και η προσθήκη βιοψίας συνιστάται όταν απαιτείται δεύτερη κυτταρολογία.²¹⁷

Η καθοδηγούμενη με υπερηχογράφημα βιοψία του υπεζωκότα (PB) ενδείκνυται ιδιαίτερα παρουσία πάχυνσης ή μαζών στον υπεζωκότα. Αναφερόμενη ευαισθησία κυμαίνεται από 76% έως 93%, με ειδικότητα 100%.²¹⁸ Η CT-καθοδηγούμενη PB μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί, προσφέροντας απόδοση παρόμοια με αυτή του υπερηχογραφήματος.²¹⁹ Η θωρακοσκόπηση με PB είναι το χρυσό πρότυπο στη διάγνωση της ΜΡΕ και έχει διαγνωστική απόδοση μεταξύ 90% και 100%.²²⁰ Μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό γενική αναισθησία στην αίθουσα χειρουργείου (χειρουργική θωρακοσκόπηση) ή υπό βαθειά καταστολή και τοπική αναισθησία στην αίθουσα αναπνευστικής ενδοσκόπησης (ιατρική θωρακοσκόπηση) με παρόμοια διαγνωστική απόδοση, επιπλοκές και ευαισθησία περίπου 95%.²²¹

Η διάγνωση της ΜΡΕ συνεπάγεται υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα.²²² Πολλά προγνωστικά μοντέλα έχουν προταθεί για να βοηθήσουν στη λήψη κλινικών αποφάσεων, αλλά μόνο ένα έχει επικυρωθεί εξωτερικά, δηλαδή η

κλίμακα προγνωστικής στρατηγικής LENT που βασίζεται σε 4 παραμέτρους: επίπεδα LDH στο υπεζωκοτικό υγρό, κλίμακα ECOG, λόγος ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων στο αίμα και τύπος όγκου.²²³ Οι ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες ή υπεζωκοτικό μεσοθηλίωμα ζουν σχεδόν ένα έτος κατά μέσο όρο, ενώ οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα έχουν τη χειρότερη πρόγνωση, με μέσο χρόνο επιβίωσης μόλις 2–3 μήνες. Το σκορ LENT επιτρέπει μια αρκετά ακριβή στρωματοποίηση σε ομάδες υψηλού, μεσαίου και χαμηλού κινδύνου, κάτι που μπορεί να βοηθήσει στη λήψη αποφάσεων σχετικά με την επεμβατικότητα της περαιτέρω θεραπείας.²²⁴

Οι περισσότερες MPE προκαλούν συμπτώματα, και η έκταση της ΥΣ συνδέεται με την πιθανότητα κακοήθειας, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η (μονομερής) συλλογή, τόσο πιο πιθανό είναι ο καρκίνος να είναι η αιτία. Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο συνηθισμένη αιτία, αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το ένα τρίτο των περιπτώσεων, ακολουθούμενος από τον καρκίνο του μαστού (16,8%) και το κακόηθες λέμφωμα (11,5%). Η επιλογή μεταξύ των διαθέσιμων θεραπευτικών επιλογών θα πρέπει να γίνεται με βάση τα συμπτώματα, την κλινική κατάσταση του ασθενούς, τον τύπο του όγκου, την ανταπόκριση στη συστηματική θεραπεία και την επαναδιόγκωση του πνεύμονα μετά από θεραπευτική παρακέντηση. Αυτές οι επιλογές περιλαμβάνουν:

- Αναμονή και παρακολούθηση
- Θεραπευτική αφαίρεση του υπεζωκοτικού υγρού με παρακέντηση
- Εισαγωγή υπεζωκοτικού σωλήνα και ενστάλαξη παράγοντα πλευροδέσεως
- Πλευροδέση μέσω θωρακοσκόπησης
- Εισαγωγή υπεζωκοτικού καθετήρα

Ο κύριος στόχος της θεραπείας της MPE είναι η μείωση των συμπτωμάτων και η βελτίωση της ποιότητας ζωής. Η τρέχουσα σύσταση είναι να προσφέρεται πρώιμη οριστική θεραπεία για τον έλεγχο της MPE και να μην περιμένουμε την επίδραση των στοχευμένων θεραπειών.²²⁵ Η θεραπευτική θωρακοκέντηση δεν

συνιστάται ως μοναδικό θεραπευτικό μέτρο, εκτός αν οι ασθενείς έχουν σύντομο προσδόκιμο ζωής (λιγότερο από 1 μήνα). Προσθήκη IPC χρησιμεύει σε περιπτώσεις όπου η πλευροδέση αντενδείκνυται ή έχει αποτύχει, καθώς και σε περιοπτώσεις κακής λειτουργικής κατάστασης. Αυτή είναι πλέον μια πρώτη επιλογή που επιτρέπει την μεταφορά της θεραπευτικής διαδικασίας σε εξωτερικό ιατρείο.²²⁶

4.4 Αυτοαντισώματα σε ΥΣ

Ενώ τα ΦΑ είναι καλά περιγεγραμμένα στον ορό, λιγότερα είναι γνωστά για τη σημασία τους στο ΥΥ και άλλες εσωτερικές εκκρίσεις του σώματος. Αυτό οφείλεται κυρίως στη δυσκολία συλλογής ανθρώπινων δειγμάτων από αυτές τις συγκεκριμένες πηγές, ειδικά σε υγιείς συνθήκες.²²⁷ Οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί κυρίως στα αυτοαντισώματα IgG που προκύπτουν φυσικά ή σχετίζονται με ασθένειες. Για παράδειγμα, υψηλά επίπεδα αντισωμάτων κατά του κυκλικού κιτρολινωμένου πεπτιδίου (anti-CCP) μαζί με κυτταρολογικά ευρήματα είναι χρήσιμα στη διάγνωση ΥΣ που προκαλείται από ρευματοειδή αρθρίτιδα χωρίς ιστορικό τραύματος και χωρίς εκδηλώσεις λοίμωξης, κακοήθειας ή αυτοάνοσων νοσημάτων.²²⁸ Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) στο ΥΥ αποτελούν δυνητικούς διαγνωστικούς δείκτες στη διάκριση της λύκου πλευρίτιδας από ΥΣ άλλων αιτιολογιών, ενώ έχουν επίσης ανιχνευθεί αντισώματα κατά του δίκλωνου DNA (anti-dsDNA).²²⁹ Η αγγειίτιδα που σχετίζεται με τα αντισώματα κατά του κυτταροπλάσματος ουδετερόφιλων (ANCA), μια ετερογενής ομάδα συστηματικών αγγειιτίδων, προσβάλλει κυρίως μικρά αιμοφόρα αγγεία που περιστασιακά οδηγούν σε ΥΣ, και τα ANCA που ανιχνεύονται στον ορό και το ΥΥ έχουν συσχετιστεί με τη διάγνωση των ασθενών.^{230,231} Επιπλέον, οι ΥΣ που προκαλούνται από το σύνδρομο Sjögren είναι θετικές για τον ρευματοειδή παράγοντα, ANA, αντισώματα κατά των αντιγόνων SS-A και SS-B.²³² Αυτοαντισώματα που στοχεύουν την πρωτεΐνη p53 έχουν ανιχνευθεί σε MPE, χωρίς όμως να υπάρχει σταθερή σύνδεση με την παρουσία ή απουσία καρκινικών κυττάρων στο υγρό.²³³ Ωστόσο, τα αντι-p53 ΦΑ έχουν επίσης ανιχνευθεί σε μη-κακοήθεις συλλογές, όπως η ΤΡΕ.²³⁴ Σε άλλη

μελέτη, υψηλή συγκέντρωση αυτοαντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης Bcl-2-like 11 (BIM) ανιχνεύθηκε στον ορό και στο υγρό ασθενών με MPE σε σύγκριση με TBPE, με πιθανή προστιθέμενη αξία στη διαφορική διάγνωση.²³⁵ Τέλος, μια μελέτη που επικεντρώθηκε στα επίπεδα IgM και IgA ΦΑ κατά της κίτρινης συνθάσης (anti-CS) στο ΥΥ παρείχε ενδείξεις ότι τα ΦΑ υπάρχουν στο ΥΥ και έδειξε σημαντική συσχέτιση με συγκεκριμένα αντιβακτηριακά αντισώματα ύστερα από λοίμωξη.²³⁶

Οι ανοσολογικές αποκρίσεις εντός της κοιλότητας ενορχηστρώνονται από τα λευκοκύτταρα, τα οποία εδράζουν στον SALC που περιλαμβάνει τα λεμφικά θυλάκια που βρίσκονται στις ορογόνες κοιλότητες και συμβάλλουν στην άμυνα των ορογόνων μεμβρανών έναντι παθογόνων και στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών.²³⁷ Τα B-1 κύτταρα αποτελούν την κυρίαρχη υποομάδα λεμφοκυττάρων στον SALC και υπεύθυνα για την παραγωγή ΦΑ, διαδραματίζοντας σημαντικούς ομοιοστατικούς ρόλους, καθώς και ρόλο πρώτης γραμμής άμυνας στις τοπικές και συστηματικές ανοσολογικές αποκρίσεις.²³⁸ Παρόλο που τα IgA ΦΑ βρίσκονται σε αφθονία στις εκκρίσεις, είναι σημαντικό να τονιστεί και ο απαραίτητος ρόλος των IgM ΦΑ στις εκκρίσεις και στη ρύθμιση της ανοσίας σε αυτά τα σημεία.²³⁹ Η παραγωγή τους περιλαμβάνει τη ρύθμιση της κατανομής των B-1 κυττάρων, εξασφαλίζοντας την στοχευμένη παραγωγή IgM ΦΑ.²⁴⁰ Για παράδειγμα, σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα λοίμωξης του υπεζωκότα από το νηματώδες *Litomosoides sigmodontis* και τον μύκητα *Alternaria alternata*, η επαγόμενη οξεία πνευμονική φλεγμονή στην πλευρική κοιλότητα ενεργοποιεί γρήγορα τα B-1 κύτταρα μέσω παραγωγής IL-5, οδηγώντας σε τοπική παραγωγή IgM ΦΑ.²⁴¹ Έχει ήδη περιγραφεί στο ποντικό, πως μετά από έκθεση σε LPS, τα B-1 κύτταρα μεταναστεύουν, κυρίως εγκαταλείποντας την περιτοναϊκή κοιλότητα για να κατευθυνθούν προς τις θέσεις φλεγμονής, ωστόσο λιγότερα είναι γνωστά για τα υπολείμματα των πλευριτικών B-1 κυττάρων.²⁴²

Με βάση τα εισαγωγικά στοιχεία, η συσσώρευση ΥΥ σε διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως καρδιακή ανεπάρκεια, κακοήθειες, λοιμώξεις ή άλλες αιτίες,

μπορεί να οδηγήσει σε ΥΣ, μια κοινή πάθηση που επηρεάζει εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. Παρόλο που έχει αποδειχθεί η παρουσία Β1 λεμφοκυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα, η ανοσολογία του υπεζωκοτικά παραμένει ασαφής. Επιπλέον, η ανίχνευση και η μελέτη των ΦΑ στις ΥΣ είναι ελλιπής, με ελάχιστα διαθέσιμα δεδομένα. Τα ΦΑ αναγνωρίζουν εξ ορισμού τεράστια ποικιλία αυτό και ετεροαντιγόνα ή αντιγόνα του εαυτού και του ξένου, με αποτέλεσμα να είναι εξαιρετικά δύσκολο να οριστεί ένας ελάχιστος αριθμός στόχων των ΦΑ που να αντανάκλα την κατάσταση της φυσικής αυτοανοσίας στον άνθρωπο. Η διάγνωση της ΥΣ συχνά απαιτεί τον προσδιορισμό της αιτίας της συσσώρευσης του ΥΥ, κάτι που σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι αρκετά δύσκολο στην κλινική πράξη.

Ειδικό Μέρος

Σκοπός

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνήσει αν το υπεζωκοτικό υγρό περιέχει ΦΑ διαφορετικών τάξεων (IgM, IgA, και IgG) και ειδικοτήτων έναντι μιας σειράς οκτώ (8) αντιγόνων του εαυτού και του ξένου, χαρακτηρισμένων στόχων των ΦΑ, αναλύοντας τυχόν διακυμάνσεις των επιπέδων τους στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό ασθενών με ΥΣ ποικίλης αιτιολογίας. Οι μετρήσεις των επιπέδων των ΦΑ πραγματοποιήθηκαν με έμμεση ELISA, δομικμασίες που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο και προσαρμόστηκαν με βάση το αντιγόνο στόχο και την τάξη των ΦΑ που ανιχνεύονταν σε κάθε περίπτωση με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεθόδου ανά συνθήκη. Επιπλέον, η μελέτη επιδίωξε να εξετάσει τη δυνητική χρήση των επιπέδων των ΦΑ ως βιοδείκτες για τη διαφοροποίηση των αιτίων των ΥΣ.

Συγκεκριμένα, οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

1. Η διερεύνηση της πιθανής τοπικής παραγωγής, παρουσίας και των επιπέδων των τριών κύριων τάξεων ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό ασθενών με ΥΣ διαφορετικής αιτιολογίας.
2. Η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων των επιπέδων αυτών των ΦΑ με την ολική συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών στο υπεζωκοτικό υγρό για τη κάθε τάξη και άλλες βιοχημικές παράμετρους που μετρήθηκαν κατά τη βιοψία (pH, γλυκόζη, ολική πρωτεΐνη, αλβουμίνη, LDH και αδενοσινοδιαμινάση).
3. Η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων των επιπέδων των ΦΑ με την αιτιολογία των ΥΣ και της της πιθανής αξιοποίησής τους ως βιοδείκτες για τη διαφοροδιάγνωση των ΥΣ.

Τα ευρήματα αυτής της μελέτης θα προσφέρουν νέες γνώσεις για τη φυσική ανοσία στην κοιλότητα και τον ρόλο των ΦΑ στην παθοφυσιολογία διαφόρων τύπων ΥΣ. Τα αποτελέσματα πιθανά να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων με δυνητική αξιοποίηση στη διαφοροδιάγνωση και τη διαχείριση των ΥΣ.

5. Υλικά

5.1 Αναλώσιμα και Συσκευές

Πίνακας 1: Είδη αναλωσίμων της μελέτης

Είδος	Εταιρεία
Σωληνάρια τύπου falcon 50 και 15 ml	Brand, Γερμανία
Σωληνάρια τύπου erpendorf 1,5 ml	
Σωληνάρια πολυπροπενίου 1,3 ml	
Πλαστικές πιπέτες των 10 ml, 5 ml και 2ml	
Πλάκες πολυστυρενίου μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα για ELISA	

Πίνακας 2: Συσκευές και όργανα της μελέτης

Συσκευές/ Όργανα	Εταιρεία	Μοντέλο
Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους	LKB Biochrom, Ηνωμένο Βασίλειο	Ultrospec II
Φασματοφωτόμετρο πλακών ELISA	TECAN, Grödig/Salzburg, Αυστρία	TECAN Spark Control Magellan V2.2
Φυγόκεντρος	Sigma, ΗΠΑ	4K10
Νεφελομετρητής	Beckman Coulter, ΗΠΑ	IMAGE [®] 800 Protein Chemistry Analyzer

5.2 Διαλύματα-Χημικά

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (KP) 1 M και 0,1M, pH 7,4:** Σε διάλυμα K_2HPO_4 1M προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος KH_2PO_4 1M έτσι ώστε το pH του τελικού διαλύματος να γίνει 7,4. Για διάλυμα 0,1 M προστίθενται 100 ml διαλύματος KP 1M και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L. Αναλυτικά, διάλυμα μονόξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4) 1M [228 gr $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ M.B. 228,23 g/mol (Merck) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό (dH_2O)] & Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) 1M [136 gr KH_2PO_4 M.B. 136,08 g/mol (Merck) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό].
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσία χλωριούχου νατρίου [Phosphate Buffered Saline (PBS)]:** Σε 9 gr χλωριούχου νατρίου (NaCl) M.B. 58,4 g/mol (Merck) προστίθενται 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα KP 1M, pH 7,4 και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό
- **PBS – Tween 0,1%:** Σε 1 L PBS προστίθεται 1 ml Tween 20 (Merck)
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl παρουσία χλωριούχου νατρίου [Tris Buffered Saline (TBS)]:** Σε 9 gr NaCl (Merck) προστίθενται 3 gr Tris M.B. 121,1 g/mol (Merck). Η ρύθμιση του pH στο 7,4 γίνεται με προσθήκη διαλύματος HCl 25% (Merck) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού-διττανθρακικού νατρίου [Carbonate BiCarbonate (CBC)] 1M, pH 9,6:** Σε 35 gr ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) (Merck) προστίθενται 56 gr όξινο ανθρακικό νάτριο ($NaHCO_3$) (Merck) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1 L με απεσταγμένο νερό. Για χρήση αραιώνεται 10 φορές με απεσταγμένο νερό
- **Υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης:** Σε 20 mg π-νιτροφαινόλη (PNPP) (Sigma) προστίθενται 20 ml διαλύματος αλκαλικής φωσφατάσης, 0,1 M

διάλυμα γλυκίνης – καυστικού νατρίου (NaOH) pH 10,4, 1 mM MgCl₂ (Merck) και 1 mM ZnCl₂ (Merck).

5.3 Αντιγόνα

Για τη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντιγόνα και αντιγόνα τα οποία παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ) με βάση καθιερωμένης μεθοδολογίας. Τα χαρακτηριστικά των επιλεγμένων αντιγόνων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά αντιγόνων της μελέτης

Ονομασία	Είδος	Προέλευση (ιστός, κύτταρα)	Παρασκευή	Κωδικός/ Βιβλιογραφία
Ακτίνη (G actin)	Άνθρωπος	Μυϊκός ιστός	εργ. Ανοσολογίας ΕΙΠ	8,9
Μυοσίνη (Muscle myosin)	Άνθρωπος	Μυϊκός ιστός	εργ. Ανοσολογίας ΕΙΠ	8,9
Θυρεοσφαιρίνη (Tg)	Άνθρωπος	Θύμος αδένας	εργ. Ανοσολογίας ΕΙΠ	8,9
DNA (native)	Βοοειδές	Θύμος αδένας	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ΗΠΑ	D1501
TNP (Tri- Nitro- Phenyl)	Συνθετικό	Πρόσδεση TNP σε πρωτεϊνικό φορέα (BSA)	εργ. Ανοσολογίας ΕΙΠ	243
Λιποπολυσακχαρίτης (LPS)	Βακτήριο (Gram-)	<i>Escherichia coli</i>	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	L2880
Υαλουρονιδάση	Βοοειδές	Όρχεις	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	H3884
Καρβονική Ανυδράση (CA II)	Βοοειδές	Ερυθροκύτταρα	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	C3934

5.4 Δευτερογενή αντισώματα

Αντισώματα κασίκας που αναπτύχθηκαν έναντι ανοσοσφαιρινών ανθρώπου τάξης IgM (109-055-129), IgA (109-055-011) και IgG (109-055-088) συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (anti-human specific - AP conjugated) (Jackson ImmunoResearch, Ηνωμένο Βασίλειο).

5.5 Πρότυπα δείγματα (Standards)

N/T Protein Control SL/M, Siemens Γερμανίας: Είναι βαθμονομημένα δείγματα ποιοτικού ελέγχου, πολλαπλών αναλυτών, που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ακρίβειας και επαναληψιμότητας (precision control) στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών του ανθρώπινου ορού μέσω ανοσονεφελομετρίας, με τα συστήματα BN Systems της Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, και συγκεκριμένα τον προσδιορισμό των ανθρώπινων IgG, IgM, IgA

6. ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Δειγματοληψία

Δείγματα συλλέχθηκαν από 63 ασθενείς με ΥΣ, οι οποίοι διαγνώστηκαν στο Τμήμα Πνευμονολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, για την περίοδο 2019 έως 2023 (**Πίνακας 4**). Βιοχημικά δεδομένα [pH, γλυκόζη, ολική πρωτεΐνη, αλβουμίνη, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDH) και αδενοσινοδιαμινάση (ADA), μέγεθος της συλλογής] συλλέχθηκαν επίσης από τις βιοψίες κατά τη διάγνωση των ασθενών. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 4 ομάδες: α) ΥΣ από συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (CHFPE), β) Μη λοιμώδεις ΥΣ (NIPE), γ) Παραπνευμονικές ΥΣ (PPE) και δ) Κακοήθεις ΥΣ (MPE). Παρόλο που οι MPE αποτελούν μια ετερογενή ομάδα ασθενών, συχνά μοιράζονται χαμηλά επίπεδα ΦΑ κατά γλυκανών ως κοινό ανοσολογικό χαρακτηριστικό και συνεπώς για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης οι MPE αναλύθηκαν ως μία οντότητα. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Θεσσαλίας (Αριθμός: 29268/16-07-2019) και η ενήμερη συγκατάθεση λήφθηκε από όλους τους συμμετέχοντες.

Πίνακας 4: Ομάδες ασθενών και δημογραφικά στοιχεία συμμετεχόντων

ΥΣ	Διάγνωση	N, %	Ηλικία (m,SD)	Φύλο (Α/Θ)	Κάπνισμα (N, %)
CHFPE	Διιδρωματική	6, 9.5%	74±6	4/2	4/6, 66.6%
NIPE	Εξιδρωματική	15, 23.8%	74±17	12/3	10/15, 66.6%
PPE	Εξιδρωματική	14, 22.2%	65±12	10/4	7/14, 50%
MPE	Εξιδρωματική	28, 44.4%	69±10	19/9	19/29, 65.5%
Total		63	70±12	45/18	40/63, 63.5%

6.2 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA)

Βασική αρχή: Η κλασική δοκιμασία ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) στηρίζεται στη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Τα αντισώματα που βρίσκονται στο δείγμα αντιδρούν με αντιγόνα που είναι ακινητοποιημένα σε φρεάτια πλακών μικροτιτλοδότησης. Μετά την απομάκρυνση των ελεύθερων αντισωμάτων με πλύσεις, η παρουσία και η ποσότητα του προσδεσμένου αντισώματος ανιχνεύεται με την προσθήκη αντι-ισοτυπικού αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο. Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος απομακρύνεται με πλύσεις και προστίθεται το άχρωμο υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο με τη βοήθεια του ενζύμου μετατρέπεται σε έγχρωμο προϊόν. Στα ένζυμα που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται η αλκαλική φωσφατάση, η υπεροξειδάση και η β-γαλακτοσιδάση. Η ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος μετράται σε ειδικό φασματοφωτομετρικό μετρητή πλακών.

Τα επίπεδα των ΦΑ εκτιμήθηκαν με δοκιμασίες έμμεσης ELISA που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο για τους επιλεγμένους αντιγονικούς στόχους. Συνοπτικά, τα αντιγόνα αραιώθηκαν σε διάλυμα ανθρακικού-διττανθρακικού ρυθμιστικού διαλύματος 0.1M pH 9.6 σε έλτιστες ανα αντιγόνο συνθήκες και

επωάστηκαν όλη τη νύχτα στους 4°C στις μικροπλάκες. Οι πλάκες στη συνέχεια πλύθηκαν καλά με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) pH 7.4 και κορεστήθηκαν με PBS που περιείχε 1% BSA (PBS-BSA 1%, 150 μl/φρέατιο) για 1 ώρα στους 37°C. Τα δείγματα αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (μπλοκάρισμα με 0.05% Tween) σε κατάλληλες ανα αντιγόνο αραιώσεις και επωάστηκαν (100 μl/φρέατιο) για 2 ώρες στους 37°C. Τόσο το πλευριτικό υγρό όσο και ο ορός για κάθε άτομο δοκιμάστηκαν στην ίδια αραιώση, παράλληλα στο ίδιο πείραμα. Μετά από εκτεταμένο πλύσιμο, προστέθηκαν δευτερογενή αντισώματα συνδεδεμένα με αλκαλική φωσφατάση έναντι των IgM, IgA και IgG σε τελική συγκέντρωση 0.1 μg/ml (100 μl/φρέατιο) και επωάστηκαν για 2 ώρες στους 37°C. Μετά από εκτεταμένο πλύσιμο, η δέσμευση των αντισωμάτων αξιολογήθηκε με την προσθήκη του υποστρώματος PNPP και η οπτική πυκνότητα (OD) του έγχρωμου προϊόντος μετρήθηκε στα 450nm (αναφορά στα 620nm) σε φωτόμετρο TECAN. Για την κανονικοποίηση μεταξύ των δοκιμών, χρησιμοποιήθηκαν τρεις θετικοί και τρεις αρνητικοί έλεγχοι σε κάθε πλάκα και η διακύμανση μεταξύ των δοκιμασιών περιορίστηκε σε λιγότερο από 10%. Χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη υπεζωκοτικού υγρού και ορού από κάθε ασθενή και υπολογίστηκε για κάθε ασθενή ο λόγος υπεζωκοτικού υγρού προς ορό (PF/S). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν παράλληλα και στην ίδια αραιώση.

6.3 Μέτρηση ολικής συγκέντρωσης ανοσοσφαιρίνης με Νεφελομετρία

Η βασική αρχή της νεφελομετρίας βασίζεται στη μέτρηση της σκέδασης του φωτός από ένα αιώρημα σωματιδίων, όπως τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος. Όταν ένα δείγμα που περιέχει ανοσοσφαιρίνες αναμειγνύεται με ειδικά αντιδραστήρια, σχηματίζονται σύμπλοκα που διαχέουν το φως. Η ένταση της διάχυσης του φωτός είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο δείγμα, επιτρέποντας την ακριβή ποσοτικοποίησή τους μέσω της νεφελομετρικής ανάλυσης.

Η νεφελομετρία είναι μια γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων ανοσοσφαιρινών (Ig) σε βιολογικά υγρά, υποστηρίζοντας τη διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενειών. Ο αναλυτής

πρωτεϊνών IMAGE 800 χρησιμοποιεί τη Διπλή Τεχνολογία Νεφελομετρίας Ρυθμού Ανίχνευσης για ακριβή ανάλυση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Η δυναμική μέθοδος μηδενισμού μειώνει τις παρεμβολές, ενώ τα έτοιμα προς χρήση επισημασμένα αντιδραστήρια αυξάνουν την αποδοτικότητα. Το σύστημα προσφέρει ενημερώσεις βαθμονόμησης με μία μόνο σημειακή βαθμονόμηση (single-point calibration) και εντός παρτίδας βαθμονόμηση (within-lot calibration), βελτιώνοντας την αξιοπιστία και εξοικονομώντας χρόνο προετοιμασίας. Αυτή η καινοτόμος τεχνολογία εξασφαλίζει ακριβή ποσοτικοποίηση των Igs, απαραίτητη για κλινικές εφαρμογές.

6.4 Στατιστική ανάλυση

Το τεστ κανονικότητας d'Agostino-Pearson χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της κανονικότητας της κατανομής των δεδομένων κάθε ελέγχου. Για συγκρίσεις μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων, για παραμετρικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκε το T-test και για μη παραμετρικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U τεστ. Για συγκρίσεις μεταξύ περισσότερων των δύο ανεξάρτητων ομάδων, για παραμετρικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκε το τεστ ANOVA και για μη παραμετρικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκε το Friedman τεστ.

Το τεστ ανάλυσης κατά Pearson χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών με στατιστική σημαντικότητα σε διάφορες επιμέρους αναλύσεις. Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (r) είναι ο λόγος μεταξύ της συνδιακύμανσης δύο μεταβλητών και του γινόμενου των τυπικών αποκλίσεων τους και μετρά τη γραμμική σχέση μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών ή συνόλων δεδομένων, λαμβάνοντας τιμές από -1 (ισχυρή αρνητική συσχέτιση) έως +1 (ισχυρή θετική συσχέτιση), με το 0 να δηλώνει απουσία γραμμικής σχέσης. Στο τεστ κατα χρησιμοποιήθηκε για παραμετρικά δεδομένα ενώ στην περίπτωση μη παραμετρικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε τεστ ανάλυσης κατά Spearman (συντελεστής συσχέτισης Spearman ρ).

Για την εκτίμηση των συσχετίσεων των επιπέδων των ΦΑ με την αιτιολογία της ΥΣ, της συγκέντρωση των ολικών ανοσοσφαιρινών και τις λοιπές βιοχημικές μετρήσεις, εφαρμόστηκαν πολυπαραμετρικά μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης

(linear regression) και αναλύσεις πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (multiple logistic regression). Τα πολυπαραμετρικά μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της σχέσης μιας εξαρτημένης μεταβλητής (συνεχής) και πολλαπλών ανεξάρτητων μεταβλητών (συνεχών ή κατηγορικών), για την ανίχνευση σημαντικών παραγόντων που επηρεάζουν ένα φαινόμενο μεταξύ. Τα πολυπαραμετρικά πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης χρησιμοποιούνται όταν η εξαρτημένη μεταβλητή είναι κατηγορική (δυαδική ή πολυκατηγορική) και αποσκοπούν στην ανάλυση παραγόντων που επηρεάζουν ένα δυαδικό αποτέλεσμα και κατηγοριοποίηση των δεδομένων με βάση αυτό. Τα αποτελέσματα της πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης απεικονίστηκαν ως καμπύλες ROC και υπολογίστηκε το AUC (area under the curve) καθώς και η ειδικότητα (θετική προλεπτική αξία) και η ευαισθησία (αρνητική προλεπτική αξία) σε κάθε περίπτωση.

