



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Ματθαίος Γ. Σπελέτας

Διδακτορική Διατριβή

«Επικοινωνία ουδετεροφίλων- Β-λεμφοκυττάρων»

υπό

Γερασιμίνας Τσιντή

Βιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2020

© 2020 Γερασιμίνα Τσιντή

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).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (2^η/21-10-2020 ΓΣΕΣ):

1^{ος} Εξεταστής Ματθαίος Σπελέτας, (Επιβλέπων)

Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Ομότιμος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής Ευθυμία Πετεινάκη

Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής Κωνσταντίνος Παπαγιαννίτσης

Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής Νικόλαος Γιαννακούλας

Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής Δημοσθένης Μακρής

Αναπληρωτής Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής Μαρία Ιωάννου

Καθηγήτρια Παθολογικής-Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*Στα ανίψια μου Ελένη-Ισιδώρα, Χριστίνα-Παναγιώτα και
Ιωάννη-Νικόλαο.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή αποτελεί την συγγραφική προσπάθεια περιγραφής και ανάλυσης μιας σειράς πειραμάτων που διεξήχθησαν στο Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια της διδακτορικής μου μελέτης. Τώρα που το πόνημα αυτό φτάνει στο τέλος του, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους με στήριξαν στην προσπάθεια αυτή με οποιοδήποτε τρόπο.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο αυτής της διδακτορικής εργασίας και επιβλέποντά μου, τον Καθηγητή κύριο Ματθαίο Σπελέτα ο οποίος μου εμπιστεύτηκε την εκπόνησή της και έτσι κατόρθωσα να έρθω σε επαφή με ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο της επιστημονικής έρευνας. Οι γνώσεις που αποκόμισα σε πολλαπλά επίπεδα, μέσα από τη συνεργασία μου μαζί του, είναι ανεκτίμητες. Σε κάθε βήμα διεξαγωγής της εργασίας ήταν έμπρακτα παρών και πρόθυμος να με διδάξει την επιστημονική μέθοδο, να με συμβουλεύει και να με καθοδηγεί. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειχνε. Εξίσου ή και περισσότερο σημαντικό είναι ότι πάντα ένιωθα, ότι για οτιδήποτε, μπορούσα να τον εμπιστευτώ και να υπολογίζω στη στήριξή του.

Θέλω να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου στον ομότιμο Καθηγητή κύριο Αναστάσιο Γερμενή, ο οποίος με δέχθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας πριν από μερικά χρόνια στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Μου έδωσε έτσι την ευκαιρία και τη δυνατότητα να προχωρήσω σε διδακτορικές σπουδές. Τον ευχαριστώ για τη συνεχή στήριξη, καθοδήγηση και πάνω απ' όλα για τα μαθήματα και τη ολόπλευρη διδασκαλία του. Νιώθω εξαιρετικά τυχερή, καθώς ως φοιτήτριά του, βίωσα τη σημασία του πραγματικού δασκάλου και επιστήμονα, με γνήσιο ενδιαφέρον για την πρόοδο και αγάπη για τη νέα γενιά.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κυρία Ευθυμία Πετεινάκη, για την βοήθειά της ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Από τις πρώτες ημέρες της παρουσίας μου στο εργαστήριο Ανοσολογίας, ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια και καθ' όλη τη διάρκεια των διδακτορικών μου σπουδών, μου παρείχε την αμέριστη υποστήριξή της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εντατικολογίας κ. Δημοσθένη Μακρή, για την ουσιαστική βοήθειά του με τα υλικά των ασθενών με σήψη από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ευχαριστώ την κα Ιωάννα Παπαμαργαρίτη, νοσηλεύτρια του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και του Ε.Ι. Ανοσοανεπαρκειών, για την πραγματικά πολύτιμη βοήθειά της με τον χειρισμό του υλικού των ασθενών και των φυσιολογικών μαρτύρων. Την ευχαριστώ για την συνεργατικότητα, τη φιλία της, την καλοσύνη και το ομαδικό πνεύμα της.

Ευχαριστώ τις δασκάλες μου Δρ. Μαρία Ζαμανάκου και Δρ. Ευαγγελία Γραμουστιάνου, για το χρόνο που διέθεσαν σε μένα, την καθοδήγησή τους και τις γνώσεις που μου παρείχαν. Ευχαριστώ την κα Ευαγγελία Καραμούτη που ήταν πάντα πρόθυμη να μου μεταλαμπαδεύσει την ουσιαστική εμπειρία της και τους φίλους και συνοδοιπόρους Δρ. Ειρήνη Σεβδαλή και Δρ. Αδάμ Μολυβδά για τις αμέτρητες ώρες που περάσαμε δουλεύοντας μαζί. Τους ευχαριστώ για όλες τις γνώσεις και απόψεις - επιστημονικές και μή- που ανταλλάξαμε και που πάντα ήταν πρόθυμοι να με βοηθήσουν και να με στηρίξουν.

Επίσης ευχαριστώ τους: Γεωργία Τσιούμα, Ανδρονίκη Καπουσούζη, Νάνσυ Περιστερή, Παναγιώτη Ντέλλα, Νάνσυ Φουσίκα, Σοφία Ραφτοπούλου, Χρήστο Παπαδόπουλο, Ιωάννη Κουλά, Γεδεών Λουλέ, Φαίδρα Παρσοπούλου, Σοφία Βάτσιου, Κλεοπάτρα Γραβάνη, Φανή Τσαντούλα, Ζωή Φλώρου, Κατερίνα Τσιλιπουνιδάκη, Εργίνα Μάλλη, Rajesh Jagirdar και δεκάδες άλλα πρώην και νυν μέλη του εργαστηρίου και του τμήματος Ιατρικής, που θα χρειαζόμουν πραγματικά σελίδα ολόκληρη για να τους αναφέρω όλους και που όλοι τους -ένας προς έναν- με βοήθησαν και με βοηθούν όλα αυτά τα χρόνια, συνεργαζόμαστε, συνυπάρχουμε επικοινωνητικά και επικοινωνούμε επιστημονικά και φιλικά.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής (Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Κουκούλης) και ιδιαίτερα την Καθηγήτρια κυρία Μαρία Σαμαρά και την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Παπαθανασίου για την επικοινωνητική συνύπαρξη και τη βοήθειά τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου. Τους γονείς μου Νίκο και Ελένη Τσιντή, τις αδερφές μου Ιωάννα και Μαρία Τσιντή, τους θείους μου Δωροθέα Μακρυγιάννη και Γιάννη Μακρή, τους Γεράσιμο Μακρή, Γεωργία Μακρή, Λευτέρη Βασιλακόπουλο, Διονύση Χριστοφίλη, και τον Ηλία Κυρούση. Χωρίς όλους αυτούς τους ανθρώπους, οι οποίοι με στήριζαν με κάθε τρόπο, δεν θα μπορούσε αυτό το πόνημα να ολοκληρωθεί.

Γερασιμίνα Τσιντή

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Γερασιμίνα Ν. Τσιντή









Ημερομηνία γέννησης *****

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- 12/2014- Σήμερα Υποψήφια Διδάκτωρ, Εργαστήριο Ανοσολογίας Ιστοσυμβατότητας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Θέμα: Επικοινωνία Ουδετεροφίλων- Β-Λεμφοκυττάρων. Επιβλέπων: Ματθαίος Σπελέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής.
- 11/2013-10/2014 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Βαθμός: 9,87, «Άριστα». Τίτλος Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας: «**Η λειτουργία των ουδετεροφίλων στις αντισωματικές ανεπάρκειες.**» Υπεύθυνος Καθηγητής: Αναστάσιος Ε. Γερμενής. Βαθμός: «Άριστα» (10).
- 09/ 2006-04/2013 Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ
Βαθμός Πτυχίου: 6,28, «Καλώς»
Τίτλος Ερευνητικής Διπλωματικής Εργασίας: «**Μελέτη του ρόλου της Φωσφολιπάσης C στη δημιουργία πολυμερών σωληνίνης.**» Υπεύθυνος Καθηγητής: Αποστολάκος Π. Βαθμός: «Άριστα» (10)
- 2003-2006 6ο Ενιαίο Λύκειο Γλυφάδας, Βαθμός απολυτηρίου: 19,2/20, «Άριστα»

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα **Ελληνική**

Λοιπές γλώσσες

	ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
	Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
Αγγλικά	C2	C2	C2	C2	C2
Cambridge English: Proficiency (CPE) C2 και Κρατικό Πιστοποιητικό Γλωσσομάθειας (Γ1-πολύ καλή γνώση)					
Γαλλικά	B2	B2	B2	B2	B2
Diplôme d'études en langue française 2nd degré και Κρατικό Πιστοποιητικό Γλωσσομάθειας (B2- καλή γνώση)					

Επίπεδα: A1/A2: Βασικός χρήστης - B1/B2: Ανεξάρτητος χρήστης - C1/C2: Έμπειρος χρήστης
[Κοινό Ευρωπαϊκό Πλαίσιο Αναφοράς για Γλώσσες](#)

Ψηφιακή
δεξιότητα

ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ				
Επεξεργασία δεδομένων	Επικοινωνία	Δημιουργία Περιεχομένου	Ασφάλεια	Επίλυση προβλημάτων
Έμπειρος Χρήστης	Έμπειρος Χρήστης	Έμπειρος Χρήστης	Έμπειρος Χρήστης	Έμπειρος Χρήστης
Επίπεδα: Βασικός χρήστης - Ανεξάρτητος χρήστης - Έμπειρος χρήστης Ψηφιακές δεξιότητες - Πίνακας αυτοαξιολόγησης				
ECDL Core (Word, Excel, Power Point, Access, Internet, Outlook, Windows, Βασικές Έννοιες Πληροφορικής)				

- Καλή γνώση λογισμικού επεξεργασίας εικόνων: Adobe Photoshop

Υποτροφίες

2018 (Μάρτιος-Αύγουστος): Erasmus+ Traineeship Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Άσκηση διάρκειας 6 μηνών στο University Clinic Carl-Gustav-Carus, Medical Faculty of the TU Dresden, Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine of Medical Theoretical Center, Director: Prof. Triantafyllos Chavakis . Αντικείμενο άσκησης: **“Innate immune training phenomenon”**

Συμμετοχή σε έργα με σύμβαση

Κωδ έργου ΕΛΚΕ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας: **5358**.
14/10/2020 - 31/10/2020

Έργο: Facilitated immunoglobulin administration registry and outcomes study -FIGARO.
Αντικείμενο έργου: «Καταγραφή δεδομένων ασθενών με ανοσοανεπάρκειες» Αριθ. πρωτ.: ΕΞΕ0035657/002

Κωδ έργου ΕΛΚΕ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας:
3565.00. 22/3/2019 - 31/8/2019

Έργο: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ 2017 (ΦΕΚ328/15-03-2005).
Αντικείμενο έργου: «ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ» Αριθ. πρωτ.: ΕΞΕ0007650/003

Κωδ έργου ΕΛΚΕ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας:
3565.00 15/1/2020 - 15/4/2020

Έργο: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ 2017 (ΦΕΚ328/15-03-2005)
Αντικείμενο έργου: «ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ» Αριθ. πρωτ.: ΕΞΕ0000217/002

Δημοσιεύσεις

- **Gerasimina Tsinti**, Demosthenes Makris, Anastasios E. Germenis, Matthaios Speletas. (2020) Persistent activation of innate immunity in patients with primary antibody deficiencies. *Journal of Immunology Research* (**accepted**)
- **Tsinti G**, Germenis A.E., Speletas M. (2018) The impact of experimental manipulation on neutrophil immunophenotyping. *Biomed Res Clin Prac* 3. doi: 10.15761/BRCP.1000169
- Ntellas, P., Dardiotis, E., Sevdali, E., Siokas, V., Aloizou, A. M., **Tsinti, G.**, Germenis, A. E., Hadjigeorgiou, G. M., Eibel, H., & Speletas, M. (2020). TNFRSF13C/BAFFR P21R and H159Y polymorphisms in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders*, 37, 101422. doi.org/10.1016/j.msard.2019.101422

1. O. Koltsida, G. Tsiouma, G. Tsinti, S. Tryfon, Z. Daniil, E.-C. Vervessou, N. Tzogas, A. Koutsouri, F. Bardaka, F. Kalala, C. Skoulakis, A. Rapti, M. Speletas. **HYPODIAGNOSIS OF PRIMARY ANTIBODY DEFICIENCIES IN PATIENTS WITH COPD, SARCOIDOSIS AND CHRONIC RHINOSINUSITIS**. 19th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2020, Online Meeting.
2. I.Kakkas, A-M.Peristeri, G.Tsinti, P.Patiou, Ch.Kelaidi, M.Dimou, P.Panagiotidis, A.Symeonidis, A.Kourakli, A.Tsirogianni, G.Tsiouma, F.Kalala, A.Banti, A.Kioumi, S.Polychronopoulou, E.Farmaki, M.Speletas. **TNFRSF13B-TACI MUTATIONS IN PATIENTS WITH PRIMARY ANTIBODY DEFICIENCIES (PAD). A NATIONWIDE STUDY IN GREECE**. 19th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2020, Online Meeting.
3. Spyros A. Papiris, Vasiliki Apollonaton, Argyrios Tzouvelekis, et al. **Genotyping and phenotyping of alpha1-antitrypsin deficiency Greek patients under augmentation therapy: a multicenter study**. European Respiratory Journal Sep 2020, 56 (suppl 64) 3324; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.3324
4. E. Sevdali, A.M. Peristeri, E. Farmaki, **G. Tsinti**, M. Palassopoulou, A. Kioumi, N. Stavrogianni, M. Speletas **RITUXIMAB AS A TRIGGERING FACTOR FOR THE DEVELOPMENT OF COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY (CVID)**. 18th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2018, Lisbon, Portugal
5. Athanasia-Marina Peristeri, **Gerasimina Tsinti**, Eirini Sevdali, Anastasios E. Germenis, Matthaïos Speletas. **XPNPEP2 PROMOTER HAPLOTYPE AND ANGIOEDEMA ATTACKS**. 10th International Congress of Internal Medicine, 2018, Athens, Greece
6. **Gerasimina Tsinti**, Anastasios E. Germenis, Matthaïos Speletas **NEUTROPHILS IN COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY: PLAYERS OR VICTIMS?** 2017 ESID Annual Meeting, Edinburgh, Great Britain.
7. **Γ. Τσιντή**, Α.Ε. Γερμενής, Μ. Σπελέτας. Η επίπτωση πειραματικών χειρισμών στον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων φυσιολογικών μαρτύρων. 43^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Ιατρική Εταιρεία Αθηνών, 2017, Αθήνα, Ελλάδα.
8. Maria Palasopoulou, **Gerasimina Tsinti**, Anastasios E Germenis, Matthaïos Speletas., Radiation as a trigger of attacks in a misdiagnosed patient with hereditary angioedema and Hodgkin's disease. 10th C1-inhibitor Deficiency Workshop, 2017, Budapest, Hungary.
9. **Gerasimina Tsinti**, Anastasios E. Germenis, Matthaïos Speletas. Defective polymorphonuclear neutrophil compartment in common variable immunodeficiency (CVID). 8th Larissa International Congress of Internal Medicine, 2016, Larissa, Greece
10. Kapoussouzi, A., Sevdali, E., Farmaki, E., Taparkou, A., **Tsinti, G.1**, Kakkas, I., Paterakis, G., Germenis, A.E., Speletas, M., on behalf of the Study Group of

Primary Immunodeficiencies of the Hellenic Society of Haematology A nation-wide study of clinical phenotypes and TACI mutations in patients with common variable immunodeficiency (CVID) and IgA deficiency (IgAD) in Greece. International Congress of Immunology 21-26 August 2016 Melbourne, Australia

11. E. Sevdali , A. Kapoussouzi , E. Farmaki , I. Kakkas , A. Taparkou , **G. Tsinti** , A.E. Germenis, H. Eibel , M. Speletas. CTLA-4 mutations in Greek patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID) . ESID Meetings, 17th Biennial Meeting, 2016, Barcelona, Spain.
12. **Τσιντή Γ.**, Οικονομίδη Ι., Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π., «Ο ρόλος της φωσφολιπάσης C στη δημιουργία των μικροσωληνίσκων.» 34ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών, 2012, Τρίκαλα.

«ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ- Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ»

Γερασιμίνα Τσιντή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ματθαίος Σπελέτας**, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Αναστάσιος Ε. Γερμενής**, Ομότιμος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Ευθυμία Πετεινάκη** Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Οι πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (Primary Antibody Deficiencies-PADs) αντιπροσωπεύουν μια ετερογενή ομάδα διαταραχών, με την κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια να είναι η πιο κοινή με κλινική σημασία. Η κύρια φαινοτυπική βλάβη έγκειται στην αδυναμία των Β-λεμφοκυττάρων να παράγουν αντισώματα, ενώ η κύρια θεραπεία εκλογής είναι η θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων. Παρόλ' αυτά η διαχείριση των υπόλοιπων φλεγμονωδών εκδηλώσεων της νόσου παραμένει ανεπαρκής, εγείροντας το ερώτημα για τον ρόλο της φυσικής ανοσίας στην παθογένεση και στην εκδήλωση του συνδρόμου. Υπάρχει πληθώρα μελετών που έχουν αποδείξει την παρουσία αλληλεπιδράσεων Β-λεμφοκυττάρων και ουδετεροφίλων με διάφορους μηχανισμούς, όπως μέσω κυτταροκινών ή/και μέσω δημιουργίας NETs, σε ζωικά μοντέλα αλλά και σε διάφορα φλεγμονώδη νοσήματα (π.χ. αυτοάνοσα). Διατυπώνεται λοιπόν η υπόθεση ότι στις PADs ένα πολύπλοκο γενετικό υπόβαθρο το οποίο επηρεάζει επιπρόσθετους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, επηρεάζει την έκφραση του κλινικού φαινοτύπου της νόσου. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε με κυτταρομετρία ροής και σε διάφορες πειραματικές συνθήκες (ήρεμη φάση, μετά από απομόνωση και μετά από επώαση παρουσία ή απουσία διεγερτών), το πρότυπο έκφρασης διάφορων δεικτών στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα, ενδεικτικών του σταδίου διαφοροποίησης, της ικανότητας για χημειοταξία, προσκόλληση, οψωνινοποίηση, μετανάστευση και φαγοκυττάρωση σε 25 ασθενείς με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες, 12 υγιείς μάρτυρες και 4 ασθενείς με σήψη. Σε αυτά τα πλαίσια αναλύσαμε επιπρόσθετα ασθενείς πριν και μετά την έναρξη θεραπείας υποκατάστασης, καθώς επίσης και έναν ασθενή ο οποίος δεν ελάμβανε θεραπεία υποκατάστασης, σε διάφορες κλινικές καταστάσεις. Διαπιστώσαμε ότι οι ασθενείς με PAD εμφανίζουν έναν χρόνια φαινότυπο ενεργοποίησης της φυσικής ανοσίας, καθώς επίσης και αρκετές διαφορές στην έκφραση δεικτών ενεργοποίησης, ωρίμανσης και προσκόλλησης ανάλογα με τις επί μέρους κλινικές εκδηλώσεις. Επιπρόσθετα, η θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη είχε ευνοϊκή επίδραση στα ουδετερόφιλα, όπως αυτό φάνηκε από την εκδήλωση ενός πιο ώριμου και λιγότερο ενεργοποιημένου φαινοτύπου στα κύτταρα ήρεμης φάσης και από την ενισχυμένη ικανότητα ενεργοποίησης μετά από έκθεση σε LPS. Ως εκ τούτου καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με PAD, επιδεικνύουν μία εμμένουσα ενεργοποίηση των

κυττάρων της φυσικής ανοσίας, η οποία πιθανώς σχετίζεται με το χρόνια φλεγμονώδες στρες που παρατηρείται συνήθως σε αυτές τις διαταραχές, αλλά μπορεί να επηρεάζεται και από το πρωτοπαθές γενετικό αίτιο της ανεπάρκειας. Η λειτουργία των ουδετεροφίλων και εν γένει των κυττάρων της φυσικής ανοσίας θα πρέπει να εξετάζεται σε παθολογικές καταστάσεις όπου το πρωτοπαθές αίτιο φαίνεται να έγκειται στα Β-λεμφοκύτταρα για την καλύτερη διαχείριση των ασθενών αυτών. Η διαλεύκανση των μηχανισμών και των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων επικοινωνίας αυτών μπορεί να διαλευκάνει παθογενετικά αίτια αυτών των νοσημάτων και η λεπτή ρύθμιση αυτών να αποτελέσει στόχο μελλοντικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Λέξεις κλειδιά

Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (PAD-Primary Antibody Deficiencies), Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια, Β-λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ενεργοποίηση, ανοσοφαινότυπος.