Σε όλες τις περιπτώσεις, το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%, οι δοκιμές ήταν αμφίπλευρες και ένα αποτέλεσμα θεωρήθηκε σημαντικό αν η εκτιμώμενη τιμή p ήταν μικρότερη από το επίπεδο σημαντικότητας ($p < 0.05$). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το GraphPad Prism έκδοση 9.0.0 (GraphPad Software, Σαν Ντιέγκο, Καλιφόρνια, ΗΠΑ).

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Διερεύνηση των επιπέδων των ΦΑ και των χαρακτηριστικών τους σε ασθενείς με ΥΣ ποικίλης αιτιολογίας.

Στο πλαίσιο της τρέχουσας μελέτης, επιχειρήθηκε η συστηματική διερεύνηση των επιπέδων των ΦΑ σε ΥΣ ασθενών με διάφορες παθήσεις. Η ανάλυση αυτή αποσκοπούσε στην κατανόηση των μοριακών και ανοσολογικών διαδικασιών που εμπλέκονται στη σχηματισμό των υπεζωκοτικών υγρών, χρησιμοποιώντας ένα εκτεταμένο φάσμα αντιγόνων ως βιολογικούς δείκτες.

Η επιλογή των αντιγόνων για την μελέτη χωρίστηκε σε δύο κύριες κατηγορίες, οι οποίες επιλέχθηκαν με βάση την συνεισφορά τους στους μηχανισμούς της

φυσικής ανοσίας και την ειδική συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία των ΥΣ. Η πρώτη κατηγορία περιλάμβανε αντιγόνα τα οποία είναι κλασικά χρησιμοποιούμενα στη διερεύνηση της φυσικής ανοσίας, συμπεριλαμβανομένων της Ακτίνης, της Μυοσίνης, της θυρεοσφαιρίνης, του DNA και του TNP. Η δεύτερη κατηγορία, περιλάμβανε ειδικά επιλεγμένα αντιγόνα, όπως το LPS, η Υαλουρονιδάση και η Καρβονική Ανυδράση, τα οποία έχουν άμεση συνάφεια με τα παθοφυσιολογικά γεγονότα που επηρεάζουν τη σύνθεση και τη δυναμική του υπεζωκοτικού υγρού στις διάφορες παθήσεις.

Η σημασία της επιλογής και της διαφοροποίησης αυτών των αντιγόνων εντοπίζεται στη δυνατότητά μας να κατανοούμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις υποκείμενες ανοσολογικές αντιδράσεις σε διάφορες κλινικές καταστάσεις. Αυτό επιτρέπει μια πιο εμπειριστατωμένη ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς η διακριτή αντίληψη της λειτουργίας κάθε αντιγόνου μας προσφέρει τη δυνατότητα να συνδυάσουμε κλινικά στοιχεία με μοριακά δεδομένα. Η τελική ανάλυση των δεδομένων αναμένεται να παρέχει περαιτέρω επιβεβαίωση των υποθέσεων μας και να ενισχύσει την κατανόηση της διαδικασίας που οδηγεί στην εμφάνιση των ΥΣ, με απώτερο στόχο τη βελτίωση των διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Μια σειρά από πειραματικές δοκιμασίες έλαβε χώρα για την ανάπτυξη των ELISA κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες ανα αντιγόνο και ανα τάξη ΦΑ. Οι δοκιμασίες αυτές πραγματοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης επίστρωσης του αντιγόνου και των αραιώσεων των δειγμάτων καθώς επίσης του χρόνου των επωάσεων και των αραιώσεων των δευτερευόντων συζευγμάτων. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι βέλτιστες αραιώσεις του υπεζωκοτικού υγρού και του ορού ανα αντιγόνο και ανα τάξη ΦΑ, όπως αυτές προσδιορίστηκαν από τα πειράματα βελτιστοποίησης των δοκιμασιών (**Πίνακας 5**).

Αντιγόνο		Συγκέντρωση επίστρωσης	Αιραίωση δείγματος (Υπεζωκοτικό υγρό και ορός)		
		μg/ml	IgM	IgA	IgG
Πάνελ αντιγόνων Φυσικής Ανοσίας	Ακτίνη	10	1/15	1/30	1/30
	Μυοσίνη	3	1/40	1/30	1/40
	DNA	10	1/30	1/30	1/60
	TNP	10	1/15	1/25	1/30
	Θυρεοσφαιρίνη	10	1/30	1/20	1/40
Πάνελ αντιγόνων Εξειδικευμένης στόχευσης	LPS	5	1/40	1/30	1/40
	Υαλουρονιδάση	5	1/30	1/30	1/40
	Καρβονική Ανυδράση	5	1/30.	1/20	1/40

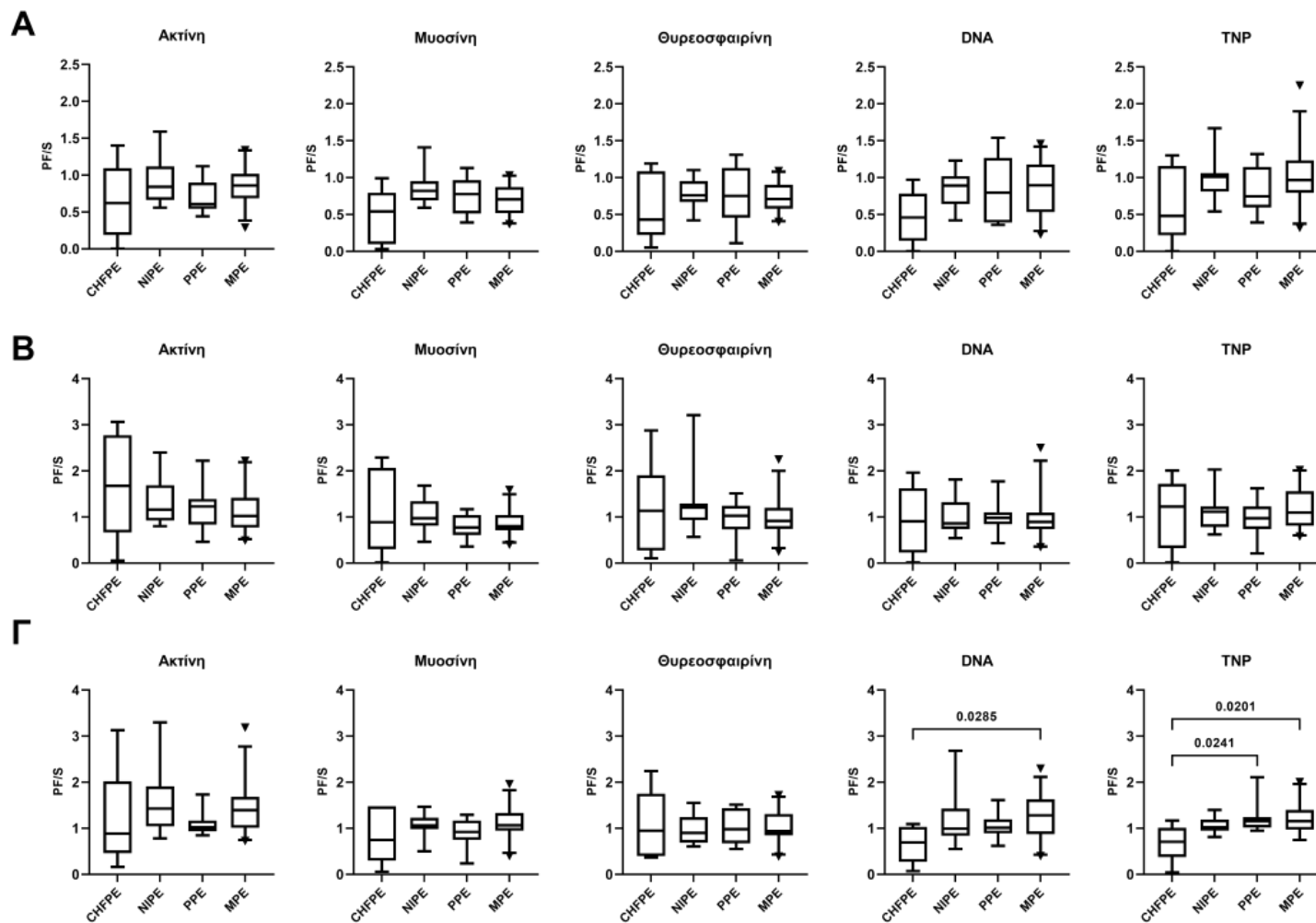
Πίνακας 5: Παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις επίστρωσης των οκτώ (8) αντιγόνων της μελέτης που χρησιμοποιήθηκαν στις ELISA ως στόχοι των ΦΑ και τις αραιώσεις υπεζωκοτικού υγρού και ορού ανά τάξη και ανα αντιγόνο.

Μετά τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών ακολούθησαν δοκιμασίες ελέγχου τόσο για τη μελέτη των διαφορών στα επίπεδα των ΦΑ μεταξύ του υπεζωκοτικού υγρού και του ορού ανα ασθενή, αλλά και για τη μελέτη των διαφορών των επιπέδων των ΦΑ στις ΥΣ μεταξύ των διαφορετικών ομάδων.

7.1.1 Σύγκριση επιπέδων ΦΑ σε υπεζωκοτικό υγρό και ορό.

Για την σύγκριση των επιπέδων των ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό σε σχέση με τα επίπεδα του ορού, αυτά μετρήθηκαν στα δύο βιολογικά υγρά για κάθε εξεταζόμενο (σύνολο 63 ασθενείς) κάτω από την ίδια αραίωση και ο λόγος υγρού προς ορό (PF/S) υπολογίστηκε με βάση τις τιμές οπτικής απορρόφησης για κάθε δείγμα. Η ανάλυση του λόγου PF/S διεξήχθη με έμφαση στις δύο κύριες κατηγορίες αντιγόνων που έχουν επιλεγεί για τη μελέτη.

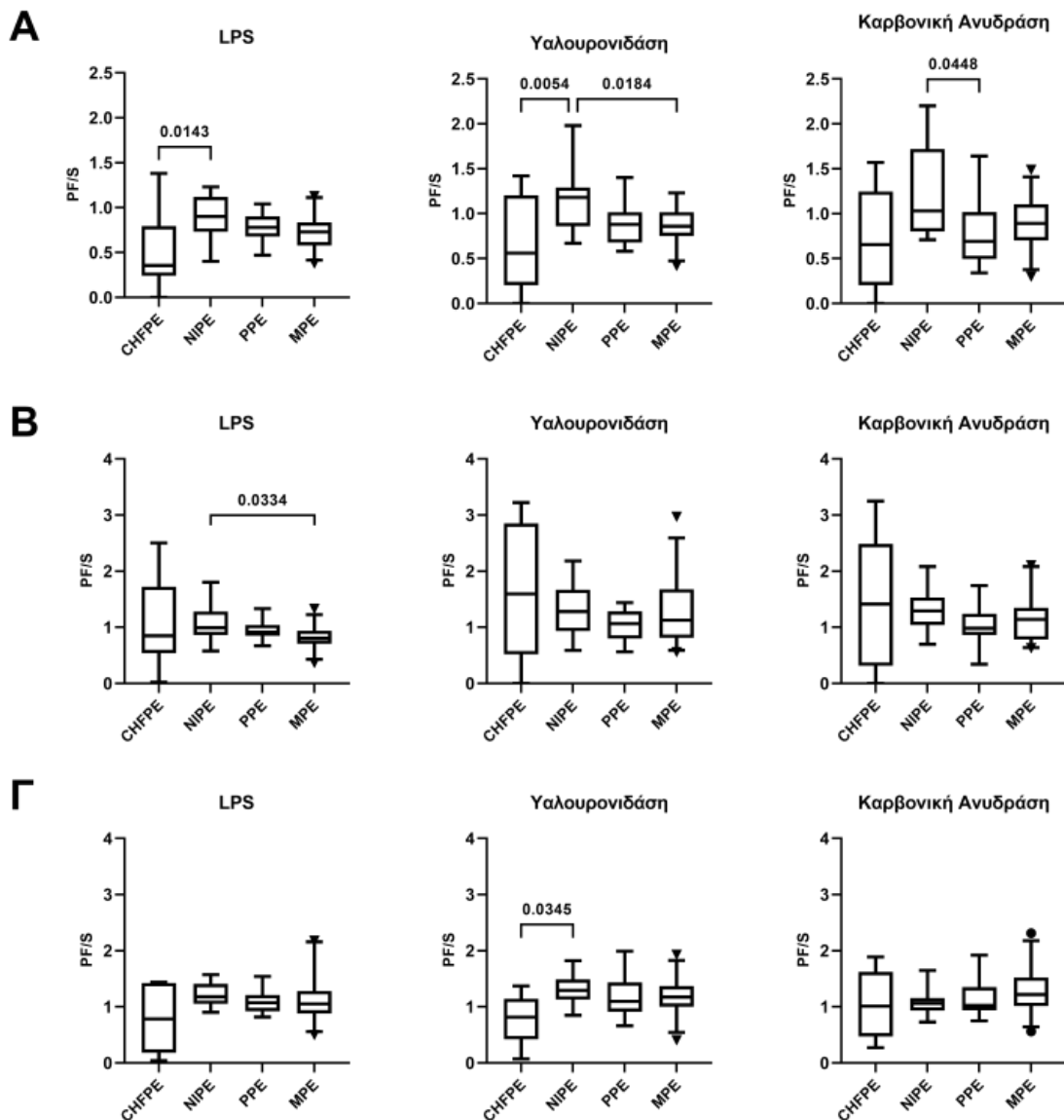
Στα παρακάτω διαγράμματα (box plots) απεικονίζονται συγκριτικά για τις τέσσερις ομάδες ασθενών με ΥΣ, για τα ΦΑ τάξης IgM (**Εικόνα 1Α**), IgA (**Εικόνα 1Β**) και IgG (**Εικόνα 1Γ**), για την πρώτη κατηγορία αντιγόνων της φυσικής ανοσίας. Οι διαφορές στα επίπεδα των ΦΑ μεταξύ του υπεζωκοτικού υγρού και του ορού ήταν σημαντικές, με τα επίπεδα στο υγρό να είναι σε πολλές περιπτώσεις υψηλότερα, υποδεικνύοντας πιθανή τοπική παραγωγή αντισωμάτων στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Για τα IgG ΦΑ ο λόγος PF/S στην ομάδα MPE ήταν σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με της ομάδας CHFPE για το DNA ($p=0.0285$), και το TNP ($p=0.0201$), ενώ, ο λόγος PF/S στην ομάδα PPE ήταν σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με της ομάδας CHFPE για το TNP ($p=0.0241$).



Εικόνα 1: Σύγκριση του λόγου PF/S των επιπέδων των IgM (Α), των IgA (Β) και των IgG (Γ) ΦΑ μεταξύ των ομάδων ασθενών για το πάνελ των αντιγόνων της φυσικής ανοσίας.

Στην δεύτερη κατηγορία, τα επίπεδα των ΦΑ για τα ειδικά επιλεγμένα αντιγόνα που σχετίζονται άμεσα με την παθοφυσιολογία των ΥΣ (LPS, η Υαλουρονιδάση και η Καρβονική Ανυδράση), έδειξαν επίσης σημαντικές διαφορές (**Εικόνα 2**). Σε πολλές περιπτώσεις, ιδιαίτερα για τα IgA και IgG ΦΑ, ο λόγος των επιπέδων στο υγρό έναντι του ορού ήταν υψηλότερος, υποδεικνύοντας την ενεργή ανοσολογική απόκριση στην τοπική περιοχή της φλεγμονής.

Για τα IgM ΦΑ σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν μεταξύ των ομάδων ελέγχου και για τα τρία αντιγόνα. Πιο συγκεκριμένα και στις τρεις περιπτώσεις, ο λόγος PF/S στην ομάδα NIPE ήταν ο υψηλότερος μεταξύ των ομάδων και σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν σε σύγκριση με την ομάδα CHFPE ($p=0.0054$) και την ομάδα MPE ($p=0.0184$) για την Υαλουρονιδάση, με την ομάδα PPE ($p=0.0448$) για την Καρβονική Ανυδράση και με την ομάδα CHFPE ($p=0.0143$) για το LPS. Για τα IgA ΦΑ ο λόγος PF/S στην ομάδα NIPE ήταν σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με της ομάδας MPE για το LPS ($p=0.0334$). Για τα IgG ΦΑ ο λόγος PF/S στην ομάδα NIPE ήταν σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με της ομάδας CHFPE για την Υαλουρονιδάση ($p=0.0345$).



Είκονα 2: Σύγκριση του λόγου PF/S των επιπέδων των IgM (Α), των IgA (Β) και των IgG (Γ) ΦΑ μεταξύ των ομάδων ασθενών για το πάνελ των ειδικά επιλεγμένων αντιγόνων.

7.1.2 Σύγκριση επιπέδων ΦΑ σε υπεζωκοτικό υγρό μεταξύ των ομάδων ασθενών με ΥΣ ποικίλης αιτιολογίας.

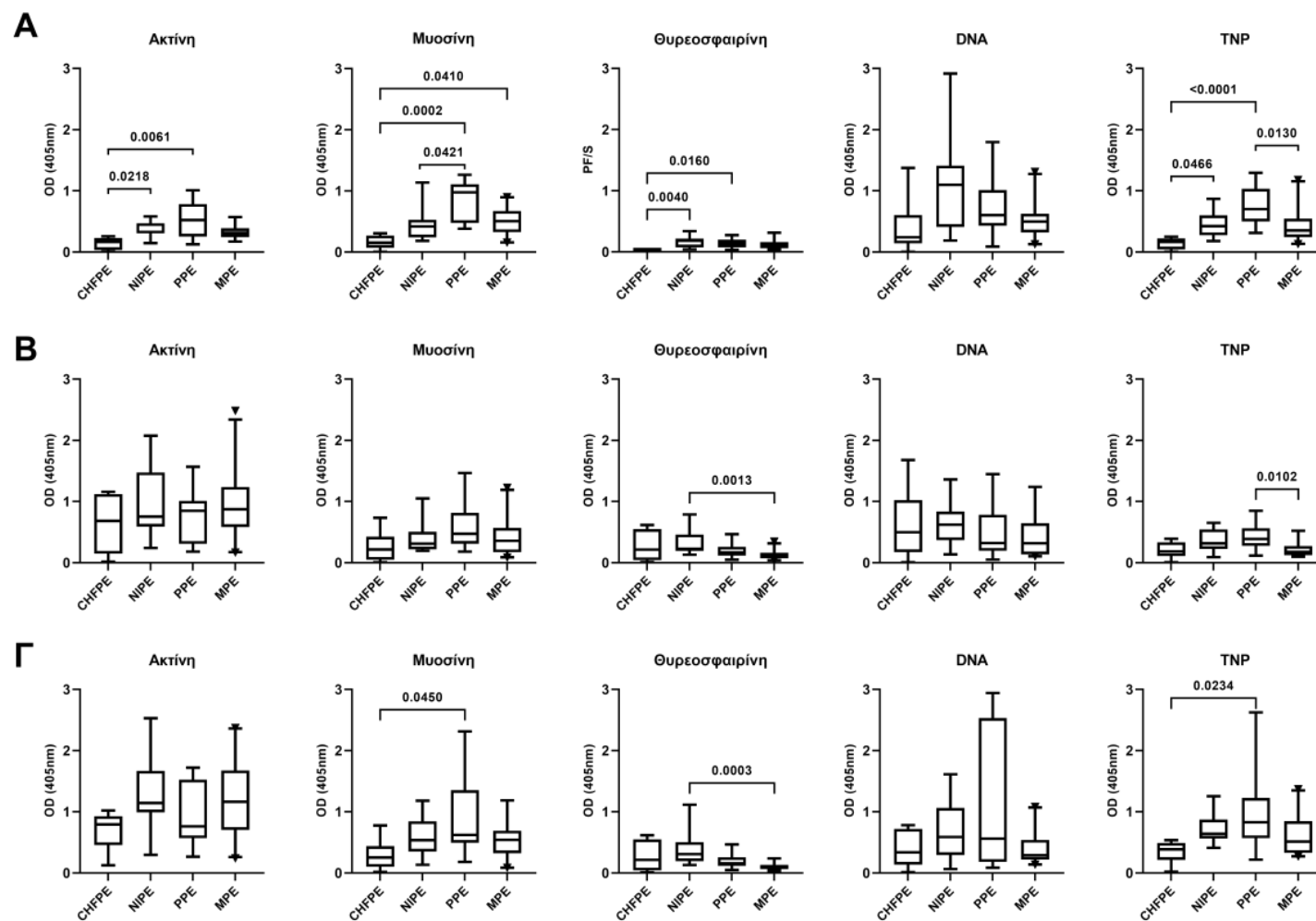
Η δεύτερη φάση της ανάλυσης επικεντρώθηκε στην σύγκριση των επιπέδων των ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό ανάμεσα στους ασθενείς με ΥΣ διαφορετικής αιτιολογίας κάτω από την ίδια αραίωση σε παράλληλα πειράματα ELISA, διακρίνοντας τα αποτελέσματα ανά τις δύο κατηγορίες αντιγόνων.

Στην κατηγορία των αντιγόνων της φυσικής ανοσίας, οι συγκρίσεις επικεντρώθηκαν στη διαφορά των επιπέδων ΦΑ μεταξύ των ασθενών με διάφορες υποκείμενες παθήσεις, όπως φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (box plots) που απεικονίζονται συγκριτικά για τις τέσσερις ομάδες ασθενών με ΥΣ, για τα ΦΑ τάξης IgM (**Εικόνα 3Α**), IgA (**Εικόνα 3Β**) και IgG (**Εικόνα 3Γ**).

Για τα επίπεδα των IgM ΦΑ σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν μεταξύ των ομάδων ελέγχου για όλα τα αντιγόνα που εξετάστηκαν εκτός του DNA. Πιο συγκεκριμένα, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα NIPE σε σύγκριση με την ομάδα CHFPE στην Ακτίνη ($p=0.0061$), στο TNP ($p=0.0466$) και στη Θυρεοσφαιρίνη ($p=0.004$). Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα PPE σε σύγκριση με την ομάδα CHFPE στην Ακτίνη ($p=0.0061$), στην Μυοσίνη ($p=0.0002$), στο TNP ($p<0.0001$) και στη Θυρεοσφαιρίνη ($p=0.0160$). Τέλος, αυξημένα επίπεδα IgM ΦΑ σημειώθηκαν στην ομάδα PPE σε σχέση με την ομάδα NIPE και στην Μυοσίνη ($p=0.0421$) και σε σχέση με την ομάδα MPE για το TNP ($p=0.0130$).

Για τα επίπεδα των IgA ΦΑ, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα NIPE σε σύγκριση με την ομάδα MPE στη Θυρεοσφαιρίνη ($p=0.0013$). Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα PPE σε σύγκριση με την ομάδα MPE στο TNP ($p=0.0102$).

Για τα επίπεδα των IgG ΦΑ, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα NIPE σε σύγκριση με την ομάδα MPE στη Θυρεοσφαιρίνη ($p=0.0003$). Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα PPE σε σύγκριση με την ομάδα CHFPE στη Μυοσίνη ($p=0.045$) και στο TNP ($p=0.0234$).



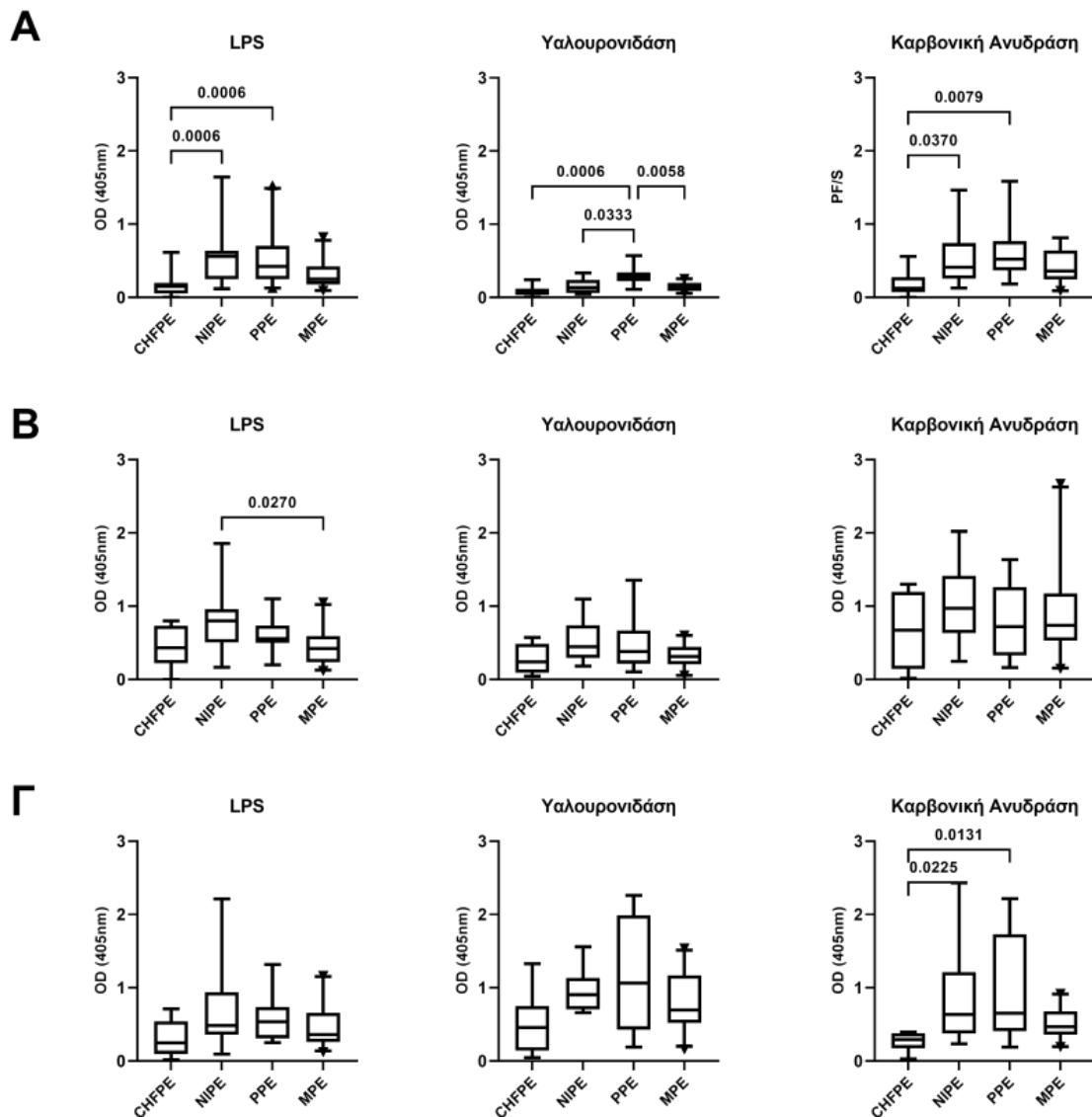
Εικόνα 3: Σύγκριση των επιπέδων IgM (A), IgA (B) και IgG (Γ) ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό των ασθενών ανά ομάδα ελέγχου για το πάνελ αντιγόνων της φυσικής ανοσίας.

Για τα ειδικά αντιγόνα, η ανάλυση αποκάλυψε σημαντικές διαφοροποιήσεις των ΦΑ που συνδέονται με την ειδική αιτιολογία των ΥΣ. Οι διαφορές των επιπέδων των ΦΑ μεταξύ των ασθενών με διάφορες υποκείμενες παθήσεις φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (box plots) που απεικονίζονται συγκριτικά για τις τέσσερις ομάδες ασθενών με ΥΣ, για τα ΦΑ τάξης IgM (**Εικόνα 4Α**), IgA (**Εικόνα 4Β**) και IgG (**Εικόνα 4Γ**).

Για τα επίπεδα των IgM ΦΑ σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν μεταξύ των ομάδων ελέγχου για όλα τα αντιγόνα που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα NIPE σε σύγκριση με την ομάδα CHFPE στην Καρβονική Ανυδράση ($p=0.037$) και στο LPS ($p=0.0218$). Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα PPE σε σύγκριση με την ομάδα CHFPE στο LPS ($p=0.0006$), στην Υαλουρονιδάση ($p=0.0006$) και στην Καρβονική Ανυδράση ($p=0.0079$). Τέλος, αυξημένα επίπεδα IgM ΦΑ έναντι της Υαλουρονιδάσης σημειώθηκαν στην ομάδα PPE σε σχέση με την ομάδα NIPE ($p=0.0333$) και σε σχέση με την ομάδα MPE ($p=0.0058$).

Για τα επίπεδα των IgA ΦΑ, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα NIPE σε σύγκριση με την ομάδα MPE στο LPS ($p=0.027$), ενώ υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα PPE σε σύγκριση με την ομάδα MPE στο TNP ($p=0.0102$).

Για τα επίπεδα των IgG ΦΑ, υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα NIPE σε σύγκριση με την ομάδα CHFPE στη Καρβονική Ανυδράση ($p=0.0225$), ενώ υψηλότερα επίπεδα σημειώθηκαν για την ομάδα PPE σε σύγκριση με την ομάδα CHFPE στη Μυοσίνη ($p=0.045$), στη Καρβονική Ανυδράση ($p=0.0131$) και στο TNP ($p=0.0234$).



Εικόνα 4: Σύγκριση των επιπέδων IgM (A), IgA (B) και IgG (Γ) ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό των ασθενών ανά ομάδα ελέγχου για το πάνελ των ειδικά επιλεγμένων αντιγόνων.

7.2 Διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων των ΦΑ και των επιμέρους ανοσολογικών και βιοχημικών παραμέτρων των ΥΣ.

Βιοχημικά δεδομένα [pH, γλυκόζη, ολική πρωτεΐνη, αλβουμίνη, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDH) και αδενοσινδιαμινάση (ADA), μέγεθος ΥΣ] συλλέχθηκαν επίσης από τις βιοψίες κατά τη διάγνωση των ασθενών. Οι μετρήσεις των ολικών ανοσοσφαιρινών IgM, IgA και IgG πραγματοποιήθηκαν με

νεφελομετρία και στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ο μέσος όρος, η διάμεσος και η τυπική απόκλιση αυτών, για τις τέσσερις ομάδες ελέγχου (Πίνακας 6).

Δείγμα	IgM mg/dl (mean, median) $\pm$ SD		IgA mg/dl (mean, median) $\pm$ SD		IgG mg/dl (mean, median) $\pm$ SD	
	PF	S	PF	S	PF	S
CHFPE	(52.3, 10.1) $\pm$ 108.2	(106.0, 53.6) $\pm$ 147.1	(142.5, 73.6) $\pm$ 165.7	(241.3, 244.5) $\pm$ 80.5	(570.2, 444.5) $\pm$ 575.7	(1011.7, 985.0) $\pm$ 326.5
NIPE	(55.5, 49.4) $\pm$ 28.9	(110.5, 97.2) $\pm$ 62.9	(192.3, 195.0) $\pm$ 101.3	(318.6, 278.5) $\pm$ 167.2	(1082.2, 1030.0) $\pm$ 267.3	(1421.8, 1415.0) $\pm$ 323.3
PPE	(72.1, 79) $\pm$ 33.7	(169.0, 134) $\pm$ 203.3	(187.1, 175.0) $\pm$ 74.7	(343.9, 315.0) $\pm$ 143.2	(954.8, 1026.0) $\pm$ 239.9	(1263.7, 1310.0) $\pm$ 279.0
MPE	(55.9, 41.7) $\pm$ 69.6	(152, 90.4) $\pm$ 204	(146.0, 129.0) $\pm$ 77.9	(283.5, 268.0) $\pm$ 125.0	(796.3, 767.0) $\pm$ 246.1	(1151.5, 1090.0) $\pm$ 370.6
M.O.	(59.0, 45.1) $\pm$ 60.1	(134.4, 93.8) $\pm$ 154.3	(167.0, 143.1) $\pm$ 104.9	(296.8, 276.5) $\pm$ 129.0	(850.9, 816.9) $\pm$ 332.3	(1212.2, 1200.0) $\pm$ 324.8

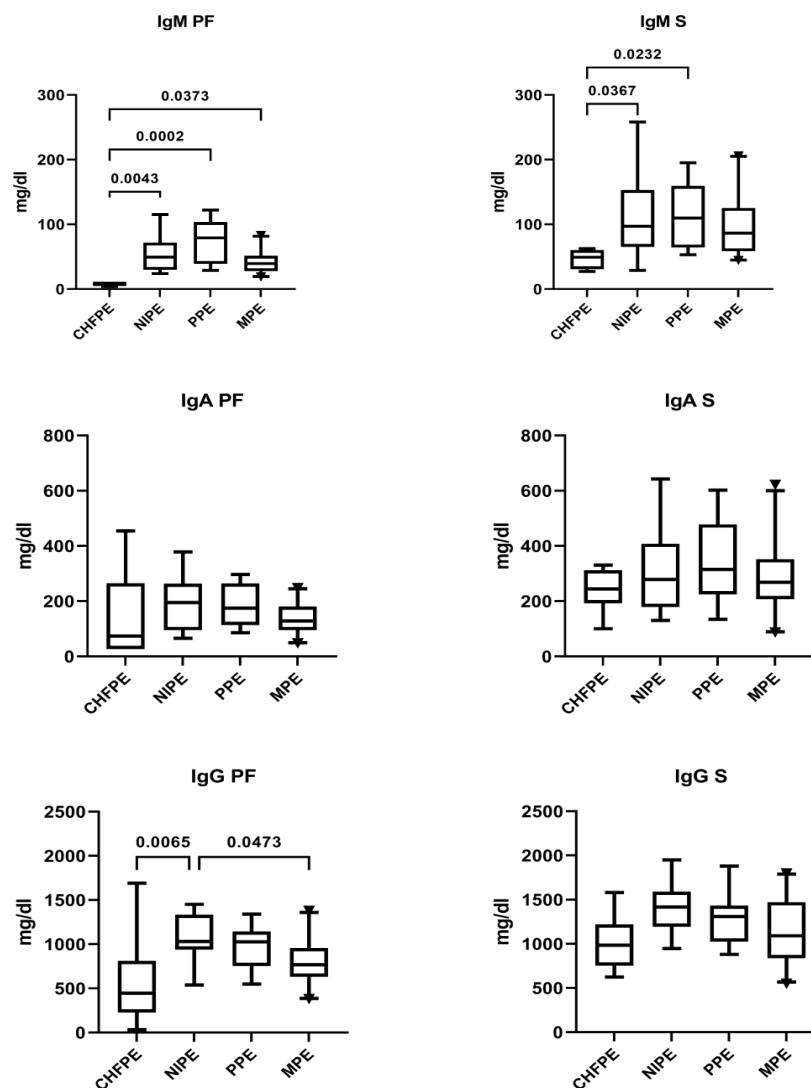
Πίνακας 6: Παρουσιάζονται ο μέσος όρος, η διάμεσος και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών IgM, IgA και IgG που πραγματοποιήθηκαν με νεφελομετρία, στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό των ατόμων για τις τέσσερις ομάδες ελέγχου.

7.2.1 Ανάλυση των συγκεντρώσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη στο υπεζωκοτικό υγρό και ορό.

Οι συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών για τις τρεις τάξεις και στις τέσσερις ομάδες ελέγχου ήταν σημαντικά χαμηλότερες στο υπεζωκοτικό υγρό σε σχέση με τον ορό του κάθε εξεταζόμενου. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών στο υπεζωκοτικό υγρό είχαν υψηλή θετική συσχέτιση με αυτές στον ορό με βάση τον συντελεστή συσχέτισης γινομένου ροπής Pearson (Pearson correlation coefficient), ενώ η μικρότερη θετική συσχέτιση σημειώθηκε για τις IgM ($r=0.645$, $p=0.023$) και τις IgA ($r=0.581$, $p=0.037$) της ομάδας PPE, καθώς και για τις IgG της ομάδας MPE ($r=0.713$, $p=0.002$).

Από την ανάλυση ANOVA για τη διερεύνηση των διαφορών στη συγκέντρωση των ολικών ανοσοσφαιρινών μεταξύ των ομάδων ελέγχου (**Εικόνα 5**) βρέθηκε πως η συγκέντρωση των IgM στο υπεζωκοτικό υγρό της ομάδας CHFPE ήταν

σημαντικά χαμηλότερη από τις υπόλοιπες ομάδες [NIPE ($p=0.0043$), PPE ($p=0.0002$) και MPE ($p=0.0373$)]. Επιπλέον, η συγκέντρωση των IgM στον ορό της ομάδας CHFPE ήταν σημαντικά χαμηλότερη από τη NIPE ($p=0.0367$) και τη PPE ($p=0.0232$). Τέλος, η συγκέντρωση των IgG στο υπεζωκοτικό υγρό της ομάδας NIPE ήταν σημαντικά υψηλότερη από τη CHFPE ($p=0.0065$) και τη MPE ($p=0.0473$). Δεν βρέθηκαν διαφορές στις συγκεντρώσεις των IgA στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό μεταξύ των ομάδων.



Εικόνα 5: Συγκεντρώσεις ολικών ανοσοσφαιρινών IgM, IgA και IgG στο υπεζωκοτικό υγρό (αριστερά) και στον ορό (δεξιά).

Όταν οι συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών για τη κάθε τάξη αναλύθηκαν σε πολυμπαραμετρικά μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για τη διερεύνηση της συσχέτισής τους με τις βιοχημικές παραμέτρους των ΥΣ διαπιστώθηκε μια ισχυρή συσχέτιση αυτών με τα επίπεδα της ADA για τις IgM ($p=0.0201$), IgA ($p=0.0482$) και IgG ($p=0.0472$). Τα αποτελέσματα των συσχετίσεων παρατίθενται συνοπτικά στον **πίνακα 7**. Ο λόγος PF/S για τις συγκεντρώσεις των ολικών IgM εμφάνισε θετική συσχέτιση με τις PPE ($p=0.0179$) καθώς και με το pH της ΥΣ ($p=0.0249$), ενώ αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης ($p=0.0151$). Η συγκέντρωση των ολικών IgA στο υπεζωκοτικό υγρό αλλά και ο λόγος PF/S εμφάνισε θετική συσχέτιση με το θηλυκό φύλο, ενώ επιπλέον, ο λόγος PF/S συσχετίστηκε θετικά με το pH της ΥΣ ($p=0.0061$), το μέγεθος της ΥΣ ($p=0.0289$) και αρνητικά με το κάπνισμα ($p=0.0144$). Επιπρόσθετα, η ανάλυση επιβεβαίωσε τη θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης των IgG στο υπεζωκοτικό υγρό με την ομάδα NIPE ($p=0.0232$) και PPE ($p=0.0475$) καθώς και με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στην ΥΣ ($p=0.0491$) και το θηλυκό φύλο ($p=0.0156$). Θετική ήταν και η συσχέτιση του λόγου PF/S για τις ολικές IgA με το pH ($p=0.0310$) και το θηλυκό φύλο ($p=0.0018$). Τέλος, η συγκέντρωση των IgM συσχετίστηκε θετικά με το κάπνισμα στις ομάδες PPE ($p=0.0184$) και MPE ($p=0.0408$), ενώ η συγκέντρωση των IgG εμφάνισε θετική συσχέτιση με το μέγεθος της ΥΣ της MPE ($p=0.0096$).

Τάξη	[lg]	Σχετιζόμενη ΥΣ		Σχετιζόμενος Βιοχημικός δείκτης ΥΣ	
			P Value		P Value
IgM	PF	-		+ ADA	p=0.0201
	PF/S	+ PPE	p=0.0179	+ pH/ - Συγκέντρωση γλυκόζης	p=0.0249/ p=0.0151
IgA	PF	-		+ ADA/ + Φύλο (Θυληκό)	p=0.0482/ p=0.0272
	PF/S	-		+ pH/ + Μέγεθος ΥΣ/ + Φύλο (Θυληκό) - Κάπνισμα	p=0.0061/ p=0.0289/ p=0.0275/ p=0.0144
IgG	PF	+ NIPE/ + PPE	p=0.0232/ p=0.0475	+ ADA/ + Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης/ - Φύλο (αρσενικό)	p=0.0472/ p=0.0491/ p=0.0156
	PF/S	-		+ pH/ + Φύλο (Θυληκό)	p=0.0310/ p=0.0018

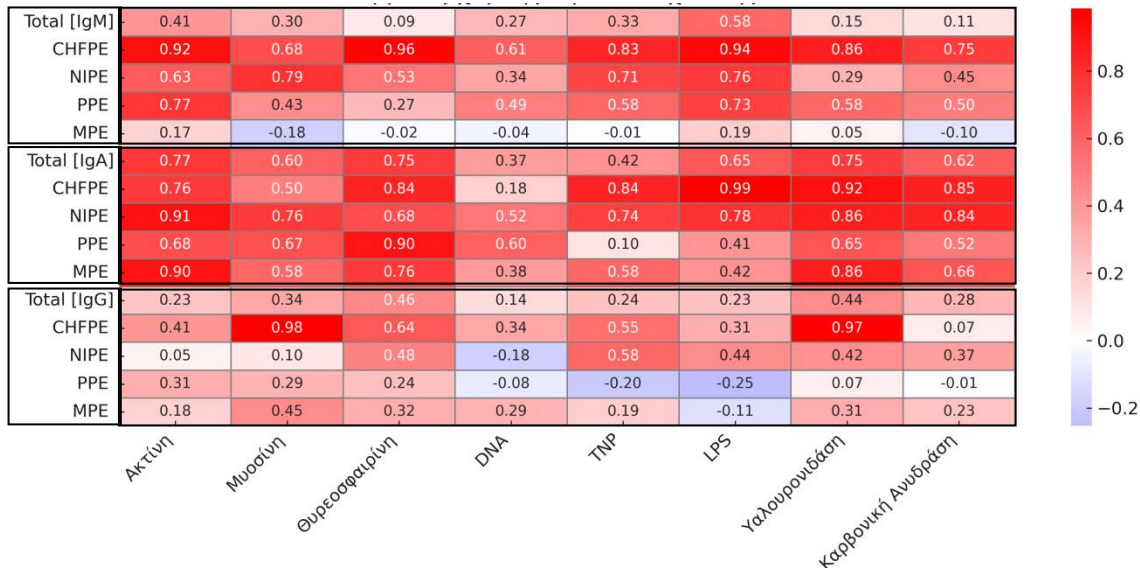
Πίνακας 7: Αποτελέσματα συσχετίσεων από τις αναλύσεις γραμμικής παλινδρόμησης των συγκεντρώσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη και των βιοχημικών παραμέτρων των ΥΣ. Οι συγκεντρώσεις των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη στο υπεζωκοτικό υγρό (PF) ή ο λόγος τους (PF/S), αναλύθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές και οι βιοχημικές παράμετροι των ΥΣ ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Δίπλα από κάθε εξαρτημένη ή ανεξάρτητη μεταβλητή προσδιορίζεται η θετική (+) ή ανηρτική (-) συσχέτιση αυτής με τα επίπεδα των ΦΑ.

7.2.2 Διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων των ΦΑ και της συγκέντρωσης των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη.

Τα επίπεδα των ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό των ατόμων της μελέτης αναλύθηκαν με βάση τον συντελεστή συσχέτισης γινομένου ροπής Pearson (Pearson correlation coefficient) συγκρινόμενα με τις συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών για τη κάθε τάξη. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο αναλύσεις όπου η πρώτη αφορούσε τη σχέση των επιπέδων των ΦΑ στο

υπεζωκοτικό υγρό σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών σε αυτό (**Εικόνα 6**), ενώ η δεύτερη αφορούσε τη συσχέτιση του λόγου των επιπέδων των ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό και ορό (PF/S) σε σχέση με τον αντίστοιχο λόγο των συγκεντρώσεων των ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη (**Εικόνα 7**).

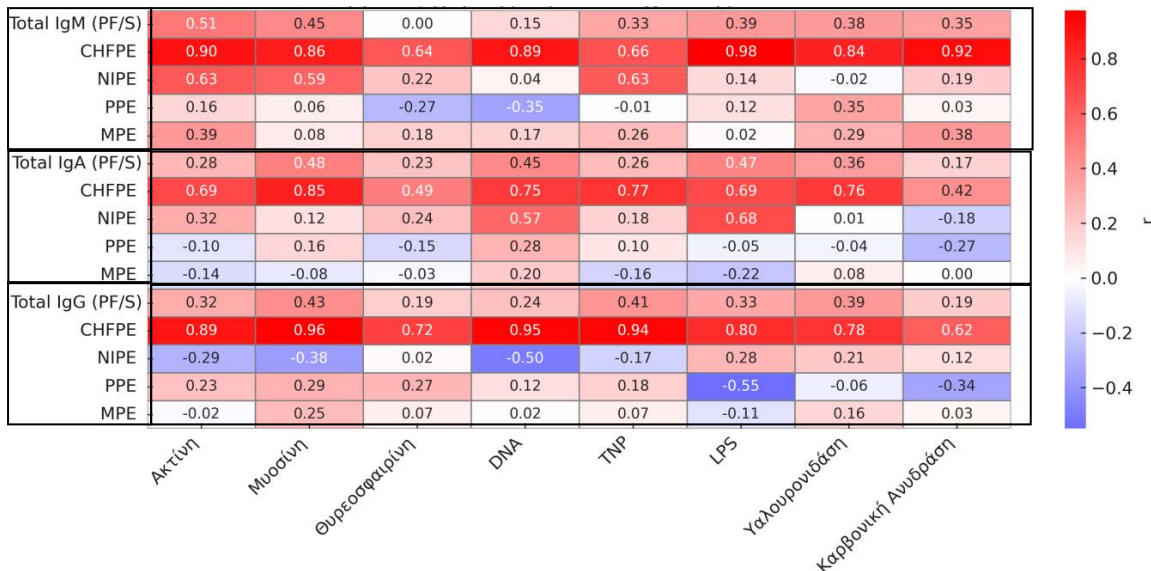
Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα επίπεδα των ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό εμφάνισαν υψηλή συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις των ολικών ανοσοσφαιρινών για τη κάθε τάξη (**Εικόνα 6**). Ωστόσο, τα επίπεδα των IgM ΦΑ δεν υπέδειξαν καμία συσχέτιση με τη συγκέντρωση των ολικών IgM στην ομάδα MPE, ενώ παρόμοια εικόνα εμφάνισαν τα επίπεδα των IgG ΦΑ για την ομάδα PPE.



Εικόνα 6: Θερμικός χάρτης δεδομένων ανάλυσης κατά Pearson (Pearson correlation analysis) για τη συσχέτιση μεταξύ των ΦΑ και της συγκέντρωσης των ολικών ανοσοσφαιρινών ανά τάξη και ανά αντιγόνο. Στα αντίστοιχα κελία αναγράφεται η τιμή r , του δείκτη συσχέτισης μεταξύ των δύο παραμέτρων του κάθετου (αντιγόνου) και του οριζόντιου (τάξη/ομάδα ελέγχου) άξονα.

Ο λόγος PF/S των επιπέδων των ΦΑ εμφάνισε υψηλή συσχέτιση με τον αντίστοιχο λόγο των συγκεντρώσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών για τη κάθε τάξη στην ομάδα CHFPE (**Εικόνα 7**). Αντίθετα, Ο λόγος PF/S των επιπέδων IgM και IgA ΦΑ εμφάνισε από καθόλου ως σχετικά μικρή αρνητική συσχέτιση με τον αντίστοιχο λόγο των συγκεντρώσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών κάθε τάξης στις ομάδες PPE και MPE. Ο λόγος PF/S των επιπέδων των IgG ΦΑ εμφάνισε

από καθόλου ως σχετικά μικρή αρνητική συσχέτιση με τον αντίστοιχο λόγο των συγκεντρώσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών στην ομάδα MPE ενώ για τις ομάδες NIPE και PPE η συσχέτιση αυτή εμφανίστηκε να είναι έως και ισχυρά αρνητική, π.χ. στη περίπτωση του DNA ($r=-0.5$) και του LPS ($r=-0.55$).



Εικόνα 7: Θερμικός χάρτης δεδομένων ανάλυσης κατα Pearson (Pearson correlation analysis) για τη συσχέτιση μεταξύ του λόγου PF/S των επιπέδων των ΦΑ και του αντίστοιχου λόγου της συγκέντρωσης των ολικών ανοσοσφαιρινών ανά τάξη και ανά αντιγόνο. Στα αντίστοιχα κελία αναγράφεται η τιμή r , του δείκτη συσχέτισης μεταξύ των δύο παραμέτρων του κάθετου (αντιγόνο) και του οριζόντιου (τάξη/ομάδα ελέγχου) άξονα.

7.2.3 Διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων των ΦΑ, της συγκέντρωσης των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη και των βιοχημικών παραμέτρων των ΥΣ.

Τα επίπεδα των ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό (PF) και ο λόγος PF/S, για κάθε τάξη και αντιγόνο αναλύθηκαν σε πολυπαραμετρικά μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression analysis) ως η εξαρτημένη μεταβλητή για τη διερεύνηση της συσχέτισής τους με την συγκέντρωση των ολικών ανοσοσφαιρινών ανά τάξη και με τις βιοχημικές παραμέτρους των ΥΣ που μετρήθηκαν κατά τη βιοψία ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Στους πίνακες παρουσιάζονται συνοπτικά οι συσχετίσεις των επιπέδων των ΦΑ ανά τάξη για το

πάνελ των αντιγόνων της φυσικής ανοσίας (**Πίνακας 8**) και για τα τρία ειδικά επιλεγμένα αντιγόνα (**Πίνακας 9**).

Στο υπεζωκοτικό υγρό, για τα IgM ΦΑ διαπιστώθηκε μια συσχέτιση των ΦΑ έναντι ακτίνης και της συγκέντρωσης της ολικής IgM ($p=0.0484$), συσχέτιση των ΦΑ έναντι Μυοσίνης με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρο ($p=0.0293$) και συσχέτιση των ΦΑ έναντι Υαλουρονιδάσης με το μέγεθος της ΥΣ ($p=0.0103$). Για τα IgA ΦΑ διαπιστώθηκε μια ισχυρή συσχέτιση των ΦΑ με τη συγκέντρωση των ολικών IgA για όλα τα αντιγόνα ($p<0.0001$). Επιπλέον, τα IgA ΦΑ έναντι ακτίνης φάνηκε να σχετίζονται με την ομάδα MPE ($p=0.0080$) καθώς και με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρο ($p=0.0492$). Επιπρόσθετα, τα IgA ΦΑ έναντι Καρβονικής Ανυδράσης φάνηκε να σχετίζονται με την ομάδα MPE ($p=0.0022$), με την LDH ($p=0.0035$) και με το μέγεθος της ΥΣ ($p=0.0220$), ενώ τα IgA ΦΑ έναντι Μυοσίνης φάνηκε να σχετίζονται και αυτά με την το μέγεθος της ΥΣ ($p=0.0270$). Τέλος για τα IgG ΦΑ διαπιστώθηκε μια ισχυρή συσχέτιση των IgG ΦΑ έναντι του TNP με την ομάδα PPE ($p=0.0061$).

Αντίστοιχα, ο λόγος PF/S, για τα IgM ΦΑ έναντι της ακτίνης φάνηκε να σχετίζεται με την LDH ($p=0.0129$) και την ADA ($p=0.0005$), για τα IgM ΦΑ έναντι του DNA με την ομάδα MPE ($p=0.0118$) και τη συγκέντρωσης της γλυκόζης στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0153$), για τα IgM ΦΑ έναντι του TNP με την ομάδα MPE ($p=0.0384$), για τα IgM ΦΑ έναντι της Μυοσίνης με την ADA ($p=0.0275$) και της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0201$), για τα IgM ΦΑ έναντι της Υαλουρονιδάσης με την ομάδα NIPE ($p=0.0186$) και της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0215$) και για τα IgM ΦΑ έναντι της Καρβονικής Ανυδράσης με την ADA ($p=0.0341$).

Τάξη ΦΑ	Δείγμα	Αντιγόνο	Σχετιζόμενη ΥΣ		Σχετιζόμενος Βιοχημικός δείκτης ΥΣ	
				P Value		P Value
IgM	PF	Ακτίνη	-		+ Συγκέντρωση ολικής IgM	p=0.0484
	PF	Μυοσίνη	-		+ Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης	p=0.0293
	PF/S	Ακτίνη	-		- LDH/ + ADA	p=0.0129/ p=0.0005
	PF/S	Μυοσίνη	-		+ ADA/ + Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης	p=0.0275/ p=0.0201
	PF/S	DNA	+ MPE	p=0.0118	+ Συγκέντρωση γλυκόζης	p=0.0153
	PF/S	TNP	+ MPE	p=0.0384	+ ADA	p=0.0259
IgA	PF	Όλα τα αντιγόνα	-		+ Συγκέντρωση των ολικών IgA	p<0.0001
	PF	Ακτίνη	+ MPE	p=0.0080	- Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης	p=0.0492
	PF	Μυοσίνη	-		- Μέγεθος ΥΣ	p=0.0270
	PF/S	Ακτίνη	- PPE	p=0.0153	- Συγκέντρωση γλυκόζης	p=0.0155
	PF/S	Μυοσίνη	-		+ ADA	p=0.0185
	PF/S	DNA/ TNP	-		+ Φύλο (Θυληκό)	p=0.0485/ p=0.0189
IgG	PF	TNP	+ PPE	p=0.0061	-	
	PF	Θυρεοσφαιρίνη	- MPE	p=0.0490	-	
	PF/S	Ακτίνη/ Μυοσίνη	-		+ Αριθμός ερυθρών	p=0.0359/ p=0.02
	PF/S	DNA	+ NIPE/ + MPE	p=0.0458/ p=0.018	+ Συγκέντρωση γλυκόζης	p=0.0022

Πίνακας 8: Αποτελέσματα συσχετίσεων από τις αναλύσεις γραμμικής παλινδρόμησης των ΦΑ έναντι των αντιγόνων του πάνελ της φυσικής ανοσίας. Τα επίπεδα των ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό (PF) ή ο λόγος τους (PF/S), αναλύθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές και η αιτιολογία της ΥΣ καθώς και οι βιοχημικές παράμετροι των ΥΣ ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Δίπλα από κάθε εξαρτημένη ή ανεξάρτητη μεταβλητή προσδιορίζεται η θετική (+) ή ανηρητική (-) συσχέτιση αυτής με τα επίπεδα των ΦΑ.

Ο λόγος PF/S για τα IgA ΦΑ έναντι της ακτίνης φάνηκε να σχετίζεται με την ομάδα PPE ($p=0.0153$) και τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0155$), για τα IgA ΦΑ έναντι του DNA και του TNP με το φύλο ($p=0.0485$ και $p=0.0189$, αντίστοιχα), για τα IgA ΦΑ έναντι του LPS με την ομάδα MPE ($p=0.0185$), για τα IgA ΦΑ έναντι της Μυοσίνης με την ADA ($p=0.0185$) και για τα IgA ΦΑ έναντι της Υαλουρονιδάσης με την ομάδα PPE ($p=0.0109$).

Τάξη ΦΑ	Δείγμα	Αντιγόνο	Σχετιζόμενη ΥΣ		Σχετιζόμενος Βιοχημικός δείκτης ΥΣ	
				P Value		P Value
IgM	PF	Υαλουρονιδάση	-		+ Μέγεθος ΥΣ	$p=0.0103$
	PF/S	Υαλουρονιδάση	+ NIPE	$p=0.0186$	+ Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης	$p=0.0215$
	PF/S	Καρβονική Ανυδράση	-		+ ADA	$p=0.0341$
IgA	PF	Καρβονική Ανυδράση	+ MPE	$p=0.0022$	- LDH/ - Μέγεθος ΥΣ	$p=0.0035/p=0.0220$
	PF/S	LPS	- MPE	$p=0.0185$	-	
	PF/S	Υαλουρονιδάση	- PPE	$p=0.0109$	-	
IgG	PF/S	LPS	-		- Αριθμό κυττάρων	$p=0.02$
	PF/S	Υαλουρονιδάση	-		+ Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης	$p=0.0131$

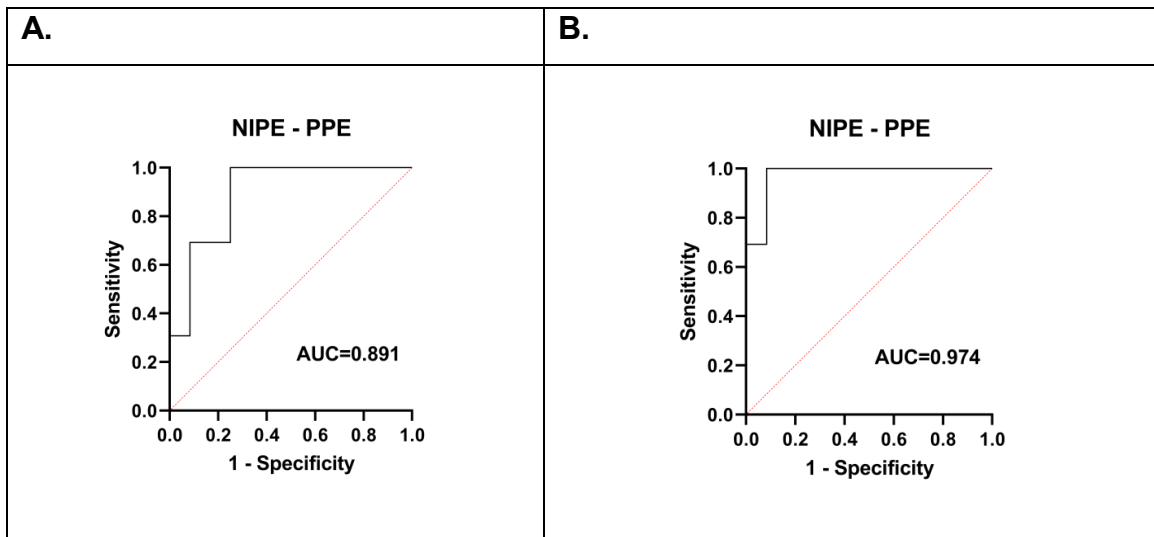
Πίνακας 9: Αποτελέσματα συσχετίσεων από τις αναλύσεις γραμμικής παλινδρόμησης των ΦΑ έναντι των ειδικών αντιγονικών Στόχων. Τα επίπεδα των ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό (PF) ή ο λόγος τους (PF/S), αναλύθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές και η αιτιολογία της ΥΣ καθώς και οι βιοχημικές παράμετροι των ΥΣ ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Δίπλα από κάθε εξαρτημένη ή ανεξάρτητη μεταβλητή προσδιορίζεται η θετική (+) ή αρνητική (-) συσχέτιση αυτής με τα επίπεδα των ΦΑ.