Abstract

Primary antibody deficiencies (PAD) represent a heterogeneous group of disorders, with common variable immunodeficiency being the most common with clinical significance. The main phenotypic defect resides in the inability of B cells to produce antibodies, and the cornerstone of therapy is immunoglobulin replacement treatment in order to fight infections. However, the management of the other inflammatory manifestations is inadequate, raising the question about the role of innate immunity in the pathogenesis and expression of the syndrome. Several studies have proven the existence of interactions between B-lymphocytes and neutrophils through various mechanisms such as the production of cytokines and NETs, in animal models and inflammatory diseases (e.g. autoimmune diseases). Thus, the hypothesis is made, that a complex genetic background affecting additional cell populations, such as polymorphonuclear cells (PMN) and monocytes, influences the expression of the clinical phenotype of the disease. In this study, we investigated by flow cytometry in different conditions (resting state, and after isolation and incubation, with and without stimuli), the expression pattern of several markers on PMN and monocytes, indicative of their maturation, capacity for chemotaxis, adhesion, opsonization, migration and phagocytosis in 25 PAD patients, 12 healthy blood donors and 4 septic patients. In this context, we also analyzed patients before and after the initiation of replacement treatment, as well as an untreated patient in different clinical conditions. Interestingly, we observed that PAD patients exhibit a chronic activation status of the innate immunity compartment, along with several differences in the expression of activation, maturation and adhesion markers, with respect to different clinical conditions. Moreover, immunoglobulin replacement treatment had a favorable effect on PMN, as it was expressed by a more mature and less activated phenotype on basal state cells, and an enhanced activation capacity after LPS exposure. Thus, we conclude that PAD patients display a persistent innate immune cell activation, which is probably associated with the chronic inflammatory stress, usually observed in these disorders, but also may be affected by the primary genetic defect leading to the deficiency. The function of neutrophils and of innate immune cells in general, should be investigated in disorders

where the primary causative resides in B-cell function, for the better management of those patients. The revelation of mechanisms and complex interactions between those cell populations could clarify the pathogenesis of these diseases, while the fine tuning of this crosstalk could be target of future treatment approaches.

Key words

PAD-Primary Antibody Deficiencies, CVID-Common variable immunodeficiency, B-cells, neutrophils, monocytes, activation, immunophenotyping

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
APC	antigen-presenting cell
APDS	Activated PI3K-delta syndrome
APRIL	A proliferation-inducing ligand
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosine triphosphate
BAFF	B-cell activating factor
BPI	Bactericidal/permeability-increasing protein
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CART	chimeric antigen receptor therapy
CEACAM	carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules
CGD	Chronic Granulomatous Disease
CHAI	CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration
CID	Combined immunodeficiency
CMP	Common myeloid progenitor
CMV	Cytomegalovirus
CNV	Copy number variation
CR1	Complement receptor type 1
CR3	Complement receptor type 3
CRD	Chronic respiratory disease
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	Receptor for the C-X-C chemokine
DAG	Diacylglycerol kinase
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DNA	Deoxyribonucleic acid

EBV	Epstein-Barr virus
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESID	European Society for Immunodeficiencies
FcγR	Fc-gamma receptors
FMF	Familial Mediterranean Fever
fMLP	N-formyl-met-leu-phe
fSCIG	Facilitated subcutaneous immunoglobulin
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GLILD	Granulomatous–lymphocytic interstitial lung disease
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMP	Granulocyte-monocyte progenitors
GOF	Gain-of-function mutation
GPCR	G protein-coupled receptors
hCAP-18	Human Cationic Antimicrobial Protein
Hck	hematopoietic cell kinase
HHV8	Human herpes virus 8
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HNP	human neutrophil peptides
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IEI	Inborn Errors of Immunity
IFN	Interferone
IKZF1	IKAROS Family Zinc Finger 1
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITGAM	Integrin Subunit Alpha M
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
IVIG	Intravenous immunoglobulin
kDa	kiloDaltons
LAD	Leukocyte Adhesion Deficiency
LAMP	Lysosomal-associated membrane protein

LDGs	Low-Density Granulocytes
LDNs	Low-Density Neutrophils
LOF	Loss of function
LPS	Lipopolisaccharite
LRBA	LPS Responsive Beige-Like Anchor Protein
MAMP	microbe associated molecular pattern
MBL	Mannose binding lectine
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells
MFI	Mean fluorescent intensity
MHC	Major histocompatibility complex
MMP8	matrix metalloproteinase-8
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MPO	Myeloperoxidase
MZ	Marginal zone
NADPH	Dihyronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NETs	Neutrophil extracellular traps
NFkB	Nuclear factor-κB
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NGS	Next generation sequencing
NHS	Normal human serum
Nramp-1	Natural resistance-associated macrophage protein 1
OLFM-4	Olfactomedin 4
PAF	Platelet-activating factor
PARS	Protease-activated receptors
PD1	Programmed cell death protein 1
PDL1	Programmed death-ligand 1
PFAPA	Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, Adenitis
PI3Kδ	Phosphoinositide 3-kinase delta
PICS	persistent inflammatory-immunosuppressive and catabolic syndrome
PID	Primary immunodeficiency disorder

PIDD	Primary immune deficiency diseases
PMN	polymorphonuclear leukocytes
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTX3	pentraxin 3
Pyk-2	Protein tyrosine kinase
rac	Ras-related C3 botulinum toxin
ROS	Reactive oxygen species
SCID	Severe combined immunodeficiency
SHIP1	Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SLE	Systemic lupus erythematosus
SLeX	Sialyl Lewis ^x
SLPI	Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SYK	spleen tyrosine kinase
TACI	Transmembrane activator and CAML interactor
TLR4	Toll-like receptor 4
TNFRSF13B	TNF Receptor Superfamily Member 13B
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
XLA	X-linked agammaglobulinemia (XLA)
B-XΛΛ	B- Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ	6
Περίληψη.....	11
Abstract	13
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	15
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	22
I. ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ: ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ.....	23
I.1. Η λειτουργία και οι μηχανισμοί δράσης των ουδετεροφίλων	26
I.1.α. Αντιμικροβιακά πεπτίδια	26
Αζουροφιλικά κοκκία	28
Τα κοκκία αρνητικά μυελοϋπεροξειδάσης	31
Εκκριτικά κυστίδια	33
I.1.β. Μηχανισμοί αποκοκκίωσης	33
I.1.γ. Μηχανισμοί προσκόλλησης και ενδοθηλιακής μετανάστευσης	34
I.1.δ. Έκφραση υποδοχέων ανοσοαφαιρινών	35
Η έκφραση και ο ρόλος των FcγR στα ουδετερόφιλα κατά την ομοιόσταση.....	36
Οι FcγR υποδοχείς των ουδετεροφίλων κατά τη φλεγμονή.....	38
I.2. Λειτουργική/φαινοτυπική ετερογένεια	39
I.2.α. Φαινότυπος: Κατάσταση ενεργοποίησης.....	40
I.2.β. Φαινότυπος: Κυτταρική γήρανση/ανοσογήρανση	41
I.2.γ. Φαινότυπος: «Αριστερή στροφή».....	42
I.2.δ. Φαινότυπος: Οξεία φλεγμονή/σήψη.....	43
I.2.ε. Φαινότυπος: καταστολή προσαρμοστικής ανοσίας	45
I.3. Ο ρόλος των ουδετεροφίλων στην ιστική αναγέννηση και επούλωση.....	47
I.4. Νοσήματα που σχετίζονται με υπερνεργοποίηση των φαινοτύπων των ουδετεροφίλων	48
I.5. Νοσήματα που σχετίζονται με υπο-ενεργοποίηση ή λειτουργική ανεπάρκεια των φαινοτύπων των ουδετεροφίλων.....	48
I.5.α. Επίκτητη υποενεργοποίηση κατά το σύνδρομο αντισταθμιστικής αντιφλεγμονώδους απόκρισης μετά από μείζον τραύμα και στη σήψη.....	50
II. ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	51
III. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	56
III.1. Ταξινόμηση πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών: διαγνωστικά κριτήρια και θεραπεία	58

III.2. Δευτεροπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες.....	64
III.3. Αξιολόγηση ασθενών	65
III.3.α. Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια: Φαινότυποι	66
Η πνευμονική νόσος στην COVID.....	70
Εντερική νόσος στην COVID.....	72
Κακοήθειες εκδηλώσεις.....	73
III.4. Μονογονιδιακές βλάβες ανοσιακής ρύθμισης και Β-λεμφοκυτταρικής λειτουργίας	74
IV. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ.....	77
V. ΣΚΟΠΟΣ	79
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	81
I. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	82
Μελέτη της επίπτωσης πειραματικών χειρισμών: υγιείς μάρτυρες	82
Μελέτη της φυσικής ανοσίας: ομάδες ασθενών και υγιών μαρτύρων.....	82
II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	86
II.1. Καλλιέργειες και Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση	86
II.2. Απομόνωση ουδετεροφίλων.....	88
II.2.α. Εκτίμηση καθαρότητας απομονωμένου κυτταρικού πληθυσμού και βιωσιμότητας κυττάρων.....	89
II.3. Στατιστική Ανάλυση.....	94
II.4. Ανάλυση εξονίου 5 του γονιδίου IKZF1.....	94
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	97
III.1. Η επίπτωση των πειραματικών χειρισμών στον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων υγιών μαρτύρων	97
III.1.α. Έκφραση υποδοχέων ανοσοσφαιρινών	97
III.1.β. Έκφραση δεικτών ωρίμανσης (CD10)	99
III.1.γ. Έκφραση μορίων προσκόλλησης (CD11b, CD18 και CD66b)	99
III.2. Η ενεργοποίηση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας σε ασθενείς με PAD.....	102
III.2.α. Η επίδραση της θεραπείας υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη στο φαινότυπο των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων σε ασθενείς με PADs.....	110
III.2.β. Σχέση των κλινικών χαρακτηριστικών με τον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων.	112
III.2.γ. Μελέτη ασθενούς σε διαφορετικές κλινικές καταστάσεις.	113
IV. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	119
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	122
V.1. Η επίπτωση των πειραματικών χειρισμών στον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων.	122

V.2. Η λειτουργία των ουδετεροφίλων σε ασθενείς με PAD	124
V.3. Η επίδραση του γενετικού υποβάθρου στη φυσική ανοσία ασθενών με PAD.....	129
VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	132
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	133
Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής	156

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ: ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ

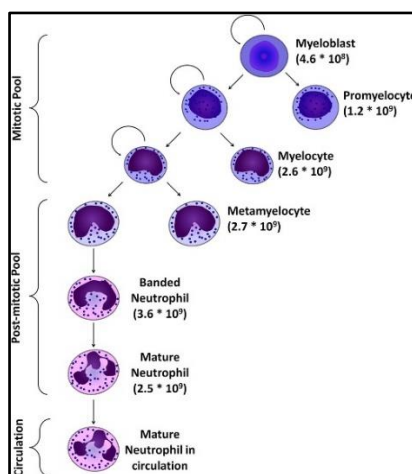
Τα ουδετερόφιλα προκύπτουν από τα προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς (κοινά προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς-common myeloid progenitors CMPs), τα οποία εντοπίζονται στον μυελό των οστών αλλά και σε εξωμυελικές θέσεις όπως ο σπλήνας. Κατά τα αρχικά στάδια διαφοροποίησης (Εικόνα 1), τα προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς (μυελοβλάστες) διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησης προς μονοκύτταρα/μακροφάγα, προς ουδετερόφιλα αλλά και προς άλλα κύτταρα της μυελικής σειράς όπως τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα. Αυτή η κοινή πορεία διαφοροποίησης καταλήγει στο τελευταίο προγονικό κύτταρο που δύναται να διαφοροποιηθεί και προς τις δύο σειρές, το προγονικό κύτταρο κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (granulocyte macrophage progenitor (GMP)). Το πρώτο προγονικό κύτταρο του οποίου η πορεία διαφοροποίησης έχει δεσμευτεί προς τη σειρά των ουδετεροφίλων είναι το προμυελοκύτταρο. Αυτό το κύτταρο, στους ανθρώπους μπορεί να αναγνωριστεί από το στρογγυλό πυρήνα του και το σχετικά σκούρο κυτταρόπλασμα, ενώ διατηρεί την ικανότητα διαίρεσης. Αυτό αποτελεί και το πρώτο στάδιο στην πορεία ωρίμανσης των ουδετεροφίλων που συνιστά την επονομαζόμενη «μιτωτική δεξαμενή των ουδετεροφίλων».(1) Ο αριθμός των κυτταρικών διαίρεσεων που λαμβάνουν χώρα στο στάδιο του προμυελοκυττάρου στους ανθρώπους είναι ασαφής καθώς αυτά μπορούν είτε να πολλαπλασιαστούν ή να διαφοροποιηθούν στο αμέσως επόμενο στάδιο διαφοροποίησης που είναι το μυελοκύτταρο. Το μυελοκύτταρο χαρακτηρίζεται από λιγότερο πυκνό και λιγότερο σκούρο κυτταρόπλασμα, ενώ συνιστά το τελευταίο κύτταρο της μιτωτικής δεξαμενής καθώς είναι το τελευταίο κύτταρο στην πορεία διαφοροποίησης που διαθέτει την ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Μετά το στάδιο των μυελοκυττάρων τα πρόδρομα κύτταρα των ουδετεροφίλων χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και εισάγονται στην επονομαζόμενη μεταμιτωτική δεξαμενή. Αυτό το στάδιο σηματοδοτεί την έναρξη ενός πραγματικού προγράμματος διαφοροποίησης με πρώτο στάδιο αυτό των μεταμυελοκυττάρων. Στον άνθρωπο αυτά χαρακτηρίζονται από νεφροειδή πυρήνα και πιο διαυγές κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια αυτά ωριμάζουν στα ραβδοπύρηνα τα οποία χαρακτηρίζονται από πεταλοειδή πυρήνα και διαυγές κυτταρόπλασμα. Αυτά τα κύτταρα δεν εντοπίζονται σε συνθήκες ομοιόστασης στην κυκλοφορία, αλλά κατά την οξεία φλεγμονή και τη λοίμωξη

οδηγώντας στην λεγόμενη «αριστερή στροφή» του πληθυσμού των ουδετεροφίλων, φαινόμενο που πρωτοπεριγράφηκε από τον Arneht (*Die neutrophilen weissen Blutkörperchen bei Infektions-Krankheiten, 1903*). Η μεταμιτωτική δεξαμενή χαρακτηρίζεται από χρονική διάρκεια 5-6 ημερών στους ανθρώπους, ξεκινώντας από το στάδιο του μυελοκυττάρου, μεταβαίνοντας στο στάδιο του ραβδοπύρηνου, μέχρι την τελική διαφοροποίηση στα ώριμα ουδετερόφιλα. Στα τρωκτικά ο χρόνος αυτός είναι σημαντικά μικρότερος (2-3 ημέρες).(2)

Οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι το ώριμο ουδετερόφιλο στον μυελό των οστών σηματοδοτεί τη λήξη της μεταμιτωτικής δεξαμενής, όπου το ουδετερόφιλο υφίσταται τελική διαφοροποίηση πριν την απελευθέρωσή του στο περιφερικό αίμα. Κάποιοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι μεγάλο μέρος των ουδετεροφίλων του μυελού κινητοποιούνται ως «δεξαμενή ταχείας κινητοποίησης» σε περιόδους φλεγμονώδους στρες. Παρόλ'αυτά δεν είναι γνωστή η μοίρα των κυττάρων αυτών σε συνθήκες ομοιόστασης, δεδομένου μάλιστα του γεγονότος ότι η «εμφανής απόπτωση» στη δεξαμενή των ουδετεροφίλων στο μυελό των οστών είναι σπάνια. Πρόσφατη μελέτη μεταγραφώματος και επιγενώματος των ουδετεροφίλων υποστηρίζει ότι οι μεγαλύτερες αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την πορεία διαφοροποίησής τους στον μυελό των οστών είναι κατά την μετάβασή τους στην αιματική κυκλοφορία.

Τα ώριμα ουδετερόφιλα είναι παρόντα στο αγγειακό σύστημα σε δύο μορφές δεξαμενών. Η μία δεξαμενή αφορά στα ελεύθερα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα της αιματικής κυκλοφορίας και η άλλη αφορά στα εδράζοντα ουδετερόφιλα του αίματος σε ορισμένους ιστούς. Αυτή είναι η δεξαμενή των μεταναστευσάντων ουδετεροφίλων και αυτά εντοπίζονται σε ιστούς όπως το ήπαρ, ο σπλήνας και ο ίδιος ο μυελός των οστών. (3)(4)



Εικόνα.1: Πορεία διαφοροποίησης ουδετεροφίλων. Tak *et al.* J Leukoc Biol. 2013;94(4):595–601.

Τα ουδετερόφιλα των ποντικών και των ανθρώπων που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, διαθέτουν διακριτά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τα οποία μεταβάλλονται χρονικά σταδιακά ακολουθώντας κίρκαδικό ρυθμό.

Επιπρόσθετα, τουλάχιστον για τα ποντίκια αυτές οι φαινοτυπικές αλλαγές, συνεπάγονται παράλληλα αλλαγές και σε επίπεδο μεταγραφώματος καθώς και στις ιδιότητες μετανάστευσης. Κυρίαρχη λειτουργία που επηρεάζεται χρονικά κατά τον κίρκαδικό ρυθμό, είναι οι αναδιατάξεις του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Έτσι κατά τη διάρκεια της ημέρας, τα ουδετερόφιλα των ποντικών χάνουν τις μικρολάχνες της πλασματικής μεμβράνης τους, χάνοντας και σταδιακά κατ'αυτόν τον τρόπο την ικανότητα κύλισης στις σελεκτίνες του ενδοθηλίου. Αυτή η αλλαγή συνεπάγεται πιθανά και μία σταδιακή απώλεια της ικανότητας μετανάστευσης των ουδετεροφίλων στην περιοχή της φλεγμονής. (5)

Η δυναμική της εισόδου των ουδετεροφίλων σε ιστούς σε κατάσταση ομοιόστασης ή κατά την φλεγμονή έχει μελετηθεί εκτενώς στα ποντίκια, αλλά για τους ανθρώπους υπάρχουν κυρίως ορισμένες συγκριτικές μελέτες οι οποίες αφορούν ιστούς όπως οι πνεύμονες και ο σπλήνας. Εκτός από τη λειτουργία τους σε αυτά τα όργανα σε κατάσταση φλεγμονής, ο ρόλος τους έχει διερευνηθεί και ως θέσεις που λαμβάνει χώρα «επαναπρογραμματισμός των ουδετεροφίλων», όπως έχει δείχθει σε πνεύμονες ποντικών όπου στη συνέχεια αυτά επιστρέφουν στην περιοχή του μυελού των οστών για απομάκρυνση. Από την άλλη μελέτες έχουν δείξει ότι τα ίδια τα ουδετερόφιλα μπορούν να μεταβάλλουν το μεταγραφικό προφίλ σε πνεύμονες ποντικών επηρεάζοντας τη μετάσταση σε καρκινικά μοντέλα. (6)

Ο σπλήνας αντιπροσωπεύει επίσης έναν ιστό όπου η λειτουργία των ουδετεροφίλων έχει μελετηθεί σε πλαίσια νοσημάτων αλλά και σε συνθήκες ομοιόστασης. Μελέτες σε ανθρώπινους σπλήνες έχουν δείξει την παρουσία τουλάχιστον δύο πληθυσμών ουδετεροφίλων στην περιθλακιδώδη ζώνη, οι οποίοι επάγουν την έκκριση της IgM και την ισοτυπική μεταστροφή των B-λεμφοκυττάρων της οριακής ζώνης μέσω της έκκρισης παραγόντων όπως ο BAFF, ο APRIL, η IL-21 και η πεντραξίνη-3. Αυτοί οι πληθυσμοί έχει δείχθει ότι επάγονται μεταγεννητικά, μέσω τοπικών σημάτων όπως η IL-10, και ο GM-CSF και με τη σειρά τους επάγουν αντιμικροβιακή παραγωγή αντισωμάτων με T-ανεξάρτητο τρόπο. (7)

Τέλος το ήπαρ συνιστά όργανο ενεργούς συσσώρευσης και καταστροφής των ουδετεροφίλων η οποία μεσολαβείται από τα κύτταρα Kupffer.(8)

Ο αριθμός των ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα μπορεί να μεταβληθεί σε σημαντικό βαθμό από μικρές αλλαγές της ομοιόστασης. Πριν από αρκετές δεκαετίες είχε δειχθεί ότι ορμόνες του στρες όπως η επινεφρίνη και η κορτιζόλη μπορούν να μεταβάλλουν σε μεγάλο βαθμό τον απόλυτο αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα. Αυτά τα κύτταρα φαινομενικά έχουν τον ίδιο φαινότυπο με αυτά πριν τη διέγερση. Παρόμοιο φαινόμενο περιγράφεται και κατά την άσκηση. Η κύρια θεώρηση είναι ότι υφίσταται μία δυναμική ισορροπία μεταξύ των ελεύθερων κυκλοφορούντων κυττάρων και των αλληλεπιδρώντων με τα αγγειακά τοιχώματα. (8,9)

I.1. Η λειτουργία και οι μηχανισμοί δράσης των ουδετεροφίλων

I.1.α. Αντιμικροβιακά πεπτίδια

Η φλεγμονώδης απόκριση η οποία μεσολαβείται των ουδετεροφίλων προσεγγίζεται ως μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων η οποία περιλαμβάνει την αρχική προσκόλληση των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων στο ενεργοποιημένο αγγειακό ενδοθήλιο, την επακόλουθη εξαγγείωση και την μετανάστευση στις εστίες της φλεγμονής και εν τέλει την κατά τόπους απομάκρυνση των μικροοργανισμών μέσω της φαγοκυττάρωσης, της παραγωγής των ROS και της απελευθέρωσης των μικροβιοκτόνων ουσιών.(10)

Οι περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες βασίζονται στην απελευθέρωση των εκκριτικών κυστιδίων.(11) Οι διάφοροι πληθυσμοί των ουδετεροφιλικών κοκκίων συνιστούν μια σημαντική παρακαταθήκη όχι μόνο αντιμικροβιακών πρωτεϊνών, πρωτεασών και συστατικών της οξειδωτικής αναπνευστικής έκρηξης, αλλά και μιας μεγάλης γκάμας μεμβρανοσυνδεδεμένων υποδοχέων για μόρια προσκόλλησης του ενδοθηλίου, πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, βακτηριακών παραγώγων και διαλυτών μεσολαβητών της φλεγμονής. Είναι η ελεγχόμενη κινητοποίηση αυτών των κυτταροπλασματικών οργανιδίων η οποία μετατρέπει τα ουδετερόφιλα από ένα παθητικά κυκλοφορούν κύτταρο, σε ένα εν δυνάμει δραστικό κύτταρο της φυσικής ανοσίας. Επιπρόσθετα η ρυθμιζόμενη εξωκυττάρωση κοκκίων επιτρέπει στα ουδετερόφιλα να αξιοποιήσουν τα οπλοστάσια των εν δυνάμει κυτταροτοξικών

πρωτεϊνών των κοκκίων με ένα στοχευμένο τρόπο, αποτρέποντας μια γενικευμένη βλάβη στον ιστό του ξενιστή στις περισσότερες των περιπτώσεων.(12)

Τα ουδετερόφιλα προκύπτουν κατά τη διαδικασία της μυελικής διαφοροποίησης. Η δημιουργία των ουδετεροφίλων (κοκκιοποίηση) άρχεται από τα πρώιμα προμυελοκύτταρα όπου ανώριμα μεταφορικά κυστίδια εκβάλλουν από το σύμπλεγμα golgi και συντήκονται. Τα προκύπταντα πρώιμα κοκκία χαρακτηρίζονται αρχικά από το υψηλό τους περιεχόμενο σε μυελοπεροξειδάση (MPO) και ως εκ τούτου ονομάστηκαν κοκκία θετικά για την μυελοϋπεροξειδάση αλλά αναφέρονται επίσης και ως αζουροφιλικά κοκκία εξαιτίας της συγγένειας που εμφανίζουν με τη βασική χρωστική Azur A, ή αλλιώς ονομάζονται και πρωτογενή κοκκία.(13)

Η παραγωγή της MPO σταματά κατά τη μετάβαση από το στάδιο του προμυελοκυττάρου στο μυελοκύτταρο. Συνεπώς τα κοκκία που σχηματίζονται κατά τα επόμενα στάδια είναι αρνητικά για την μυελοϋπεροξειδάση.