Τέλος, ο λόγος PF/S για τα IgG ΦΑ έναντι της ακτίνης φάνηκε να σχετίζεται με τον αριθμό των ερυθρών στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0359$), για τα IgG ΦΑ έναντι του DNA με τις ομάδες NIPE ($p=0.0458$) και MPE ($p=0.018$) και με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0022$), για τα IgG ΦΑ έναντι του TNP με την ομάδα MPE ($p=0.0014$), για τα IgG ΦΑ έναντι του LPS με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.02$), για τα IgG

ΦΑ έναντι της Μυοσίνης με τον αριθμό των ερυθρών στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.02$) και για τα IgG ΦΑ έναντι της Υαλουρονιδάσης με την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0131$).

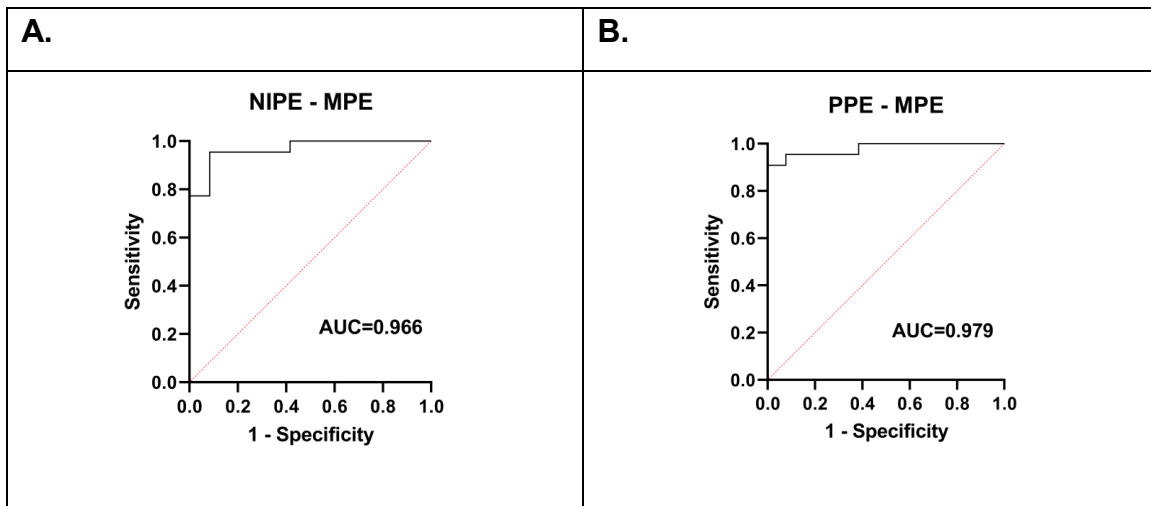
Καθώς ο λόγος PF/S των επιπέδων των ΦΑ για τα αντιγόνα της ακτίνης και του TNP μεταξύ αυτών του πάνελ της φυσικής ανασίας και της Υαλουρονιδάσης μεταξύ των ειδικών αντιγόνων της μελέτης, υπέδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων στις αναλύσεις που προηγήθηκαν, αναλύθηκαν περαιτέρω μαζί με τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών για τις τρεις τάξεις, σε πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση (multivariate logistic regression analysis) για τη διερεύνηση της ικανότητας διαφοροποίησης των ασθενών της μελέτης με βάση την αιτιολογία της ΥΣ. Η ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για να μελετήσει τη σχέση μεταξύ μιας δυαδικής εξαρτημένης μεταβλητής, π.χ. απουσία (NIPE) ή παρουσία λοίμωξης (PPE) και πολλαπλών ανεξάρτητων συνεχών μεταβλητών, π.χ. τα επίπεδα των ΦΑ (PF/S) και οι συγκεντρώσεις των ολικών ανοσοσφαιρινών για κάθε τάξη.

Όταν χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα των τριών τάξεων ΦΑ έναντι της ακτίνης και του TNP μαζί με τις αντίστοιχες ολικές συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών, η πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση έδειξε υψηλή διαχωριστική ικανότητα μεταξύ των μη-λοιμωδών ΥΣ (NIPE) και των παραπνευμονικών ΥΣ (PPE) με εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη AUC=0.974 και 91.7% αρνητική και 92.3% θετική προβλεπτική αξία (**Εικόνα 8Α**). Όταν για τον ίδιο διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα των τριών τάξεων ΦΑ έναντι της υαλουρονιδάσης, η πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση έδειξε χαμηλότερη αλλά σχετικά υψηλή διαχωριστική ικανότητα, με εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη AUC=0.891 και 81.8% αρνητική και 78.6% θετική προβλεπτική αξία (**Εικόνα 8Β**).



Εικόνα 8: Καμπύλες ROC που δημιουργήθηκαν από τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης. Ως εξαρτημένες μεταβλητές ορίστηκαν η απουσία (NIPE) ή η παρουσία (PPE) λοίμωξης και ως συνεχείς μεταβλητές ορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ολικών ανοσοσφαιρινών για τις τρεις τάξεις ανοσοσφαιρινών και ο λόγος PF/S των επιπέδων των ΦΑ A. έναντι της ακτίνης κα του TNP και B. έναντι της υαλουρονιδάσης.

Όταν χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα των τριών τάξεων ΦΑ έναντι της ακτίνης του TNP και της υαλουρονιδάσης συνδυαστικά μαζί με τις αντίστοιχες ολικές συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών, η πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση έδειξε υψηλή διαχωριστική ικανότητα μεταξύ των μη-λοιμωδών ΥΣ (NIPE) και των καρκινικών ΥΣ (MPE) με εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη AUC=0.966 και 91.7% αρνητική και 95.5% θετική προβλεπτική αξία (**Εικόνα 9A**). Όταν για τον διαχωρισμό μεταξύ των λοιμωδών ΥΣ (PAPE) και των καρκινικών ΥΣ (MPE) χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες μεταβλητές, η πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση έδειξε εξίσου υψηλή διαχωριστική ικανότητα, με εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη AUC=0.979 και 92.3% αρνητική και 95.5% θετική προβλεπτική αξία (**Εικόνα 9B**).



Εικόνα 9: Καμπύλες ROC που δημιουργήθηκαν από τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης. Ως συνεχείς μεταβλητές ορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ολικών ανοσοσφαιρινών για τις τρεις τάξεις ανοσοσφαιρινών και ο λόγος PF/S των επιπέδων των ΦΑ έναντι της ακτίνης του TNP και της υαλουρονιδάσης και ως εξαρτημένες μεταβλητές ορίστηκε Α. παρουσία μη-λοιμώδους ΥΣ (NIPE) ή καρκινικής ΥΣ (MPE) και Β. παρουσία λοιμώδους ΥΣ (NIPE) ή καρκινικής ΥΣ (MPE).

7.3 Διερεύνηση της τοπικής παραγωγής των ΦΑ στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Από τις αναλύσεις των μετρήσεων των ολικών ανοσοσφαιρινών φάνηκε πως σε όλες τις περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις στο υπεζωκοτικό υγρό ήταν χαμηλότερες από αυτές του ορού. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις ο λόγος PF/S των επιπέδων των ΦΑ ήταν σημαντικά μεγαλύτερος του 1 γεγονός που υποδεικνύει πιθανά αυξημένη τοπική παραγωγή των ΦΑ κάτω από ορισμένες συνθήκες. Για τη διερεύνηση των παραμέτρων που σχετίζονται με την εμφανή αύξηση των ΦΑ στην ΥΣ οι ασθενείς της μελέτης κατηγοριοποιήθηκαν σε υποομάδες με βάση τα παρακάτω κριτήρια: α) ασθενείς με λόγο PF/S μεγαλύτερο της μονάδας (>1) για το 50% των αντιγόνων που ελέγχθηκαν για τα IgM ΦΑ και για το 75% των αντιγόνων που ελέγχθηκαν για τα IgA και IgG ΦΑ και β) ασθενείς με λόγο PF/S μεγαλύτερο της μονάδας (>1) και για τις τρεις τάξεις ΦΑ για το 25% και το 75% των αντιγόνων που ελέγχθηκαν. Οι ομάδες των ασθενών παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω **Πίνακα 10**.

Ig class	Αντιγόνα	Ασθενείς με PF/S ≥ 1
IgM	(4/8) 50%	21/63 (33.3%)
IgA	(6/8) 75%	13/63 (20.6%)
IgG	(6/8) 75%	18/63 (28.6%)
IgM+IgA+IgG	(2/8) 25%	30/63 (47.6%)
	(6/8) 75%	7/63 (11.1%)

Πίνακας 10: Νούμερα και ποσοστά ασθενών που εμφάνισαν για τα επίπεδα των ΦΑ ανά τάξη και συνολικά, λόγο PF/S μεγαλύτερο της μονάδας (PF/S>1).

Όταν οι ασθενείς με λόγο PF/S μεγαλύτερο της μονάδας αναλύθηκαν ανά τάξη ΦΑ, βρέθηκε πως ο λόγος PF/S για τα IgM ΦΑ ήταν σημαντικά υψηλότερος σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς, χωρίς όμως η ίδια διαφορά να εντοπίζεται στις απόλυτες τιμές των IgM ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό. Από την άλλη, στους ασθενείς αυτούς βρέθηκε πως τα επίπεδα των IgA ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς, χωρίς όμως η ίδια διαφορά να εντοπίζεται στις απόλυτες τιμές των επιπέδων των IgA ΦΑ στον ορό ή στον λόγο PF/S. Επιπλέον, στους ασθενείς αυτούς βρέθηκε πως τα επίπεδα των IgG ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό και στον ορό ήταν σημαντικά υψηλότερα από τους υπόλοιπους ασθενείς, χωρίς όμως η ίδια διαφορά να εντοπίζεται στον λόγο PF/S. Τέλος, η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε πως στους ασθενείς με λόγο PF/S μεγαλύτερο της μονάδας ανά τάξη ΦΑ εμφανίζονται σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IgM ΦΑ έναντι της ακτίνης ($p=0.0225$) και του DNA ($p<0.0001$) και IgG ΦΑ έναντι της ακτίνης ($p=0.0016$).

Όταν αναλύθηκαν οι ασθενείς με λόγο PF/S μεγαλύτερο της μονάδας και για τις τρεις τάξεις των ΦΑ, 30/63 (47.6%) εμφάνισαν λόγο PF/S μεγαλύτερο της μονάδας για το 25% των αντιγόνων που ελέγχθηκαν και για τους οποίους η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης επιβεβαίωσε μια αρνητική συσχέτιση με τα

επίπεδα της LDH στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0214$) και αυξημένα επίπεδα IgA ΦΑ έναντι του TNP ($p=0.0212$). Επιπλέον, 7/63 (11.1%) ασθενείς εμφάνισαν λόγο PF/S μεγαλύτερο της μονάδας και για τις τρεις τάξεις των ΦΑ, για το 75% των αντιγόνων που ελέγχθηκαν και για τους οποίους η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε μια θετική συσχέτιση με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων στην ΥΣ ($p=0.034$), αυξημένα επίπεδα IgA ΦΑ έναντι του TNP ($p=0.0377$) και IgG ΦΑ έναντι της ακτίνης ($p=0.0200$). Τέλος, άλλοι παράμετροι που φάνηκε πως επηρεάζουν τα επίπεδα των ΦΑ σ' αυτές τις ομάδες ασθενών, όπως ανέδειξε η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης είναι α) για τα επίπεδα των IgM ΦΑ: έναντι της Μυοσίνης η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0318$), έναντι της Υαλουρονιδάσης το μέγεθος της ΥΣ ($p=0.0114$) και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0462$), έναντι της Καρβονικής Ανυδράσης η ADA ($p=0.0323$) και β) για τα επίπεδα των IgA ΦΑ: έναντι της Ακτίνης η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό ($p=0.0235$), έναντι της Μυοσίνης ($p=0.0282$) και της Υαλουρονιδάσης ($p=0.0462$) το μέγεθος της ΥΣ καθώς επίσης γ) η συγκέντρωση των ολικών IgA για όλα τα αντιγόνα που ελέγχθηκαν ($p<0.001$). Στον **Πίνακα 11** παρατίθενται τα βασικά ευρήματα ως προς τα χαρακτηριστικά των ΦΑ, τις συγκεντρώσεις των ολικών ανοσοσφαιρινών και τις βιοχημικές παραμέτρους των ΥΣ, που εντοπίστηκαν στους ασθενείς που εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό σε σχέση με τον ορό.

Ig class	Ασθενείς με PF/S ≥ 1	[Ig]	PF ΦΑ
IgM	21/63 (33.3%)	↑PF/S	↑ Ακτινη ↑ DNA
IgA	13/63 (20.6%)	↑PF	-
IgG	18/63 (28.6%)	↑PF, ↑S	↑ Ακτινη

Ig class	Ασθενείς με PF/S ≥ 1	Παράμετρος	PF ΦΑ
IgM+IgA+IgG	30/63 (47.6%)	LDH (r-)	↑IgA TNP
	7/63 (11.1%)	↑ αρ. κυττάρων ΥΣ	↑IgA TNP ↑ IgG Ακτινη

Πίνακας 11: Βασικά ευρήματα ως προς τα χαρακτηριστικά των ΦΑ, τις συγκεντρώσεις των ολικών ανοσοσφαιρινών και τις βιοχημικές παραμέτρους των ΥΣ, που εντοπίστηκαν στους ασθενείς που εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό σε σχέση με τον ορό.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Τα ΦΑ στις ΥΣ

Τα ΦΑ είναι ανοσοσφαιρίνες κυρίως τάξης IgM, αλλά και IgA, IgG, ακόμα και IgE. Παράγονται κυρίως από τα B1 λεμφοκύτταρα που εδρεύουν σε ορογόνες κοιλότητες όπως η υπεζωκοτική, η περιτοναϊκή και η περικαρδιακή.²⁴⁴ Για τον λόγο αυτό, η αρχική μας υπόθεση και στόχος της μελέτης αυτής ήταν η ανίχνευσή τους σε ΥΣ καθώς, δεν υπήρχαν μελέτες στη βιβλιογραφία που να τεκμηριώνουν την παρουσία τους σε αυτές, σε ανθρώπους. Η μελέτη των ΦΑ σε ΥΣ ποικίλης αιτιολογίας αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας, καθώς τα ΦΑ διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην έμφυτη ανοσία, ενώ η παρουσία, τα επίπεδα και τα χαρακτηριστικά τους στο υπεζωκοτικό υγρό ενδέχεται να παρέχουν παθοφυσιολογικές και διαγνωστικές πληροφορίες, συμβάλλοντας στη καλύτερη διαχείριση των ΥΣ.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη μέτρηση των επιπέδων των ΦΑ έναντι οκτώ αντιγόνων-στόχων, τόσο στο υπεζωκοτικό υγρό όσο και στον ορό, σε ασθενείς με ΥΣ λόγω καρδιακής ανεπάρκειας (CHFPE), ΥΣ μη λοιμώδους αιτιολογίας (NIPE), παραπνευμονικές ΥΣ (δηλαδή λοιμώδους αιτιολογίας) (PPE) και κακοήθεις ΥΣ (MPE). Η επιλογή των αντιγόνων για την μελέτη χωρίστηκε σε

δύο κύριες κατηγορίες, οι οποίες επιλέχθηκαν με βάση την συνεισφορά τους στους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας και την ειδική συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία των ΥΣ. Η πρώτη κατηγορία περιλάμβανε αντιγόνα τα οποία είναι κλασικά χρησιμοποιούμενα στη διερεύνηση της φυσικής ανοσίας, ενώ η δεύτερη κατηγορία, ειδικά επιλεγμένα αντιγόνα, τα οποία έχουν υπό διαφορετικές περιστάσεις συνάφεια με παραμέτρους της ανάπτυξης ΥΣ και επομένως διακριτό παθοφυσιολογικό ενδιαφέρον αναφορικά με την παραγωγή και τη δυναμική διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού στις διάφορες παθήσεις.

Σε διιδρωματικές ΥΣ, όπως αυτές που σχετίζονται με την οξεία καρδιακή ανεπάρκεια, αναμένεται χαμηλή είσοδος πρωτεϊνών του ορού στην υπεζωκοτική κοιλότητα.²⁴⁵ Από την άλλη πλευρά, τα ΦΑ παράγονται φυσιολογικά από κύτταρα που εδρεύουν σε ορογόνες κοιλότητες, όπως η υπεζωκοτική, αλλά ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία των ΥΣ παραμένει άγνωστος.²⁴⁶ Τα αποτελέσματα δείχνουν διαφορές στα επίπεδα ΦΑ ανάμεσα στο υπεζωκοτικό υγρό και τον ορό, ενώ η αύξηση του λόγου PF/S >1 σε αρκετές περιπτώσεις και για διαφορετικές τάξεις αντισωμάτων ενισχύει την υπόθεση της τοπικής τους παραγωγής στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Οι υποομάδες ασθενών που πληρούσαν αυτά τα κριτήρια ενδέχεται να σχετίζονται με διακριτές φλεγμονώδεις καταστάσεις ή ανοσολογικά μοτίβα που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία των ΥΣ. Η υπερέκφραση ΦΑ (ιδίως IgM) στο υπεζωκοτικό υγρό —παρά τη χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών ανοσοσφαιρινών— υποδεικνύει μια πιθανή ανεξάρτητη τοπική ανοσολογική δραστηριότητα, η οποία δεν αντικατοπτρίζεται στη συστηματική κυκλοφορία. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση ότι τα B1-κύτταρα στην υπεζωκοτική κοιλότητα συμμετέχουν ενεργά στην τοπική ανοσιακή απόκριση, ειδικά σε εξιδρωματικές συλλογές, γεγονός που έχει αποδειχθεί σε ποντίκια, αλλά όχι στον άνθρωπο.²⁴⁷ Οι σημαντικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα επίπεδα των ΦΑ και κρίσιμων βιοχημικών δεικτών όπως η LDH και η ADA υποδεικνύουν ότι τα ΦΑ αντανakλούν ενεργές φλεγμονώδεις ή παθολογικές διεργασίες στον υπεζωκοτικό χώρο. Αυτά τα ευρήματα ενισχύουν την κατανόηση του ρόλου των ΦΑ στη διατήρηση της

ανοσολογικής ομοιόστασης και της συμμετοχής τους σε αυτοάνοσες και άλλες παθολογικές καταστάσεις.

8.2 Εκτίμηση της φυσικής αυτοανοσίας στις ΥΣ

Λόγω της τεράστιας ποικιλίας αντιγόνων που μπορούν να αποτελέσουν δυνητικούς στόχους των ΦΑ, ο καθορισμός ενός ελάχιστου συνδυασμού αντιγόνων-αντισωμάτων που να αντικατοπτρίζει την κατάσταση της φυσικής αυτοανοσίας στον άνθρωπο είναι ιδιαίτερα δύσκολος.²⁴⁸ Οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί σε διάφορα αντιγόνα, αρχικά ως μέσο διερεύνησης και ταξινόμησης της ποικιλομορφίας των αντιγονικών στόχων που αναγνωρίζονται από τα ΦΑ, και στη συνέχεια σε ορισμένα εξ αυτών, λόγω της συσχέτισής τους με παθολογικές καταστάσεις.²⁴⁹ ΦΑ που στρέφονται έναντι συντηρημένων επίτοπων σε αντιγόνα που εκφράζονται σε αφθονία από τα κύτταρα, όπως κυτταροσκελετικά συστατικά και το DNA, έχουν ανιχνευθεί στον ορό υγείων ατόμων, ενώ ο ρόλος τους έχει περιγραφεί ιδιαίτερος σε φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες καταστάσεις.²⁵⁰ Στο πλαίσιο των ΥΣ, η ανίχνευση ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό έχει αναφερθεί σε περιπτώσεις αντι-DNA αντισωμάτων σε ΥΣ που έχουν συσχετιστεί με αυτοάνοσες καταστάσεις. Στην παρούσα μελέτη και σύμφωνα με αποτελέσματα από προγενέστερες μελέτες, επιλέξαμε πέντε αντιγόνα (ακτίνη, μυοσίνη, θυρεοσφαιρίνη, DNA, και TNP) ως αντιπροσωπευτικούς στόχους για την εκτίμηση της φυσικής αυτοανοσίας.

Η αυξημένη παρουσία ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό σε ομάδες όπως PPE και NIPE ενισχύει την υπόθεση περί τοπικής ανοσολογικής ενεργοποίησης. Ο λόγος PF/S >1 των ΦΑ έναντι της ακτίνης, της μυοσίνης, του DNA και του TNP για αρκετά αντιγόνα, ενισχύει το ενδεχόμενο τοπικής σύνθεσης από B1 κύτταρα, όπως έχει υποστηριχθεί και σε άλλες αντίστοιχες κοιλότητες του σώματος σε πειραματικά μοντέλα (π.χ. περιτοναϊκή).²⁵¹ Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την άποψη ότι το πάνελ αυτών των αντιγόνων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της φυσικής ανοσίας στην υπεζωκοτική κοιλότητα και να προσφέρει παθοφυσιολογικές και διαγνωστικές πληροφορίες για την αιτιολογία των ΥΣ.

8.2.1 ΦΑ έναντι Ενδογενών αντιγόνων

Η **ακτίνη** και η **μυοσίνη** είναι βασικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, που εκφράζονται ευρέως στους περισσότερους ιστούς και παρουσιάζονται κυρίως στο εξωκυττάριο περιβάλλον κατά τη διάρκεια κυτταρικού τραυματισμού ή απόπτωσης.²⁵² Η ανώμαλη ενδοκυττάρια έκφραση της ακτίνης και των πρωτεϊνών δέσμευσής της συνδέεται με ποικίλες παθολογικές διεργασίες, όπως η εξέλιξη του καρκίνου, η ίνωση και η αμυλοείδωση, ενώ η φυσιολογική λειτουργία του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι ζωτικής σημασίας για τη δυναμική των λοιμώξεων, και η απελευθέρωση των κυτταροσκελετικών στοιχείων στο εξωκυττάριο περιβάλλον ενδέχεται να συμβάλλει σε αλλεργίες, διαταραχές της πήξης και την κυστική ίνωση.²⁵³ Τα ΦΑ έναντι πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, όπως η ακτίνη και η μυοσίνη, έχουν ανιχνευθεί σε ορούς που προέρχονται από ομφάλιο αίμα και σε υγιή παιδιά, ενώ έχει επίσης αναφερθεί η εμπλοκή τους σε ενήλικες σε διάφορες παθολογικές φλεγμονώδεις ή αυτοάνοσες καταστάσεις, όπως η μυοκαρδίτιδα και η ηπατική βλάβη, όπου συμβάλλουν στην ενίσχυση της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης.^{254,255,256,257} Στο πλαίσιο των ΥΣ, η παρουσία αυτών των ΦΑ, και ειδικότερα τα αυξημένα επίπεδα ΦΑ έναντι της ακτίνης και της μυοσίνης που παρατηρήθηκαν στις εξιδρωματικές ΥΣ (NIPE, PPE και MPE) σε σχέση με τις διιδρωματικές ΥΣ (CHFPE), μπορεί να αντανακλά αυξημένο βαθμό φλεγμονώδους ενεργοποίησης και απελευθέρωσης ενδοκυττάρων αντιγόνων στην υπεζωκοτική κοιλότητα λόγω κυτταρικής νέκρωσης.²⁵⁸ Η διαφοροποίηση αυτή ευθυγραμμίζεται με ευρήματα άλλων μελετών που δείχνουν ανοσολογική ενεργοποίηση και ενδογενή αντιγονική διέγερση σε λοιμώδεις ΥΣ, υποστηρίζοντας τον ρόλο των ΦΑ ως δεικτών τοπικής ιστικής αποδιοργάνωσης.²⁵⁹ Επιπρόσθετα, η θετική συσχέτιση των IgM ΦΑ έναντι της ακτίνης με δείκτες φλεγμονής όπως η LDH και η ADA, ενισχύει την υπόθεση της τοπικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η σχετική απουσία τους στις MPE ενδεχομένως υποδηλώνει την ανοσοκατασταλτική φύση του νεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος, ωστόσο ο υψηλός λόγος PF/S για τα IgA και IgG ΦΑ

πιθανά να αντιστοιχεί σει ενεργοποίηση κάτω από αυξημένη αντιγονική έκθεση στα αντιγόνα αυτά.^{260,261} Αντίστοιχα, τα IgA ΦΑ έναντι της ακτίνης συσχετίστηκαν με την ολική πρωτεΐνη που αποτελεί βασικό δείκτη διαπερατότητας και ανταπόκρισης της υπεζωκοτικής μεμβράνης στους μεσολαβητές της φλεγμονής. Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας που παρουσιάζουν αντισώματα έναντι ακτίνης και μυοσίνης σε συνθήκες απουσίας αυτοάνοσου νοσήματος, ως μέσου αποκατάστασης της καταστροφής ιστών ή φλεγμονωδών διεργασιών ευθυγραμμίζονται με δεδομένα που υποστηρίζουν την άμεση συμμετοχή της ακτίνης σε ασθένειες του πνεύμονα και του ομοιοστατικού ρόλου των ΦΑ.^{262,263}

Το **DNA** είναι γνωστός στόχος αυτοαντισωμάτων-δεικτών συστηματικών αυτοάνοσων νοσημάτων. Μελέτες για τα αυτοαντισώματα έναντι του DNA σε διάφορες νόσους, συμπεριλαμβανομένων αυτοάνοσων διαταραχών, όπως ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος (ΣΕΛ), η πολλαπλή σκλήρυνση, η νεφρίτιδα και άλλες, υποστηρίζουν τα πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη ρυθμιστική τους λειτουργία στο ανοσιακό σύστημα.²⁶⁴ Παρομοίως, η παρουσία αντι-DNA αντισωμάτων στο υπεζωκοτικό υγρό έχει συσχετιστεί με αυτοάνοσες παθήσεις, όπως ο ΣΕΛ, και η ανίχνευσή τους στο υπεζωκοτικό υγρό μπορεί πιθανά να συμβάλει στη διάγνωση και κατανόηση της παθοφυσιολογίας τέτοιων καταστάσεων.²⁶⁵ Τα επίπεδα PF/S των IgG αντι-DNA ΦΑ ήταν σημαντικά υψηλότερα στις κακοήθεις ΥΣ (MPE) σε σχέση με τις διδρωματικές ΥΣ (CHFPE), πιθανώς αντικατοπτρίζοντας την απορρύθμιση της ανοσολογικής ανοχής και την παρουσία κυτταρικού θανάτου από αποπτωτικά ή νεοπλασματικά κύτταρα. Αντισώματα κατά του DNA είναι καλά τεκμηριωμένοι δείκτες αυτοάνοσων νοσημάτων, αλλά η παρουσία τους σε κακοήθεις συλλογές μπορεί να συνδέεται με την ενδογενή ανοσολογική αντίδραση κατά των νεοπλασματικών κυττάρων ή με την έκλυση μορίων DNA που αντανakλούν το σκέλος του cell-free DNA.²⁶⁶

Η **θυρεοσφαιρίνη** επιλέχθηκε ως ένα ιστοειδικό αντιγόνο που συχνά αναγνωρίζεται από ΦΑ του ορού αλλά επίσης και σε περιπτώσεις θυρεοειδίτιδας ή μεταστατικού καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα. Αντισώματα έναντι της θυρεοσφαιρίνης έχουν ανιχνευθεί σε περιπτώσεις καρκίνου του θυρεοειδούς με

μεταστάσεις στον υπεζωκότα, οδηγώντας σε κακοήθεις ΥΣ με κακή πρόγνωση.^{267,268} Παρά το γεγονός ότι η θυρεοσφαιρίνη αποτελεί ιστοειδικό αντιγόνο το οποίο συχνά αναγνωρίζεται από ΦΑ, ιδίως σε περιπτώσεις θυρεοειδίτιδας ή καρκίνων του αδένα, στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα IgM, IgA και IgG ΦΑ έναντι αυτής ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις κακοήθεις ΥΣ (ΜΡΕ) σε σύγκριση με τις ομάδες ΝΙΡΕ και ΡΡΕ. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί επιπλέον να ερμηνευθεί μέσα από το πρίσμα της ανοσοκαταστολής που χαρακτηρίζει το μικροπεριβάλλον των ΜΡΕ, όπου παρατηρείται αυξημένη έκφραση ανοσορυθμιστικών κυτοκινών (όπως TGF- β και IL-10) και μορίων αναστολής της ανοσοαπόκρισης, οδηγώντας σε δυσλειτουργία ή εξάντληση των Β1 κυττάρων.²⁶⁹ Επιπλέον, σε περιπτώσεις μεταστατικής νόσου θυρεοειδούς, τα κυκλοφορούντα αντιγόνα (Θυρεοσφαιρίνη) δύνανται να «καταναλώνουν» τα αντίστοιχα αντισώματα σχηματίζοντας ανοσοσυμπλέγματα, καθιστώντας τα μη ανιχνεύσιμα με τις κλασικές μεθόδους όπως η ELISA.²⁷⁰ Εναλλακτικά, η δυναμική ανακατανομή των ΦΑ εντός του μικροπεριβάλλοντος της υπεζωκοτικής κοιλότητας μπορεί να ευνοεί την παρουσία ΦΑ με υψηλότερη παθοφυσιολογική σημασία, όπως αυτά κατά της ακτίνης ή εκείνων κατά εξωγενών αντιγόνων όπως το TNP, εις βάρος άλλων όπως τα αντι-θυρεοσφαιρίνης, περιορίζοντας έτσι την έκφρασή τους τοπικά.²⁷¹

8.2.2 ΦΑ έναντι εξωγενών αντιγόνων

Το **TNP** (τρινιτροφαινόλη) είναι ένα απτένιο που έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της φυσικής ανοσίας και τα ΦΑ έναντι αυτού έχουν προταθεί ως έμμεσος δείκτης για την εκτίμηση της πολυδραστικότητας του ορού, η οποία αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό των ΦΑ.^{272,273} Τα αντισώματα κατά του TNP (ή του DNP), τα οποία κωδικοποιούνται κυρίως από γονίδια της βλαστικής σειράς, αποτελούν σημαντικό μέρος του φυσικού ρεπερτορίου αντισωμάτων και διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην ανοσολογική ομοίωση και την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού.²⁷⁴ Ειδικότερα, τα αντι-DNP αντισώματα έχουν υιοθετηθεί ως βιοδείκτες πολυδραστικότητας, καθώς το DNP αποτελεί ένα συνθετικό απτένιο που δεν απαντάται φυσιολογικά στον οργανισμό και επομένως, η αντίδραση

εναντίον του αποτελεί ισχυρή ένδειξη πολυδραστικότητας και όχι ειδικής, αντιγονο-κατευθυνόμενης ανοσιακής απόκρισης.²⁷⁵ Τα αντισώματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων και των παθογόνων, καθώς προάγουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και ενισχύουν τη φαγοκυττάρωση, συμβάλλοντας έτσι στην αποτροπή της χρόνιας φλεγμονής και της αυτοανοσίας.²⁷⁶ Η ποσοτικοποίησή τους αποτελεί εν δυνάμει δείκτη της ανοσολογικής κατάστασης και ενδέχεται να έχει διαγνωστική σημασία σε νοσήματα που χαρακτηρίζονται από διαταραχές στην ανοσοεπιτήρηση ή απορρύθμιση της ομοιόστασης. Η παρουσία τους στο υπεζωκοτικό υγρό μπορεί να αντικατοπτρίζει μια γενικευμένη ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης, αν και η κλινική τους σημασία παραμένει υπό διερεύνηση. Στη παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα IgM αντι-TNP ΦΑ στις PPE σε σύγκριση με τις MPE και CHFPE καθώς και αυξημένα στις NIPE σε σύγκριση με τις MPE, ενώ αυξημένα ήταν και τα επίπεδα των IgA αντι-TNP ΦΑ στις PPE σε σχέση με τις MPE. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με προηγούμενες παρατηρήσεις που έχουν αναδείξει την αυξημένη παραγωγή πολυδραστικών αντισωμάτων σε λοιμώξεις, ωστόσο φαίνεται επιπλέον πως υποδεικνύουν μια ισχυρή ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας και της τοπικής παραγωγής ΦΑ τόσο σε λοιμώδεις όσο και μη λοιμώδεις φλεγμονώδεις συλλογές.²⁷⁷

8.3 Αντιγόνα σχετιζόμενα με διαφορετικές παθοφυσιολογικές εκφάνσεις των ΥΣ

Τα τρία αυτά ειδικά αντιγόνα —LPS, Υαλουρονιδάση και Καρβονική Ανυδράση— αποτελούν δείκτες λειτουργικών διεργασιών στο υπεζωκοτικό περιβάλλον: μικροβιακή αναγνώριση (LPS), ρύθμιση αποδόμησης του υαλουρονικού οξέος που παράγεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα (Υαλουρονιδάση), και ρύθμιση οξεοβασικής ισορροπίας (Καρβονική Ανυδράση). Η παρουσία ΦΑ έναντι των αντιγόνων αυτών υποδεικνύει πολυεπίπεδη συμμετοχή της φυσικής ανοσίας, πέρα από την κλασική άμυνα έναντι παθογόνων.

8.3.1 ΦΑ έναντι LPS

ΦΑ που στοχεύουν το LPS δεν έχουν ποτέ περιγραφεί σε υπεζωκοτικό υγρό ασθενών με ΥΣ, παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί πειραματικά μοντέλα ποντικών με λοιμώδη ΥΣ. Για παράδειγμα, έχει δείχθει σε ποντίκια C57Bl/6 ότι η παραγωγή των αντι-LPS IgM ΦΑ από τα B1a λεμφοκύτταρα εξαρτάται από την IL-1β, διαδραματίζοντας προστατευτικό ρόλο έναντι της πνευμονικής λοίμωξης από *Francisella tularensis* LVS.²⁷⁸ Το LPS λειτουργεί ως ισχυρός διεγέρτης της φυσικής ανοσίας σε ένα ευρύ φάσμα ευκαρυωτικών οργανισμών, από έντομα έως ανθρώπους, επηρεάζοντας παράλληλα την ειδική ανοσία. Αξιοσημείωτα, το LPS αποτελεί κύριο παράγοντα των σηπτικών επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένου του σηπτικού σοκ σε ασθενείς, ενώ η στόχευση του LPS έχει ήδη προταθεί ως ευεργετική για λοιμώξεις από Gram-αρνητικά βακτήρια.^{279,280} Ωστόσο, μετά από ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος, το LPS μπορεί να προκαλέσει ανοχή, μια κρίσιμη ανοσολογική απόκριση που βοηθά στη διατήρηση της ομοιόστασης και στην αποτροπή υπερβολικής φλεγμονής.²⁸¹ Από παθοφυσιολογικής σκοπιάς, το LPS δρα μέσω υποδοχέων Toll-like (κυρίως TLR4), ενεργοποιώντας NFκB και την παραγωγή IL-1, TNF-α και IFN-γ. Επιπλέον, έχει δείχθει ότι η διέγερση των TLRs επηρεάζει σημαντικά τον τίτλο των πολυδραστικών αντισωμάτων.²⁸² Η παρουσία περιβαλλοντικού LPS μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μείωση της επίπτωσης αυτοάνοσων νοσημάτων και στην ενίσχυση της ανοχής του εντέρου έναντι των ποικίλων αντιγόνων στα τρόφιμα.²⁸³ Η τυχόν εμπλοκή των ΦΑ στην LPS-επαγόμενη ανοχή ως πρωταρχικό ή δευτερογενές συμβάν παραμένει υπό διερεύνηση.²⁸⁴

Στα αποτελέσματά μας, βρέθηκαν χαμηλότερα επίπεδα ΦΑ έναντι του LPS στις CHFPE χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες ελέγχου. Επιπλέον, τα επίπεδα των IgM αντι-LPS ΦΑ στο υπεζωκοτικό υγρό βρέθηκαν αυξημένα στις PPE σε σύγκριση με τις MPE, υποδηλώνοντας υπερβολική ανοσολογική ενεργοποίηση ως απόκριση σε βακτηριακή λοίμωξη ή/και φλεγμονή στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Αυτή η

παρατήρηση ισχύει και για τη μέτρηση των ΦΑ στον ορό, όπου στις MPE τα επίπεδα των IgM αντι-LPS ΦΑ ήταν χαμηλότερα σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων. Αυτό το αποτέλεσμα ευθυγραμμίζεται με άλλες μελέτες που έδειξαν ότι συγκεκριμένες ειδικότητες ΦΑ έναντι υδατανθρακικών επιτόπων ανευρίσκονται συχνά σε μειωμένα επίπεδα στον ορό ασθενών με καρκίνο.²⁸⁵ Το εύρημα αυτό μπορεί να είναι διαγνωστικά χρήσιμο στα πρώιμα στάδια της διαφορικής διάγνωσης, καθώς οι μετρήσεις στον ορό μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη PPE ή την απουσία MPE.

Επιπρόσθετα, για τα IgA αντι-LPS ΦΑ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων τους στις NIPE σε σύγκριση με τις PPE, υποδηλώνοντας ότι τα ανιχνευθέντα αντι-LPS ΦΑ παράγονται ανεξάρτητα από την έκθεση σε λοιμογόνους παράγοντες. Αυτό θα μπορούσε να υποστηριχθεί και από την απουσία διασταυρούμενης αντίδρασης των IgG. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία των αντι-LPS ΦΑ ενδέχεται να μην σχετίζεται άμεσα με έκθεση σε λοιμογόνο παράγοντα, αλλά να αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εγγενούς ανοσιακής επιτήρησης. Η αυξημένη ανίχνευση αντι-LPS ΦΑ στις NIPE μπορεί να αποτελεί έκφραση αυτής της πρώιμης ενεργοποίησης της φυσικής ανοσίας χωρίς να έχει προηγηθεί ειδική ευαισθητοποίηση, βασική ιδιότητα των ΦΑ. Οι διαφορές στα επίπεδα των αντι-LPS επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης, η οποία έδειξε αρνητική συσχέτιση του λόγου PF/S για τα IgM και τα IgA αντι-LPS ΦΑ με την ομάδα των ασθενών με MPE. Επιπλέον, οι μετρήσεις των επιπέδων των αντι-LPS ΦΑ σε συνδυασμό με τα βιοχημικά ευρήματα του υπεζωκοτικού υγρού και του ορού αύξησαν σημαντικά τόσο τη θετική όσο και την αρνητική προγνωστική αξία για τη διάκριση μεταξύ κακοήθων και καλοήθων ΥΣ.

Η αξία των μετρήσεων των αντι-LPS ΦΑ στη διάγνωση ή τη διαχείριση των ΥΣ παραμένει να διευκρινιστεί, ιδιαίτερα για τη διάγνωση των MPE, δεδομένης της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας της κυτταρολογικής εξέτασης του υπεζωκοτικού υγρού. Συνεπώς, τα ευρήματά μας παρέχουν τη βάση για περαιτέρω διερεύνηση αυτής της υπόθεσης, η οποία πρέπει να επιβεβαιωθεί σε μελλοντικές μελέτες. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματά

μας περιορίζονται σε μια αντιπροσωπευτική smooth μορφή LPS που χρησιμοποιήθηκε ως στόχος αντιγόνου στα πειράματά μας. Συγκεκριμένα, ο ορότυπος O55 είναι γνωστός ως ένας από τους πιο διαδεδομένους στα *Enteropathogenic Escherichia coli*, και επομένως, τα ανιχνευθέντα αντι-LPS αντισώματα ανήκουν στο ρεπερτόριο των ΦΑ και όχι σε ειδικότητα έναντι συγκεκριμένου οροτύπου.²⁸⁶ Ωστόσο, άλλες μη σχετικές παραλλαγές θα πρέπει να δοκιμαστούν περαιτέρω, καθώς μπορεί να αποδειχθούν πιο αποτελεσματικές στην ανάδειξη των διαφορών που παρατηρήθηκαν. Αυτό ευθυγραμμίζεται με προηγούμενα συμπεράσματα για την αναγνώριση ελάχιστων υδατανθρακικών επίτοπων που εκφράζονται άφθονα σε μικροβιακές επιφάνειες ως ένας αποδοτικός μηχανισμός της χυμικής ανοσίας για την αντιμετώπιση των παθογόνων και της ομοιόστασης του ανοσιακού συστήματος.²⁸⁷

Ένα ακόμη ενδιαφέρον συμπέρασμα είναι ότι οι διαφορετικές τάξεις ΦΑ (G, A, M) μπορεί να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες στο πλαίσιο της ανάλυσης του υπεζωκοτικού υγρού, οι οποίες θα χάνονταν αν οι μετρήσεις περιορίζονταν μόνο στη συνολική δραστηριότητα των ΦΑ. Παρότι οι διαφορές στα επίπεδα των αντι-LPS ΦΑ ήταν εμφανείς και σημαντικές μεταξύ των ομάδων ασθενών στη μονοπαραγοντική ανάλυση, αυτό επιβεβαιώθηκε στην πολυπαραγοντική ανάλυση μόνο όταν συμπεριλήφθηκαν και οι μετρήσεις στον ορό ως λόγος PF/S. Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις των IgM, IgA και IgG αντι-LPS ΦΑ τόσο στο υπεζωκοτικό υγρό όσο και στον ορό είναι απαραίτητες για τη μέγιστη αξιοποίησή τους σε συνδυασμό με τα κλινικά εργαστηριακά δεδομένα.²⁸⁸

8.3.2 ΦΑ έναντι Υαλουρονιδάσης

Το υαλουρονικό οξύ (HA) είναι μια γλυκοζαμινογλυκάνη που απαντάται σε αφθονία στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ενυδάτωσης, της ελαστικότητας και της δομικής ακεραιότητας των ιστών.²⁸⁹ Παίζει καθοριστικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός, η κινητικότητα και η μετανάστευση των κυττάρων καθώς και η επούλωση τραυμάτων. Ο καταβολισμός του HA

πραγματοποιείται κυρίως μέσω των υαλουρονιδασών, μιας οικογένειας ενζύμων που διασπούν το ΗΑ σε μικρότερα τμήματα, τροποποιώντας έτσι τη βιολογική του δράση.

Οι υαλουρονιδάσες, και ειδικότερα η ΡΗ20, εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς και εμπλέκονται σε διεργασίες όπως η γονιμοποίηση και η αναδιαμόρφωση των ιστών αλλά και σε διαδικασίες της καρκινογένεσης όπως η αγγειογένεση και η φλεγμονή.²⁹⁰ Η δράση τους επηρεάζει το ιξώδες των βιολογικών υγρών που έχουν σημαντική συγκέντρωση ΗΑ – για παράδειγμα, η αυξημένη δραστηριότητα της μπορεί να μειώσει το ιξώδες του υπεζωκοτικού υγρού, διευκολύνοντας την παροχέτευση μιας ΥΣ. Στον υπεζωκότα, το ΗΑ παράγεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα, συμβάλλοντας, μεταξύ άλλων, στη μείωση της τριβής μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα κατά την αναπνοή.²⁹¹ Σε περιπτώσεις ασθενών με ΜΡΕ όπου το υπεζωκοτικό υγρό έχει υψηλή τιμή ιξώδους και έτσι η παροχέτευση της ΥΣ είναι ανέφικτη, έχει περιγραφεί η θεραπευτική χορήγηση υαλουρονιδάσης στην υπεζωκοτική κοιλότητα με αποτέλεσμα τη μείωση του ιξώδους και την επακόλουθη δυνατότητα παροχέτευσης της ΥΣ.²⁹² Τα παραπάνω αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της υαλουρονιδάσης στη φυσιολογική διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού αλλά και την κλινική αξία της εξωγενούς θεραπευτικής χορήγησης της προκειμένου να διευκολυνθεί η παροχέτευση μιας ΜΡΕ.

Ωστόσο, το ΗΑ παρουσιάζει επίσης υπερφλεγμονώδη δράση και αποτελεί σημαντικό συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα του ΗΑ μπορεί να αυξηθούν σε ασθενείς με καλοήθεις φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, όπου τα συνοβιακά κύτταρα παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ΗΑ υπό την επίδραση κυταροκινών, όπως ο TNF-α και η IL-1β. Αυξημένα επίπεδα ΗΑ έχουν αναφερθεί και σε ασθενείς με φυματιώδεις ΥΣ.²⁹³ Επιπλέον, τα επίπεδα του ΗΑ στο υπεζωκοτικό υγρό σε επιπλεγμένες παραπνευμονικές συλλογές ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με διδρώματα ή άλλους τύπους εξιδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών, συμπεριλαμβανομένων των κακοήθων συλλογών και των μη

επιπλεγμένων παραπνευμονικών συλλογών.²⁹⁴ Παρόλο που τα δεδομένα σχετικά με τα επίπεδα του ΗΑ σε παραπνευμονικές συλλογές είναι περιορισμένα, πιθανολογείται πως το ΗΑ μπορεί να παράγεται τοπικά στο σημείο της φλεγμονής, ως μέρος της απόκρισης των μεσοθηλιακών κυττάρων στη λοίμωξη, και μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην κλινική πορεία του εμπτυήματος.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας ανέδειξαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα IgM ΦΑ έναντι της υαλουρονιδάσης στην ομάδα NIPE σε σύγκριση με τις CHFPE και της MPE, ενώ παρόμοια τάση εμφάνιζαν και για την ομάδα PPE. Η παρουσία αυτών των ΦΑ ενδέχεται να αντικατοπτρίζει ανοσολογική ρύθμιση της υαλουρονιδάσης και, κατ' επέκταση, της βιοσύνθεσης και αποδόμησης του ΗΑ. Το ΗΑ εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία των ΥΣ μέσω της ιδιότητάς του να συγκρατεί νερό και να συμβάλλει στην αύξηση της πίεσης εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Έτσι, τα αντισώματα που στρέφονται κατά της υαλουρονιδάσης μπορεί να περιορίζουν τη διάσπαση του ΗΑ, μειώνοντας τον όγκο της ΥΣ. Σε μη λοιμώδεις αλλά και σε παραπνευμονικές συλλογές, το ανοσιακό σύστημα μπορεί να παράγει ενεργά ΦΑ έναντι της υαλουρονιδάσης, ρυθμίζοντας έτσι τη δραστηριότητα του ενζύμου και επηρεάζοντας τον καταβολισμό του ΗΑ.

Φαίνεται λοιπόν πως το ΗΑ και η υαλουρονιδάση διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των ΥΣ, επηρεάζοντας τα χαρακτηριστικά του υγρού και την κλινική έκβαση. Η παρουσία ΦΑ έναντι της υαλουρονιδάσης στις ΥΣ φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με την αιτιολογία τους, αντανakλώντας τη σημασία της παθοφυσιολογικής διαταραχής που οδηγεί στην ΥΣ αναφορικά με την απόκριση των κυττάρων Β1α που παράγουν τα ΦΑ στην υπαζωκοτική κοιλότητα. Θα οφελήσει πολύ στο μέλλον η μέτρηση των ΦΑ έναντι της υαλουρονιδάσης σε συνδυασμό με τα επίπεδα ΗΑ στο υπεζωκοτικό υγρό. Η κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί να προσφέρει νέες προοπτικές στη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση των ΥΣ μέσω στοχευμένης τροποποίησης του μεταβολισμού του ΗΑ.

8.3.3 ΦΑ έναντι Καρβονικής Ανυδράσης

Οι καρβονικές ανυδράσεις (CAs) αποτελούν μια οικογένεια ψευδαργυρο-εξαρτώμενων ενζύμων που καταλύουν την αναστρέψιμη υδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) προς διττανθρακικό (HCO_3^-) και πρωτόνιο (H^+). Αποτελούν ένζυμα-κλειδιά για τη ρύθμιση του pH και της παραγωγής υγρών στις ορογόνες κοιλότητες. Εκφράζονται ευρέως σε διάφορους ιστούς, υπογραμμίζοντας τον κεντρικό τους ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης.²⁹⁵ Αυτή η θεμελιώδης αντίδραση είναι κρίσιμη για διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αναπνοής, της ρύθμισης της οξεοβασικής ισορροπίας και του σχηματισμού βιολογικών υγρών, όπως το γαστρικό οξύ και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενώ, στους μεταβολικά ενεργούς ιστούς, όπως οι μύες, οι CAs διευκολύνουν την απομάκρυνση του CO_2 , προλαμβάνοντας την ενδοκυτταρική οξέωση. Επιπλέον, οι μεμβρανοδεσμευμένες CAs συμβάλλουν στην οξίνιση του εξωκυττάριου περιβάλλοντος, κρίσιμη για διαδικασίες όπως η μεταφορά ιόντων και η απορρόφηση θρεπτικών ουσιών. Ορισμένες ισομορφές της CA σχετίζονται με παθολογικές διεργασίες ασβεστοποίησης, προάγοντας την εναπόθεση αλάτων ασβεστίου σε ιστούς. Αυτή η λειτουργία έχει σημασία σε παθήσεις όπως η αγγειακή ασβεστοποίηση, η νεφρολιθίαση και οι ασβεστοποιήσεις που σχετίζονται με κακοήθειες, καθιστώντας τις CAs δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους.²⁹⁶

Σύγχρονες μελέτες έχουν διερευνήσει κάποιες ισομορφές της CA στις ΥΣ. Για παράδειγμα, τα επίπεδα της καρβονικής ανυδράσης XII (CAXII) βρέθηκαν αυξημένα σε υπεζωκοτικά υγρά ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα σε σύγκριση με εκείνα ασθενών με φυματιώδη πλευρίτιδα. Η αυξημένη έκφραση της CAXII έχει προταθεί μάλλον καταχρηστικά ως βιοδείκτης για κακοήθειες ΥΣ, με δεδομένη τη χαμηλή ευαισθησία 60% και ειδικότητα 75%.²⁹⁷ Στη παρούσα μελέτη, τόσο τα IgM όσο και τα IgG ΦΑ έναντι της καρβονικής ανυδράσης II παρουσίασαν σημαντικά αυξημένο λόγο PF/S στην ομάδα NIPE σε σύγκριση με τις ομάδες MPE και CHFPE. Η αυξημένη τοπική παρουσία των ΦΑ αυτών στο υπεζωκοτικό υγρό πιθανώς υποδηλώνει ένα ρόλο του ανοσιακού συστήματος στους μηχανισμούς ρύθμισης της ενδοϋπεζωκοτικής οξεοβασικής ισορροπίας και το pH

του υγρού ειδικά σε καταστάσεις με έντονη φλεγμονή. Η ανοσορρύθμιση της καρβονικής ανυδράσης δεν έχει πλήρως χαρτογραφηθεί, αλλά υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής της σε νοσήματα όπως το καρκίνωμα νεφρικού τύπου και η νόσος του Behçet, όπου τα αντισώματα έναντι αυτής ανιχνεύονται στον ορό.^{298,299,300} Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση των IgM ΦΑ έναντι της CA με την ADA στο υπεζωκοτικό υγρό, δείκτη φλεγμονώδους δραστηριότητας, γεγονός που υποστηρίζει την ενεργό συμμετοχή αυτών των ΦΑ σε τοπικές διεργασίες.

Η ανίχνευση των ΦΑ έναντι της CA στις ΥΣ μπορεί να έχει ενδιαφέρουσες προεκτάσεις. Σε καλοήθεις φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως λοιμώξεις ή αυτοάνοσες αντιδράσεις, η αυξημένη διέγερση και ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος μπορεί να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ΦΑ έναντι αυτοαντιγόνων όπως η CA. Αντίθετα, οι κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές συχνά συνοδεύονται από μηχανισμούς ανοσοδιαφυγής των καρκινικών κυττάρων, που μπορεί να καταστέλλουν την παραγωγή ΦΑ. Το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον που προκαλείται από τον όγκο μπορεί να εξηγήσει τα χαμηλά επίπεδα ΦΑ σε αυτούς τους ασθενείς. Η παραπάνω υπόθεση συνάδει με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ΦΑ έναντι της CA στις καλοήθεις σε σύγκριση με τις κακοήθεις ΥΣ. Η πιθανή εμπλοκή αυτών των ΦΑ μπορεί να εντοπιστεί στην αποκατάσταση του όξινου μικροπεριβάλλοντος που δημιουργούν τα καρκινικά κύτταρα και στην ανάπτυξη των όγκων. Έτσι, η μέτρηση αυτών των αντισωμάτων θα μπορούσε να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των ΥΣ.

8.4 Συμπεράσματα και Μελλοντικές Κατευθύνσεις

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη που απέδειξε την παρουσία ΦΑ στο ανθρώπινο υπεζωκοτικό υγρό και παρέχει σημαντικές ενδείξεις τοπικής παραγωγής ΦΑ στην ανθρώπινη υπεζωκοτική κοιλότητα. Επίσης, έδειξε ότι η ποσότητα των ΦΑ και των τριών τάξεων που αξιολογήθηκαν (G, A, M) ποικίλλει ανάλογα με την υποκείμενη αιτία ανάπτυξης της ΥΣ. Τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι τα ΦΑ διαδραματίζουν ρόλο στην τοπική ανοσολογική απόκριση στην υπεζωκοτική κοιλότητα και θέτουν τις βάσεις για επόμενες

μελέτες που θα διερευνήσουν σε βάθος το ρόλο των ΦΑ σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις σε σχέση με τους πληθυσμούς B1 λεμφοκυττάρων που εντοπίζονται στο λεμφικό ιστό της υπεζωκοτικής κοιλότητας.

Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των ΦΑ μεταξύ ομάδων ασθενών. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των IgM και IgA ΦΑ αντι-LPS ήταν αυξημένα σε λοιμώδεις και μη λοιμώδεις μη κακοήθεις συλλογές, ενώ μειωμένα σε κακοήθεις συλλογές, υποδηλώνοντας πιθανή καταστολή της φυσικής ανοσίας στο περιβάλλον κακοήθειας. Η διαφοροποίηση των επιπέδων των ΦΑ μεταξύ καλοήθων και κακοήθων συλλογών υποδεικνύει την πιθανή χρήση τους ως βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόγνωση των ΥΣ.³⁰¹ Επιπλέον, η αναλογία PF/S >1 που βρέθηκε για αρκετά αντιγόνα υποδηλώνει ενδοϋπεζωκοτική παραγωγή των ΦΑ, πιθανώς από B1 κύτταρα, όπως έχει προταθεί και σε άλλες ορογόνες κοιλότητες κυρίως σε πειραματικές μελέτες σε ποντίκια. Η χρησιμότητα όλων αυτών των μετρήσεων παραμένει να καθοριστεί. Ωστόσο, το γεγονός ότι τα ΦΑ μπορούν να ανιχνευθούν σε ΥΣ, εγείρει ερωτήματα σχετικά με τον φυσιολογικό τους ρόλο, τα οποία πρέπει να διερευνηθούν σε μελλοντικές μελέτες. Αυτά τα ερωτήματα είναι κεντρικά για τη διατήρηση της ανοσιακής ομοιόστασης στην υπεζωκοτική κοιλότητα, τον πιθανό ανοσορρυθμιστικό τους ρόλο, την αποκατάσταση και αναγέννηση των ιστών, καθώς και τις προστατευτικές τους δράσεις έναντι παθογόνων ή κακοήθειας.

Η διάγνωση των ΥΣ παραμένει σημαντική πρόκληση στην κλινική πράξη, δεδομένης της ποικιλίας των αιτιολογιών που τις προκαλούν, όπως λοιμώξεις, κακοήθειες, καρδιακή ανεπάρκεια και άλλες παθήσεις. Η έγκαιρη και ακριβής διαφοροδιάγνωση είναι κρίσιμη για τη σωστή θεραπευτική διαχείριση και την πρόγνωση, μειώνοντας τον κίνδυνο επιπλοκών. Τα ΦΑ στην υπεζωκοτική κοιλότητα θα πρέπει να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βάθος και λεπτομέρεια, καθώς είναι ενδεικτικό από την παρούσα μελέτη ότι μπορούν να παρέχουν πληροφορίες αξιοποιήσιμες σε όλα τα παραπάνω επίπεδα, διαφοροδιάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία σε συνδυασμό με την διεύρυνση των γνώσεων για την ανοσολογική ομοιόσταση της υπεζωκοτικής κοιλότητας.