Τα κοκκία τα οποία είναι αρνητικά στην μυελοϋπεροξειδάση μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις κατηγορίες των ειδικών (δευτερογενών) και της ζελατινάσης (τριτογενών) κοκκίων με βάση το χρόνο εμφάνισής τους και το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο.

Τα ειδικά κοκκία σχηματίζονται στα μυελοκύτταρα και στα μεταμυελοκύτταρα, έχουν υψηλό περιεχόμενο σε λακτοφερρίνη και χαμηλό περιεχόμενο σε ζελατινάση.(14)

Τα εκκριτικά κυστίδια είναι κοκκία που υφίστανται εξωκυττάρωση και εμφανίζονται στα ώριμα ουδετερόφιλα. Το γεγονός ότι αυτά τα κυστίδια περιέχουν πρωτεΐνες της μεμβράνης υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός τους προκύπτει μέσω ενδοκυττάρωσης.(15)

Όλες οι κατηγορίες των κοκκίων μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά όπως η λιπιδική μεμβρανική διπλοστιβάδα και μια ενδοκυστιδιακή θεμέλια ουσία, η οποία περιέχει πρωτεΐνες οι οποίες προορίζονται για εξωκυττάρωση ή για διάθεση στα φαγοσώματα. Παρόλ'αυτά υφίστανται σημαντικές διαφορές μεταξύ των διάφορων κατηγοριών των κοκκίων με βάση το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι πρωτεΐνες οι οποίες συντίθενται κατά το ίδιο αναπτυξιακό στάδιο των ουδετεροφίλων συνεντοπίζονται στην ίδια κατηγορία κοκκίων. Επιπρόσθετα εάν το βιοσυνθετικό χρονικό παράθυρο μιας πρωτεΐνης τροποποιηθεί πειραματικά από το στάδιο του μυελοκυττάρου σε αυτό του προμυελοκυττάρου, θα εντοπιστεί στα αζουροφιλικά κοκκία. Συνολικά αυτά τα ευρήματα εγείρουν και υποστηρίζουν την υπόθεση στόχευσης με βάση τη χρονικότητα σύμφωνα με την οποία η στόχευση των πρωτεϊνών στους διακριτούς πληθυσμούς των κοκκίων καθορίζεται από το χρόνο

βιοσύνθεσής τους. Η ετερογένεια λοιπόν των αζουροφιλικών κοκκίων εξηγείται και από την λεπτή ρύθμιση και τον έλεγχο της έκφρασης των μεμονωμένων γονιδίων των πρωτεϊνών που μεσολαβούνται μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι, όπως και οι πρωτεΐνες, είναι παρόντες σε διακριτά στάδια της ωρίμανσης των ουδετεροφίλων. Οι πρωτεΐνες δεν στοχεύονται όλες με την ίδια αποτελεσματικότητα στα κοκκία και ο βαθμός αποτελεσματικότητας για μια δεδομένη πρωτεΐνη μπορεί επιπρόσθετα να εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο σχηματίζεται η πρωτεΐνη.(16)

Η λυσοζύμη είναι κατιονικό αντιμικροβιακό πεπτίδιο μεγέθους 14 kDa. Σε συμφωνία με το βιοσυνθετικό προφίλ η λυσοζύμη είναι παρούσα σε όλους τους υποπληθυσμούς με μέγιστες συγκεντρώσεις στα ειδικά κοκκία. Η λυσοζύμη πρωτεολύει τα πολυμερή πεπτιδογλυκάνης στα βακτηριακά τοιχώματα και ασκεί βακτηριοκτόνο δράση έναντι των μη παθογόνων Gram+ βακτηρίων *Bacillus subtilis*.

Η λυσοζύμη επίσης συνδέεται με το LPS και μειώνει την παραγωγή κυτταροκινών και τη θνησιμότητα που προκαλείται από το LPS σε μοντέλο σηπτικού σοκ σε ποντίκια.(17)

Αζουροφιλικά κοκκία

Τα αζουροφιλικά κοκκία περιέχουν όξινες υδρολάσες και αντιμικροβιακές πρωτεΐνες και για πολλά χρόνια χαρακτηρίζονταν ως πρωτογενή λυσοσώματα. Όπως τα λυσοσώματα έτσι και τα αζουροφιλικά κοκκία περιέχουν γκρανουλοφυσίνη (CD63) στη μεμβράνη τους. Παρόλ' αυτά σε αντίθεση με τα λυσοσώματα δεν περιέχουν τις πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τα λυσοσώματα LAMP1 και LAMP2, ούτε το σύστημα του υποδοχέα της 6 φωσφορικής μανόζης. Γι' αυτό και τα αζουροφιλικά κοκκία χαρακτηρίζονται ως ρυθμιζόμενα εκκριτικά κοκκία και όχι ως λυσοσώματα. Εκτός από το CD63 άλλες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα αζουροφιλικά κοκκία είναι το CD68, πρεσελίνη 1, στοματίνη και μια κυστιδιακού τύπου H⁺ -ATPάση. Τα αζουροφιλικά κοκκία επιδεικνύουν μεγάλη ετερογένεια στο μέγεθος και στο σχήμα και έχουν δειχθεί διαφορετικοί υποπληθυσμοί με διακριτά φυσικά, κυτταροχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Με βάση το χρόνο εμφάνισής τους κατά τη μυελοποίηση τα αζουροφιλικά κοκκία μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες: τα πρώιμα, τα φτωχά σε ντεφενσίνη αζουροφιλικά κοκκία τα οποία σχηματίζονται από την αρχή του

προμυελοκυτταρικού σταδίου και τα όψιμα, πλούσια σε ντεφενσίνη αζουροφιλικά κοκκία, τα οποία σχηματίζονται κατά τη μετάβαση από το στάδιο του προμυελοκυττάρου στο μυελοκύτταρο.(15)

Τα αζουροφιλικά κοκκία υφίστανται περιορισμένη εξωκυττάρωση ως απόκριση στη διέγερση και θεωρούνται ότι συνεισφέρουν πρωτογενώς στην εξόντωση και αποικοδόμηση των μικροοργανισμών η οποία λαμβάνει χώρα στο λυσόσωμα.(18)

Πολλές από τις πρωτεΐνες των αζουροφιλικών κοκκίων συντίθενται ως πρόδρομες μορφές, οι οποίες υφίστανται πρωτεολυτική πέψη με την άφιξή τους στο διαμέρισμα των κοκκίων. Μετά την απομάκρυνση των αμινοτελικών προπεπτιδίων, οι πρωτεΐνες αποθηκεύονται στην ενεργό στεροδιαμόρφωσή τους. Τα προπεπτίδια αποτρέπουν την λανθασμένη αναδίπλωση, την αυτοτοξικότητα ή την διατήρηση ώριμων πρωτεϊνών κατά τη διέλευσή τους από τη βιοσυνθετική μηχανή του κυττάρου.(14)

Η καθοριστική πρωτεΐνη των θετικών στην περοξειδάση κοκκίων, η μυελοπεροξειδάση είναι μια μικροβιοκτόνος αιμοπρωτεΐνη 150 kDa η οποία απελευθερώνεται στο φαγόσωμα ή στον εξωκυττάριο χώρο μετά από ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων.

Η ΜΡΟ αλληλεπιδρά με το H₂O₂ που σχηματίζεται από την οξειδάση του NADPH και αυξάνει το τοξικό δυναμικό αυτού του οξειδωτικού. Μέσω της οξείδωσης του χλωρίου της τυροσίνης και του νιτρικού, το σύστημα H₂O₂-MPO επάγει το σχηματισμό του υποχλωρικού οξέως (HOCl), άλλων προϊόντων χλωρίου, δραστικών ριζών τυροσίνης και ενδιάμεσων δραστικού αζώτου, όπου όλα μπορούν να πλήξουν τις μεμβράνες των μικροοργανισμών.(19)

Οι άλφα-ντεφενσίνες αποτελούν κύρια συστατικά των αζουροφιλικών κοκκίων οι οποίες εκτιμάται ότι αποτελούν τουλάχιστον το 5% του περιεχομένου των ουδετεροφίλων. Οι ντεφενσίνες είναι μικρά (3,5 kDa) κατιονικά, αντιμικροβιακά, κυτταροτοξικά πεπτίδια. Τα ουδετερόφιλα περιέχουν 4 στενά σχετιζόμενες α-ντεφενσίνες 29-30 αα (ανθρώπινο ουδετεροφιλικό πεπτίδιο-Human Neutrophil peptide (HNP)1-4), οι οποίες αποθηκεύονται στα αζουροφιλικά κοκκία πλούσια σε ντεφενσίνες. Το γεγονός ότι αυτά τα κοκκία εμφανίζονται αργότερα κατά τη διαδικασία της μυελοποίησης απ'ό,τι άλλα αζουροφιλικά κοκκία, εξηγείται από το βιοσυνθετικό παράθυρο των α-ντεφενσινών. Ενώ πρωτεΐνες των αζουροφιλικών κοκκίων όπως η ΜΡΟ, η ανθρώπινη λευκοκυτταρική ελαστάση και η πρωτεΐνάση-3 συντίθενται καθ' όλη τη διάρκεια της προμυελοκυτταρικής φάσης, η παραγωγή των α-ντεφενσινών άρχεται στο στάδιο των ώριμων προμυελοκυττάρων και συνεχίζεται στα

μυελοκύτταρα. Οι ντεφενσίνες διέρχονται μέσω της βιοσυνθετικής μηχανής ως προμορφές της τάξεως των 75 α.α.

Στα προμυεολκύτταρα οι προντεφενσίνες υφίστανται κατάλυση και ωριμάζουν στις ντεφενσίνες οι οποίες στη συνέχεια κατανέμονται στα αζουροφιλικά κοκκία.

Αντίθετα οι ντεφενσίνες οι οποίες συντίθενται στα μυελοκύτταρα δεν διατηρούνται στα ειδικά κοκκία αλλά εκκρίνονται συνεχώς στη δομή των προδομών των 75 α.α. Αυτό υποδεικνύει ότι η επεξεργασία και η διατήρησή τους στον ενδοκυττάριο χώρο εξαρτάται από τις πρωτεάσες των κοκκίων.

Οι α-ντεφενσίνες των ανθρώπινων ουδετεροφίλων χαρακτηρίζονται από αντιμικροβιακή δράση έναντι μιας ευρείας γκάμας βακτηρίων, μυκήτων και πρωτοζώων. Επιτελούν τη δράση τους μέσω του σχηματισμού πολυμερών διαμεμβρανικών πόρων. Επιπρόσθετα οι ντεφενσίνες των ουδετεροφίλων επάγουν τη χημειοταξία των μονοκυττάρων, CD4 και CD8 κυττάρων μετά την εξωκυττάρωση.(20)

Ένα άλλο ισχυρό αντιμικροβιακό πεπτίδιο των αζουροφιλικών κοκκίων είναι η πρωτεΐνη αύξησης της μεμβρανικής διαπερατότητας (BPI), μια υψηλά κατιονική, 50 kDa πρωτεΐνη η οποία σκοτώνει τα Gram- βακτήρια σε nanomolar συγκεντρώσεις. Η BPI συνδέεται σε αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα του λιποπολισακχαρίτη στην εξωτερική μεμβράνη των Gram(-) βακτηρίων μέσω της αντιβακτηριακής N-τελικής περιοχής. Αυτή η σύνδεση επάγει αναδιατάξεις των λιπιδίων της εξωτερικής μεμβράνης καθώς επίσης και αναστολή της αύξησης που ακολουθείται από βακτηριακή βλάβη στην εσωτερική μεμβράνη. Η καρβοξυτελική περιοχή του BPI ευνοεί τη σύνδεση των βακτηρίων στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα ευνοώντας κατ'αυτόν τον τρόπο την φαγοκυττάρωση.(21)

Τα αζουροφιλικά κοκκία περιέχουν δομικά σχετιζόμενες σερπροσιδίνες (πρωτεάσες σερίνης με μικροβιοκτόνο δράση): την πρωτεΐνωση-3, την καθεψίνη-G και την ελαστάση. Οι σερπροσιδίνες είναι κατιονικά πολυπεπίδια 25-29 kDa, οι οποίες επιδεικνύουν πρωτεολυτική δραστηριότητα έναντι μιας ποικιλίας συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως η ελαστίνη, η φμπρονεκτίνη, η λαμινίνη, το κολλαγόνο τύπου IV κ.α. Επιπρόσθετα επάγουν την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών, των επιθηλιακών κυττάρων, των μακροφάγων, των λεμφοκυττάρων και των αιμοπεταλίων και έχουν αντιμικροβιακές ικανότητες.

Η πρωτεΐνωση δείχθηκε πρόσφατα ότι είναι υπεύθυνη για την εξωκυττάρια πρωτεολυτική διάσπαση και ενεργοποίηση του ειδικού ανθρώπινου κοκκιοκυτταρικού πεπτιδίου της καθελιδίνης πρωτεΐνης-18 (hCAP-18). Διάφοροι αναστολείς των

ανθρώπινων ουδετεροφιλικών πρωτεασών σερίνης εντοπίζονται στο πλάσμα, συμπεριλαμβανομένης της α1-αντιθρυψίνης, α2-μακροσφαιρίνης, α1-αντιχυμοθρυψίνης και του αναστολέα της εκκρινόμενης λευκοπρωτεΐνάσης (SLPI). Η απρόσκοπτη ενεργότητα της ελαστάσης θεωρείται ότι διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση του ανθρώπινου εμφυσίματος ειδικά στους ασθενείς με υποκείμενη ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης. Η αζουροσιδίνη αποτελεί ένα ομόλογο αντιμικροβιακής πρωτεάσης σερίνης μεγέθους 29 kDa και εντοπίζεται στα αζουροφιλικά κοκκία. Η αζουροσιδίνη δρα χημειοτακτικά για τα μονοκύτταρα, τους ινοβλάστες και τα T-λεμφοκύτταρα, αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα κατά την εξαγγείωση των ουδετεροφίλων. Σε αντίθεση με την ελαστάση, την πρωτεΐνάση-3 και την καθεψίνη G, η αζουροσιδίνη είναι πρωτεολυτικά ανενεργή εξαιτίας αμινοξικών υποκαταστάσεων εντός της καταλυτικής τριάδας των πρωτεασών σερίνης.(22)

Τα κοκκία αρνητικά μυελοϋπεροξειδάσης

Τα αρνητικά μυελοϋπεροξειδάσης κοκκία μπορούν να διακριθούν στα ειδικά (δευτερογενή) κοκκία και τα κοκκία ζελατινάσης (τριτογενή).(23)

Αυτή η διάκριση είναι αφηρημένη καθώς τα κοκκία αρνητικά περοξειδάσης σχηματίζονται σε ένα συνεχές στα μυελοκύτταρα, μεταμυελοκύτταρα, στα ραβδοπύρρηνα και στα ώριμα ουδετερόφιλα. Παρόλ'αυτά εννοιολογικός διαχωρισμός των αρνητικά σε περοξειδάση κοκκίων στις 2 κατηγορίες, είναι σημαντικός, καθώς τα εξειδικευμένα κοκκία και τα κοκκία ζελατινάσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους αναφορικά με το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο και τις εκκριτικές τους ιδιότητες. Ως εκ τούτου τα μεγαλύτερα ειδικά κοκκία είναι πλούσια σε αντιβιοτικά συστατικά, ενώ τα μικρότερα κοκκία ζελατινάσης δεν είναι. Από την άλλη, τα κοκκία ζελατινάσης εξωκυτταρώνονται πιο εύκολα από τα εξειδικευμένα κοκκία. Αυτά τα χαρακτηριστικά υποδεικνύουν το γεγονός ότι τα κοκκία ζελατινάσης είναι σημαντικά πρωταρχικά ως αποθήκες ενζύμων διάσπασης της θεμέλιας ουσίας και μεμβρανικών υποδοχέων, οι οποίοι είναι απαραίτητοι κατά τη διάρκεια της εξαγγείωσης των ουδετεροφίλων και της διαπίδησης, ενώ τα ειδικά κοκκία συμμετέχουν κυρίως στις αντιμικροβιακές λειτουργίες της κινητοποίησης των αντιμικροβιακών συστατικών είτε στο φαγόσωμα, είτε στο εξωκυττάριο περιβάλλον του κυττάρου. Στις πρωτεΐνες περιλαμβάνονται ορισμένα ισχυρά αντιμικροβιακά πεπτίδια συμπεριλαμβανομένων της λακτοφερίνης,

της hCAP-18, NGAL, λυσοζύμης και Nramp-1. Τα κοκκία αρνητικά περοξειδάσης περιέχουν επίσης τρεις μεταλλοπρωτεάσες με μεγάλη φυσιολογικά και παθοφυσιολογική σημασία, όπως η κολλαγενάση (μεταλλοπρωτεϊνάση-8 της θεμέλιας ουσίας (MMP-8)), η ζελατινάση (MMP-9) και η πρόσφατα ανακαλυφθείσα λευκολυσίνη (MMP-25). Το κυτόχρωμα p22/gr91phox (κυτόχρωμα b588) συνιστά μεμβρανικό συστατικό και των δύο πληθυσμών αρνητικών περοξειδάσης κοκκίων το οποίο μεταφέρεται στην επιφάνεια της μεμβράνης του φαγοσώματος μετά από ενεργοποίηση του ουδετερόφιλου. (24)

Μετά τη μετατόπιση, το κυτόχρωμα b558 λειτουργεί ως τελικός ηλεκτρονιακός μεταφορέας της συγκεκριμένης οξειδάσης της αναπνευστικής έκρηξης.

Η λακτοφερρίνη συνιστά μια γλυκοπρωτεΐνη 78 kDa η οποία αποθηκεύεται κυρίως στα ειδικά κοκκία. Επιτελεί αντιμικροβιακή δράση έναντι ενός ευρέως φάσματος Gram- και Gram+ βακτηρίων. Η πρωτεΐνη αποτελεί μέλος της οικογένειας των τρανσφερινών πρωτεϊνών συνδεδεμένων με σίδηρο, όπου αναχαιτεί τη μικροβιακή αύξηση μέσω συσσώρευσης σιδήρου. Επιπρόσθετα της ικανότητας σύνδεσης με σίδηρο, η λακτοφερρίνη συνδέεται με τις βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες μέσω μιας N-τελικής αμφιπαθητικής α-έλικας περιοχής, προκαλώντας μη-αντιστρεπτή μεμβρανική βλάβη και κυτταρική λύση. Η δομή με αντιβακτηριακή δράση της λακτοφερρίνης η οποία ονομάζεται λακτοφερρίσίνη, απελευθερώνεται μετά από καταλυτική πέψη από τα γαστρική πεψίνη. Η λακτοφερρίνη είναι παρούσα σε διάφορα βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του βρεφικού γάλακτος.(25)

Η hCAP-18 είναι συστατικό των ειδικών κοκκίων έχει μέγεθος 19 kDa και ανήκει στην οικογένεια των αντιμικροβιακών πεπτιδίων της καθελιδίνης. Η N-τελική περιοχή μεγέθους 14 kDa παρουσιάζει υψηλή ομολογία με άλλες καθελιδίνες, ενώ το C-τελικό άκρο το οποίο ονομάζεται LL-37 σχηματίζει μια αμφιπαθητική α-έλικα και παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram+ και Gram- βακτηρίων ενώ επάγει χημειοταξία των ουδετεροφίλων, T-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, όταν διαχωρίζεται από την προδομή της καθελίνης.(21) Η καρβοξυτελική περιοχή απελευθερώνεται μέσω της πρωτεϊνάσης-3 μετά από εξωκυττάρωση. Η HCAP-18 παράγεται από κερατινοκύτταρα σε καταστάσεις δερματικής φλεγμονής όπως στον ΣΕΛ ή στην ατοπική δερματίτιδα αλλά όχι από τα επιδερμικά κύτταρα του μη-φλεγμαινόντος δέρματος. Κατά την επούλωση, ο παράγοντας IGF-1 (insulin like growth factor-1) επάγει την έκκριση της HCAP-18 από τα κερατινοκύτταρα. (11,21)

Εκκριτικά κυστίδια

Τα ενδοκυτταρικά κυστίδια συνιστούν μια παρακαταθήκη μεμβρανικών υποδοχέων που είναι απαραίτητοι στις πρωιμότερες φάσεις της φλεγμονώδους απόκρισης των ουδετεροφίλων.

Τα εκκριτικά κυστίδια κινητοποιούνται ως απόκριση σε μια μεγάλη ποικιλία φλεγμονωδών ερεθισμάτων. Οι μεμβράνες των εκκριτικών κυστιδίων είναι πλούσιες στη β2-ιντεγκρίνης CD11b/CD18 (Mac-1, CR3), στον υποδοχέα συμπληρώματος CR1, υποδοχείς για τα φορμυλοπεπτίδια fMLP, στον υποδοχέα LPS/CD14, στον CD16 FcγRIII και στην μεταλλοπρωτεάση λευκοσύνη, όπου όλα ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη μετά την αποκοκκίωση. Η κινητοποίηση των εκκριτικών κυστιδίων συνοδεύεται από πτώση της έκφρασης του CD62L από την επιφάνεια των ουδετεροφίλων. Οι συνδυασμένες επιφανειακές αλλαγές που επάγονται από την ενσωμάτωση των εκκριτικών κυστιδίων επιτρέπουν στο ουδετερόφιλο να εγκαταστήσει ισχυρή επαφή με το ενεργοποιημένο αγγειακό ενδοθήλιο *in vivo*.(11,23)

I.1.β. Μηχανισμοί αποκοκκίωσης

Τα κινητοποιούντα ενδοκυττάρια διαμερίσματα των ουδετεροφίλων διαφέρουν στην διαθεσιμότητά τους για αποκοκκίωση. Τα εκκριτικά κυστίδια χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη τάση για αποκοκκίωση, ακολουθούν τα κοκκία ζελατινάσης, τα ειδικά κοκκία και τα αζουροφιλικά κοκκία. Ως εκ τούτου η *in vitro* διέγερση με νανομοριακές συγκεντρώσεις μεσολαβητών φλεγμονής όπως το fMLP οδηγεί σε ταχεία και ολοκληρωτική απελευθέρωση εκκριτικών κυστιδίων χωρίς αξιοσημείωτη απελευθέρωση κοκκίων.

Διέγερση με πιο ισχυρούς αγωνιστές όπως το PMA επάγει την πλήρη απελευθέρωση των κοκκίων ζελατινάσης, τη μέτρια απελευθέρωση των ειδικών κοκκίων και χαμηλού βαθμού αποκοκκίωση των αζουροφιλικών κοκκίων. (17)

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία συνδέουν τη σύνδεση των επιφανειακών υποδοχέων με την αποκοκκίωση είναι πολύπλοκα και μόνο μερικώς χαρακτηρισμένα. Η ιεραρχική κινητοποίηση των ουδετεροφιλικών κοκκίων και των εκκριτικών κυστιδίων που περιγράφεται παραπάνω μπορεί να αναπαραχθεί *in vitro* με σταδιακή αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του ασβεστίου. Διάφοροι διεγέρτες έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν αύξηση στο κυτοσολικό ασβέστιο συμπεριλαμβανομένης της σύνδεσης στις L-selectin του CD11b/CD18 και του υποδοχέα του fMLP. Η

σύνδεση των $\beta 2$ -ιντεγκρινών επάγει την ενεργοποίηση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης, οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν ένα εύρος πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων της φωσφολιπάσης $C\gamma 2$ και της φωσφολιπάσης D. Οι ενεργοποιημένες φωσφολιπάσες καταλύουν τη διάσπαση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και της φωσφατιδυλοχολίνης οδηγώντας στην παραγωγή (1,4,5)P₃, της DAG και του φωσφατιδικού οξέος PA. Με τη σειρά τους αυτοί οι μεταβολίτες ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση C και επάγουν την απελευθέρωση του Ca^{2+} διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. Ανάλογα η διέγερση διαμέσου του GPCR υποδοχέα του fMLP αυξάνει τη συγκέντρωση της (1,4,5)P₃ επαρκώς ώστε να κινητοποιήσει το Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρια δεξαμενές. Οι μηχανισμοί που συνδέουν τις λιπιδιακές αλλαγές και τις διαβαθμίσεις του Ca^{2+} με την αποκοκκίωση δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Οι ανεξίνες είναι πρωτεΐνες συνδεδεμένες με φωσφολιπίδια οι οποίες μεσολαβούν τη συσσώρευση κυστιδίων και τη σύντηξή τους με τη μεμβράνη όταν εκτεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου. (14)

I.1.γ. Μηχανισμοί προσκόλλησης και ενδοθηλιακής μετανάστευσης

Η στρατολόγηση των ουδετεροφίλων λαμβάνει χώρα εντός λεπτών/ωρών και συνιστά ένα γεγονός σημασίας στην οξεία απόκριση του ξενιστή έναντι των εισβαλλόντων μικροοργανισμών. Αυτή η στρατολόγηση περιλαμβάνει μια σειρά ρυθμισμένων εξωκυττωτικών γεγονότων τα οποία σταδιακά αλλάζουν την λειτουργική κατάσταση των ουδετεροφίλων. Μετά από διέγερση με μεσολαβητές φλεγμονής τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία πρόσκεινται στα σημεία της λοίμωξης μεταφέρουν την P-σελεκτίνη από τα ενδοκυττάρια κοκκία (Weibel-Pallade σωματίδια) στις μεμβράνες στην πλευρά του αυλού. Η P-σελεκτίνη συνδέεται με την ουδετεροφιλική επιφανειακή πρωτεΐνη γλυκοπρωτεϊνικός συνδέτης P-σελεκτίνης (PSGL-1) μέσω μιας αλληλεπίδρασης υψηλής συγγένειας η οποία προωθεί την κύλιση του ουδετερόφιλου κατά μήκος του ενδοθηλίου.(26)

Το αγγειακό ενδοθήλιο το οποίο έχει διεγερθεί από κυτταροκίνες επίσης αυξάνει την έκφραση της E-σελεκτίνης, εκφράζει συνδέτες για την ουδετεροφιλική L-σελεκτίνη και παράγει ουσίες οι οποίες ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα όπως ο PAF και η IL-8. Οι ουδετεροφιλικές ενδοθηλιακές αλληλεπιδράσεις επάγουν την κινητοποίηση των εκκριτικών κυστιδίων από τα ουδετερόφιλα. Όπως αναφέρθηκε αυτή η κινητοποίηση

εμπλουτίζει την επιφάνεια των ουδετεροφίλων με β2-ιντεγκρίνη CD11b/CD18 και συνοδεύεται από πτώση της έκφρασης της CD62L. Επειδή οι διαλυτές ουσίες που περιέχονται στα εκκριτικά κυστίδια έχουν προέλευση από το πλάσμα, η αποκοκκίωση των εκκριτικών κυστιδίων δεν σχετίζεται με συστηματική διαρροή εν δυνάμει τοξικών πρωτεϊνών των κοκκίων. (27)

Οι μετατοπισμένες β2-ιντεγκρίνες δεσμεύουν ενδοθηλιακά μόρια προσκόλλησης της οικογένειας των ICAM.(28) Η εξωκύττωση των κοκκίων της ζελατινάσης απελευθερώνει κολλαγονολυτικές μεταλλοπρωτεάσες οι οποίες διαδραματίζουν πιθανό σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της διάσπασης της αγγειακής μεμβράνης κατά την εξαγγείωση των ουδετεροφίλων. Κατά την επακόλουθη μετανάστευση των ουδετεροφίλων μέσω των διάμεσων ιστών τα ειδικά κοκκία και τα αζουροφιλικά κοκκία υφίστανται μερική αποκοκκίωση. Αυτά τα γεγονότα εξωκύττωσης κινητοποιούν υποδοχείς για συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και απελευθερώνουν επιπρόσθετα ένζυμα διάσπασης της εξωκυττάριας ουσίας συμπεριλαμβανομένων της κολλαγενάσης και των πρωτεασών σερίνης γεγονός που υποβοηθά τη μετανάστευση. Μετά από επαφή τους με τα βακτήρια τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούν τους ποικίλους οξυγονοεξαρτώμενους και οξυγονοανεξάρτητους μηχανισμούς απελευθερώνοντας τα αζουροφιλικά και τα ειδικά κοκκία στο φαγόσωμα ή στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. (29,30)

1.1.δ. Έκφραση υποδοχέων ανοσοσφαιρινών

Τα ουδετερόφιλα εκφράζουν διάφορους υποδοχείς που τους επιτρέπουν να αποκριθούν άμεσα σε ποικίλα φλεγμονώδη ερεθίσματα και σήματα κινδύνου.

Μεταξύ αυτών οι υποδοχείς για τη σταθερή περιοχή των IgG (FcγRs) είναι οι από τους πιο σημαντικούς. Οι άνθρωποι εκφράζουν 6 κλασσικούς FcγRs. FcγRI/CD64, FcγRIIA/CD32A, FcγRIIB/CD32B, FcγRIIC/CD32C, FcγRIIIA/CD16A, and FcγRIIIB/CD16B.(31)

Όλοι αυτοί οι υποδοχείς συνδέονται με τουλάχιστον 2 από τις 4 διαφορετικές υποτάξεις των IgG. Όλοι οι FcγRs εκτός από το FcγRIIB και FcγRIIIB, είναι κλασσικοί υποδοχείς ενεργοποίησης. Τα σήματα ενεργοποίησης μετάγονται από ένα μοτίβο ενεργοποίησης βασισμένο σε τυροσίνες ανοσοϋποδοχέων (ITAM) το οποίο είναι

παρόν στην κυτταροπλασματική επικράτεια του ίδιου του FcR (FcγRIIA/FcγRIIC), ή σχετίζεται με την υπομονάδα σηματοδότησης, συγκεκριμένα την FcRg αλυσίδα.(32)

Όλοι οι FcγRs είναι κλασσικοί υποδοχείς ενεργοποίησης εκτός των FcγRII και FcγRIIB. Τα σήματα ενεργοποίησης μεταγονται μέσω ενός μοτίβου ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) το οποίο βρίσκεται είτε στην κυτταροπλασματική επικράτεια του FcγR (FcγRIIA/FcγRIIC), είτε σε μία σχετιζόμενη υπομονάδα σηματοδότησης, συγκεκριμένα στην αλυσίδα του FcRg. Με την σύζευξη του FcγR από πολυμερείς συνδέτες, κινάσες της Src οικογένειας φωσφορυλιώνουν αυτά τα μοτίβα, επιτρέποντας την ενεργοποίηση του καταρράκτη σηματοδότησης, ο οποίος περιλαμβάνει την SYK (spleen tyrosine kinase) την κινάση 3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K), τη φωσφολιπάση Cγ, Rho και Rac, καταλήγοντας στην κινητοποίηση του ασβεστίου, στην κυτταρική ενεργοποίηση, στην παραγωγή κυτταροκινών/χημειοκινών και στην κυτταρική μετανάστευση. Αντισταθμίζοντας αυτούς τους FcγR υποδοχείς ενεργοποίησης ο ανασταλτικός υποδοχέας FcγRIIB διαθέτει ένα μοτίβο ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) στην κυτταροπλασματική επικράτεια. Μετά από την συν-δέσμευσή του με τον υποδοχέα ενεργοποίησης, το φωσφορυλιωμένο ITIM στρατολογεί την SHIP1 φωσφατάση (inositol polyphosphate-5-phosphatase) η οποία ρυθμίζει αρνητικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία άρχονται από τους υποδοχείς που περιέχουν ITAM μοτίβα.

(33)Επιπρόσθετα, πολλοί FCGR πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο, προσθέτοντας στην πολυπλοκότητα αυτής της οικογένειας υποδοχέων με αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες και συγγένειες για τους συνδέτες τους και συνεργάζονται, ρυθμίζουν και ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την ρύθμιση κυτταρικών αποκρίσεων.(31)

Η έκφραση και ο ρόλος των FcγR στα ουδετερόφιλα κατά την ομοιόσταση

Τα ουδετερόφιλα του αίματος υγιών ατόμων εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό ενός μάλλον άτυπου FcγR του FcγRIIB. Ο FcγRIIB είναι μία GPI-συζευγμένη πρωτεΐνη χωρίς ικανότητα σηματοδότησης από μόνη της. Πρωτοπεριγράφηκε το 1982 μέσω του μονοκλωνικού αντισώματος που είχε αναπτυχθεί τότε (mAb, 3G8) το οποίο αναγνωρίζει επιπρόσθετα και τον FcγRIIA στα μονοκύτταρα και στα NK-λεμφοκύτταρα.(34)

Ο FcγRIIIb συνιστά μία από τις πιο πολυπληθείς πρωτεΐνες στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων όπου κάθε κύτταρο εκφράζει 100.000-200.000 αντίγραφα. Στα ήρεμα ουδετερόφιλα, ο υποδοχέας χαρακτηρίζεται από ίση κατανομή στην πλασματική μεμβράνη. Επιπρόσθετα, τα διαμερίσματα της ενδοκυττάριας αποθήκευσης έχουν περιγραφεί ότι επιτρέπουν την ταχεία κινητοποίηση του FcγRIIIb στην κυτταρική μεμβράνη μετά από δέσμευση του υποδοχέα. Ενώ θεωρούνταν ότι δεν διαθέτουν κάποια λειτουργία σηματοδότησης, τώρα είναι εν γένει αποδεκτό ότι ο FcγRIIIb μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, και συγκεκριμένα να επάγει καταρροϊκά σήματα, οδηγώντας στην κινητοποίηση των ιόντων Ca^{2+} , την κυτταρική προσκόλληση και αποκοκκίωση αλλά όχι στην οξειδωτική έκρηξη. Το ακριβές ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα πλήρως αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της Src κινάσης Hck, MAPK κινάσες, ERK κινάσες, p38 και την κινάση τυροσίνης Pyk2.(32)

Οι κύριες λειτουργίες των FcγRIIIb κατά την ομοιόσταση είναι η απομάκρυνση των αυθόρμητα σχηματισμένων ανοσοσυμπλεγμάτων από την αγγειακή κυκλοφορία και η διατήρηση της δεξαμενής του διαλυτού FcγRIIIb. Τα ανοσοσυμπλέγματα τα οποία συνδέονται με τους FcγRIIIb εσωτερικοποιούνται μέσω ενός μηχανισμού των GPI-συζευγμένων υποδοχέων και της ενδοκύττωσης υγρής φάσης και ως εκ τούτου η απομάκρυνση των ανοσοσυμπλεγμάτων χωρίς την επαγωγή της κυτταρικής ενεργοποίησης θα μπορούσε να είναι δηλητηριώδης για τον ξενιστή.(35) Ο διαλυτός υποδοχέας FcγRIIIb είναι παρών στον ορό των υγιών ατόμων σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 5 nM. Προκύπτει από την πρωτεολυτική διάσπαση του επιφανειακού FcγRIIIb στα ενεργοποιημένα και αποπτωτικά ουδετερόφιλα. Παρά τη σχετική αφθονία του η λειτουργία του διαλυτού sFcγRIIIb παραμένει αδιευκρίνιστη. Ο sFcγRIIIb διατηρεί την ικανότητα σύνδεσης με Fc και ως εκ τούτου ανταγωνίζεται με τους μεμβρανικούς χαμηλής συγγένειας υποδοχείς για να καταστείλει τις Fc-εξαρτώμενες ανοσολογικές αντιδράσεις. Εξαιτίας του γεγονότος ότι ο FcγRIIIb προσδένεται με πολυδύναμες IgG1 και IgG3, αλλά όχι με IgG2 ή IgG4, η βιολογική ενεργότητα των τελευταίων δεν επηρεάζεται από την παρουσία του διαλυτού υποδοχέα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι IgG2 και οι IgG4 προσδένονται λιγότερο ισχυρά σε άλλους υποδοχείς χαμηλής συγγένειας εξαιρουμένου του FcγRIIA-H131). Επιπρόσθετα αυτής της πιθανής ανοσορρυθμιστικής λειτουργίας έχει επίσης αναφερθεί ότι ο διαλυτός sFcγRIIIb μπορεί να συνδεθεί με υποδοχείς συμπληρώματος CD11b/CD18 ή CR3/Mac-1 και CD11c/CD18 ή CR4 μέσω αλληλεπιδράσεων

υδατανθράκων/λεκτινών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να καταλήγουν στην παραγωγή κυτταροκινών από ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα ή μπορεί να αναστέλλουν την εξαρτώμενη από τις β2-ιντεγκρίνες προσκόλληση και την επακόλουθη διαενδοθηλιακή μετανάστευση.(31)

Τα ουδετερόφιλα εκφράζουν ιδιοσυστατικά έναν δεύτερο υποδοχέα χαμηλής συγγένειας IgG τον FcγRIIA. Επιδεικνύει χαμηλότερη συγγένεια στα ουδετερόφιλα ήρεμης φάσης συγκριτικά με τα διεγερμένα, ένα χαρακτηριστικό που έχει αποδοθεί στην αλληλεπίδραση του με τις ιντεγκρίνες.(36)

Σε αντίθεση με τους άλλους υποδοχείς τα ουδετερόφιλα εκφράζουν λιγότερο από 2000 αντίγραφα του υποδοχέα υψηλής συγγένειας FcγRI, ενώ παρουσιάζουν χαμηλή ικανότητα πρόσδεσης σε μονομερή IgG1 καθώς και χαμηλή ικανότητα φαγοκύτωσης IgG-οψωνιοποιημένων σωματιδίων.(37)

Οι FcγR υποδοχείς των ουδετεροφίλων κατά τη φλεγμονή

Η έκφραση των FcγR των ουδετεροφίλων μπορεί να αλλάξει δραματικά κατά τη φλεγμονή και τη λοίμωξη. Αξιοσημείωτη, είναι η μεγάλη αύξηση της έκφρασης του FcγRI παρουσίας κυτταροκινών φλεγμονής όπως η IFN-γ ή ο G-CSF. Αυτό δίνει τη δυνατότητα στα ουδετερόφιλα να προσδέουν επαρκώς μονομερή IgG να φαγοκυτταρώνουν IgG-οψωνιοποιημένα βακτήρια να επιτελούν αντιμυκητιασικές λειτουργίες και να επάγουν την παραγωγή ROS ως απόκριση στην δέσμευση του FCγRI. Η αύξηση της έκφρασης του FcγRI καθιστά τα ουδετερόφιλα ικανότερα στην επαγωγή της κυτταροτοξικότητας που μεσολαβείται από τα αντισώματα (ADCC). Ως εκ τούτου, η έκφραση του FcγRI έχειδειχθεί ότι αντανάκλα κατάσταση λοίμωξης και ενεργότητα νόσου σε πολυάριθμες φλεγμονώδεις καταστάσεις, ενώ η χαμηλή έκφραση CD64 συνιστά δείκτη για διατήρηση της ύφεσης της νόσου Crohn σε ασθενείς που λαμβάνουν infliximab. Έτσι το CD64 συζητάται ως ένας ενδιαφέρον βιοδείκτης, ιδιαίτερα στην περίπτωση της σήψης.(37,38)

Παρόλ' αυτά ορισμένες μελέτες δεν συμφωνούν ότι το CD64 συνιστά έναν αξιόπιστο δείκτη για την ανίχνευση της σήψης και διαφορετικές μελέτες αναφέρουν αποκλίνουσα ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση της σήψης με βάση την έκφραση του CD64. Δύο μετα-αναλύσεις αναφέρουν μεγάλη ετερογένεια στο σχεδιασμό των

μελετών και στα αποτελέσματα, γεγονός που οφείλεται στα διαφορετικά πρωτόκολλα επεξεργασίας και ανάλυσης των αποτελεσμάτων από διαφορετικά εργαστήρια.(39,40) Η IFN- γ έχει μικρή επίδραση στην έκφραση του Fc γ RIIA αλλά μπορεί να επάγει τη έκφραση του Fc γ RIIIB αν και σε χαμηλά επίπεδα, ενώ ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες μπορεί να επάγει την πτώση των επιπέδων του Fc γ RIIIIB. Η έκφραση του Fc γ RIIA στα ουδετερόφιλα μπορεί να επαχθεί από τον TNF- α . Ως εκ τούτου, διεγερμένα ουδετερόφιλα και ουδετερόφιλα με άτομα που πάσχουν από φλεγμονώδεις καταστάσεις επιδεικνύουν αυξημένες αποκρίσεις εξαρτώμενες από τους Fc γ R υποδοχείς.(31)

Τέλος, τα ανοσοσυμπλέγματα των IgG μπορούν να αποτελέσουν την έναρξη της φλεγμονής, αλλεργικών αντιδράσεων και αυτοανοσίας. Αυτό συμβαίνει κυρίως όταν τα ποσά των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων αυξάνονται ξαφνικά και υπερβαίνουν την ικανότητα του οργανισμού να τα απομακρύνει, όταν διαμορφώνουν μη διαλυτά συμπλέγματα τα οποία καθιζάνουν στα κύτταρα του ενδοθηλίου, ή όταν αυτοαντισώματα προσδένονται σε μεγάλες επιφάνειες οψωνίζοντας δομές οι οποίες είναι ανθεκτικές στη φαγοκύτωση.(41)

I.2. Λειτουργική/φαινοτυπική ετερογένεια

Τα ουδετερόφιλα έχουν πολλαπλούς ρόλους. Τουλάχιστον ένα μέρος της δεξαμενής αυτών είναι υπεύθυνο για την άμυνα του ξενιστή έναντι των εισβαλλόντων μικροοργανισμών και απαραίτητο για μια επιτυχή ανοσιακή απόκριση.