9. Βιβλιογραφία

- ¹ MARRACK, J. Nature of Antibodies. *Nature* **133**, 292–293 (1934). doi: [10.1038/133292b0](https://doi.org/10.1038/133292b0)
- ² Jerne NK. THE NATURAL-SELECTION THEORY OF ANTIBODY FORMATION. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1955 Nov 15;41(11):849-57. doi: [10.1073/pnas.41.11.849](https://doi.org/10.1073/pnas.41.11.849)
- ³ Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*. 1974 Jan;125C(1-2):373-89. PMID: [4142565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4142565/).
- ⁴ PORTER RR. The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J*. 1959 Sep;73(1):119-26. doi: [10.1042/bj0730119](https://doi.org/10.1042/bj0730119)
- ⁵ EDELMAN GM, POULIK MD. Studies on structural units of the gamma-globulins. *J Exp Med*. 1961 May 1;113(5):861-84. doi: [10.1084/jem.113.5.861](https://doi.org/10.1084/jem.113.5.861)
- ⁶ Vollmers HP, Brändlein S. The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol Histopathol*. 2005 Jul;20(3):927-37. doi: [10.14670/HH-20.927](https://doi.org/10.14670/HH-20.927)
- ⁷ Karsenti E, Guilbert B, Bornens M, Avrameas S. Antibodies to tubulin in normal nonimmunized animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Sep;74(9):3997-4001. doi: [10.1073/pnas.74.9.3997](https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.3997)
- ⁸ Avrameas S, Guilbert B, Dighiero G. Natural antibodies against tubulin, actin myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera, and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia may express similar antibody specificities. *Ann Immunol (Paris)*. 1981 Mar-Apr;132C(2):231-6. doi: [10.1016/0769-2625\(81\)90031-3](https://doi.org/10.1016/0769-2625(81)90031-3)
- ⁹ Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J Immunol*. 1982 Jun;128(6):2779-87. PMID: [6176652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6176652/).
- ¹⁰ Lutz HU, Wipf G. Naturally occurring autoantibodies to skeletal proteins from human red blood cells. *J Immunol*. 1982 Apr;128(4):1695-9. PMID: [7061846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7061846/).
- ¹¹ Casali P, Notkins AL. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today*. 1989 Nov;10(11):364-8. doi: [10.1016/0167-5699\(89\)90268-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(89)90268-5)
- ¹² Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today*. 1991 May;12(5):154-9. doi: [10.1016/S0167-5699\(05\)80045-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(05)80045-3)
- ¹³ Dighiero G, Guilbert B, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies. *J Immunol*. 1982 Jun;128(6):2788-92. PMID: [6804567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6804567/).
- ¹⁴ Marchalonis JJ, Kaveri S, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD. Natural recognition repertoire and the evolutionary emergence of the combinatorial immune system. *FASEB J*. 2002 Jun;16(8):842-8. doi: [10.1096/fj.01-0953hyp](https://doi.org/10.1096/fj.01-0953hyp)
- ¹⁵ Palma J, Tokarz-Deptuła B, Deptuła J, Deptuła W. Natural antibodies - facts known and unknown. *Cent Eur J Immunol*. 2018;43(4):466-475. doi: [10.5114/ceji.2018.81354](https://doi.org/10.5114/ceji.2018.81354)
- ¹⁶ Hofmann J, Greter M, Du Pasquier L, Becher B. B-cells need a proper house, whereas T-cells are happy in a cave: the dependence of lymphocytes on secondary lymphoid tissues during evolution. *Trends Immunol*. 2010 Apr;31(4):144-53. doi: [10.1016/j.it.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.it.2010.01.003)
- ¹⁷ Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity*. 2012 Jan 27;36(1):13-21. doi: [10.1016/j.immuni.2011.11.017](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.017)
- ¹⁸ Ueki Y, Goldfarb IS, Harindranath N, Gore M, Koprowski H, Notkins AL, Casali P. Clonal analysis of a human antibody response. Quantitation of precursors of antibody-producing cells and generation and characterization of monoclonal IgM, IgG, and IgA to rabies virus. *J Exp Med*. 1990 Jan 1;171(1):19-34. doi: [10.1084/jem.171.1.19](https://doi.org/10.1084/jem.171.1.19)
- ¹⁹ Avrameas S, Ternynck T, Tsonis IA, Lymberi P. Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview. *J Autoimmun*. 2007 Dec;29(4):213-8. doi: [10.1016/j.jaut.2007.07.010](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.07.010)
- ²⁰ Louzir H, Belal-Kacemi L, Sassi A, Laouini D, Ben Ismail R, Dellagi K. Natural autoantibodies, IgG antibodies to tetanus toxoid and CD5+ B cells in patients with Mediterranean visceral leishmaniasis.

-
- The Leishmania Study Group. Clin Exp Immunol. 1994 Mar;95(3):479-84. doi: [10.1111/j.1365-2249.1994.tb07022.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb07022.x)
- ²¹ Kulik L, Fleming SD, Moratz C, Reuter JW, Novikov A, Chen K, Andrews KA, Markaryan A, Quigg RJ, Silverman GJ, Tsokos GC, Holers VM. Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury. J Immunol. 2009 May 1;182(9):5363-73. doi: [10.4049/jimmunol.0803980](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803980)
 - ²² Chou MY, Fogelstrand L, Hartvigsen K, Hansen LF, Woelkers D, Shaw PX, Choi J, Perkmann T, Bäckhed F, Miller YI, Hörkkö S, Corr M, Witztum JL, Binder CJ. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. J Clin Invest. 2009 May;119(5):1335-49. doi: [10.1172/JCI36800](https://doi.org/10.1172/JCI36800)
 - ²³ Hedegaard CJ, Chen N, Sellebjerg F, Sørensen PS, Leslie RG, Bendtzen K, Nielsen CH. Autoantibodies to myelin basic protein (MBP) in healthy individuals and in patients with multiple sclerosis: a role in regulating cytokine responses to MBP. Immunology. 2009 Sep;128(1 Suppl):e451-61. doi: [10.1111/j.1365-2567.2008.02999.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02999.x)
 - ²⁴ Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008 Sep;4(9):491-8. doi: [10.1038/ncprheum0895](https://doi.org/10.1038/ncprheum0895)
 - ²⁵ Notkins AL. Polyreactivity of antibody molecules. Trends Immunol. 2004 Apr;25(4):174-9. doi: [10.1016/j.it.2004.02.004](https://doi.org/10.1016/j.it.2004.02.004)
 - ²⁶ Brändlein S, Vollmers HP. Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. Histol Histopathol. 2004 Jul;19(3):897-905. doi: [10.14670/HH-19.897](https://doi.org/10.14670/HH-19.897)
 - ²⁷ Liao HX, Chen X, Munshaw S, Zhang R, Marshall DJ, Vandergrift N, Whitesides JF, Lu X, Yu JS, Hwang KK, Gao F, Markowitz M, Heath SL, Bar KJ, Goepfert PA, Montefiori DC, Shaw GC, Alam SM, Margolis DM, Denny TN, Boyd SD, Marshal E, Egholm M, Simen BB, Hanczaruk B, Fire AZ, Voss G, Kelsoe G, Tomaras GD, Moody MA, Kepler TB, Haynes BF. Initial antibodies binding to HIV-1 gp41 in acutely infected subjects are polyreactive and highly mutated. J Exp Med. 2011 Oct 24;208(11):2237-49. doi: [10.1084/jem.20110363](https://doi.org/10.1084/jem.20110363)
 - ²⁸ Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. J Immunol. 1995 Jul 1;155(1):190-202. PMID: [7602095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7602095/).
 - ²⁹ Feeney AJ. Predominance of the prototypic T15 anti-phosphorylcholine junctional sequence in neonatal pre-B cells. J Immunol. 1991 Dec 15;147(12):4343-50. PMID: [1753104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1753104/).
 - ³⁰ Seidl KJ, MacKenzie JD, Wang D, Kantor AB, Kabat EA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Frequent occurrence of identical heavy and light chain Ig rearrangements. Int Immunol. 1997 May;9(5):689-702. doi: [10.1093/intimm/9.5.689](https://doi.org/10.1093/intimm/9.5.689)
 - ³¹ Mercolino TJ, Arnold LW, Hawkins LA, Haughton G. Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1+ (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline. Relationship to cells that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes. J Exp Med. 1988 Aug 1;168(2):687-98. doi: [10.1084/jem.168.2.687](https://doi.org/10.1084/jem.168.2.687)
 - ³² Ikematsu H, Kasaian MT, Schettino EW, Casali P. Structural analysis of the VH-D-JH segments of human polyreactive IgG mAb. Evidence for somatic selection. J Immunol. 1993 Oct 1;151(7):3604-16. PMID: [134627373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/134627373/).
 - ³³ Benedict CL, Gilfillan S, Thai TH, Kearney JF. Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. Immunol Rev. 2000 Jun;175:150-7. PMID: [10933600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10933600/).
 - ³⁴ Förster I, Gu H, Rajewsky K. Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. EMBO J. 1988 Dec 1;7(12):3693-703. doi: [10.1002/j.1460-2075.1988.tb03251.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03251.x)
 - ³⁵ Ichiyoshi Y, Casali P. Analysis of the structural correlates for antibody polyreactivity by multiple reassortments of chimeric human immunoglobulin heavy and light chain V segments. J Exp Med. 1994 Sep 1;180(3):885-95. doi: [10.1084/jem.180.3.885](https://doi.org/10.1084/jem.180.3.885)
-

- ³⁶ Holodick NE, Vizconde T, Hopkins TJ, Rothstein TL. Age-Related Decline in Natural IgM Function: Diversification and Selection of the B-1a Cell Pool with Age. *J Immunol.* 2016 May 15;196(10):4348-57. doi: [10.4049/jimmunol.1600073](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600073)
- ³⁷ Wedemayer GJ, Patten PA, Wang LH, Schultz PG, Stevens RC. Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science.* 1997 Jun 13;276(5319):1665-9. doi: [10.1126/science.276.5319.1665](https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1665)
- ³⁸ Dimitrov JD, Planchais C, Roumenina LT, Vassilev TL, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Antibody polyreactivity in health and disease: statu variabilis. *J Immunol.* 2013 Aug 1;191(3):993-9. doi: [10.4049/jimmunol.1300880](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300880)
- ³⁹ Wright A, Tao MH, Kabat EA, Morrison SL. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J.* 1991 Oct;10(10):2717-23. doi: [10.1002/j.1460-2075.1991.tb07819.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07819.x)
- ⁴⁰ Leibiger H, Wüstner D, Stigler RD, Marx U. Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem J.* 1999 Mar 1;338 (Pt 2):529-38. PMID: [10024532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10024532/).
- ⁴¹ Reyneveld GI, Savelkoul HFJ, Parmentier HK. Current Understanding of Natural Antibodies and Exploring the Possibilities of Modulation Using Veterinary Models. A Review. *Front Immunol.* 2020 Sep 10;11:2139. doi: [10.3389/fimmu.2020.02139](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02139)
- ⁴² Madi A, Bransburg-Zabary S, Kenett DY, Ben-Jacob E, Cohen IR. The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview. *Adv Exp Med Biol.* 2012;750:198-212. doi: [10.1007/978-1-4614-3461-0_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3461-0_15)
- ⁴³ Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jan;11(1):34-46. doi: [10.1038/nri2901](https://doi.org/10.1038/nri2901)
- ⁴⁴ Zhou ZH, Notkins AL. Polyreactive antigen-binding B (PAB-) cells are widely distributed and the PAB population consists of both B-1+ and B-1- phenotypes. *Clin Exp Immunol.* 2004 Jul;137(1):88-100. doi: [10.1111/j.1365-2249.2004.02511.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02511.x)
- ⁴⁵ Holodick NE, Rodríguez-Zhurbenko N, Hernández AM. Defining Natural Antibodies. *Front Immunol.* 2017 Jul 26;8:872. doi: [10.3389/fimmu.2017.00872](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00872)
- ⁴⁶ Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity.* 2005 Jul;23(1):7-18. doi: [10.1016/j.immuni.2005.04.011](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.011)
- ⁴⁷ Hardy RR, Hayakawa K. Perspectives on fetal derived CD5+ B1 B cells. *Eur J Immunol.* 2015 Nov;45(11):2978-84. doi: [10.1002/eji.201445146](https://doi.org/10.1002/eji.201445146)
- ⁴⁸ Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med.* 2011 Jan 17;208(1):67-80. doi: [10.1084/jem.20101499](https://doi.org/10.1084/jem.20101499)
- ⁴⁹ Kreuk LS, Koch MA, Slayden LC, Lind NA, Chu S, Savage HP, Kantor AB, Baumgarth N, Barton GM. B cell receptor and Toll-like receptor signaling coordinate to control distinct B-1 responses to both self and the microbiota. *Elife.* 2019 Aug 21;8:e47015. doi: [10.7554/eLife.47015](https://doi.org/10.7554/eLife.47015)
- ⁵⁰ Tian Q, Beardall M, Xu Y, Li J, Parker DC, Casanova N, Bakke AC, Chen C. B cells expressing a natural polyreactive autoantibody have a distinct phenotype and are overrepresented in immunoglobulin heavy chain transgenic mice. *J Immunol.* 2006 Aug 15;177(4):2412-22. doi: [10.4049/jimmunol.177.4.2412](https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.4.2412)
- ⁵¹ Montecino-Rodriguez E, Fice M, Casero D, Berent-Maoz B, Barber CL, Dorshkind K. Distinct Genetic Networks Orchestrate the Emergence of Specific Waves of Fetal and Adult B-1 and B-2 Development. *Immunity.* 2016 Sep 20;45(3):527-539. doi: [10.1016/j.immuni.2016.07.012](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.012)
- ⁵² Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev.* 2000 Jun;175:70-9. PMID: [10933592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10933592/).
- ⁵³ Veronesi R, Bizzini B, Focaccia R, Coscina AL, Mazza CC, Focaccia MT, Carraro F, Honningman MN. Naturally acquired antibodies to tetanus toxin in humans and animals from the galápagos islands. *J Infect Dis.* 1983 Feb;147(2):308-11. doi: [10.1093/infdis/147.2.308](https://doi.org/10.1093/infdis/147.2.308)

- ⁵⁴ Martin F, Kearney JF. Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity*. 2000 Jan;12(1):39-49. doi: [10.1016/s1074-7613\(00\)80157-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80157-0)
- ⁵⁵ Zhu X, Huang H, Zhao L. PAMPs and DAMPs as the Bridge Between Periodontitis and Atherosclerosis: The Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Feb 25;10:856118. doi: [10.3389/fcell.2022.856118](https://doi.org/10.3389/fcell.2022.856118)
- ⁵⁶ Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol*. 1995 Dec;7(6):812-8. doi: [10.1016/0952-7915\(95\)80053-0](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80053-0)
- ⁵⁷ Grabar P. Hypothesis. Auto-antibodies and immunological theories: an analytical review. *Clin Immunol Immunopathol*. 1975 Nov;4(4):453-66. doi: [10.1016/0090-1229\(75\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0090-1229(75)90087-2)
- ⁵⁸ Lutz HU. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *J Autoimmun*. 2007 Dec;29(4):287-94. doi: [10.1016/j.jaut.2007.07.007](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.07.007)
- ⁵⁹ O'Nuallain B, Hrcic R, Wall JS, Weiss DT, Solomon A. Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):7071-8. doi: [10.4049/jimmunol.176.11.7071](https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.7071)
- ⁶⁰ Pantaleo A, Giribaldi G, Mannu F, Arese P, Turrini F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun Rev*. 2008 Jun;7(6):457-62. doi: [10.1016/j.autrev.2008.03.017](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.03.017)
- ⁶¹ Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Boullier A, Hartvigsen K, Hökkö S, Miller YI, Woelkers DA, Corr M, Witztum JL. The role of natural antibodies in atherogenesis. *J Lipid Res*. 2005 Jul;46(7):1353-63. doi: [10.1194/jlr.R500005-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R500005-JLR200)
- ⁶² Quartier P, Potter PK, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol*. 2005 Jan;35(1):252-60. doi: [10.1002/eji.200425497](https://doi.org/10.1002/eji.200425497)
- ⁶³ Heyman B. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:709-37. doi: [10.1146/annurev.immunol.18.1.709](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.709)
- ⁶⁴ Bovin NV. Natural antibodies to glycans. *Biochemistry (Mosc)*. 2013 Jul;78(7):786-97. doi: [10.1134/S0006297913070109](https://doi.org/10.1134/S0006297913070109)
- ⁶⁵ Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. 1999 Dec 10;286(5447):2156-9. doi: [10.1126/science.286.5447.2156](https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2156)
- ⁶⁶ Hastings WD, Tumang JR, Behrens TW, Rothstein TL. Peritoneal B-2 cells comprise a distinct B-2 cell population with B-1b-like characteristics. *Eur J Immunol*. 2006 May;36(5):1114-23. doi: [10.1002/eji.200535142](https://doi.org/10.1002/eji.200535142)
- ⁶⁷ Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*. 2010 Nov;10(11):778-86. doi: [10.1038/nri2849](https://doi.org/10.1038/nri2849)
- ⁶⁸ Dimitrov JD, Planchais C, Scheel T, Ohayon D, Mesnage S, Berek C, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. A cryptic polyreactive antibody recognizes distinct clades of HIV-1 glycoprotein 120 by an identical binding mechanism. *J Biol Chem*. 2014 Jun 20;289(25):17767-79. doi: [10.1074/jbc.M114.556266](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556266)
- ⁶⁹ Mouquet H, Scheid JF, Zoller MJ, Krogsgaard M, Ott RG, Shukair S, Artyomov MN, Pietzsch J, Connors M, Pereyra F, Walker BD, Ho DD, Wilson PC, Seaman MS, Eisen HN, Chakraborty AK, Hope TJ, Ravetch JV, Wardemann H, Nussenzweig MC. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. *Nature*. 2010 Sep 30;467(7315):591-5. doi: [10.1038/nature09385](https://doi.org/10.1038/nature09385)
- ⁷⁰ Cui X, Meza BP, Adler SP, McVoy MA. Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine*. 2008 Oct 23;26(45):5760-6. doi: [10.1016/j.vaccine.2008.07.092](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.092)
- ⁷¹ Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol*. 2005 Mar;26(4):347-62. doi: [10.1007/s00281-004-0182-2](https://doi.org/10.1007/s00281-004-0182-2)

- ⁷² Heidenreich F, Vincent A, Roberts A, Newsom-Davis J. Epitopes on human acetylcholine receptor defined by monoclonal antibodies and myasthenia gravis sera. *Autoimmunity*. 1988;1(4):285-97. doi: [10.3109/08916938809010682](https://doi.org/10.3109/08916938809010682)
- ⁷³ Kohler H, Pashov A, Kieber-Emmons T. The Promise of Anti-idiotypic Revisited. *Front Immunol*. 2019 Apr 12;10:808. doi: [10.3389/fimmu.2019.00808](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00808)
- ⁷⁴ Vincent T, Plawewski M, Goulabchand R, Guilpain P, Eliaou JF. Emerging clinical phenotypes associated with anti-cytokine autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2015 Jun;14(6):528-35. doi: [10.1016/j.autrev.2015.01.015](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.015)
- ⁷⁵ Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin: exploiting the potential of natural antibodies. *Autoimmun Rev*. 2012 Sep;11(11):792-4. doi: [10.1016/j.autrev.2012.02.006](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.02.006)
- ⁷⁶ Alarcón-Segovia D, Ruiz-Argüelles A, Fishbein E. Antibody penetration into living cells. I. Intranuclear immunoglobulin in peripheral blood mononuclear cells in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 1979 Mar;35(3):364-75. PMID: [PMC1537612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1537612/).
- ⁷⁷ Ruiz-Argüelles A, Alarcón-Segovia D. Penetration of autoantibodies into living cells, 2000. *Isr Med Assoc J*. 2001 Feb;3(2):121-6. PMID: [11344822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11344822/).
- ⁷⁸ Ruiz-Argüelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Alarcón-Segovia D. Antibody penetration into living cells: pathogenic, preventive and immuno-therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. 2003;9(23):1881-7. doi: [10.2174/1381612033454379](https://doi.org/10.2174/1381612033454379)
- ⁷⁹ Hansen JE, Chan G, Liu Y, Hegan DC, Dalal S, Dray E, Kwon Y, Xu Y, Xu X, Peterson-Roth E, Geiger E, Liu Y, Gera J, Sweasy JB, Sung P, Rockwell S, Nishimura RN, Weisbart RH, Glazer PM. Targeting cancer with a lupus autoantibody. *Sci Transl Med*. 2012 Oct 24;4(157):157ra142. doi: [10.1126/scitranslmed.3004385](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004385)
- ⁸⁰ Ternynck T, Avrameas A, Ragimbeau J, Buttin G, Avrameas S. Immunochemical, structural and translocating properties of anti-DNA antibodies from (NZBxNZW)F1 mice. *J Autoimmun*. 1998 Oct;11(5):511-21. doi: [10.1006/jaut.1998.0222](https://doi.org/10.1006/jaut.1998.0222)
- ⁸¹ Avrameas A, Gasmi L, Buttin G. DNA and heparin alter the internalization process of anti-DNA monoclonal antibodies according to patterns typical of both the charged molecule and the antibody. *J Autoimmun*. 2001 Jun;16(4):383-91. doi: [10.1006/jaut.2001.0512](https://doi.org/10.1006/jaut.2001.0512)
- ⁸² Seddiki N, Nato F, Lafaye P, Amoura Z, Piette JC, Mazié JC. Calreticulin, a potential cell surface receptor involved in cell penetration of anti-DNA antibodies. *J Immunol*. 2001 May 15;166(10):6423-9. doi: [10.4049/jimmunol.166.10.6423](https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.10.6423)
- ⁸³ Zack DJ, Stempniak M, Wong AL, Taylor C, Weisbart RH. Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody. *J Immunol*. 1996 Sep 1;157(5):2082-8. PMID: [8757330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8757330/).
- ⁸⁴ Alarcon-Segovia D, Ruiz-Argüelles A, Llorente L. Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. *Immunol Today*. 1996 Apr;17(4):163-4. doi: [10.1016/s0167-5699\(96\)90258-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(96)90258-3)
- ⁸⁵ Zannikou M, Bellou S, Eliades P, Hatzioannou A, Mantzaris MD, Carayanniotis G, Avrameas S, Lymberi P. DNA-histone complexes as ligands amplify cell penetration and nuclear targeting of anti-DNA antibodies via energy-independent mechanisms. *Immunology*. 2016 Jan;147(1):73-81. doi: [10.1111/imm.12542](https://doi.org/10.1111/imm.12542)
- ⁸⁶ Ronda N, Gatti R, Orlandini G, Borghetti A. Binding and internalization of human IgG by living cultured endothelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1997 Jul;109(1):211-6. doi: [10.1046/j.1365-2249.1997.4051305.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1997.4051305.x)
- ⁸⁷ Proulx DP, Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Spontaneous internalization of IVIg in activated B cells. *Immunol Lett*. 2009 May 14;124(1):18-26. doi: [10.1016/j.imlet.2009.03.012](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.03.012)
- ⁸⁸ Ronda N, Leonardi S, Orlandini G, Gatti R, Bellosta S, Bernini F, Borghetti A. Natural anti-endothelial cell antibodies (AECA). *J Autoimmun*. 1999 Aug;13(1):121-7. doi: [10.1016/s0896-8411\(99\)99999-7](https://doi.org/10.1016/s0896-8411(99)99999-7)
- ⁸⁹ Sali AD, Karakasiliotis I, Evangelidou M, Avrameas S, Lymberi P. Immunological evidence and regulatory potential for cell-penetrating antibodies in intravenous immunoglobulin. *Clin Transl Immunology*. 2015 Oct 2;4(10):e42. doi: [10.1038/cti.2015.18](https://doi.org/10.1038/cti.2015.18)

- ⁹⁰ Stivarou T, Papaioannou L, Sarrigeorgiou I, Avgoustakis K, Lymberi P. Human monoclonal natural IgG antibodies can penetrate MDA-MB-231 cells and transport intracellularly paclitaxel-loaded gold nanorods. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 2023 Feb; (80):104109. doi: [10.1016/j.jddst.2022.104109](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104109)
- ⁹¹ Stivarou T, Papaioannou L, **Sarrigeorgiou I**, Avgoustakis K, Lymberi P. Human monoclonal natural IgG antibodies can penetrate MDA-MB-231 cells and transport intracellularly paclitaxel-loaded gold nanorods. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2023 Feb 80:104109. doi: [10.1016/j.jddst.2022.104109](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104109)
- ⁹² Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC, Nagele RG. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One.* 2013 Apr 2;8(4):e60726. doi: [10.1371/journal.pone.0060726](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060726)
- ⁹³ Bach JP, Dodel R. Naturally occurring autoantibodies against β -Amyloid. *Adv Exp Med Biol.* 2012;750:91-9. doi: [10.1007/978-1-4614-3461-0_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3461-0_7)
- ⁹⁴ Böröcz K, Simon D, Erdő-Bonyár S, Kovács KT, Tuba É, Czirják L, Németh P, Berki T. Relationship between natural and infection-induced antibodies in systemic autoimmune diseases (SAD): SLE, SSC and RA. *Clin Exp Immunol.* 2021 Jan;203(1):32-40. doi: [10.1111/cei.13521](https://doi.org/10.1111/cei.13521)
- ⁹⁵ Weksler ME, Szabo P. The effect of age on the B-cell repertoire. *J Clin Immunol.* 2000 Jul;20(4):240-9. doi: [10.1023/a:1006659401385](https://doi.org/10.1023/a:1006659401385)
- ⁹⁶ Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):271-80. doi: [10.1084/jem.192.2.271](https://doi.org/10.1084/jem.192.2.271)
- ⁹⁷ Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol.* 2012 Feb 1;188(3):939-45. doi: [10.4049/jimmunol.1102107](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102107)
- ⁹⁸ Quintana FJ, Hagedorn PH, Elizur G, Merbl Y, Domany E, Cohen IR. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 5;101 Suppl 2(Suppl 2):14615-21. doi: [10.1073/pnas.0404848101](https://doi.org/10.1073/pnas.0404848101)
- ⁹⁹ McMahon M, Skaggs B. Autoimmunity: Do IgM antibodies protect against atherosclerosis in SLE? *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Aug;12(8):442-4. doi: [10.1038/nrrheum.2016.108](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.108)
- ¹⁰⁰ Jiang C, Zhao ML, Searce RM, Diaz M. Activation-induced deaminase-deficient MRL/lpr mice secrete high levels of protective antibodies against lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2011 Apr;63(4):1086-96. doi: [10.1002/art.30230](https://doi.org/10.1002/art.30230)
- ¹⁰¹ Shoenfeld Y, Toubi E. Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential. *Arthritis Rheum.* 2005 Sep;52(9):2599-606. doi: [10.1002/art.21252](https://doi.org/10.1002/art.21252)
- ¹⁰² Tsiantoulas D, Kiss M, Bartolini-Gritti B, Bergthaler A, Mallat Z, Jumaa H, Binder CJ. Secreted IgM deficiency leads to increased BCR signaling that results in abnormal splenic B cell development. *Sci Rep.* 2017 Jun 14;7(1):3540. doi: [10.1038/s41598-017-03688-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03688-8)
- ¹⁰³ Nguyen TT, Baumgarth N. Natural IgM and the Development of B Cell-Mediated Autoimmune Diseases. *Crit Rev Immunol.* 2016;36(2):163-177. doi: [10.1615/CritRevImmunol.2016018175](https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2016018175)
- ¹⁰⁴ Wei X, Roettger Y, Tan B, He Y, Dodel R, Hampel H, Wei G, Haney J, Gu H, Johnstone BH, Liu J, Farlow MR, Du Y. Human anti-prion antibodies block prion peptide fibril formation and neurotoxicity. *J Biol Chem.* 2012 Apr 13;287(16):12858-66. doi: [10.1074/jbc.M111.255836](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255836)
- ¹⁰⁵ Kimura A, Takemura M, Saito K, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Association between naturally occurring anti-amyloid β autoantibodies and medial temporal lobe atrophy in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017 Feb;88(2):126-131. doi: [10.1136/jnnp-2016-313476](https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-313476)
- ¹⁰⁶ Szabo P, Relkin N, Weksler ME. Natural human antibodies to amyloid beta peptide. *Autoimmun Rev.* 2008 Jun;7(6):415-20. doi: [10.1016/j.autrev.2008.03.007](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.03.007)
- ¹⁰⁷ Nishiyama Y, Taguchi H, Hara M, Planque SA, Mitsuda Y, Paul S. Metal-dependent amyloid β -degrading catalytic antibody construct. *J Biotechnol.* 2014 Jun 20;180:17-22. doi: [10.1016/j.jbiotec.2014.03.026](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.026)
- ¹⁰⁸ Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol.* 2019 Jan;73(1):22-27. doi: [10.1016/j.jicc.2018.05.010](https://doi.org/10.1016/j.jicc.2018.05.010)