Τα ουδετερόφιλα προσεγγίζονται συνήθως ως ένας ομοιογενής πληθυσμός κυττάρων με σύντομο χρόνο ζωής, τα οποία εμπλέκονται κυρίως στους μηχανισμούς άμυνας έναντι των εισβαλλόντων μικροοργανισμών. Τα κύτταρα διαθέτουν ένα μεγάλο οπλοστάσιο μηχανισμών που βοηθούν στην τέλεση των λειτουργιών τους που κυμαίνονται από την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου από τη μεμβρανοσυνδεδεμένη οξειδάση του NADPH, μέχρι τις κυτταροτοξικές πρωτεΐνες και τα πεπτίδια που εδράζονται στα διάφορα κοκκία του κυτταροπλάσματος, όπως περιγράφηκαν αναλυτικά παραπάνω.(42) Πρόσφατα η αντίληψη ότι αποτελούν έναν ομοιογενή πληθυσμό έχει διαψευστεί και έχουν περιγραφεί διάφοροι φαινότυποι που επιδεικνύουν εξειδικευμένες δράσεις όπως η εμπλοκή στην επούλωση των ιστών, στην

θανάτωση καρκινικών κυττάρων και σε ανοσορυθμιστικές διαδικασίες. Δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτά τα κύτταρα προέρχονται από διαφορετικές οδούς διαφοροποίησης προερχόμενα από τον μυελό των οστών ή κατά πόσον «εκπαιδεύονται» στην περιοχή των ιστών, μεταβάλλοντας τον φαινότυπό τους. Η λειτουργική ετερογένεια σε έναν ανοσοφαινοτυπικά ομοιογενή πληθυσμό, αποτελεί παράγοντα που προσθέτει στην πολυπλοκότητα των φαινοτύπων των ουδετεροφίλων. (20)

1.2.α. Φαινότυπος: Κατάσταση ενεργοποίησης

Τα ουδετερόφιλα αποκρίνονται ταχέως στα σήματα φλεγμονής που προέρχονται από περιοχές λοίμωξης ή ιστικής βλάβης έξω από την αιματική κυκλοφορία. Εκφράζουν διάφορους υποδοχείς μέσω των οποίων μπορούν να ανιχνεύουν τους διαλυτούς μεσολαβητές της φλεγμονής, οι οποίοι κυμαίνονται από βιοδραστικά λιπίδια μέχρι κυτταροκίνες. Ο πρώτος μηχανισμός που ενεργοποιείται από την αλληλεπίδραση με αυτούς τους μεσολαβητές είναι η πρωταρχική ενεργοποίηση (priming), διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα μεταβαίνουν σε μία κατάσταση «προ-ενεργοποίησης». (43) Αυτή η πρωταρχική απόκριση είναι καίρια για την ικανότητα των κυττάρων να αλληλεπιδρούν με τα αγγειακά τοιχώματα και να μεταναστεύουν μέσω του ενδοθηλίου. Η μετανάστευση μεσολαβείται από την αύξηση της επιφανειακής έκφρασης μορίων προσκόλλησης και την λειτουργική ενεργοποίηση των υποδοχέων ιντεγκρίνης, οι οποίοι σε ήρεμη κατάσταση βρίσκονται σε αδρανή διαμόρφωση. Μετά την εξαγγείωση τα κύτταρα θα μεταναστεύσουν κατά μήκος μίας βαθμίδωσης χημειοτακτικών σημάτων και κατ'αυτόν τον τρόπο προσανατολίζονται στην περιοχή της λοίμωξης και/ή της ιστικής βλάβης. (44) Εκεί τα κύτταρα αναλαμβάνουν την εξόντωση των λοιμογόνων παραγόντων και την εκκαθάριση του κατεστραμμένου ιστού. Η πρωταρχική ενεργοποίηση είναι σημαντική καθώς οι μηχανισμοί εξόντωσης ενισχύονται σε μεγάλο βαθμό από μεσολαβητές φλεγμονής. Για παράδειγμα η πρωταρχική ενεργοποίησή τους ενισχύει την παραγωγή ROS, την αποκοκκίωση και την χημειοταξία σε απόκριση σε άλλα διεγερτικά ερεθίσματα. (43)

Τα ουδετερόφιλα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και εκφράζουν μια πληθώρα υποδοχέων υπεύθυνων για τη μετάδοση αυτών των σημάτων από το εξωκυττάριο περιβάλλον στο ενδοκυττάριο μέσο. Τα κύτταρα μπορούν να ενσωματώσουν όλα αυτά τα σήματα σε μία αλλαγή της κατάστασης ενεργοποίησης η

οποία κυμαίνεται από την πρωταρχική μέχρι την πλήρη ενεργοποίηση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός φάσματος υποτύπων ουδετεροφίλων.(43)

Η διέγερση και ενεργοποίηση των κυττάρων ορίζονται ως διαφορετικές καταστάσεις κυττάρων που ανήκουν στον ίδιο φαινότυπο. Αυτές οι διεργασίες δεν σχετίζονται τυπικά με τη διαδικασία της ενεργοποίησης ενώ λαμβάνουν χώρα σχετικά γρήγορα.

Φαινότυπος ορίζεται ως το ουδετερόφιλο που έχει κερδίσει ή απωλέσει μία συγκεκριμένη λειτουργία που δεν χαρακτηρίζει τους άλλους κυτταρικούς φαινοτύπους.

Οι διακριτοί αυτοί φαινότυποι πιθανόν προκύπτουν από διαφορές στη διαφοροποίηση των ουδετεροφίλων στο μυελό των οστών ή στους ιστούς. Αυτή η διαδικασία είναι σχετικά αργή. (45)

Προφανώς είναι δύσκολο να διακρίνουμε μεταξύ διαφοροποίησης και ενεργοποίησης, καθώς το διαμέρισμα των ουδετεροφίλων είναι υψηλά δυναμικό με κίνηση μεταξύ του μυελού, της κυκλοφορίας και των ιστών.(8)

1.2.β. Φαινότυπος: Κυτταρική γήρανση/ανοσογήρανση

Πολλές μελέτες σχετίζουν την ηλικία των ουδετεροφίλων με συγκεκριμένους δείκτες και λειτουργίες. Κύριο χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ηλικίας τους είναι η κατάτμηση του πυρήνα τους. Σε καταστάσεις φλεγμονής, ραβδοπύρνα απελευθερώνονται στην περιφέρεια προκαλώντας αυτό που ονομάζουμε αριστερή στροφή. (46)

Παρόλ'αυτά τα ουδετερόφιλα με υπερκατατμημένο πυρήνα που απελευθερώνονται στην περιφέρεια κατά την οξεία φλεγμονή, δεν είναι πιο γηρασμένα συγκριτικά με αυτά με τη φυσιολογική πυρηνική μορφολογία. Η προέλευση αυτών είναι ακόμα άγνωστη, αλλά δεν φαίνεται να σχετίζεται με κατάσταση ενεργοποίησης, καθώς το πρωτέωμα φαίνεται να διαφέρει ενώ αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτη πτώση της μεταφραστικής δραστηριότητας. Ανεπάρκεια B12, σχετίζεται επίσης με το φαινότυπο αυτό, αν και παραμένει άγνωστο το αν ανήκουν στον ίδιο φαινότυπο με αυτά που εντοπίζονται κατά την οξεία φλεγμονή. (4)

Εκτός από την πυρηνική μορφολογία, πολλοί επιφανειακοί δείκτες σχετίζονται με την κυτταρική ηλικία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση CD10, η οποία εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα ραβδοπύρνα. Αυτοί οι δείκτες,

όπως το CD15, CD11b, CD10, επάγονται σε φυσιολογικά ώριμα κύτταρα μετά από σύντομη διέγερση. (47)

Τα ουδετερόφιλα πεθαίνουν μέσω απόπτωσης στους ιστούς και απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται εφφεροκύτωση.(48)

I.2.γ. Φαινότυπος: «Αριστερή στροφή»

Μετά την ωρίμανση, τα ουδετερόφιλα διατηρούνται στον μυελό των οστών μέσω της έκφρασης του υποδοχέα CXCR4(συνδέτης CXCL12) ενώ ο CXCR2 (συνδέτης IL-8 (CXCL1 και 2) ελέγχουν την έξοδό τους στο περιφερικό αίμα. Φλεγμονώδη ερεθίσματα μπορούν να επάγουν την απελευθέρωση των ουδετεροφίλων διαταράσσοντας την ισορροπία στον άξονα CXCR4/CXCL12 μέσω διάφορων μηχανισμών. Κατά τη σοβαρή λοίμωξη μεγάλοι αριθμοί ουδετεροφίλων απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από την μετα-μιτωτική δεξαμενή του μυελού των οστών καθώς και από τη δεξαμενή των μεταναστευσάντων ουδετεροφίλων (δηλαδή αυτών που είναι δεσμευμένων στην μικροκυκλοφορία).(3)

Τα ουδετερόφιλα της περιφέρειας αποτελούνται από ετερογενείς υποπληθυσμούς με διαφορετικές καταστάσεις διέγερσης και λειτουργία. Κατά τη σοβαρή φλεγμονή ένας μεγάλος αριθμός ανώριμων ουδετεροφίλων ή ραβδοκυττάρων εμφανίζονται στην κυκλοφορία, ενώ μπορούν ακόμα να αναγνωριστούν ακόμα και πληθυσμοί προγονικών κυττάρων. Ως εκ τούτου η εμμένουσα φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε εξάντληση του μυελού από ουδετερόφιλα το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε μια κατάσταση ανεπάρκειας της φυσικής ανοσίας.(49) Στην παρούσα φάση παρόλ'αυτά είναι ασαφές πώς είναι δυνατόν να ερμηνευτεί η παρουσία των ανώριμων κυττάρων στην αιματική κυκλοφορία ως απόκριση στη φλεγμονή. Μπορεί να αποτελεί μια αντισταθμιστική απόκριση η οποία άρχεται από την απώλεια των ώριμων ουδετεροφίλων από το μυελό των οστών ή από τη στοχευμένη φλεγμονώδη απόκριση στο βακτηριακό ερέθισμα. Τα ουδετερόφιλα παρουσιάζουν μία αξιοσημείωτη πτώση της έκφρασης διάφορων υποδοχέων συγκριτικά με τα ώριμα κυκλοφορούντα. (18)

Επιπρόσθετα με τους υποδοχείς της IL-8 (CXCR1 και CXCR2) και του C5a υποδοχέα, οι Fc υποδοχείς (CD16 και CD32) οι οποίοι είναι σημαντικοί για την αναγνώριση των

παθογόνων, τη φαγοκυττάρωση και την εξόντωση παρουσιάζουν χαμηλότερη έκφραση στα ανώριμα κύτταρα.(50)

Σχετικά μικρός αριθμός μελετών έχουν εξετάσει τη λειτουργία των ανώριμων και των προγονικών ουδετεροφίλων κατά την οξεία φλεγμονή. Στους σηπτικούς ασθενείς τα ανώριμα ουδετερόφιλα έχουν δείχθει ότι παρουσιάζουν μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα. Μειωμένη φαγοκυττάρωση και αυξημένοι αριθμοί κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων των ουδετεροφίλων έχουν συσχετισθεί με φτωχή πρόγνωση σε σηπτικούς ασθενείς καθώς και σε ασθενείς με οξεία φλεγμονή. (51)

1.2.δ. Φαινότυπος: Οξεία φλεγμονή/σήψη

Η οξεία φλεγμονή η οποία επάγεται από το τραύμα, τη σήψη ή την ισχαιμική βλάβη. Είναι γνωστό ότι συνεισφέρει στην εκδήλωση σοβαρών επιπλοκών όπως είναι η οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια (ARDS) και η πολυοργανική ανεπάρκεια.

Αυτό έχει αποδοθεί στη δυσλειτουργία των μικρών αγγείων, στην ιστική βλάβη και στην απορρύθμιση του μεταβολισμού που προκαλούνται από την οξεία φλεγμονή. Έχει αναγνωριστεί ότι η σοβαρή συστηματική λοίμωξη μπορεί επίσης να καταλήξει σε εκτεταμένη αντισταθμιστική καταστολή των ανοσιακών αποκρίσεων καθιστώντας τον ξενιστή επιρρεπή στις λοιμώξεις ή ανίκανο να αντιμετωπίσει τις υπάρχουσες λοιμώξεις.(52)

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επαρκή αντιμικροβιακή άμυνα μπορούν να παρεμποδίσουν την επακόλουθη ανοσιακή απάντηση. Αυτό μπορεί να προκληθεί από ανεπαρκή έλεγχο των ίδιων αντιμικροβιακών μηχανισμών όπως 1) η αυτο- ή παρακρινής πέψη σημαντικών επιφανειακών υποδοχέων, 2) η μείωση της έκφρασης επιφανειακών υποδοχέων και σηματοδοτικών μονοπατικών στη μη επιλύουσα φλεγμονή ή κατά τη διάρκεια ενός δευτερεύοντος μικροβιακού ερεθίσματος ως επακόλουθο μιας πρωταρχικής στείρας φλεγμονής (μεσολαβούμενης από DAMP ή MAMP), 3) απελευθέρωση των πληθυσμών των ουδετεροφίλων με μειωμένες μικροβιοκτόνες δραστηριότητες. Επιπρόσθετα, τα ουδετερόφιλα στις φλεγμονώδεις καταστάσεις μπορούν να επηρεάσουν άλλα ανοσοκύτταρα συμβάλλοντας στην εκδήλωση του φαινομένου της ανοσιακής παράλυσης του συστήματος της προσαρμοστικής ανοσίας.(53)

Οι πρωτεάσες σερίνης που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα επηρεάζουν την έκφραση υποδοχέων κρίσιμων για την αλληλεπίδραση ουδετεροφίλων-μικροβίων. Εκτός από τη διεγερτική δράση μέσω των υποδοχέων των ενεργοποιημένων από τις πρωτεάσες σερίνης (PARS), αυτές μπορούν να καταστείλουν τις ανοσιακές αποκρίσεις μέσω της πρωτεολυτικής πέψης σημαντικών επιφανειακών υποδοχέων κυττάρων και της φυσικής και της προσαρμοστικής ανοσίας. Για παράδειγμα η ουδετεροφιλική ελαστάση καταλύει την πέψη του CXCR1, ενός υποδοχέα για την IL-8 στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων. Αυτός ο μηχανισμός εμπλέκεται σε φαινόμενα οξείας φλεγμονής, όπως έχει διαπιστωθεί σε κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα ασθενών με τραύμα ή σήψη όπου εκλεκτικά καταστέλλουν την έκφραση του CXCR2, του 2^{ου} από τους δύο υποδοχείς της IL-8. (54)

Οι Tarlowe και συν έδειξαν ότι η πτώση της έκφρασης αυτού του υποδοχέα προηγήθηκε της εμφάνισης της πνευμονίας σε ασθενείς με τραύμα σε κρίσιμη κατάσταση. Η πτώση του CXCR2 και η πέψη του CXCR1 μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη απόκριση στην IL-8 ενός σημαντικού χημειοτακτικού παράγοντα των ουδετεροφίλων.(55)

Επιπρόσθετα οι πρωτεάσες σερίνης των ουδετεροφίλων μπορούν να οδηγήσουν στην διάσπαση υποδοχέων συμπληρώματος όπως ο υποδοχέας του CR1 (CD35) και του C5aR (CD88) στα ουδετερόφιλα. Αυτοί οι υποδοχείς είναι κρίσιμοι καθώς μεσολαβούν τη χημειοταξία, την αποκοκκίωση και την ορθή αναγνώριση οψωνινοποιημένων μικροβιακών στόχων από το CR1 και το C5aR αντίστοιχα. Κατά τη φλεγμονή η μειωμένη έκφραση του C5aR οφείλεται στη δέσμευσή του και στην επακόλουθη εσωτερικοποίησή του. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή ανεπάρκεια της φαγοκυττάρωσης παθογόνων από τα ουδετερόφιλα, καθώς η C5a-επαγόμενη χημειοταξία είναι σημαντική για τα ουδετερόφιλα προκειμένου να αντιμετωπίσουν τους οψωνινοποιημένους στόχους. Οι πρωτεάσες δεν παρεμποδίζουν μόνο τη λειτουργία των ουδετεροφίλων, μπορούν να επηρεάσουν τα μονοκύτταρα στο μικροπεριβάλλον. Η ουδετεροφιλική ελαστάση καταλύει πρωτεολυτικά τη διάσπαση του CD14 ενός υποδοχέα απαραίτητου για την αναγνώριση υψηλής συγγένειας του λιποπολισακχαρίτη από το TLR4, οδηγώντας έτσι σε ανεπάρκεια της ορθής αναγνώρισης των βακτηρίων από τα μονοκύτταρα. Τέλος η ελαστάση και η καθεψίνη G μεσολαβούν την απομάκρυνση (shedding) των υποδοχέων των κυτταροκινών IL-2 και IL-6 στα T-λεμφοκύτταρα.(56)

Το τραύμα και η ιστική βλάβη μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων κυτταρικών συστατικών από τα νεκρωτικά κύτταρα. Αυτά τα ενδοκυττάρια συστατικά είναι γνωστά και ως DAMPS. Είναι συστατικά του ίδιου του ξενιστή και χρησιμεύουν ως σημαντικοί φλεγμονώδεις μη μικροβιακοί διεγέρτες μετά από βλάβη. Μετά από τη διατύπωση της υπόθεσης του κινδύνου από τον Matzinger,(57) ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν εστιάσει σε μόρια που επάγουν αυτήν την απόκριση. Τα πιο εκτεταμένα μελετημένα DAMPs είναι η HMGB1, οι HSPs, ATP, ουρικό οξύ, φορμυλιωμένα πεπτίδια από μιτοχόνδρια και το μιτοχονδριακό DNA. Η φλεγμονή που επάγεται από παθογόνα από την άλλη πλευρά μεσολαβείται από μικροβιακά συστατικά τα οποία αναφέρονται και ως MAMPs τα οποία ομοιάζουν των DAMPs και πιο σημαντικό μοιράζονται τους ίδιους υποδοχείς στα ουδετερόφιλα. Αυτός ο βιολογικός μιμητισμός και η χρήση παρόμοιων υποδοχέων δημιουργεί ένα πρόβλημα για το ανοσιακό σύστημα καθώς η βλάβη (DAMPs) επάγει την πτώση της έκφρασης πολλών από αυτούς τους υποδοχείς μέσω ομόλογης και ετερόλογης απευαισθητοποίησης. Αυτό μπορεί να καταστήσει τα ουδετερόφιλα ανίκανα να οδηγηθούν σε μια επαρκή απόκριση στο επακόλουθο μικρόβιο (MAMP).(56)

1.2.ε. Φαινότυπος: καταστολή προσαρμοστικής ανοσίας

Τα ουδετερόφιλα έχουν χαρακτηριστεί ως επαγγελματίες φαγοκυττάρωσης.(6) Εκτός όμως από την άμεση αντιμικροβιακή τους λειτουργία συμμετέχουν και στην τροποποίηση των μηχανισμών της προσαρμοστικής ανοσίας κατά την οξεία φλεγμονή.(58)

Υπό αυτές τις συνθήκες τα ουδετερόφιλα παράγουν χημειοκίνες και εκκρίνουν τα περιεχόμενα των κοκκίων τα οποία εν συνεχεία προσελκύουν και τροποποιούν τις λειτουργίες των T-λεμφοκυττάρων άμεσα και έμμεσα. Για παράδειγμα η ουδετεροφιλική ελαστάση μειώνει την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων από τα δενδριτικά κύτταρα, περιορίζοντας την ωρίμανση και την επαγωγή μιας ορθής Th1 απόκρισης.(59)

Επιπρόσθετα τα T-λεμφοκύτταρα στο μικροπεριβάλλον της φλεγμονής μπορεί να επηρεαστούν από την ουδετεροφιλική ελαστάση μέσω της πρωτεολυτικής δράσης που ασκεί στους υποδοχείς της IL-2 και IL-6.(60)

Ένας άλλος μηχανισμός ανοσολογικής ρύθμισης έχει δειχθεί στα μακροφάγα μετά τη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών ουδετεροφίλων. Υπό αυτές τις συνθήκες οι ανοσολογικές αποκρίσεις των μακροφάγων μετατοπίζονται προς την απόκτηση ενός πιο αντιφλεγμονώδους τύπου κυττάρων.(61) Η άμεση ρύθμιση των T-κυτταρικών αποκρίσεων από τα ουδετερόφιλα έχει σταδιακά καθιερωθεί ως αντίληψη. Ένας μεγάλος αριθμός ενδείξεων υποστηρίζει το γεγονός ότι μια ετερογενής ομάδα ανώριμων μονοπύρηνων και ουδετερόφιλων τα οποία ονομάζονται κατασταλτικά κύτταρα της μυελικής σειράς μπορούν να καταστείλουν τις T-κυτταρικές αποκρίσεις σε διάφορα μοντέλα καρκίνου στα ποντίκια. Επιπρόσθετα αυτά τα κύτταρα έχουν δειχθεί ότι διαδραματίζουν ρόλο σε διάφορα μοντέλα λοιμωδών νοσημάτων, μεταμόσχευσης οργάνων και αυτοάνοσων νοσημάτων. (62) Η αναγνώριση των ανθρώπινων ανώριμων κοκκιοκυτταρικών MDSCs αποτελεί μια πρόκληση. Ιδιαίτερα η διαφοροποίησή τους από ώριμους φαινοτύπους ουδετεροφίλων στο αίμα κατά την οξεία φλεγμονή, εκκρεμεί να επιβεβαιωθεί. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα MDSCs –μπορούν να καταστείλουν τα T-λεμφοκύτταρα περιλαμβάνουν την έκφραση και την έκκριση της αργινάσης-1 η οποία διασπά την αργινίνη από το μικροπεριβάλλον. Η διάσπαση της L-αργινίνης η οποία είναι ένα απαραίτητο αμινοξύ οδηγεί στη δέσμευση των κυττάρων στη G0-G1 φάση του κυτταρικού κύκλου.(63) Επιπρόσθετα στην ανθρώπινη φλεγμονή έχει δειχθεί η ύπαρξη ενός πληθυσμού ώριμων CD62L ουδετερόφιλων ικανών να καταστείλουν τις T-κυτταρικές αποκρίσεις μέσω ενός μηχανισμού που βασίζεται στην απελευθέρωση των ROS στην ανοσολογική σύναψη.(64) Πρόσφατα παρόμοια ουδετερόφιλα σε ασθενείς με σηπτικό σοκ έχουν δειχθεί ότι εκφράζουν αργινάση-1 και καταστέλλουν τις T-κυτταρικές λειτουργίες.(65) Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίον τα ουδετερόφιλα μπορούν να παρεμποδίσουν τις T-κυτταρικές αποκρίσεις είναι μέσω PD_L1, ενός ισχυρού επαγωγέα της απόπτωσης στα T-λεμφοκύτταρα. Ο υποκείμενος μηχανισμός της έκφρασης του PD-L1 συνιστά μια διαδικασία εξαρτώμενη από την IFN-γ. Ο άξονας PD-1-PD-L1 αποτελεί σημαντικό μηχανισμό ανοσοκαταστολής στους σηπτικούς ασθενείς επάγοντας την απόπτωση των λεμφοκυττάρων και τη δυσλειτουργία των μονοκυττάρων.(53)

Το μπλοκάρισμα αυτού του άξονα μετά την επαγωγή της σήψης, χορηγώντας ένα αντίσωμα έναντι του PD1, βελτίωσε την επιβίωση στα ποντίκια. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να είναι προστατευτικός σε ιστούς με μεγάλες διηθήσεις φλεγμονής. Από την άλλη πλευρά αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι ανεπιθύμητη όταν τα ουδετερόφιλα

μεταναστεύουν στους λεμφαδένες και εμπλέκονται με την προσαρμοστική ανοσία, όπως έχει περιγραφεί σε διάφορες καταστάσεις. Σε αυτούς τους λεμφαδένες τα ουδετερόφιλα είναι ικανά να παρεμποδίσουν τις ανοσιακές αποκρίσεις μέσω της αλληλεπίδρασης με τα T- και B-λεμφοκύτταρα. (53)

Η σοβαρή φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει στην ανοσοπαράλυση μέσω διάφορων μηχανισμών. Τα ουδετερόφιλα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία αυτή, είτε μέσω μειωμένων αντιμικροβιακών λειτουργιών είτε μέσω άμεσης καταστολής της προσαρμοστικής ανοσίας. Πολλές πειραματικές μελέτες έχουν διεξαχθεί όπου διερευνώνται ο καταστρεπτικός ρόλος των ουδετεροφίλων, που συνεισφέρει στην οργανική βλάβη κατά την οξεία φλεγμονή.(56)

Παρόλ' αυτά ο ρόλος τους στην παράλυση παραμένει ως επί το πλείστον ένα πεδίο που δεν έχει μελετηθεί. Οι μελέτες που διερευνούν τον αιτιολογικό τους ρόλο στην επιρρέπεια στις λοιμώξεις σε ζωικά μοντέλα σοβαρής φλεγμονής θα πρέπει να διεξαχθούν. Μειωμένες αντιμικροβιακές λειτουργίες των ουδετεροφίλων και η ικανότητά τους να καταστείλουν την προσαρμοστική ανοσία *in vitro* θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την κλινική έκβαση των ασθενών. Αυτή η προσέγγιση είναι σημαντική προκειμένου να εμβαθύνουμε στην κατανόησή μας αναφορικά με τον ρόλο των ουδετεροφίλων στην ανοσοπαράλυση οδηγώντας σε καταστροφικές συνέπειες μετα-χειρουργικά, μετά το τραύμα και σε σηπτικούς ασθενείς. (66)

1.3. Ο ρόλος των ουδετεροφίλων στην ιστική αναγέννηση και επούλωση.

Μελέτες σε μοντέλα ποντικών και σε παιδιά με ανεπάρκεια προσκόλλησης λευκοκυττάρων (LAD) τύπου I, II και III έχουν δείξει ανεπάρκεια στην ιστική επούλωση η οποία σχετίζεται με απουσία των ουδετεροφίλων στους ιστούς και αξιοσημείωτη ουδετεροφιλία στο αίμα και στον μυελό των οστών. Παρόλ' αυτά οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν διαλευκανθεί. Πρέπει να επισημανθεί ότι η ανεπάρκεια CD18 επηρεάζει την είσοδο και των μονοκυττάρων στους ιστούς, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν μπορούμε να αποδώσουμε την αποκλειστικότητα στα ουδετερόφιλα για το ρόλο τους στην ιστική επούλωση. (67)

I.4. Νοσήματα που σχετίζονται με υπερνεργοποίηση των φαινοτύπων των ουδετεροφίλων

Χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, όπως η κυστική ίνωση, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, αλλά και η οξεία φλεγμονή (π.χ. SIRS, οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια και πολυοργανική ανεπάρκεια, έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό την ιστική βλάβη που επάγεται από ουδετερόφιλα. Παρόλο που η κοινή προσέγγιση για την αντιμετώπιση αυτών των καταστάσεων, είναι η χορήγηση κατασταλτικών φαρμάκων των ουδετεροφίλων, τίθεται το ζήτημα ότι αυτά πολλές φορές εμφανίζουν αντοχή και δεν παρατηρείται απόκριση. (56)

I.5. Νοσήματα που σχετίζονται με υπο-ενεργοποίηση ή λειτουργική ανεπάρκεια των φαινοτύπων των ουδετεροφίλων.

Οι ανεπάρκειες των ουδετεροφίλων μπορεί να αφορούν σε διαταραχές του αριθμού αυτών. Η ουδετεροπενία μπορεί να είναι παροδική ή χρόνια και να οφείλεται σε συγγενείς διαταραχές (π.χ. αδυναμία παραγωγής από τον μυελό των οστών). (68) Από την άλλη μπορεί να σχετίζεται με σύνδρομα όπως οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες (XLA, hyper-IgM)(68), μεταβολικά νοσήματα όπως η νόσος αποθήκευσης του γλυκογόνου τύπου 1b, και άλλα σύνδρομα όπως το Shwachman-Diamond σύνδρομο κ.α.(69) Τέλος οι ουδετεροπενίες μπορεί να εκδηλώνονται στα πλαίσια αυτοάνοσων εκδηλώσεων αλλά και ιδιοπαθείς όπως η χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία. (70)

Πρωτοπαθείς διαταραχές των ουδετεροφίλων μπορεί να αφορούν και στη λειτουργία αυτών.(71) Η πιο κοινή κληρονομούμενη ανεπάρκεια των ουδετεροφίλων είναι η Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος, η οποία προκαλείται από μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του συμπλέγματος της οξειδάσης του NADPH. (69,72). Αυτό έχει ως συνέπεια την απύσα ή μειωμένη ικανότητα αναπνευστικής έκρηξης. Άλλες διαταραχές της αναπνευστικής έκρηξης οφείλονται σε ανεπάρκεια της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO), της συνθετάσης της γλουταθειόνης και σε σοβαρή ανεπάρκεια της G6PD. (19)

Άλλες λειτουργικές διαταραχές των ουδετεροφίλων που έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο αφορούν στους μηχανισμούς μετανάστευσης στις εξαγγειακές θέσεις. Η διαδικασία της μετανάστευσης των ουδετεροφίλων από την αιματική κυκλοφορία μέσω του ενδοθηλίου μεσολαβείται από διάφορες οικογένειες μορίων προσκόλλησης

και τους προσδέτες τους.(8) Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας οι οποίες είναι παρούσες σε όλα τα λευκοκύτταρα και είναι σημαντικές για την ισχυρή προσκόλληση αυτών στο ενδοθήλιο και την μετέπειτα διαενδοθηλιακή μετανάστευση. Κάθε μόριο ιντεγκρίνης είναι ένα ετεροδιμερές το οποίο αποτελείται από μία α και μία β αλυσίδα.(29) Οι σελεκτίνες είναι μία άλλη κατηγορία μορίων προσκόλλησης τα οποία μεσολαβούν την αρχική παροδική αλληλεπίδραση τύπου κύλισης («rolling»), μεταξύ των λευκοκυττάρων και του ενδοθηλίου.(26,73) Χαρακτηριστικά οι συνδέτες τους είναι επικράτειες γλυκοζυλίωσης (εξ 'ου και το όνομα λεκτίνη), που τους διακοσμούν. Παράδειγμα αποτελεί το υδατανθρακικό αντιγόνο ομάδας αίματος SLex (sialyated Lewis X).(74) Ο όρος ανεπάρκεια προσκόλλησης λευκοκυττάρων προτάθηκε από τους Anderson και Springer για την περιγραφή μιας κατάστασης που οφείλεται σε βλάβη των β2-ιντεγκρινών, ετεροδιμερών των α και β υπομονάδων οι οποίες ονομάζονται CD11 και CD18 αντίστοιχα. (75)Υπάρχουν τρεις διαφορετικές υπομονάδες α, οι CD11a, CD11b, και CD11c οι οποίες συνδυάζονται με μία κοινή υπομονάδα CD18.(76) Η μοριακή βλάβη οφείλεται στην απύση ή μειωμένη έκφραση της CD18, που προκαλείται από μεταλλάξεις οι οποίες χαρτογραφούνται στην χρωμοσωμική περιοχή 21q21.3.(30) Συνέπεια αυτού είναι η έλλειψη λειτουργικών CD11/CD18 γλυκοπρωτεϊνών σε όλα τα λευκοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα σε αυτήν τη συνθήκη είναι ικανά για κύλιση στο ενδοθήλιο αλλά ανίκανα να προσδεθούν ισχυρά σε αυτό και να μεταναστεύσουν στους ιστούς. Ως εκ τούτου τα ουδετερόφιλα δεν συσσωρεύονται στις εξαγγειακές θέσεις φλεγμονής παρά την εξεσημασμένη λευκοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα. Η διαταραχή αυτή ονομάζεται LADI, ενώ έχει περιγραφεί και η LADII η οποία χαρακτηρίζεται από σοβαρή υποφουκοζυλίωση.(67) Άλλες διαταραχές χημειοταξίας (hyper-IgE σύνδρομο, σύνδρομο Wiskott-Aldrich), ανεπάρκειες συμπληρώματος, διαταραχές οψωνινοποίησης (MBL ανεπάρκεια), αποκοκκίωσης (Chediak Higashi σύνδρομο και ανεπάρκειες των ειδικών κοκκίων, μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις.(69) Παρόλ'αυτά οι φαινότυποι και η λειτουργίες των ουδετεροφίλων στις ανεπάρκειες παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες.

1.5.α. Επίκτητη υποενεργοποίηση κατά το σύνδρομο αντισταθμιστικής αντιφλεγμονώδους απόκρισης μετά από μείζον τραύμα και στη σήψη.

Οι περισσότεροι φαινότυποι που περιγράφονται προέρχονται από κύτταρα απομονωμένα από το περιφερικό αίμα. Παρόλ'αυτά η κύρια τοποθεσία για τη δράση των ουδετεροφίλων είναι οι ιστοί. Παραμένει άγνωστο εάν τα ουδετερόφιλα εδράζονται μόνιμα σε ιστούς ενώ το θέμα της επανακυκλοφορίας είναι ακόμα υπό συζήτηση. Γι'αυτό είναι σημαντική η μελέτη των ουδετεροφίλων και στην περιοχή των ιστών. Υπάρχουν περιοχές από τις οποίες μπορούν να απομονωθούν ουδετερόφιλα κατά ένα σχετικά άθικτο τρόπο. Παραδείγματα αποτελούν το βρογχοκυψελιδικό υγρό, τα πτύελα, το αρθρικό υγρό και τα ουδετερόφιλα της στοματικής κοιλότητας. Η ανοσοφαινοτύπιση αυτών των πληθυσμών έχει δείξει ενεργοποιημένα, ώριμα ουδετερόφιλα. (43) Η δυσκολία στην ερμηνεία του φαινοτύπου ενεργοποίησης έγκειται στον εάν αυτή οφείλεται στην διαδικασία της εγκατάστασης των κυττάρων από την περιφέρεια στον ιστό, με τη σχετιζόμενη με το εκάστοτε νόσημα ουδετεροφιλία των ιστών, ή εάν είναι οργανοειδική. (77) Αν και υπάρχουν λίγα δεδομένα αναφορικά με τους φαινοτύπους αυτούς σε υγιή άτομα, η διαδικασία της εγκατάστασης των ουδετεροφίλων στους ιστούς από μόνη της φαίνεται ικανή για την επαγωγή του φαινοτύπου ενεργοποίησης. Εκτός από ανοσοϊστοχημικά δεδομένα που αφορούν τους N1/N2 φαινοτύπους, (78) δεν είναι γνωστά πολλά αναφορικά με τους φαινοτύπους των ουδετεροφίλων σε καταστάσεις ομοίωσης και νόσου.

Επιπρόσθετα των φαινοτύπων των ουδετεροφίλων σε παθολογικές καταστάσεις έχουν περιγραφεί επιπρόσθετοι δείκτες που μπορεί να αντιπροσωπεύουν διακριτούς φαινοτύπους κατά την ομοίωση. Συγκεκριμένα οι δείκτες αυτοί είναι οι NB1/CD177 που εκφράζεται περίπου στο 45%-65% των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων και λειτουργεί ως πρωτεΐνη αγκυροβόλησης για την πρωτεΐνη 3 PR3. (79) Ο άλλος δείκτης είναι η *Olfactomedin-4* (OLFM-4) η οποία περιγράφηκε από τους Clemmensen και συν. (80,81) Δεν έχει αποδοθεί κάποια ειδική λειτουργία σε αυτούς τους δείκτες, παρόλ'αυτά υπάρχουν μελέτες που σχετίζουν την έκφρασή τους με την παθογένεση νοσημάτων, οι οποίες δεν θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία.

Τα ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος φαίνονται ως ενιαίος πληθυσμός όταν αναλύονται ανοσοφαινοτυπικά. Όταν αναλύονται όμως με κριτήριο την φαγοκυτταρική τους ικανότητα τότε μία σημαντική πολυπλοκότητα αναδεικνύεται και διαπιστώνεται ότι και σε φυσιολογικούς μάρτυρες υφίσταται ετερογένεια στην

φαγοκυτταρική ικανότητα βακτηρίων. Η υπόθεση που έχει διαμορφωθεί στα πλαίσια της ανωτέρω παρατήρησης είναι ότι τα ουδετερόφιλα που επιδεικνύουν καλύτερη φαγοκυτταρική ικανότητα είναι αυτά που πρώτα θα μεταναστεύσουν στην περιοχή των ιστών. (20)

Το διαμέρισμα των ουδετεροφίλων είναι πολύ πιο πολύπλοκο απ' ό,τι αναμενόταν. Η διατήρηση της ομοιόστασης σε φυσιολογική κατάσταση και η επαναφορά της σε κατάσταση νόσου επιτυγχάνεται όταν η ισορροπία μεταξύ των φλεγμονωδών και των αντιφλεγμονωδών δράσεων επαναφέρεται. (82)

Απλά η συλλογική αναστολή της δράσης των ουδετεροφίλων συνεπάγεται και απρόβλεπτο κίνδυνο για λοιμώδεις επιπλοκές. Πράγματι ασθενείς που παρουσιάζουν καταστολή της δράσης των ουδετεροφίλων στα πλαίσια συνδρόμων όπως CARS και PICS μπορεί ακόμα και να ευνοηθούν από την ενεργοποίησή τους.(83) Ενδείξεις που ενισχύουν αυτήν την υπόθεση προέρχονται από την σημαντική μελέτη των Pickkers και συν. οι οποίοι έδειξαν ότι η IFN-γ δρα ανταγωνιστικά στην LPS-επαγόμενη ανοσοπαράλυση στους ανθρώπους, ενώ το 2020 αναμένεται να δημοσιευτούν και τα αποτελέσματα σχετικής κλινικής μελέτης.(84)

II. ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι πρώτες ενδείξεις ότι τα ουδετερόφιλα δεν αποτελούν ομοιογενή πληθυσμό προέκυψαν από μελέτες για τον καρκίνο όπου ταυτοποιήθηκε ο πληθυσμός των κατασταλτικών κυττάρων μυελικής προέλευσης «myeloid derived suppressor cells-MDSCs) και τα N1/N2 σχετιζόμενα με καρκίνο ουδετερόφιλα στα ποντίκια. Αυτά τα πειράματα παρείχαν ενδείξεις ότι τα ουδετερόφιλα μπορούν να επηρεάσουν την ανοσιακή απόκριση έναντι του καρκίνου. Διαφορετικοί υποπληθυσμοί ουδετεροφίλων εμπλέκονται σε καλύτερη εξόντωση των καρκινικών κυττάρων (N1 κύτταρα), και/ή καταστολή της ανοσιακής απόκρισης έναντι του καρκίνου (N2 κύτταρα και MDSCs).(78) Παρόλ'αυτά μέχρι στιγμής η ύπαρξη των N1/N2 πληθυσμών στον άνθρωπο *in vivo*, δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως, καθώς παρόλο που ανακλύπτουν νέες μελέτες, πολλές είναι αντικρουόμενες. (85)

Τα MDSCs έχουν μελετηθεί κυρίως στα ποντίκια και κυρίως μελετώνται συλλογικά χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονοκυτταρικών και ουδετεροφιλικών πληθυσμών ούτε διαχωρισμό από τον φυσιολογικό πληθυσμό των ώριμων ουδετεροφίλων.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τουλάχιστον *in vitro* τα ουδετερόφιλα επιτελούν αντικαρκινική δράση μέσω κυτταροτοξικότητας μεσολαβούμενης από αντισώματα και τρογοκύτωσης . (86)

Παράλληλα με την περιγραφή της περίπλοκης απόκρισης των ουδετεροφίλων στην ανοσολογία του καρκίνου, ορισμένες μελέτες έχουν περιγράψει και τη διαμερισματοποίηση των ουδετεροφίλων στην διαδικασία της ανοσορύθμισης κατά τη οξεία φλεγμονή, ή κατά την κινητοποίηση των ουδετεροφίλων από τον G-CSF. (85)

Αυτές οι μελέτες από κοινού έδειξαν ότι ουδετερόφιλα με υπερ-κατατμημένο πυρήνα μπορούν να καταστέλλουν την T-κυτταρική ενεργοποίηση και/ή πολλαπλασιασμό. Τα κατασταλτικά κύτταρα που κινητοποιούνται κατά τη οξεία φλεγμονή χαρακτηρίζονται από φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης CD16, χαμηλή έκφρασης CD62L και υψηλή έκφραση CD11b και CD11c. (87)

Τέλος ένας επιπλέον φαινότυπος που έχει παρατηρηθεί σε χρόνιες φλεγμονώδεις και λοιμώδεις νόσους, στον καρκίνο και στην οξεία φλεγμονή, είναι ο επονομαζόμενος πληθυσμός των κοκκιοκυττάρων χαμηλής πυκνότητας (Low Density Granulocytes-LDGs). Αυτά έχουν μελετηθεί σε ασθενείς με SLE όπου έχει δειχθεί αυξημένη έκφραση δεικτών ενεργοποίησης και αυξημένη τάση για σχηματισμό NETs.(88) Δεν έχει ξεκαθαριστεί εάν πρόκειται για κύτταρα τα οποία είναι πρόσκαιρα ενεργοποιημένα, ή μακροχρόνια διαφοροποιημένα. Η σύνθεση των ουδετεροφίλων που βρίσκονται στο στρώμα των κυττάρων χαμηλής πυκνότητας είναι ετερογενής, ενώ υπάρχει μία αξιοσημείωτη διαφορά στον αριθμό και στις ιδιότητες ου τους αποδίδονται σε διάφορες καταστάσεις μελέτης. Γι' αυτό το λόγο δεν μπορούν να ενταχθούν σε μία διακριτή φαινοτυπική κατηγορία βάσει μόνο το χαρακτηριστικό της πυκνότητας.(6)

Οι IgG μέσω των υποδοχέων καθιστούν τα ουδετερόφιλα ικανά να αντιδρούν σε απειλές με αντιγόνο-ειδικό τρόπο, αλλά συνιστούν επιπρόσθετα το έναυσμα για την ιστική βλάβη όταν στοχεύονται αυτοαντιγόνα. Πράγματι συγκεντρώνονται όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι τα ουδετερόφιλα δεν συνιστούν απλά δραστικά κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, αλλά ενεργά διαμορφώνουν τις ανοσιακές αποκρίσεις μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα κύτταρα και την απελευθέρωση μεσολαβητών.(89)

Δεδομένα από ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν G-CSF υποδεικνύουν ότι τα ουδετερόφιλα μπορούν να επικοινωνούν με τα Β-λεμφοκύτταρα μέσω της παραγωγής BAFF (B-cell activating factor), ένα μόριο το οποίο είναι γνωστό ότι συμβάλλει στην επιβίωση των Β-λεμφοκυττάρων και στις αποκρίσεις τους. Ομοίως, ο παράγοντας APRIL, (A Proliferation Inducing Ligand), συνιστά σημαντικό παράγοντα