- ¹⁰⁹ Lappalainen J, Lindstedt KA, Oksjoki R, Kovanen PT. OxLDL-IgG immune complexes induce expression and secretion of proatherogenic cytokines by cultured human mast cells. *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2):357-63. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.024](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.024)
- ¹¹⁰ Tuominen A, Miller YI, Hansen LF, Kesäniemi YA, Witztum JL, Hökkö S. A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Sep;26(9):2096-102. doi: [10.1161/01.ATV.0000233333.07991.4a](https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000233333.07991.4a)
- ¹¹¹ Zhang J, Ten Dijke P, Wuhrer M, Zhang T. Role of glycosylation in TGF- β signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Protein Cell*. 2021 Feb;12(2):89-106. doi: [10.1007/s13238-020-00741-7](https://doi.org/10.1007/s13238-020-00741-7)
- ¹¹² Hensel F, Hermann R, Brändlein S, Krenn V, Schmausser B, Geis S, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis. *Lab Invest*. 2001 Nov;81(11):1553-63. doi: [10.1038/labinvest.3780369](https://doi.org/10.1038/labinvest.3780369)
- ¹¹³ Brändlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res*. 2003 Nov 15;63(22):7995-8005. PMID: [14633732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14633732/).
- ¹¹⁴ Hensel F, Hermann R, Schubert C, Abé N, Schmidt K, Franke A, Shevchenko A, Mann M, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1999 Oct 15;59(20):5299-306. PMID: [10537313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10537313/).
- ¹¹⁵ Daëron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:203-34. doi: [10.1146/annurev.immunol.15.1.203](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.203)
- ¹¹⁶ Schwartz-Albiez R. Naturally occurring antibodies directed against carbohydrate tumor antigens. *Adv Exp Med Biol*. 2012;750:27-43. doi: [10.1007/978-1-4614-3461-0_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3461-0_3)
- ¹¹⁷ Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004 Feb;50(2):380-6. doi: [10.1002/art.20018](https://doi.org/10.1002/art.20018)
- ¹¹⁸ Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, Iglesias AH, Merbl Y, Izquierdo G, Lucas M, Basso AS, Khoury SJ, Lucchinetti CF, Cohen IR, Weiner HL. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 2;105(48):18889-94. doi: [10.1073/pnas.0806310105](https://doi.org/10.1073/pnas.0806310105)
- ¹¹⁹ Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet*. 2004 May 8;363(9420):1544-6. doi: [10.1016/S0140-6736\(04\)16154-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16154-0)
- ¹²⁰ Díaz-Zaragoza M, Hernández-Ávila R, Viedma-Rodríguez R, Arenas-Aranda D, Ostoa-Saloma P. Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review). *Oncol Rep*. 2015 Sep;34(3):1106-14. doi: [10.3892/or.2015.4095](https://doi.org/10.3892/or.2015.4095)
- ¹²¹ Rahsepar AA, Mirzaee A, Moodi F, Moohebbati M, Tavallaie S, Khorashadizadeh F, Mottahedi B, Esfehanizadeh J, Azari A, Khojasteh R, Mousavi S, Paydar R, Amini M, Ghayour-Mobarhan M, Ferns GA, Sahebkar A. Malondialdehyde-Modified LDL IgG Antibody Levels and Indices of Cardiac Function in Valvular Heart and Coronary Artery Disease Patients. *Med Princ Pract*. 2015;24(5):424-31. doi: [10.1159/000431178](https://doi.org/10.1159/000431178)
- ¹²² Frostegård J. Low level natural antibodies against phosphorylcholine: a novel risk marker and potential mechanism in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Clin Immunol*. 2010 Jan;134(1):47-54. doi: [10.1016/j.clim.2009.08.013](https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.08.013)
- ¹²³ Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol*. 2012 Apr 4;3:66. doi: [10.3389/fimmu.2012.00066](https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00066)
- ¹²⁴ Bernth Jensen JM, Hansen AT, Söderström A, Jørgensen CS, Larsen CS, Skov Sørensen UB, Thiel S, Petersen MS. A low level of naturally occurring antibodies associates with functional antibody deficiency. *Clin Immunol*. 2022 Aug;241:109070. doi: [10.1016/j.clim.2022.109070](https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.109070)

- ¹²⁵ Bernth Jensen JM, Søgaaard OS, Thiel S. The level of naturally occurring anti-αGal antibody predicts antibody response to polysaccharide vaccination in HIV-infected adults. *Scand J Immunol.* 2021 May;93(5):e13008. doi: [10.1111/sji.13008](https://doi.org/10.1111/sji.13008)
- ¹²⁶ Bergman D, Bäckström C, Hansson-Hamlin H, Larsson A, Holst BS. Pre-existing canine anti-IgG antibodies: implications for immunotherapy, immunogenicity testing and immunoassay analysis. *Sci Rep.* 2020 Jul 29;10(1):12696. doi: [10.1038/s41598-020-69618-3](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69618-3)
- ¹²⁷ Maneiro JR, Salgado E, Gomez-Reino JJ. Immunogenicity of monoclonal antibodies against tumor necrosis factor used in chronic immune-mediated inflammatory conditions: systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med.* 2013 Aug 12;173(15):1416-28. doi: [10.1001/jamainternmed.2013.7430](https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.7430)
- ¹²⁸ van Schouwenburg PA, van de Stadt LA, de Jong RN, van Buren EE, Kruithof S, de Groot E, Hart M, van Ham SM, Rispens T, Aarden L, Wolbink GJ, Wouters D. Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. *Ann Rheum Dis.* 2013 Jan;72(1):104-9. doi: [10.1136/annrheumdis-2012-201445](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201445)
- ¹²⁹ Caldera JR, Tsai CM, Trieu D, Gonzalez C, Hajam IA, Du X, Lin B, Liu GY. The characteristics of pre-existing humoral imprint determine efficacy of *S. aureus* vaccines and support alternative vaccine approaches. *Cell Rep Med.* 2024 Jan 16;5(1):101360. doi: [10.1016/j.xcrm.2023.101360](https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101360)
- ¹³⁰ Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, Vakulskas CA, Collingwood MA, Zhang L, Bode NM, Behlke MA, Dejene B, Cieniewicz B, Romano R, Lesch BJ, Gomez-Ospina N, Mantri S, Pavel-Dinu M, Weinberg KI, Porteus MH. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med.* 2019 Feb;25(2):249-254. doi: [10.1038/s41591-018-0326-x](https://doi.org/10.1038/s41591-018-0326-x)
- ¹³¹ Simhadri VL, McGill J, McMahon S, Wang J, Jiang H, Sauna ZE. Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018 Jun 15;10:105-112. doi: [10.1016/j.omtm.2018.06.006](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.06.006)
- ¹³² Sunyer JO, Zarkadis IK, Lambris JD. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol Today.* 1998 Nov;19(11):519-23. doi: [10.1016/s0167-5699\(98\)01341-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(98)01341-3)
- ¹³³ Ferrara G, Zumla A, Maeurer M. Intravenous immunoglobulin (IVIg) for refractory and difficult-to-treat infections. *Am J Med.* 2012 Oct;125(10):1036.e1-8. doi: [10.1016/j.amjmed.2012.01.023](https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.01.023)
- ¹³⁴ Shopsis B, Kaveri SV, Bayry J. Tackling Difficult Staphylococcus aureus Infections: Antibodies Show the Way. *Cell Host Microbe.* 2016 Nov 9;20(5):555-557. doi: [10.1016/j.chom.2016.10.018](https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.018)
- ¹³⁵ João C, Negi VS, Kazatchkine MD, Bayry J, Kaveri SV. Passive Serum Therapy to Immunomodulation by IVIG: A Fascinating Journey of Antibodies. *J Immunol.* 2018 Mar 15;200(6):1957-1963. doi: [10.4049/jimmunol.1701271](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701271)
- ¹³⁶ Rossato E, Ben Mkaddem S, Kanamaru Y, Hurtado-Nedelec M, Hayem G, Descatoire V, Vonarburg C, Miescher S, Zuercher AW, Monteiro RC. Reversal of Arthritis by Human Monomeric IgA Through the Receptor-Mediated SH2 Domain-Containing Phosphatase 1 Inhibitory Pathway. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Jul;67(7):1766-77. doi: [10.1002/art.39142](https://doi.org/10.1002/art.39142)
- ¹³⁷ Saha C, Das M, Patil V, Stephen-Victor E, Sharma M, Wymann S, Jordi M, Vonarburg C, Kaveri SV, Bayry J. Monomeric Immunoglobulin A from Plasma Inhibits Human Th17 Responses *In Vitro* Independent of FcαRI and DC-SIGN. *Front Immunol.* 2017 Mar 14;8:275. doi: [10.3389/fimmu.2017.00275](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00275)
- ¹³⁸ Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, Ravetch JV. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science.* 2008 Apr 18;320(5874):373-6. doi: [10.1126/science.1154315](https://doi.org/10.1126/science.1154315)
- ¹³⁹ Washburn N, Schwab I, Ortiz D, Bhatnagar N, Lansing JC, Medeiros A, Tyler S, Mekala D, Cochran E, Sarvaiya H, Garofalo K, Meccariello R, Meador JW 3rd, Rutitzky L, Schultes BC, Ling L, Avery W, Nimmerjahn F, Manning AM, Kaundinya GV, Bosques CJ. Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar 17;112(11):E1297-306. doi: [10.1073/pnas.1422481112](https://doi.org/10.1073/pnas.1422481112)

- ¹⁴⁰ von Gunten S, Shoenfeld Y, Blank M, Branch DR, Vassilev T, Käsermann F, Bayry J, Kaveri S, Simon HU. IVIG pluripotency and the concept of Fc-sialylation: challenges to the scientist. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):349. doi: [10.1038/nri3401-c1](https://doi.org/10.1038/nri3401-c1)
- ¹⁴¹ Engert A, Balduini C, Brand A, Coiffier B, Cordonnier C, Döhner H, de Wit TD, Eichinger S, Fibbe W, Green T, de Haas F, Iolascon A, Jaffredo T, Rodeghiero F, Salles G, Schuringa JJ; EHA Roadmap for European Hematology Research. The European Hematology Association Roadmap for European Hematology Research: a consensus document. *Haematologica*. 2016 Feb;101(2):115-208. doi: [10.3324/haematol.2015.136739](https://doi.org/10.3324/haematol.2015.136739)
- ¹⁴² Warrington AE, Bieber AJ, Ciric B, Pease LR, Van Keulen V, Rodriguez M. A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J Neurosci Res*. 2007 Apr;85(5):967-76. doi: [10.1002/jnr.21217](https://doi.org/10.1002/jnr.21217)
- ¹⁴³ Ferrero J, Williams L, Stella H, Leitermann K, Mikulskis A, O'Gorman J, Sevigny J. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2016 Jun 20;2(3):169-176. doi: [10.1016/j.trci.2016.06.002](https://doi.org/10.1016/j.trci.2016.06.002)
- ¹⁴⁴ Hong DS, Hui D, Bruera E, Janku F, Naing A, Falchook GS, Piha-Paul S, Wheler JJ, Fu S, Tsimberidou AM, Stecher M, Mohanty P, Simard J, Kurzrock R. MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 α in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol*. 2014 May;15(6):656-66. doi: [10.1016/S1470-2045\(14\)70155-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70155-X)
- ¹⁴⁵ Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014 Oct;14(10):667-85. doi: [10.1038/nri3738](https://doi.org/10.1038/nri3738)
- ¹⁴⁶ Kuper CF, Pieters RHH, van Bilsen JHM. Nanomaterials and the Serosal Immune System in the Thoracic and Peritoneal Cavities. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 5;22(5):2610. doi: [10.3390/ijms22052610](https://doi.org/10.3390/ijms22052610)
- ¹⁴⁷ Zhou L. et al. (2015). Fetal B1 cell development and tissue residency in serous cavities. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 539–551. doi: [10.1038/nri3870](https://doi.org/10.1038/nri3870)
- ¹⁴⁸ Jackson-Jones LH, Duncan SM, Magalhaes MS, Campbell SM, Maizels RM, McSorley HJ, Allen JE, Bénézech C. Fat-associated lymphoid clusters control local IgM secretion during pleural infection and lung inflammation. *Nat Commun*. 2016 Sep 1;7:12651. doi: [10.1038/ncomms12651](https://doi.org/10.1038/ncomms12651)
- ¹⁴⁹ Vogiatzidis K, Zarogiannis SG, Aidonidis I, Solenov EI, Molyvdas PA, Gourgoulis KI, Hatzoglou C. Physiology of pericardial fluid production and drainage. *Front Physiol*. 2015 Mar 18;6:62. doi: [10.3389/fphys.2015.00062](https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00062)
- ¹⁵⁰ Vakamudi S, Ho N, Cremer PC. Pericardial Effusions: Causes, Diagnosis, and Management. *Prog Cardiovasc Dis*. 2017 Jan-Feb;59(4):380-388. doi: [10.1016/j.pcad.2016.12.009](https://doi.org/10.1016/j.pcad.2016.12.009)
- ¹⁵¹ Imazio M, Adler Y. Management of pericardial effusion. *Eur Heart J*. 2013 Apr;34(16):1186-97. doi: [10.1093/eurheartj/ehs372](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs372)
- ¹⁵² Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, Vargas-Barato F, Riveros-Dueñas R. The Peritoneum: Beyond the Tissue - A Review. *Front Physiol*. 2018 Jun 15;9:738. doi: [10.3389/fphys.2018.00738](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00738)
- ¹⁵³ Solass W, Struller F, Horvath P, Königsrainer A, Sipos B, Weinreich FJ. Morphology of the peritoneal cavity and pathophysiological consequences. *Pleura Peritoneum*. 2016 Dec 1;1(4):193-201. doi: [10.1515/pp-2016-0023](https://doi.org/10.1515/pp-2016-0023)
- ¹⁵⁴ Du L, Wei N, Maiwall R, Song Y. Differential diagnosis of ascites: etiologies, ascitic fluid analysis, diagnostic algorithm. *Clin Chem Lab Med*. 2023 Dec 20;62(7):1266-1276. doi: [10.1515/cclm-2023-1112](https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1112)
- ¹⁵⁵ Bello AK, Okpechi IG, Osman MA, Cho Y, Cullis B, Htay H, Jha V, Makusidi MA, McCulloch M, Shah N, Wainstein M, Johnson DW. Epidemiology of peritoneal dialysis outcomes. *Nat Rev Nephrol*. 2022 Dec;18(12):779-793. doi: [10.1038/s41581-022-00623-7](https://doi.org/10.1038/s41581-022-00623-7)
- ¹⁵⁶ Georgiou GK, Harisis H, Mitsis M, Batsis H, Fatouros M. Acute chylous peritonitis due to acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2012 Apr 28;18(16):1987-90. doi: [10.3748/wjg.v18.i16.1987](https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i16.1987)
- ¹⁵⁷ Charalampidis C, Youroukou A, Lazaridis G, Baka S, Mpoukovinas I, Karavasilis V, Kioumis I, Pitsiou G, Papaiwannou A, Karavergou A, Tsakiridis K, Katsikogiannis N, Sarika E, Kapanidis K, Sakkas L, Korantzis

- I, Lampaki S, Zarogoulidis K, Zarogoulidis P. Pleura space anatomy. J Thorac Dis. 2015 Feb;7(Suppl 1):S27-32. doi: [10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.48](https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.48)
- ¹⁵⁸ Zarogiannis SG. Editorial: Mesothelial Physiology and Pathophysiology. Front Physiol. 2018 Mar 22;9:263. doi: [10.3389/fphys.2018.00263](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00263)
- ¹⁵⁹ Markatis E, Perlepe G, Afthinos A, Pagkratis K, Varsamas C, Chaini E, Papanikolaou IC, Gourgoulialis KI. Mortality Among Hospitalized Patients With Pleural Effusions. A Multicenter, Observational, Prospective Study. Front Med (Lausanne). 2022 Feb 24;9:828783. doi: [10.3389/fmed.2022.828783](https://doi.org/10.3389/fmed.2022.828783)
- ¹⁶⁰ Kopcinovic LM, Culej J. Pleural, peritoneal and pericardial effusions - a biochemical approach. Biochem Med (Zagreb). 2014 Feb 15;24(1):123-37. doi: [10.11613/BM.2014.014](https://doi.org/10.11613/BM.2014.014)
- ¹⁶¹ Jany B, Welte T. Pleural Effusion in Adults-Etiology, Diagnosis, and Treatment. Dtsch Arztebl Int. 2019 May 24;116(21):377-386. doi: [10.3238/arztebl.2019.0377](https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0377)
- ¹⁶² Jany B, Welte T. Pleural Effusion in Adults-Etiology, Diagnosis, and Treatment. Dtsch Arztebl Int. 2019 May 24;116(21):377-386. doi: [10.3238/arztebl.2019.0377](https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0377)
- ¹⁶³ Thomas R, Jenkins S, Eastwood PR, Lee YC, Singh B. Physiology of breathlessness associated with pleural effusions. Curr Opin Pulm Med. 2015 Jul;21(4):338-45. doi: [10.1097/MCP.0000000000000174](https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000174)
- ¹⁶⁴ Marcondes BF, Vargas F, Paschoal FH, Cartaxo AM, Teixeira LR, Genofre EH, Onishi R, Skomro R, Lorenzi-Filho G. Sleep in patients with large pleural effusion: impact of thoracentesis. Sleep Breath. 2012 Jun;16(2):483-9. doi: [10.1007/s11325-011-0529-6](https://doi.org/10.1007/s11325-011-0529-6)
- ¹⁶⁵ Feller-Kopman D, Light R. Pleural Disease. N Engl J Med. 2018 Feb 22;378(8):740-751. doi: [10.1056/NEJMra1403503](https://doi.org/10.1056/NEJMra1403503)
- ¹⁶⁶ Zarogiannis S, Gourgoulialis K. Physiology of the pleural space. Pleural Diseases, 2009, pp.1-8. doi: [10.3109/9781420077391](https://doi.org/10.3109/9781420077391)
- ¹⁶⁷ Feller-Kopman D, Light R. Pleural Disease. N Engl J Med. 2018 Feb 22;378(8):740-751. doi: [10.1056/NEJMra1403503](https://doi.org/10.1056/NEJMra1403503)
- ¹⁶⁸ Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. Ann Intern Med. 1972 Oct;77(4):507-13. doi: [10.7326/0003-4819-77-4-507](https://doi.org/10.7326/0003-4819-77-4-507)
- ¹⁶⁹ Porcel JM, Light RW. Pleural Fluid Analysis: Are Light's Criteria Still Relevant After Half a Century? Clin Chest Med. 2021 Dec;42(4):599-609. doi: [10.1016/j.ccm.2021.07.003](https://doi.org/10.1016/j.ccm.2021.07.003)
- ¹⁷⁰ Porcel JM, Ferreiro L, Civit C, Valdés L, Esquerda A, Light RW, Bielsa S. Development and validation of a scoring system for the identification of pleural exudates of cardiac origin. Eur J Intern Med. 2018 Apr;50:60-64. doi: [10.1016/j.ejim.2017.11.008](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.11.008)
- ¹⁷¹ Bielsa S, Porcel JM, Castellote J, Mas E, Esquerda A, Light RW. Solving the Light's criteria misclassification rate of cardiac and hepatic transudates. Respirology. 2012 May;17(4):721-6. doi: [10.1111/j.1440-1843.2012.02155.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02155.x)
- ¹⁷² Jany B, Welte T. Pleural Effusion in Adults-Etiology, Diagnosis, and Treatment. Dtsch Arztebl Int. 2019 May 24;116(21):377-386. doi: [10.3238/arztebl.2019.0377](https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0377)
- ¹⁷³ Mummadi SR, Stoller JK, Lopez R, Kailasam K, Gillespie CT, Hahn PY. Epidemiology of Adult Pleural Disease in the United States. Chest. 2021 Oct;160(4):1534-1551. doi: [10.1016/j.chest.2021.05.026](https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.05.026)
- ¹⁷⁴ Porcel JM, Civit MC, Bielsa S, Light RW. Contarini's syndrome: bilateral pleural effusion, each side from different causes. J Hosp Med. 2012 Feb;7(2):164-5. doi: [10.1002/jhm.981](https://doi.org/10.1002/jhm.981)
- ¹⁷⁵ Ferreiro L, Toubes ME, San José ME, Suárez-Antelo J, Golpe A, Valdés L. Advances in pleural effusion diagnostics. Expert Rev Respir Med. 2020 Jan;14(1):51-66. doi: [10.1080/17476348.2020.1684266](https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1684266)
- ¹⁷⁶ Hooper C, Lee YC, Maskell N; BTS Pleural Guideline Group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. Thorax. 2010 Aug;65 Suppl 2:ii4-17. doi: [10.1136/thx.2010.136978](https://doi.org/10.1136/thx.2010.136978)
- ¹⁷⁷ Schnell J, Beer M, Eggeling S, Gesierich W, Gottlieb J, Herth F, Hofmann HS, Jany B, Kreuter M, Ley-Zaporozhan J, Scheubel R, Walles T, Wiesemann S, Worth H, Stoelben E. Management of Spontaneous Pneumothorax and Postinterventional Pneumothorax: German S3-Guideline. Zentralbl Chir. 2018 Aug;143(S 01):S12-S43. English, German. doi: [10.1055/a-0588-4444](https://doi.org/10.1055/a-0588-4444)

- ¹⁷⁸ Brogi E, Gargani L, Bignami E, Barbariol F, Marra A, Forfori F, Vetrugno L. Thoracic ultrasound for pleural effusion in the intensive care unit: a narrative review from diagnosis to treatment. *Crit Care*. 2017 Dec 28;21(1):325. doi: [10.1186/s13054-017-1897-5](https://doi.org/10.1186/s13054-017-1897-5)
- ¹⁷⁹ Porcel JM. Distinguishing complicated from uncomplicated parapneumonic effusions. *Curr Opin Pulm Med*. 2015 Jul;21(4):346-51. doi: [10.1097/MCP.0000000000000164](https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000164)
- ¹⁸⁰ Schaberg T, Bauer T, Brinkmann F, Diel R, Feiterna-Sperling C, Haas W, Hartmann P, Hauer B, Heyckendorf J, Lange C, Nienhaus A, Otto-Knapp R, Priwitzer M, Richter E, Rumetshofer R, Schenkel K, Schoch OD, Schönfeld N, Stahlmann R. S2k-Leitlinie: Tuberkulose im Erwachsenenalter [Tuberculosis Guideline for Adults - Guideline for Diagnosis and Treatment of Tuberculosis including LTBI Testing and Treatment of the German Central Committee (DZK) and the German Respiratory Society (DGP)]. *Pneumologie*. 2017 Jun;71(6):325-397. German. doi: [10.1055/s-0043-105954](https://doi.org/10.1055/s-0043-105954)
- ¹⁸¹ Gordon CE, Feller-Kopman D, Balk EM, Smetana GW. Pneumothorax following thoracentesis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2010 Feb 22;170(4):332-9. doi: [10.1001/archinternmed.2009.548](https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.548)
- ¹⁸² Walker SP, Morley AJ, Staddon L, De Fonseka D, Arnold DT, Medford ARL, Maskell NA. Nonmalignant Pleural Effusions: A Prospective Study of 356 Consecutive Unselected Patients. *Chest*. 2017 May;151(5):1099-1105. doi: [10.1016/j.chest.2016.12.014](https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.12.014)
- ¹⁸³ Anevlavis S, Tzouveleakis A, Bouros D. Mechanisms of pleural involvement in orphan diseases. *Respiration*. 2012;83(1):5-12. doi: [10.1159/000335128](https://doi.org/10.1159/000335128)
- ¹⁸⁴ Tang KJ, Robbins IM, Light RW. Incidence of pleural effusions in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension patients. *Chest*. 2009 Sep;136(3):688-693. doi: [10.1378/chest.08-0659](https://doi.org/10.1378/chest.08-0659)
- ¹⁸⁵ Choi SH, Cha SI, Shin KM, Lim JK, Yoo SS, Lee SY, Lee J, Kim CH, Park JY, Lee DH. Clinical Relevance of Pleural Effusion in Patients with Pulmonary Embolism. *Respiration*. 2017;93(4):271-278. doi: [10.1159/000457132](https://doi.org/10.1159/000457132)
- ¹⁸⁶ Bintcliffe OJ, Hooper CE, Rider IJ, Finn RS, Morley AJ, Zahan-Evans N, Harvey JE, Skyrme-Jones AP, Maskell NA. Unilateral Pleural Effusions with More Than One Apparent Etiology. A Prospective Observational Study. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Jul;13(7):1050-6. doi: [10.1513/AnnalsATS.201601-082OC](https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201601-082OC)
- ¹⁸⁷ Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiology of pleural effusions: analysis of more than 3,000 consecutive thoracenteses. *Arch Bronconeumol*. 2014 May;50(5):161-5. English, Spanish. doi: [10.1016/j.arbres.2013.11.007](https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.11.007)
- ¹⁸⁸ Han ZJ, Wu XD, Cheng JJ, Zhao SD, Gao MZ, Huang HY, Gu B, Ma P, Chen Y, Wang JH, Yang CJ, Yan ZH. Diagnostic Accuracy of Natriuretic Peptides for Heart Failure in Patients with Pleural Effusion: A Systematic Review and Updated Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Aug 5;10(8):e0134376. doi: [10.1371/journal.pone.0134376](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134376)
- ¹⁸⁹ Patil M, Dhillon SS, Attwood K, Saoud M, Alraiyes AH, Harris K. Management of Benign Pleural Effusions Using Indwelling Pleural Catheters: A Systematic Review and Meta-analysis. *Chest*. 2017 Mar;151(3):626-635. doi: [10.1016/j.chest.2016.10.052](https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.052)
- ¹⁹⁰ Badillo R, Rockey DC. Hepatic hydrothorax: clinical features, management, and outcomes in 77 patients and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2014 May;93(3):135-142. doi: [10.1097/MD.0000000000000025](https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000025)
- ¹⁹¹ Xiol X, Castellote J, Cortes-Beut R, Delgado M, Guardiola J, Sesé E. Usefulness and complications of thoracentesis in cirrhotic patients. *Am J Med*. 2001 Jul;111(1):67-9. doi: [10.1016/s0002-9343\(01\)00744-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(01)00744-6)
- ¹⁹² Hou F, Qi X, Guo X. Effectiveness and Safety of Pleurodesis for Hepatic Hydrothorax: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci*. 2016 Nov;61(11):3321-3334. doi: [10.1007/s10620-016-4260-9](https://doi.org/10.1007/s10620-016-4260-9)
- ¹⁹³ Chen A, Massoni J, Jung D, Crippin J. Indwelling Tunneled Pleural Catheters for the Management of Hepatic Hydrothorax. A Pilot Study. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Jun;13(6):862-6. doi: [10.1513/AnnalsATS.201510-688BC](https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201510-688BC)

- ¹⁹⁴ Grabczak EM, Krenke R, Zielinska-Krawczyk M, Light RW. Pleural manometry in patients with pleural diseases - the usefulness in clinical practice. *Respir Med*. 2018 Dec;145:230-236. doi: [10.1016/j.rmed.2018.01.014](https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.01.014)
- ¹⁹⁵ Ferreira L, Gude F, Toubes ME, Lama A, Suárez-Antelo J, San-José E, González-Barcala FJ, Golpe A, Álvarez-Dobaño JM, Rábade C, Rodríguez-Núñez N, Díaz-Louzao C, Valdés L. Predictive models of malignant transudative pleural effusions. *J Thorac Dis*. 2017 Jan;9(1):106-116. doi: [10.21037/jtd.2017.01.12](https://doi.org/10.21037/jtd.2017.01.12)
- ¹⁹⁶ Potechin R, Amjadi K, Srouf N. Indwelling pleural catheters for pleural effusions associated with end-stage renal disease: a case series. *Ther Adv Respir Dis*. 2015 Feb;9(1):22-7. doi: [10.1177/1753465814565353](https://doi.org/10.1177/1753465814565353)
- ¹⁹⁷ Letheulle J, Kerjouan M, Bénézit F, De Latour B, Tattevin P, Piau C, Léna H, Desrues B, Le Tulzo Y, Jouneau S. Les épanchements pleuraux parapneumoniques: épidémiologie, diagnostic, classification, traitement [Parapneumonic pleural effusions: Epidemiology, diagnosis, classification and management]. *Rev Mal Respir*. 2015 Apr;32(4):344-57. French. doi: [10.1016/j.rmr.2014.12.001](https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.12.001)
- ¹⁹⁸ Cargill TN, Hassan M, Corcoran JP, Harriss E, Asciak R, Mercer RM, McCracken DJ, Bedawi EO, Rahman NM. A systematic review of comorbidities and outcomes of adult patients with pleural infection. *Eur Respir J*. 2019 Oct 1;54(3):1900541. doi: [10.1183/13993003.00541-2019](https://doi.org/10.1183/13993003.00541-2019)
- ¹⁹⁹ Corcoran JP, Psallidas I, Gerry S, Piccolo F, Koegelenberg CF, Saba T, Daneshvar C, Fairbairn I, Heinink R, West A, Stanton AE, Holme J, Kastelik JA, Steer H, Downer NJ, Haris M, Baker EH, Everett CF, Pepperell J, Bewick T, Yarmus L, Maldonado F, Khan B, Hart-Thomas A, Hands G, Warwick G, De Fonseca D, Hassan M, Munavvar M, Guhan A, Shahidi M, Pogson Z, Dowson L, Popowicz ND, Saba J, Ward NR, Hallifax RJ, Dobson M, Shaw R, Hedley EL, Sabia A, Robinson B, Collins GS, Davies HE, Yu LM, Miller RF, Maskell NA, Rahman NM. Prospective validation of the RAPID clinical risk prediction score in adult patients with pleural infection: the PILOT study. *Eur Respir J*. 2020 Nov 26;56(5):2000130. doi: [10.1183/13993003.00130-2020](https://doi.org/10.1183/13993003.00130-2020)
- ²⁰⁰ Psallidas I, Kanellakis NI, Bhatnagar R, Ravindran R, Yousuf A, Edey AJ, Mercer RM, Corcoran JP, Hallifax RJ, Asciak R, Shetty P, Dong T, Piotrowska HEG, Clelland C, Maskell NA, Rahman NM. A Pilot Feasibility Study in Establishing the Role of Ultrasound-Guided Pleural Biopsies in Pleural Infection (The AUDIO Study). *Chest*. 2018 Oct;154(4):766-772. doi: [10.1016/j.chest.2018.02.031](https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.02.031)
- ²⁰¹ Grijalva CG, Zhu Y, Nuorti JP, Griffin MR. Emergence of parapneumonic empyema in the USA. *Thorax*. 2011 Aug;66(8):663-8. doi: [10.1136/thx.2010.156406](https://doi.org/10.1136/thx.2010.156406)
- ²⁰² Höfken H, Herrmann D, Ewig S, Volmerig J, Hecker E. Video-Assisted Thoracoscopic Surgery of Parapneumonic Empyema - a 10-year Single-Centre Experience. *Pneumologie*. 2018 Dec;72(12):843-850. English. doi: [10.1055/a-0648-0145](https://doi.org/10.1055/a-0648-0145)
- ²⁰³ Hassan M, Cargill T, Harriss E, Asciak R, Mercer RM, Bedawi EO, McCracken DJ, Psallidas I, Corcoran JP, Rahman NM. The microbiology of pleural infection in adults: a systematic review. *Eur Respir J*. 2019 Oct 1;54(3):1900542. doi: [10.1183/13993003.00542-2019](https://doi.org/10.1183/13993003.00542-2019)
- ²⁰⁴ Rodríguez-Leal CM, González-Corralejo C, Candel FJ, Salavert M; Medical societies for the 5th edition of Pneumonia Day. Candent issues in pneumonia. Reflections from the Fifth Annual Meeting of Spanish Experts 2023. *Rev Esp Quimioter*. 2024 Jun;37(3):221-251. doi: [10.37201/req/018.2024](https://doi.org/10.37201/req/018.2024)
- ²⁰⁵ Altmann ES, Crossingham I, Wilson S, Davies HR. Intra-pleural fibrinolytic therapy versus placebo, or a different fibrinolytic agent, in the treatment of adult parapneumonic effusions and empyema. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Oct 30;2019(10):CD002312. doi: [10.1002/14651858.CD002312.pub4](https://doi.org/10.1002/14651858.CD002312.pub4)
- ²⁰⁶ Chaddha U, Agrawal A, Feller-Kopman D, Kaul V, Shojaee S, Maldonado F, Ferguson MK, Blyth KG, Grosu HB, Corcoran JP, Sachdeva A, West A, Bedawi EO, Majid A, Mehta RM, Folch E, Liberman M, Wahidi MM, Gangadharan SP, Roberts ME, DeCamp MM, Rahman NM. Use of fibrinolytics and deoxyribonuclease in adult patients with pleural empyema: a consensus statement. *Lancet Respir Med*. 2021 Sep;9(9):1050-1064. doi: [10.1016/S2213-2600\(20\)30533-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30533-6)