πολλαπλασιασμού για τα Β-λεμφοκύτταρα, επάγοντας επιπρόσθετα τις αντιδράσεις ισοτυπικής μεταστροφής.(90)

Τα ουδετερόφιλα εκκρίνουν ιδιοσυστατικά τον παράγοντα APRIL αλλά τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα δεν δύνανται να ενεργοποιήσουν άμεσα τα Β-λεμφοκύτταρα. Κατά τη λοίμωξη, ο APRIL των ουδετεροφίλων, δεσμεύεται από τις πρωτεογλυκάνες της θειικής ηπαράνης στην περιοχή των βλεννογόνων, δημιουργώντας κατ'αυτόν τον τρόπο βάσεις για εντοπισμένη επιβίωση πλασματοκυττάρων και κατ'επέκταση παραγωγής αντισωμάτων.(90)

Μελέτες αναφέρουν ότι Β-λεμφοκύτταρα από λέμφωμα μεγάλων κυττάρων εκκρίνουν χημειοκίνες στρατολογώντας ουδετερόφιλα που παράγουν APRIL στην περιοχή του όγκου, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις του APRIL στον όγκο σχετίζεται με χαμηλότερη επιβίωση, ενώ έχουν δειχθεί επιπρόσθετοι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα ουδετερόφιλα ρυθμίζουν τη λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων σε Β-χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα. (91,92) Στον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο, τα ουδετερόφιλα αλληλεπιδρούν με τα Β-λεμφοκύτταρα με ποικίλους τρόπους. Έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή BAFF, APRIL και IFN-α επάγοντας την ανάπτυξη των Β-λεμφοκυττάρων στον μυελό των οστών. Στην κυκλοφορία τα ουδετερόφιλα σε ασθενείς με SLE έχει διαπιστωθεί ότι εκκρίνουν αυξημένες συγκεντρώσεις IL-6 μετά από διέγερση με IFN-α, υποστηρίζοντας την επιβίωση και την ωρίμανση των Β-λεμφοκυττάρων και των πλασμαβλαστών.(93,94) Ακολούθως παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση για NETOση και απελευθερώνουν LL37-DNA συμπλέγματα, τα οποία επάγουν την πολυκλωνική Β-κυτταρική ενεργοποίηση μέσω TLR9, οδηγώντας τελικά στην γένεση περισσότερο NET-ειδικών αυτοαντισωμάτων.(70)

Τα ουδετερόφιλα μπορούν να βρεθούν σε πολλαπλές περιοχές του σπλήνα, συμπεριλαμβανομένης της περιθλακιδώδους ζώνης, πέριξ της οριακής ζώνης (MZ) και του ερυθρού πολφού. Ο ακριβής τους ρόλος τους σε κάθε ένα από αυτά τα διαμερίσματα δεν είναι πλήρως κατανοητός. (95)

Στον σπλήνα, ένας εξειδικευμένος υποπληθυσμός των ουδετεροφίλων έχει περιγραφεί ως βοηθητικός πληθυσμός των Β-λεμφοκυττάρων. Αυτά τα «βοηθητικά των Β-λεμφοκυττάρων ουδετερόφιλα» NBH, εντοπίζονται γύρω από την οριακή ζώνη υγιών ατόμων και εκφράζουν υψηλά επίπεδα BAFF, APRIL και IL-21 ως απόκριση στα μικροβιακά ερεθίσματα παρέχοντας βοήθεια στα MZ-Β-λεμφοκύτταρα να επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων έναντι Τ-κυτταροανεξάρτητων αντιγόνων.(7)

Σε ασθενείς με σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία, έχει διαπιστωθεί ότι τα επίπεδα των CD27+/IgDlow κυκλοφορούντων MZ B-λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και τα επίπεδα των IgM, IgG και IgA αντισωμάτων έναντι των T-ανεξάρτητων αντιγόνων ήταν χαμηλότερα έναντι αυτών των υγιών μαρτύρων. (89)

Σε αντίθεση με αυτήν την αναφορά, σε σπλήνες δοτών προς μεταμόσχευση δεν διαπιστώθηκε η παρουσία NBH. Επιπρόσθετα, παρόμοιοι αριθμοί CD27+IgD+ μνημονικών κυττάρων έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία και υγιείς μάρτυρες. Εκτός των BAFF και APRIL, η πεντραξίνη 3 (PTX3) έχει προταθεί ότι συνιστά έναν παράγοντα προερχόμενο από τα B-λεμφοκύτταρα ο οποίος υποστηρίζει τις B-λεμφοκυτταρικές λειτουργίες. Η PTX3, αποθηκεύεται στα δευτερογενή κοκκία των ουδετεροφίλων και απελευθερώνονται μετά από ενεργοποίηση με TLR-αγωνιστές. Η PTX3 προσδένεται στα MZ B-λεμφοκύτταρα και ενισχύει την έκκριση ανοσοσφαιρινών που έχουν υποστεί ισοτυπική μεταστροφή παρουσία του παράγοντα BAFF.(96) Η ικανότητα των ουδετεροφίλων να εκκρίνουν παράγοντες ενεργοποίησης των B-λεμφοκυττάρων τα καθιστά ικανά να αλληλεπιδρούν με το σύστημα της προσαρμοστικής ανοσίας και να διαμορφώνουν τις αντισωματικές απαντήσεις, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να διεγείρουν δραστικές λειτουργίες των ουδετεροφίλων. Αυτό υποδεικνύει την πολυπλοκότητα του ανοσιακού συστήματος και τα πολλαπλά επίπεδα ρύθμισης τα οποία εμπλέκονται για να μας προστατεύουν από εξωτερικές απειλές.(89)

Είναι εμφανές λοιπόν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ότι μια σημαντική πρόοδος η οποία υποδεικνύει ότι τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα μπορούν να ρυθμίζουν άμεσα τις B-λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις έρχεται από τις παρατηρήσεις *in vitro* όπου έχει δειχθεί η ικανότητα των ουδετεροφίλων να παράγουν κυτταροκίνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την B-κυτταρική επιβίωση, ωρίμανση και διαφοροποίηση, όπως ο BAFF ο APRIL.

Αυτές οι παρατηρήσεις ισχυροποιήθηκαν από την ανακάλυψη πληθυσμών ουδετεροφίλων οι οποίοι υπό σταθερές συνθήκες αποικίζουν την περιθυλακιώδη περιοχή του ανθρώπινου σπλήνα (καθώς και του ποντικού και του ρέζους μακάκου πιθήκου), και επιδεικνύουν ιδιότητες «βοηθητικές» των B-λεμφοκυττάρων. Αυτοί οι ουδετεροφιλικόι πληθυσμοί ονομάστηκαν “B-cell-helper-neutrophils” (NBH), και έχει δειχθεί ότι ενισχύουν λόγω της εκλεκτικής εντόπισής τους στην οριακή ζώνη, T-κυτταροανεξάρτητες αντισωματικές απαντήσεις από τα B-λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης. Συγκριτικά με τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα τα NBH, εκκρίνουν

μεγαλύτερα επίπεδα παραγόντων κυτταρικής ενεργοποίησης των Β-λεμφοκυττάρων, όπως ο BAFF, ο APRIL, ο CD40L, η IL-21 και η CXCL12, ενώ επιδεικνύουν μεγαλύτερη τάση για παραγωγή NETs. Αντίθετα οι Τ-εξαρτώμενες αποκρίσεις των θυλακιωδών Β-λεμφοκυττάρων έχειδειχθεί ότι δεν επηρεάζονται από τα NBH. Το γεγονός ότι σε ήρεμη φάση οι τίτλοι αντισωμάτων έναντι Τ-ανεξάρτητων αντιγόνων βρέθηκαν μειωμένοι σε ασθενείς με συγγενή ουδετεροπενία, υποστηρίζουν ισχυρά την υπόθεση του ρόλου των ουδετεροφίλων για την διατήρηση των αποκρίσεων των Β-λεμφοκυττάρων της οριακής ζώνης, υπό συνθήκες ομοιόστασης. Οι ιδιότητες των NBH έχουνδειχθεί ότι επάγονται από GM-CSF παραγόμενο από σπληνικά λεμφοκύτταρα της φυσικής ανοσίας, αποκαλύπτοντας έτσι την ύπαρξη ενός δικτύου κυττάρων της φυσικής ανοσίας στα λεμφικά όργανα τα οποία συντηρούν τις αποκρίσεις χυμικής ανοσίας υπό συνθήκες ομοιόστασης. (97)

Αντίστοιχες ενδείξεις υπάρχουν από παρατηρήσεις πληθυσμών ουδετεροφίλων τα οποία εδράζονται στον ερυθρό πολφό του σπλήνα και εμπλέκονται στην εκκαθάριση των παθογόνων. Ένας άλλος πληθυσμός ουδετεροφίλων του αίματος έχειδειχθεί ότι διηθεί την οριακή ζώνη του σπλήνα 24-48 ώρες μετά από λοίμωξη με *S. pneumoniae* και χάρη στην αλληλεπίδραση με το τοπικό μικροπεριβάλλον διαφοροποιείται σε NBH υποστηρίζοντας την Τ-κυτταροανεξάρτητη παραγωγή αντισωμάτων από τα MZ Β-λεμφοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα που περιγράφηκαν από τους Deniset και συν. δεν είναι γνωστό εάν διαθέτουν όμοια χαρακτηριστικά με τους εδράζοντες πληθυσμούς που περιγράφηκαν από τους Puga και συν.(7)

Οι απόψεις δίστανται για το κατά πόσο τα ουδετερόφιλα μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τα θυλακιώδη Β-λεμφοκύτταρα εκτός από αυτά της οριακής ζώνης. Γενικά θεωρούνταν ότι αποκλείονται από τις περιοχές των θυλακίων για παράδειγμα μετά από μία βακτηριακή λοίμωξη. Παρόλ'αυτά πρόσφατες μελέτες έχουνδείξει ότι είναι εφικτή η στρατολόγησή τους στα σπληνικά θυλάκια με τα κατάλληλα σήματα φλεγμονής παρόντα και υφίστανται παραδείγματα συσσώρευσης αυτών σε περιπτώσεις που διασπάται η μικροανατομία του σπλήνα και η δομή του λεμφαδένα.(98)

Σε καταστάσεις αυτοανοσίας κατά τον ίδιο τρόπο οι διάφοροι πληθυσμοί των ουδετεροφίλων μπορούν να συνεισφέρουν στην δημιουργία των αυτοδραστικών κλώνων μέσω της παραγωγής των κυτταροκινών που προαναφέρθηκαν, ενώ σε ποντικούς που λάμβαναν αντι-CD20 θεραπεία έχειδειχθεί ότι συνεισφέρουν στα σπληνικά μακρόβια πλασματοκύτταρα, υποδεικνύοντας έναν πιθανό μηχανισμό που

συνεισφέρει στην αδυναμία απόκρισης ορισμένων ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα στις αντίστοιχες θεραπείες. Βέβαια ο μηχανισμός που χαίρει ιδιαίτερης προσοχής αναφορικά με τον ρόλο των ουδετεροφίλων στα αυτοάνοσα νοσήματα είναι η NETosis. Πληθυσμοί ουδετεροφίλων χαμηλής πυκνότητας (LDGs) σε ασθενείς με SLE και ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν δείχθει ότι επάγουν ισχυρότερες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και έχουν μεγαλύτερη τάση για NETosis, τα οποία διαφέρουν από τον άλλο πληθυσμό χαμηλής πυκνότητας γνωστό και ως κοκκιοκύτταρα-κατασταλτικά μυελικής σειράς (PMN-MDSCs) τα οποία εντοπίζονται σε ασθενείς με καρκίνο, λοιμώξεις και άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις.(56)

Τα NETs εκτός του ότι αποτελούν πηγή αυτοαντιγόνων φέρουν κυτταροκίνες μεσολαβώντας άμεσα την επικοινωνία με τα Β-λεμφοκύτταρα επάγοντας την διαφοροποίησή τους και την παραγωγή πλασματοκυττάρων αλλά και με υποπληθυσμούς δενδριτικών κυττάρων επάγοντας την παραγωγή IFN-α.(99)

Όπως προαναφέρθηκε τα B_{NH} με τη σειρά τους συμμετέχουν μέσω της παραγωγής BAFF και APRIL στην ανάπτυξη της Β-ΧΛΛ σε ποντίκια και τέλος έχει δείχθει σε μοντέλο ποντικού ο ρόλος των NETs και η αλληλεπίδρασή τους με τα CD5⁺ Β-λεμφοκύτταρα, ως μέρος του μηχανισμού παθογένεσης για τη μετάβαση από την αυτοανοσία στο λέμφωμα.(100)

III. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Η διαγνωστική προσέγγιση των πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών και των διαταραχών απορρύθμισης του ανοσιακού (PID και PIDD αντίστοιχα) αναφέρονται και ως συγγενείς βλάβες της ανοσίας (IEI), τυπικά άρχεται στην εκδήλωση (α) λοίμωξης υψηλής σοβαρότητας, υψηλής συχνότητας λοιμώξεων, ή λοίμωξης από οπορτουνιστικά παθογόνα, (β) συμπτώματα απορρύθμισης του ανοσιακού όπως πολυοργανική ή πρώιμης έναρξης αυτοανοσία, ή αυτοφλεγμονή και/ή (γ) κλινικές ενδείξεις ανοσοανεπάρκειας σε ασθενή με χαρακτηριστικά κάποιου συνδρόμου ή νεοπλασίας. Άλλες ενδείξεις όπως το θετικό οικογενειακό ιστορικό, αναπτυξιακές βλάβες, λεμφοπενία, υπογαμμασφαιριναιμία, η παρατεταμένη ανάγκη για ενδοφλέβια αντιβιοτική αγωγή είναι μεταξύ των πιο χαρακτηριστικών σημείων που ωθούν τους ιατρούς για περαιτέρω διερεύνηση προς στην κατεύθυνση της ανοσοανεπάρκειας.(101)

Οι σύγχρονες τεχνολογίες και η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν καταστήσει δυνατή τη χρήση της αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) για τη διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα στοχευμένα γονιδιακά πάνελ ή αλληλούχιση όλου του μεταγραφώματος ή του γονιδιώματος, τα οποία είναι διαθέσιμα σε όλο και περισσότερα κέντρα και χώρες παγκοσμίως. Εξαιτίας του μειωμένου κόστους συγκριτικά με τις παραδοσιακές γενετικές αναλύσεις και την αποδεδειγμένη αποδοτικότητα κόστους αυτά τα νέα εργαλεία έχουν αρχίσει να εφαρμόζονται νωρίτερα στη διαφοροδιαγνωστική διαδικασία. Επιπρόσθετα η ένταξη σοβαρών συνδυασμένων ή άλλων σοβαρών ανοσοανεπαρκειών στα προγράμματα γενετικής σάρωσης των νεογνών έχει καθιερωθεί σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο, καθιστώντας εφικτή την έγκαιρη διάγνωση και κατ'επέκταση το χειρισμό και τη βιωσιμότητα ασθενών με εγγενείς βλάβες της ανοσίας.(102–104)

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές πάνω από 340 μονογονιδιακές εγγενείς βλάβες της ανοσίας, αριθμός ο οποίος αυξάνεται ταχέως. Η διεθνής ένωση των ανοσολογικών εταιριών δημοσιεύει ανά διετία την ταξινόμηση των PIDs η οποία κατατάσσει αυτές σε 9 κατηγορίες ανάλογα με την υποκείμενη μοριακή βλάβη. Επιπρόσθετα της λίστας γονιδίων που σχετίζονται με τις PIDs με σύντομη περιγραφή των κύριων εργαστηριακών και κλινικών ευρημάτων, πρόσφατα έχει δημοσιευτεί έγγραφο συμφωνίας για τη διάγνωση με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά προκειμένου να επεκτείνει και να βελτιώσει την πρακτική χρήση της εν λόγω ταξινόμησης.(105)

Η καταγραφή για μια μεγάλη, ετερογενή και φαινοτυπικά αλληλεπικαλυπτόμενη ομάδα διαταραχών όπως οι εγγενείς βλάβες της ανοσίας απαιτεί αυστηρά κριτήρια για την ταξινόμηση των νοσημάτων προκειμένου να είναι εφικτή η σωστή εισαγωγή δεδομένων.

Η διάγνωση των IEI θεωρείται οριστική στις περιπτώσεις όπου έχει ταυτοποιηθεί μία γνωστή μονογονιδιακή παθολογική αλλαγή η οποία εξηγεί τον φαινότυπο, παρόλο που ο λειτουργικός έλεγχος αυτών των αλλαγών δεν απαιτείται για επιβεβαίωση μέχρι στιγμής. (105)

Παρόλ'αυτά, παρά τις τεχνολογικές προόδους στη διαγνωστική, η πλειοψηφία των ασθενών δεν έχει μία οριστική γενετική διάγνωση. Γι'αυτό κλινικά κριτήρια έχουν καθιερωθεί προκειμένου να ταξινομηθούν ορθώς η πλειοψηφία των ασθενών στη καταγραφή της ESID, ανά κατηγορία νόσου παρόλο που η γενετική αιτία είναι άγνωστη.(101) (Πίνακας 1)

Επιπρόσθετα, σε μία υποομάδα ασθενών των οποίων το υποκείμενο γενετικό αίτιο έχει ταυτοποιηθεί, ο φαινότυπος διαφέρει από την αναμενόμενη, γονοτυπικά σχετιζόμενη, κλινική εικόνα. Κάποιοι από αυτούς τους ασθενείς μπορεί να έχουν διπλούς ή πολλαπλούς γονότυπους οδηγώντας στην έκφραση ενός μικτού φαινότυπου. Σε άλλη υποομάδα ασθενών, η πορεία της νόσου μπορεί να είναι προοδευτική, οδηγώντας στην αλλαγή για παράδειγμα από CVID σε CID ή σε άλλη IEI κατηγορία.(105)

III.1. Ταξινόμηση πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών: διαγνωστικά κριτήρια και θεραπεία

Οι συγγενείς βλάβες της ανοσίας, γνωστές και ως πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, εκδηλώνονται ως αυξημένη επιρρέπεια σε λοιμώδη νοσήματα, αυτοάνοσα και αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, αλλεργία, και/ή κακοήθη νοσήματα. Αυτές οι καταστάσεις προκαλούνται από μονογονιδιακές μεταλλάξεις της γενετικής σειράς, οι οποίες οδηγούν στην απώλεια έκφρασης, στην απώλεια λειτουργίας (Loss Of Function-LOF, αμορφικές, υπομορφικές), ή σε κέρδος λειτουργίας (Gain-Of-Function, GOF, υπερμορφικές) της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης. Οι ετερόζυγες βλάβες μπορεί να υπόκεινται αυτοσωμικών επικρατών χαρακτήρων μέσω GOF, απλοανεπάρκειας, ή αρνητικής επικράτησης (negative dominance). Οι διαλληλικές αλλοιώσεις προκαλούν συνήθως αυτοσωμικούς υπολειπόμενους χαρακτήρες μέσω LOF της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης (σπάνιως GOF), ενώ οι φυλοσύνδετοι (X-linked) υπολειπόμενοι χαρακτήρες προκύπτουν από LOF γονιδίων του X- χρωμοσώματος, είτε σε ημίζυγη κατάσταση για τους άρρενες, είτε σε ομόζυγη κατάσταση για τα θήλεα. Σπάνια φυλοσύνδετοι επικρατείς χαρακτήρες μπορεί να προκύψουν από LOF ή GOF ποικιλόμορφα. Αυτό οδηγεί σε αθρόα λειτουργία της ανοσίας, λόγω των κρίσιμων ρόλων αυτών των πρωτεϊνών στην ανάπτυξη, τη διατήρηση και την λειτουργία των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος, ή άλλων κυττάρων εκτός των λευκοκυττάρων τα οποία συνεισφέρουν στην ανοσία, κατά την ομοιόσταση και ως απόκριση σε εξωγενή (π.χ. λοιμογόνους παράγοντες και περιβαλλοντικά αντιγόνα) και σε ενδογενή (π.χ. κυτταροκίνες, αυτοαντιγόνα και νεοπλασματικά κύτταρα) ερεθίσματα.(106) Οι εγγενείς βλάβες της ανοσίας θεωρούνταν παραδοσιακά ως σπάνια νοσήματα, επηρεάζοντας 1/10000 με 1/50000 γεννήσεις. Παρόλ' αυτά με τη συνεχή ανακάλυψη νέων βλαβών και τον βελτιωμένο ορισμό των κλινικών φαινοτύπων, ο συλλογικός

επιπολασμός αυτών των καταστάσεων είναι πιο πιθανό να προσεγγίζει τη συχνότητα 1/1000-1/5000.(105)

Ανεξάρτητα από την ακριβή συχνότητα και επιπολασμό, οι ΙΕΙ αντιπροσωπεύουν ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη σύνδεση συγκεκριμένων μονογονιδιακών βλαβών με κλινικούς φαινοτύπους απορρύθμισης του ανοσιακού, με την ευρεία έννοια του όρου. Η ανθρώπινη ανοσία περιλαμβάνει και άλλα κύτταρα πλην των κυκλοφορούντων ή των ιστικών λευκοκυττάρων και κυμαίνεται από το ανοσιακό σύστημα μέχρι και ολόκληρο τον οργανισμό.

Οι ΙΕΙ έχουν αποκαλύψει μη-πλεονάζοντες ρόλους μοναδικών γονιδίων και των προϊόντων τους στη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος και έχουν θέσει τη βάση για βελτιωμένες θεραπείες που στοχεύουν στους υποκείμενους μηχανισμούς της ανοσοπαθολογίας πολλών νοσημάτων. Επιπρόσθετα έχουν καθιερωθεί ως ανοσολογικά παραδείγματα αντιπροσωπεύοντας τα θεμέλια για τη βασική, κλινική και μεταφραστική ανοσολογία, ενώ παρέχουν και γνώση αναφορικά με τη μοριακή παθογένεση και πιο κοινών νοσημάτων. Έτσι η μελέτη των ΙΕΙ έχει προσφέρει σημαντική πρόοδο στην εξάσκηση της στοχευμένης μοριακής ιατρικής.