- 207 Shaw JA, Diacon AH, Koegelenberg CFN. Tuberculous pleural effusion. *Respirology*. 2019 Oct;24(10):962-971. doi: [10.1111/resp.13673](https://doi.org/10.1111/resp.13673)
- 208 Aggarwal AN, Agarwal R, Sehgal IS, Dhooira S. Adenosine deaminase for diagnosis of tuberculous pleural effusion: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019 Mar 26;14(3):e0213728. doi: [10.1371/journal.pone.0213728](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213728)
- 209 Aggarwal AN, Agarwal R, Dhooira S, Prasad KT, Sehgal IS, Muthu V. Comparative accuracy of pleural fluid unstimulated interferon-gamma and adenosine deaminase for diagnosing pleural tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021 Jun 24;16(6):e0253525. doi: [10.1371/journal.pone.0253525](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253525)
- 210 Lee J, Yoo SS, Lee SY, Cha SI, Park JY, Kim CH. Pleural fluid adenosine deaminase/serum C-reactive protein ratio for the differentiation of tuberculous and parapneumonic effusions with neutrophilic predominance and high adenosine deaminase levels. *Infection*. 2017 Feb;45(1):59-65. doi: [10.1007/s15010-016-0928-5](https://doi.org/10.1007/s15010-016-0928-5)
- 211 Thommi G, Shehan JC, Robison KL, Christensen M, Backemeyer LA, McLeay MT. A double blind randomized cross over trial comparing rate of decortication and efficacy of intrapleural instillation of alteplase vs placebo in patients with empyemas and complicated parapneumonic effusions. *Respir Med*. 2012 May;106(5):716-23. doi: [10.1016/j.rmed.2012.02.005](https://doi.org/10.1016/j.rmed.2012.02.005)
- 212 Xie S, Lu L, Li M, Xiong M, Zhou S, Zhang G, Peng A, Wang C. The efficacy and safety of adjunctive corticosteroids in the treatment of tuberculous pleurisy: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 May 24;8(47):83315-83322. doi: [10.18632/oncotarget.18160](https://doi.org/10.18632/oncotarget.18160)
- 213 Kumar A, Asaf BB, Lingaraju VC, Yendamuri S, Pulle MV, Sood J. Thoracoscopic Decortication of Stage III Tuberculous Empyema Is Effective and Safe in Selected Cases. *Ann Thorac Surg*. 2017 Nov;104(5):1688-1694. doi: [10.1016/j.athoracsur.2017.06.038](https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.06.038)
- 214 Asciak R, Rahman NM. Malignant Pleural Effusion: From Diagnostics to Therapeutics. *Clin Chest Med*. 2018 Mar;39(1):181-193. doi: [10.1016/j.ccm.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.11.004)
- 215 Sinn K, Mosleh B, Hoda MA. Malignant pleural mesothelioma: recent developments. *Curr Opin Oncol*. 2021 Jan;33(1):80-86. doi: [10.1097/CCO.0000000000000697](https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000697)
- 216 Tsim S, Stobo DB, Alexander L, Kelly C, Blyth KG. The diagnostic performance of routinely acquired and reported computed tomography imaging in patients presenting with suspected pleural malignancy. *Lung Cancer*. 2017 Jan;103:38-43. doi: [10.1016/j.lungcan.2016.11.010](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.11.010)
- 217 Froudarakis ME, Plojoux J, Kaspi E, Anevlavis S, Laroumagne S, Karpathiou G, Roca E, Adler D, Dutau H, Astoul P. Positive pleural cytology is an indicator for visceral pleural invasion in metastatic pleural effusions. *Clin Respir J*. 2018 Mar;12(3):1011-1016. doi: [10.1111/crj.12619](https://doi.org/10.1111/crj.12619)
- 218 Lin Z, Wu D, Wang J, Wang C, Huang M. Diagnostic value of ultrasound-guided needle biopsy in undiagnosed pleural effusions: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Jul 2;99(27):e21076. doi: [10.1097/MD.00000000000021076](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021076)
- 219 Park J, Park B, Lim JK, Shin KM, Lee J, Kim CH, Seo H, Lee YH, Heo J, Do YW. Ultrasound-Guided Percutaneous Needle Biopsy for Small Pleural Lesions: Diagnostic Yield and Impact of CT and Ultrasound Characteristics. *AJR Am J Roentgenol*. 2021 Sep;217(3):699-706. doi: [10.2214/AJR.20.24120](https://doi.org/10.2214/AJR.20.24120)
- 220 Avasarala SK, Lentz RJ, Maldonado F. Medical Thoracoscopy. *Clin Chest Med*. 2021 Dec;42(4):751-766. doi: [10.1016/j.ccm.2021.08.010](https://doi.org/10.1016/j.ccm.2021.08.010)
- 221 Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D. Diagnostic accuracy and safety of semirigid thoracoscopy in exudative pleural effusions: a meta-analysis. *Chest*. 2013 Dec;144(6):1857-1867. doi: [10.1378/chest.13-1187](https://doi.org/10.1378/chest.13-1187)
- 222 Bibby AC, Dorn P, Psallidas I, Porcel JM, Janssen J, Froudarakis M, Subotic D, Astoul P, Licht P, Schmid R, Scherpereel A, Rahman NM, Cardillo G, Maskell NA. ERS/EACTS statement on the management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J*. 2018 Jul 27;52(1):1800349. doi: [10.1183/13993003.00349-2018](https://doi.org/10.1183/13993003.00349-2018)

- 223 Clive AO, Kahan BC, Hooper CE, Bhatnagar R, Morley AJ, Zahan-Evans N, Bintcliffe OJ, Boshuizen RC, Fysh ET, Tobin CL, Medford AR, Harvey JE, van den Heuvel MM, Lee YC, Maskell NA. Predicting survival in malignant pleural effusion: development and validation of the LENT prognostic score. *Thorax*. 2014 Dec;69(12):1098-104. doi: [10.1136/thoraxjnl-2014-205285](https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205285)
- 224 Sundaralingam A, Bedawi EO, Rahman NM. Diagnostics in Pleural Disease. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Dec 4;10(12):1046. doi: [10.3390/diagnostics10121046](https://doi.org/10.3390/diagnostics10121046)
- 225 Chiang KY, Ho JC, Chong P, Tam TC, Lam DC, Ip MS, Lee YG, Lui MM. Role of early definitive management for newly diagnosed malignant pleural effusion related to lung cancer. *Respirology*. 2020 Nov;25(11):1167-1173. doi: [10.1111/resp.13812](https://doi.org/10.1111/resp.13812)
- 226 Dipper A, Jones HE, Bhatnagar R, Preston NJ, Maskell N, Clive AO. Interventions for the management of malignant pleural effusions: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Apr 21;4(4):CD010529. doi: [10.1002/14651858.CD010529.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD010529.pub3)
- 227 Cantey EP, Walter JM, Corbridge T, Barsuk JH. Complications of thoracentesis: incidence, risk factors, and strategies for prevention. *Curr Opin Pulm Med*. 2016 Jul;22(4):378-85. doi: [10.1097/MCP.0000000000000285](https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000285)
- 228 El-Reshaid K, Al-Bader S. Massive and unilateral rheumatoid pleural effusion without overt disease. *Int J Case Rep Images* 2021;12:101277Z01KR2021. doi: [10.5348/101277Z01KR2021CR](https://doi.org/10.5348/101277Z01KR2021CR)
- 229 Chen DY, Huang YH, Chen YM, Chen JJW, Yang TY, Chang GC, Tang KT. ANA positivity and complement level in pleural fluid are potential diagnostic markers in discriminating lupus pleuritis from pleural effusion of other aetiologies. *Lupus Sci Med*. 2021 Nov;8(1):e000562. doi: [10.1136/lupus-2021-000562](https://doi.org/10.1136/lupus-2021-000562)
- 230 Almaani S, Fussner LA, Brodsky S, Meara AS, Jayne D. ANCA-Associated Vasculitis: An Update. *J Clin Med*. 2021 Apr 1;10(7):1446. doi: [10.3390/jcm10071446](https://doi.org/10.3390/jcm10071446)
- 231 Gris P, Duchatelet P, Dierckx JP, Demol H, Quoidbach A, Dupont E. Pleural fluid in Wegener's granulomatosis. *Chest*. 1989 Jul;96(1):224. doi: [10.1378/chest.96.1.224-b](https://doi.org/10.1378/chest.96.1.224-b)
- 232 Balbir-Gurman A, Yigla M, Nahir AM, Braun-Moscovici Y. Rheumatoid pleural effusion. *Semin Arthritis Rheum*. 2006 Jun;35(6):368-78. doi: [10.1016/j.semarthrit.2006.03.002](https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2006.03.002)
- 233 Munker R, Stötzer O, Darsow M, Classen S, Lebeau A, Wilmanns W. Autoantibodies against p53 are not increased in human ascites and pleural effusions. *Cancer Immunol Immunother*. 1996 Mar;42(3):200-1. doi: [10.1007/s002620050271](https://doi.org/10.1007/s002620050271)
- 234 Wang L, Chang YH, Lee YL, Shih CM, Hsu YT, Shen GH, Haung ML, Shiau MY. Autoantibodies against tumour suppressor protein p53 in pleural effusions of patients with tuberculosis pleurisy. *Ann Clin Biochem*. 2007 Jan;44(Pt 1):57-62. doi: [10.1258/00045630779595986](https://doi.org/10.1258/00045630779595986)
- 235 Yi F, Zhang X. High-throughput autoantibody analysis in malignant pleural effusion and tuberculosis pleural effusion. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Sep;98(38):e17253. doi: [10.1097/MD.00000000000017253](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017253)
- 236 Simon D, Gilicze O, Farkas N, Najbauer J, Németh P, Lénárd L, Berki T. Correlation of natural autoantibodies and cardiovascular disease-related anti-bacterial antibodies in pericardial fluid of cardiac surgery patients. *Clin Exp Immunol*. 2018 Jul;193(1):55-63. doi: [10.1111/cei.13127](https://doi.org/10.1111/cei.13127)
- 237 Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:32-63. doi: [10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x)
- 238 Suchanek O, Clatworthy MR. Homeostatic role of B-1 cells in tissue immunity. *Front Immunol*. 2023 Sep 8;14:1106294. doi: [10.3389/fimmu.2023.1106294](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1106294)
- 239 Bemark M, Angeletti D. Know your enemy or find your friend?-Induction of IgA at mucosal surfaces. *Immunol Rev*. 2021 Sep;303(1):83-102. doi: [10.1111/imr.13014](https://doi.org/10.1111/imr.13014)
- 240 Jackson-Jones LH, B_en_ezech C. Control of innate-like B cell location for compartmentalised IgM production. *Curr Opin Immunol* 50: 9–13, 2018. doi:[10.1016/j.coi.2017.10.006](https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.10.006).
- 241 Jackson-Jones LH, Duncan SM, Magalhaes MS, Campbell SM, Maizels RM, McSorley HJ, Allen JE, Bénézech C. Fat-associated lymphoid clusters control local IgM secretion during pleural infection and lung inflammation. *Nat Commun*. 2016 Sep 1;7:12651. doi: [10.1038/ncomms12651](https://doi.org/10.1038/ncomms12651)

- 242 Moon H, Lee JG, Shin SH, Kim TJ. LPS-induced migration of peritoneal B-1 cells is associated with upregulation of CXCR4 and increased migratory sensitivity to CXCL12. *J Korean Med Sci*. 2012 Jan;27(1):27-35. doi: [10.3346/jkms.2012.27.1.27](https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.1.27)
- 243 Little JR, Eisen HN. Preparation and characterization of antibodies specific for the 2,4,6-trinitrophenyl group. *Biochemistry*. 1966 Nov;5(11):3385-95. doi: [10.1021/bi00875a001](https://doi.org/10.1021/bi00875a001)
- 244 Sims GP, Ettinger R, Shiota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4390-8. doi: [10.1182/blood-2004-11-4284](https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4284)
- 245 Jany B, Welte T. Pleural effusion in adults-etiology, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 116: 377–386, 2019. doi:[10.3238/arztebl.2019.0377](https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0377).
- 246 Davis RS. FCRL regulation in innate-like B cells. *Ann N Y Acad Sci* 1362: 110–116, 2015. doi:[10.1111/nyas.12771](https://doi.org/10.1111/nyas.12771).
- 247 Weber GF, Chousterman BG, Hilgendorf I, Robbins CS, Theurl I, Gerhardt LM, Iwamoto Y, Quach TD, Ali M, Chen JW, Rothstein TL, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis. *J Exp Med*. 2014 Jun 2;211(6):1243-56. doi: [10.1084/jem.20131471](https://doi.org/10.1084/jem.20131471)
- 248 Lymberi P, Zannikou M, Hatzioannou A. Natural Autoantibodies in Health and Disease. In *Comprehensive Pharmacology*. Vol. 5. Elsevier. 2022. p. 342–68. [https:// doi. org/ 10. 1016/ B978-0- 12- 820472- 6. 00197-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00197-3).
- 249 Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;210:167-79. doi: [10.1007/978-3-642-85226-8_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85226-8_17)
- 250 Servettaz A, Guilpain P, Tamas N, Kaveri SV, Camoin L, Mouthon L. Natural anti-endothelial cell antibodies. *Autoimmun Rev*. 2008 Jun;7(6):426-30. doi: [10.1016/j.autrev.2008.03.010](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.03.010)
- 251 Ansel KM, Harris RB, Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*. 2002 Jan;16(1):67-76. doi: [10.1016/s1074-7613\(01\)00257-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00257-6)
- 252 Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanč P, Kjær S, Feest C, Fletcher G, Durkin C, Postigo A, Skehel M, Batista F, Thompson B, Way M, Reis e Sousa C, Schulz O. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity*. 2012 Apr 20;36(4):635-45. doi: [10.1016/j.immuni.2012.03.008](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.008)
- 253 Janmey PA, Chaponnier C. Medical aspects of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Feb;7(1):111-7. doi: [10.1016/0955-0674\(95\)80052-2](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80052-2)
- 254 Dighiero G, Guilbert B, Fermand JP, Lymberi P, Danon F, Avrameas S. Thirty-six human monoclonal immunoglobulins with antibody activity against cytoskeleton proteins, thyroglobulin and native DNA: Immunological studies and clinical correlations. *Blood*. 1983;62:264–70.
- 255 Zamanou A, Samiotaki M, Panayotou G, Margaritis L, Lymberi P. Fine specificity and subclass of IgG anti-actin autoantibodies differ in health and disease. *J Autoimmun*. 2003;20:333–44
- 256 Mouthon L, Haury M, Lacroix-Desmazes S, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *J Immunol*. 1995;154:5769–78.
- 257 Caforio AL, Goldman JH, Baig MK, Haven AJ, Dalla Libera L, Keeling PJ, McKenna WJ. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression. *Heart*. 1997 Jan;77(1):62-7. doi: [10.1136/hrt.77.1.62](https://doi.org/10.1136/hrt.77.1.62)
- 258 Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013 Feb 21;38(2):209-23. doi: [10.1016/j.immuni.2013.02.003](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003)
- 259 Bielsa S, Corral E, Bagüeste P, Porcel JM. Characteristics of Pleural Effusions in Acute Idiopathic Pericarditis and Post-Cardiac Injury Syndrome. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Feb;13(2):298-300. doi: [10.1513/AnnalsATS.201510-668LE](https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201510-668LE)
- 260 Rawat K, Tewari A, Morrisson MJ, Wager TD, Jakubzick CV. Redefining innate natural antibodies as important contributors to anti-tumor immunity. *Elife*. 2021 Oct 5;10:e69713. doi: [10.7554/eLife.69713](https://doi.org/10.7554/eLife.69713)
- 261 Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Dec;12(12):860-75. doi: [10.1038/nrc3380](https://doi.org/10.1038/nrc3380)
- 262 Ge L, Trujillo G, Miller EJ, Kew RR. Circulating complexes of the vitamin D binding protein with G-actin induce lung inflammation by targeting endothelial cells. *Immunobiology*. 2014 Mar;219(3):198-207. doi: [10.1016/j.imbio.2013.10.001](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.10.001)
- 263 Avrameas S, Alexopoulos H, Moutsopoulos HM. Natural Autoantibodies: An Undersugn Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders-A Point of View. *Front Immunol*. 2018 Jun 12;9:1320. doi: [10.3389/fimmu.2018.01320](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01320)

- 264 Rekvig OP. The Anti-DNA Antibodies: Their Specificities for Unique DNA Structures and Their Unresolved Clinical Impact-A System Criticism and a Hypothesis. *Front Immunol.* 2022 Jan 11;12:808008. doi: [10.3389/fimmu.2021.808008](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808008)
- 265 Riska H, Fyhrquist F, Selander RK, Hellström PE. Systemic lupus erythematosus and DNA antibodies in pleural effusions. *Scand J Rheumatol.* 1978;7(3):159-60. doi: [10.3109/03009747809095646](https://doi.org/10.3109/03009747809095646)
- 266 Bixby B, Vrba L, Lenka J, Oshiro M, Watts GS, Hughes T, Erickson H, Chopra M, Knepler JL, Knox KS, Jarnagin L, Alalawi R, Kala M, Bernert R, Routh J, Roe DJ, Garland LL, Futscher BW, Nelson MA. Cell-Free DNA Methylation Analysis as a Marker of Malignancy in Pleural Fluid. *Res Sq [Preprint]*. 2023 Oct 9;rs.3.rs-3390107. doi: [10.21203/rs.3.rs-3390107/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3390107/v1)
- 267 Abutalib MA, Shams A, Tamur S, Khalifa EA, Alnefaie GO, Hawsawi YM. Metastatic papillary thyroid carcinoma in pleural effusion: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 2023 Dec 20;17(1):521. doi: [10.1186/s13256-023-04265-6](https://doi.org/10.1186/s13256-023-04265-6)
- 268 Liu M, Tang J, Sun N, Xi C, Shen C, Hongjun S, Luo Q, Deng X, Qiu Z. Pleural metastases from differentiated thyroid cancer: clinical features and long-term outcomes. *Eur Thyroid J.* 2025 Jan 29;14(1):e240147. doi: [10.1530/ETJ-24-0147](https://doi.org/10.1530/ETJ-24-0147)
- 269 Psallidas I, Kalomenidis I, Porcel JM, Robinson BW, Stathopoulos GT. Malignant pleural effusion: from bench to bedside. *Eur Respir Rev.* 2016 Jun;25(140):189-98. doi: [10.1183/16000617.0019-2016](https://doi.org/10.1183/16000617.0019-2016)
- 270 Ringel MD, Nabhan F. Approach to follow-up of the patient with differentiated thyroid cancer and positive anti-thyroglobulin antibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Aug;98(8):3104-10. doi: [10.1210/jc.2013-1412](https://doi.org/10.1210/jc.2013-1412)
- 271 Ge S, Zhao Y, Liang J, He Z, Li K, Zhang G, Hua B, Zheng H, Guo Q, Qi R, Shi Z. Immune modulation in malignant pleural effusion: from microenvironment to therapeutic implications. *Cancer Cell Int.* 2024 Mar 12;24(1):105. doi: [10.1186/s12935-024-03211-w](https://doi.org/10.1186/s12935-024-03211-w)
- 272 Ragimbeau J, Avrameas S. Single lipopolysaccharide-reactive B cells in the non-immune mouse spleen cell population secrete natural multispecific autoantibodies. *Scand J Immunol.* 1987;26:29-35.
- 273 Zhang H, Chen F, Zhao F, Meng C-M. Structural and electronic properties of 2,4,6-trinitrophenol (TNP). *J Mol Struct: THEOCHEM.* 2008;857:33-7.
- 274 Gunti S, Notkins AL. Polyreactive Antibodies: Function and Quantification. *J Infect Dis.* 2015 Jul 15;212 Suppl 1(Suppl 1):S42-6. doi: [10.1093/infdis/jiu512](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu512)
- 275 Lymberi P, Blancher A, Calvas P, Avrameas S. Natural autoantibodies in nude and normal outbred (Swiss) and inbred (BALB/c) mice. *J Autoimmun.* 1989 Jun;2(3):283-95. doi: [10.1016/0896-8411\(89\)90270-9](https://doi.org/10.1016/0896-8411(89)90270-9)
- 276 Zhou ZH, Tzioufas AG, Notkins AL. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun.* 2007 Dec;29(4):219-28. doi: [10.1016/j.jaut.2007.07.015](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.07.015)
- 277 Zhou ZH, Zhang Y, Hu YF, Wahl LM, Cisar JO, Notkins AL. The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe.* 2007 Mar 15;1(1):51-61. doi: [10.1016/j.chom.2007.01.002](https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.01.002)
- 278 del Barrio L, Sahoo M, Lantier L, Reynolds JM, Ceballos-Olvera I, Re F. Production of anti-LPS IgM by B1a B cells depends on IL-1b and is protective against lung infection with Francisella tularensis LVS. *PLoS Pathog* 11: e1004706, 2015. doi:[10.1371/journal.ppat.1004706](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004706).
- 279 Bertani B, Ruiz N. Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* 8, 2018. doi:[10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018](https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018).
- 280 Cohen TS, Pelletier M, Cheng L, Pennini ME, Bonnell J, Cvitkovic R, Chang CS, Xiao X, Cameroni E, Corti D, Semenova E, Warrenner P, Sellman BR, Suzich J, Wang Q, Stover CK. Anti-LPS antibodies protect against Klebsiella pneumoniae by empowering neutrophil-mediated clearance without neutralizing TLR4. *JCI Insight* 2: e92774, 2017. doi:[10.1172/jci.insight.92774](https://doi.org/10.1172/jci.insight.92774).
- 281 Mbongue JC, Vanterpool E, Firek A, Langridge WHR. Lipopolysaccharide-induced immunological tolerance in monocytederived dendritic cells. *Immuno* 2: 482-500, 2022. doi:[10.3390/immuno2030030](https://doi.org/10.3390/immuno2030030).
- 282 Gunti S, Messer RJ, Xu C, Yan M, Coleman WG Jr, Peterson KE, Hasenkrug KJ, Notkins AL. Stimulation of Toll-like receptors profoundly influences the titer of polyreactive antibodies in the circulation. *Sci Rep* 5: 15066, 2015. doi:[10.1038/srep15066](https://doi.org/10.1038/srep15066).
- 283 Mobed A, Hasanazadeh M. Environmental protection based on the nanobiosensing of bacterial lipopolysaccharides (LPSs): material and method overview. *RSC Adv* 12: 9704-9724, 2022. doi:[10.1039/d1ra09393b](https://doi.org/10.1039/d1ra09393b).
- 284 Fukushima K, Tsujino K, Futami S, Kida H. Natural autoantibodies in chronic pulmonary diseases. *Int J Mol Sci* 21: 1138, 2020. doi:[10.3390/ijms21031138](https://doi.org/10.3390/ijms21031138).

- ²⁸⁵ Bovin NV. Natural antibodies to glycans. *Biochemistry (Mosc)* 78: 786–797, 2013. doi:[10.1134/S0006297913070109](https://doi.org/10.1134/S0006297913070109).
- ²⁸⁶ Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* 30: 382–403, 2006. doi:[10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x).
- ²⁸⁷ Rollenske T, Szijarto V, Lukasiewicz J, Guachalla LM, Stojkovic K, Hartl K, Stulik L, Kocher S, Lasitschka F, Al-Saedi M, Schröder- Braunstein J, von Frankenberg M, Gaebelein G, Hoffmann P, Klein S, Heeg K, Nagy E, Nagy G, Wardemann H. Cross-specificity of protective human antibodies against Klebsiella pneumoniae LPS O-antigen. *Nat Immunol* 19: 617–624, 2018. doi:[10.1038/s41590-018-0106-2](https://doi.org/10.1038/s41590-018-0106-2).
- ²⁸⁸ Park HJ, Choi CM. Can parapneumonic effusion be diagnosed only with pleural fluid analysis? *J Thorac Dis* 12: 3422–3425, 2020. doi: [10.21037/jtd.2020.02.02](https://doi.org/10.21037/jtd.2020.02.02).
- ²⁸⁹ Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front Vet Sci*. 2019 Jun 25;6:192. doi: [10.3389/fvets.2019.00192](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00192)
- ²⁹⁰ Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry*. 2007 Jun 12;46(23):6911–20. doi: [10.1021/bi700382g](https://doi.org/10.1021/bi700382g)
- ²⁹¹ Foo CT, Paterson A, Duckworth A, Herre J. Intrapleural Hyaluronidase in Viscous Malignant Mesothelioma Pleural Effusion. *Chest*. 2021 Dec;160(6):e609–e611. doi: [10.1016/j.chest.2021.07.031](https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.07.031)
- ²⁹² Cheah HM, Fitzgerald D, Louw A, Creaney J, Lee YCG. Hyaluronic acid in viscous malignant mesothelioma pleural effusion. *Respirol Case Rep*. 2020 Dec 3;9(1):e00694. doi: [10.1002/rcr2.694](https://doi.org/10.1002/rcr2.694)
- ²⁹³ Yoshino Y, Wakabayashi Y, Seo K, Koga I, Kitazawa T, Ota Y. Hyaluronic Acid concentration in pleural fluid: diagnostic aid for tuberculous pleurisy. *J Clin Med Res*. 2015 Jan;7(1):41–4. doi: [10.14740/jocmr1980w](https://doi.org/10.14740/jocmr1980w)
- ²⁹⁴ Zaga T, Makris D, Tsilioni I, Kiropoulos T, Oikonomidi S, Damianos A, Gourgoulisanis KI. Hyaluronic acid levels are increased in complicated parapneumonic pleural effusions. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2011 Sep;75(3):167–71. doi: [10.4081/monaldi.2011.217](https://doi.org/10.4081/monaldi.2011.217)
- ²⁹⁵ Henry RP. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu Rev Physiol*. 1996;58:523–38. doi: [10.1146/annurev.ph.58.030196.002515](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.002515)
- ²⁹⁶ Adeva-Andany MM, Fernández-Fernández C, Sánchez-Bello R, Donapetry-García C, Martínez-Rodríguez J. The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans. *Atherosclerosis*. 2015 Jul;241(1):183–91. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.012](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.012)
- ²⁹⁷ Liu YL, Jing LL, Guo QS. Clinical impact and reliability of carbonic anhydrase XII in the differentiation of malignant and tuberculous pleural effusions. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(1):351–4. doi: [10.7314/apjcp.2013.14.1.351](https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.1.351)
- ²⁹⁸ Chen J, Lecuona E, Briva A, Welch LC, Sznajder JJ. Carbonic anhydrase II and alveolar fluid reabsorption during hypercapnia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Jan;38(1):32–7. doi: [10.1165/rcmb.2007-0121OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0121OC)
- ²⁹⁹ Mentese A, Alver A, Demir S, Sumer A, Ozer Yaman S, Karkucak M, Aydin Capkin A, Us Altay D, Turan I. Carbonic anhydrase I and II autoantibodies in Behçet's disease. *Acta Reumatol Port*. 2017 Jan-Mar;42(1):26–31. English. PMID: [28198796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28198796/).
- ³⁰⁰ Lakota J, Skultety L, Dubrovackova M, Altaner C. Presence of serum carbonic anhydrase autoantibodies in patients relapsed after autologous stem cell transplantation indicates an improved prognosis. *Neoplasma*. 2008;55(6):488–92. PMID: [18999876](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18999876/).
- ³⁰¹ Sarrigeorgiou I, Rouka E, Kotsiou OS, Perlepe G, Gerovasileiou ES, Gourgoulisanis KI, Lymberi P, Zarogiannis SG. Natural antibodies targeting LPS in pleural effusions of various etiologies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2024 Jun 1;326(6):L727–L735. doi: [10.1152/ajplung.00377.2023](https://doi.org/10.1152/ajplung.00377.2023)