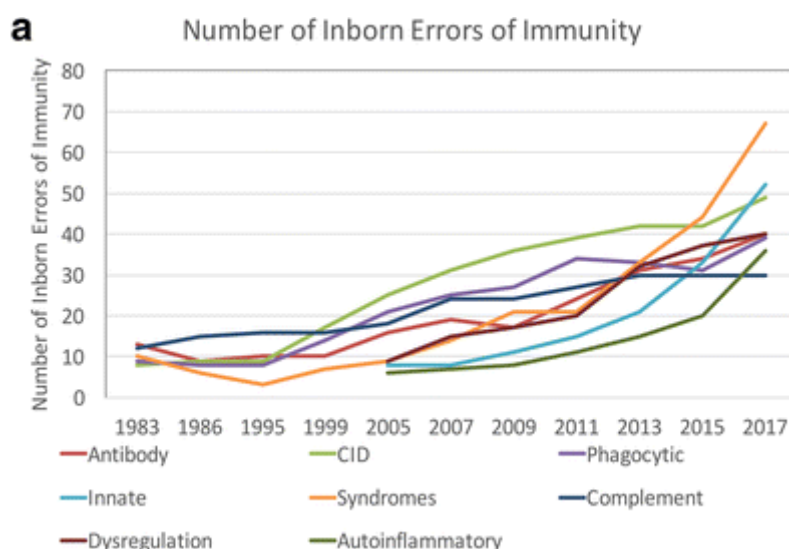
Στην τελευταία δημοσίευση της επικαιροποιημένης κατάταξης των ΙΕΙ από την επιτροπή των εμπειρογνομόνων της Διεθνούς Ένωσης των Ανοσολογικών Εταιριών, παρουσιάζονται δέκα διακριτοί πίνακες ταξινόμησης. Αυτοί είναι οι εξής: 1) Συνδυασμένες ανοσοανεπάρκειες, 2) Συνδυασμένες ανοσοανεπάρκειες με συνδρομικά χαρακτηριστικά, 3) Κατά κύριο λόγο αντισωματικές ανεπάρκειες, 4) Νοσήματα απορρύθμισης του ανοσιακού, 5) Συγγενείς βλάβες φαγοκυττάρων, 6) Βλάβες της ενδογενούς και φυσικής ανοσίας, 7) Αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, 8) Ανεπάρκειες συμπληρώματος, 9) Νοσήματα ανεπάρκειας του μυελού των οστών, 10) Φαινοτυπικά αντίγραφα (φαινοαντίγραφα-phenocopies) των εγγενών βλαβών της ανοσίας.(105)

Η ταξινόμηση σε διακριτούς φαινοτύπους δεν υπονοεί και ομοιογένεια αυτών. Είναι γνωστό ότι υφίσταται αξιοσημείωτη φαινοτυπική και κλινική ετερογένεια εντός ομάδων ασθενών με βλάβες στο ίδιο γονίδιο αλλά ακόμα και μεταξύ ατόμων του ίδιου γενεαλογικού δέντρου οι οποίοι φέρουν ακριβώς την ίδια γονιδιακή μετάλλαξη. (106) Χάριν απλοποίησης της ταξινόμησης, κάθε διαταραχή κατατάσσεται σε μία μόνο κατηγορία, αν και διακριτές διαταραχές οι οποίες οφείλονται όμως σε βλάβες των ίδιων γονιδίων, αλλά παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα κληρονομικότητας και παθογενετικούς μηχανισμούς κατατάσσονται εν τέλει σε ξεχωριστές κατηγορίες.(105)

Η πρώτη προσπάθεια ταξινόμησης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών έλαβε χώρα από επιτροπή εμπειρογνομόνων του ΠΟΥ το 1970 και συγκεκριμένα από τους Fudenberg, Good, Hitzig, Kunkel, Roitt, Rosen, Rowe, Seligmann, και Soothill. Αυτή η πρώτη προσπάθεια είχε εστιαστεί στην κατανόηση του εάν οι ανοσοανεπάρκειες μπορούν να ταξινομηθούν ως διαταραχές των Β ή των Τ-λεμφοκυττάρων.

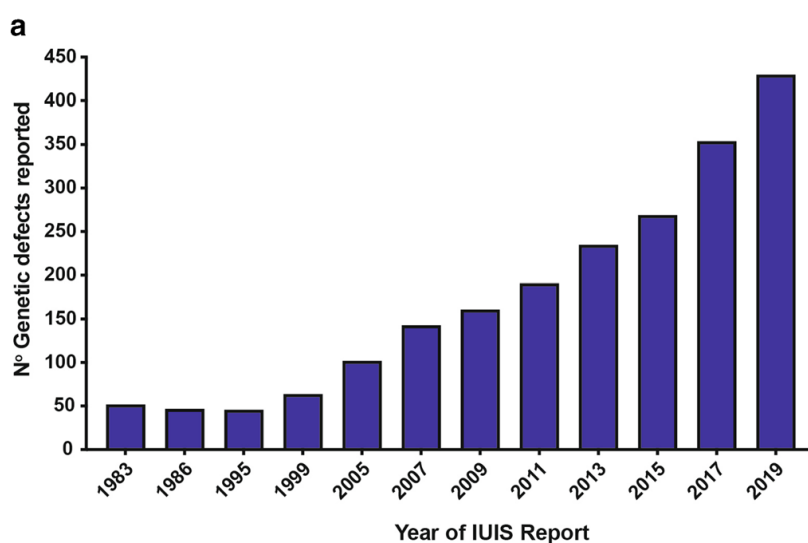
Η αρχική τους αναφορά είχε ταυτοποιήσει 16 διακριτές ανοσοανεπάρκειες ενώ είχε από τότε θέσει το «προφητικό σχόλιο» ότι *«η ομάδα της ποικίλης ανοσοανεπάρκειας πιθανότατα αποτελεί συνάθροιση μιας σειράς συνδρόμων...Συμπεριλαμβανόμενες σε αυτήν την ομάδα είναι περιπτώσεις που προηγουμένως είχαν ταξινομηθεί ως συγγενής, μη-φυλοσύνδετη υπογαμμασφαιριναιμία, πρωτοπαθής δυσγαμμασφαιριναιμία της παιδικής ηλικίας και των ενηλίκων και η «επίκτητη» πρωτοπαθής υπογαμμασφαιριναιμία. Ελπίζουμε ότι η σωστή ανάλυση αυτών των ασθενών...θα οδηγήσει στην σκιαγράφηση πολλών ομοιογενών συνδρόμων...»*(107)

Από την πρώτη εφαρμογή της NGS για την ταυτοποίηση νέων IEI που δημοσιεύτηκε το 2010, μέχρι σήμερα, περίπου το 45% του συνόλου των περιγεγραμμένων ποικιλόμορφων ανακαλύφθηκε με χρήση τεχνολογίας whole exome/genome sequencing.(108)



Εικόνα 2: Κατηγοριοποίηση των εγγενών βλαβών της ανοσίας σύμφωνα με την δημοσιευμένη καταγραφή του 2018. Picard *et al.* J Clin Immunol (2018). Στα 20.000 γονίδια του ανθρώπου οι IEI αφορούν σε μεταλλάξεις του 1,7% των γονιδίων.

Στην τελευταία καταγραφή του 2020 αναγράφονται 404 ανοσολογικά νοσήματα και 430 γνωστές γενετικές βλάβες οι οποίες αιτιολογούν αυτές τις καταστάσεις.(105) Μόλις στη δημοσίευση της ταξινόμησης του 2018 υπήρχε αναφορά για 354 διακριτές διαταραχές με 344 διαφορετικές γενετικές βλάβες.(108) Αυτό υποδεικνύει ότι πρόκειται για ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο, χάριν στην εξέλιξη των νέων τεχνολογιών που έχουν δώσει τα εργαλεία στον επιστημονικό και στον ιατρικό κόσμο, που οδηγεί εν τέλει και στην καλύτερη διαχείριση των ασθενών αυτών και στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.(105) (Εικόνες 2 και 3)



Εικόνα 3: Ρυθμός ανακάλυψης νέων εγγενών βλαβών ανοσίας από το 1983 έως το 2019. Κάθε στήλη επικονίζει τον αριθμό των υποκείμενων μονογονιδιακών βλαβών όπως αυτές αναφέρθηκαν από την επιτροπή IUIS/WHO το κάθε έτος. Tangye *et al.*, J Clin Immunol (2020)

Πίνακας 1: Κριτήρια για την κλινική διάγνωση PID για την CVID, τις αταξινόμητες αντισωματικές ανεπάρκειες και τη συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (CID)

Νόσος	Κλινικά κριτήρια για διάγνωση πιθανής ανοσοανεπάρκειας
CVID	Τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα:
	1) Αυξημένη επιρρέπεια σε λοιμώξεις
	2) Αυτοάνοσες εκδηλώσεις
	3) Κοκκιοματώδης νόσος
	4) Ανεξήγητη πολυκλωνική λεμφοϋπερπλασία
	5) Μέλος της οικογένειας με αντισωματική ανεπάρκεια (θετικό οικογενειακό ιστορικό)
	ΚΑΙ αξιοσημείωτη μείωση IgG και IgA με ή χωρίς χαμηλά επίπεδα (Σε τουλάχιστον δύο μετρήσεις: <2SD των φυσιολογικών επιπέδων για την ηλικία)
	ΚΑΙ τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα:
	1) Φτωχές αντισωματικές αποκρίσεις στα εμβόλια (και/ή απύουσες ισοαιμαγλουτινίνες). Δηλαδή απουσία προστατευτικών επιπέδων όπου αυτά ορίζονται παρά τον εμβολιασμό.
	2) Χαμηλά επίπεδα switched- memory B-λεμφοκυττάρων (B-λεμφοκυττάρων μνήμης, με ισοτυπική μεταστροφή) (<70% της φυσιολογικής τιμής ανάλογα με την ηλικία)
	ΚΑΙ μετά από αποκλεισμό δευτεροπαθούς υπογαμμασφαιραιμίας (λοιμώξη, απώλεια πρωτεϊνών, φάρμακα, νεοπλασματικά νοσήματα)
	ΚΑΙ η διάγνωση τίθεται μετά το τέταρτο ηλικιακό έτος (αν και τα συμπτώματα μπορεί να είναι παρόντα νωρίτερα)
	ΚΑΙ απουσία ενδείξεων για σοβαρές T-λεμφοκυτταρικές ανεπάρκειες, όπως αυτές ορίζονται από τουλάχιστον δύο από τα παρακάτω σημεία (y= years of life):
	1) CD4 κύτταρα/μL: 2-6 y < 300, 6-12 y < 250, >12 y < 200
	2) % παρθένων CD4: 2-6 y < 25%, 6-16 y < 20%, >16 y < 10%
	3) Απουσία πολλαπλασιασμού T-λεμφοκυττάρων
	Τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω

Αταξινόμητες αντισωματικές ανεπάρκειες		Υποτροπιάζουσες ή σοβαρές λοιμώξεις
		Αυτοάνοσες εκδηλώσεις (ιδιαίτερα αυτοάνοσες κυτταροπενίες)
		Πολυκλωνική λεμφοϋπερπλασία
		Θετικό οικογενειακό ιστορικό
		ΚΑΙ τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα
		Αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων τουλάχιστον μίας από τις: ολική IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgA, ή IgM
		Απουσία ειδικών αντισωματικών απαντήσεων μετά από εμβολιασμό
		ΚΑΙ μετά από αποκλεισμό δευτεροπαθούς υπογαμμασφαιριναιμίας (λοιμώξη, απώλεια πρωτεϊνών, φάρμακα, νεοπλασματικά νοσήματα)
		ΚΑΙ απουσία κλινικής συμπτωματολογίας, σχετιζομένης με T-λεμφοκυτταρικές διαταραχές
		ΚΑΙ δεν πληροί κανένα από τα υπόλοιπα προαναφερθέντα κριτήρια
		Τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα
		Τουλάχιστον μία σοβαρή λοίμωξη (με ανάγκη νοσηλείας)
		Μία εκδήλωση απορρύθμισης του ανοσιακίου (αυτοάνοσες εκδηλώσεις, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, σοβαρό έκζεμα, λεμφοϋπερπλασία, κοκκίωμα, νεοπλασματική νόσος)
CID		Θετικό οικογενειακό ιστορικό
		ΚΑΙ να πληρούνται 2 από τα 4 κριτήρια σχετικά με τα T-λεμφοκύτταρα
		Χαμηλοί απόλυτοι αριθμοί CD3 ή CD4 ή CD8 T-λεμφοκυττάρων (σύμφωνα με τις τιμές αναφοράς της εκάστοτε ηλικιακής κλάσης)
		Μειωμένοι απόλυτοι αριθμοί παρθένων CD4 και/ή CD8 T cells
		Υψηλός απόλυτος αριθμός γ/δ T-λεμφοκυττάρων
		Μειωμένος πολλαπλασιασμός μετά από επίδραση με μιτογόνα και διέγερση του TCR υποδοχέα
		ΚΑΙ μετά από αποκλεισμό λοίμωξης από HIV
		ΚΑΙ αποκλεισμός κλινικής διάγνωσης η οποία σχετίζεται με CID όπως συγκεκριμένα σύνδρομα,DKC, AT, CHH)

AT, Ataxia teleangiectasia; CHH, cartilage hair hypoplasia; DKC, dyskeratosis congenita; IBD, inflammatory bowel disease; SD, standard deviation; TCR, T-cell receptor.

Seidel MG *et al.* The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019

Οι αντισωματικές ανεπάρκειες συνιστούν τις πιο συχνές πρωτοπαθείς ανεπάρκειες με κλινική σημασία. Πολλές από αυτές είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένες. Οι δευτεροπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες μπορεί να προκύψουν ως συνέπεια πολλών άλλων νοσημάτων, αλλά και ως ανεπιθύμητη ενέργεια μιας σειράς φαρμακευτικών παραγόντων. Παρά τη διαφορά στον παθογενετικό μηχανισμό, οι κλινικές εκδηλώσεις είναι συνήθως παρόμοιες και συμπεριλαμβάνουν υποτροπιάζουσες και σοβαρές λοιμώξεις από θετικά κατά gram βακτήρια, κυρίως στο ανώτερο και στο κατώτερο αναπνευστικό.(109) Σε αυτές τις περιπτώσεις όμως οι θεραπευτικές προσεγγίσεις διαφέρουν. Στην περίπτωση των δευτεροπαθών αντισωματικών ανεπάρκειών, η αντιμετώπιση της πρωτογενούς αιτίας που οδήγησε σε αυτές είναι πολλές φορές δυνατή. Σε ασθενείς με ήπιες εκδηλώσεις ακολουθείται η προσέγγιση τύπου “watch and wait”, δηλαδή η παρακολούθηση της εξέλιξης της κλινικής εικόνας του ασθενούς, προ της έναρξης της θεραπείας υποκατάστασης καθώς η χορήγηση αντιβιοτικών μπορεί να αποδειχθεί επαρκής. Σε άλλες περιπτώσεις η χορήγηση γ-σφαιρίνης είναι η πιο αποτελεσματική θεραπεία. (110)

Σε ασθενείς με σαφή κλινική διάγνωση πρωτοπαθούς αντισωματικής ανεπάρκειας, η σύσταση είναι η άμεση έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης. Εξάιρεση αποτελούν οι περιπτώσεις εκλεκτικής IgA ανεπάρκειας, καθώς και η παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της παιδικής ηλικίας. Αντίστοιχα βέβαια και σε άλλες περιπτώσεις απειλητικών για τη ζωή ανοσοανεπάρκειών όπως οι SCID και οι CID οι οποίες μπορεί να σχετίζονται ή και όχι με συνδρομικά χαρακτηριστικά (όπως το σύνδρομο Wiskott-Aldrich, αν και όχι πάντα στις περιπτώσεις της Αταξίας-τελαγγειεκτασίας ή στο Nijmegen breakage σύνδρομο), η έναρξη θεραπείας υποκατάστασης είναι άμεση.(110)

III.2. Δευτεροπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες

Οι δευτεροπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο εύρος αιτιών, συμπεριλαμβανομένων των Β-λεμφοϋπερπλαστικά νοσημάτων, την απώλεια πρωτεϊνών από τη γαστρεντερική και νεφρική οδό, την προβληματική λεμφατική κυκλοφορία, τον αυξημένο καταβολισμό και τα φάρμακα. Η αυξημένη χρήση των θεραπειών που στοχεύουν στα Β-λεμφοκύτταρα όπως το rituximab, ιδιαίτερα όταν αυτό χορηγείται ως θεραπεία συντήρησης και/ή σιγχορηγείται με άλλους

φαρμακευτικούς παράγοντες, οδηγεί όλο και σε περισσότερους ασθενείς με δευτεροπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες. Τέτοιου είδους θεραπείες δεν περιορίζονται μόνο στο rituximab αλλά περιλαμβάνουν και τις T-θεραπίες που εκφράζουν χειμερικούς αντιγονικούς υποδοχείς (CART) το atacicept, το οποίο είναι ανθρωποποιημένη σύνθετη πρωτεΐνη του TACI υποδοχέα και το imatinib (εκλεκτικός αναστολέας τυροσινικών κινασών). Σε βάθος χρόνου θα πρέπει να συλλεχθούν δεδομένα αναφορικά με τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών και τις λοιμώξεις σε ασθενείς που λαμβάνουν ibrutinib (αναστολέας του BTK) και idelalisib (PI3Kδ- αναστολέας). Πολλά από αυτά τα μόρια στόχοι, είναι γνωστά στους ανοσολόγους, καθώς μεταλλάξεις στα σχετικά γονίδια έχουν δείχθει ότι προκαλούν PID. Αυτή η έκρηξη στις νέες θεραπείες και η βελτιωμένη επιβίωση είναι πιθανόν να οδηγήσουν στην αύξηση της συχνότητας των αντισωματικών ανεπαρκειών. Από την άλλη, πιο συμβατικά ανοσοκατασταλτικά φάρμακα μπορεί να προκαλούν αντισωματικές ανεπάρκειες και πλέον υπάρχουν νέες ενδείξεις ότι επιλεγμένοι ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν θεραπείες στα πλαίσια μεταμόσχευσης οργάνων, ωφελούνται από τη θεραπεία υποκατάστασης. Από την άλλη στις περιπτώσεις ασθενών όπου οι ανεπάρκειες οφείλονται σε απώλειες πρωτεϊνών από τον οργανισμό, προτιμάται η χορήγηση αντιβιοτικών ως προσέγγιση πρώτης γραμμής και όταν απαιτείται η θεραπεία υποκατάστασης, τότε η προτίμηση για τον τρόπο χορήγησης αυτής είναι η υποδόρρια οδός, λόγω της φαρμακοκινητικής αυτής. Συγκεκριμένα κατά την υποδόρρια οδό αποφεύγονται τα υψηλά επίπεδα και οι μακρύτεροι κύκλοι χορήγησης της ενδοφλέβιας, καθώς τα συνολικά επίπεδα αντισωμάτων βελτιώνονται λόγω της συχνότερης χορήγησης και της μεγάλης απώλειας που είναι επακόλουθο της ενδοφλέβιας χορήγησης, οδηγώντας κατ'επέκταση στη μείωση της συχνότητας των λοιμώξεων. (110–112)

III.3. Αξιολόγηση ασθενών

Η αξιολόγηση των ασθενών αφορά στη συλλογή κλινικών, ακτινολογικών και εργαστηριακών δεδομένων και άρχεται με την αξιολόγηση του κλινικού ιστορικού του ασθενούς εστιάζοντας στο ιστορικό των λοιμώξεων.

Αναλυτικότερα οι πληροφορίες αυτές αφορούν στο χρόνο έναρξης των λοιμώξεων, στο σημείο-όργανο που προσβάλλεται, στο τύπο του παθογόνου, στη διάρκεια αυτών, εποχικότητα, συχνότητα, σοβαρότητα, την ανάγκη για λήψη δια του στόματος ή

ενδοφλέβια αντιβιοτικής αγωγής, ή την ανάγκη νοσηλείας. Κατ'αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαλευκανθεί εάν ο ασθενής έπασχε από εμμένουσες ή υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. (113)

Η εργαστηρική αξιολόγηση αφορά σε πρώτη φάση τη μέτρηση των συνολικών επιπέδων των ανοσοσφαιρινών στον ορό (IgG, IgA και IgM) καθώς επίσης και των ειδικών αντισωμάτων έναντι τετάνου, αιμόφιλου και πνευμονιόκοκκου, αν και άλλοι τύποι ειδικών αντισωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθούν κατά τη διερεύνηση εναλλακτικά. Στόχος είναι η αξιολόγηση της ποσότητας αλλά και της ποιότητας (αποκρίσεις σε συζευγμένα και μη- εμβόλια) της χυμικής ανοσίας. Επιπρόσθετα διερευνώνται οι βασικές αιματολογικές παράμετροι καθώς και η ηπατική και η νεφρική λειτουργία, τα επίπεδα αλβουμίνης και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη.(114) Με κυτταρομετρία ροής διερευνώνται ο φαινότυπος των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών καθώς επίσης και οι σχετικοί και απόλυτοι αριθμοί τους. Κατ'αυτόν τον τρόπο μπορούν να διερευνηθούν οι πληθυσμοί μνήμης των B-λεμφοκυττάρων καθώς επίσης και τυχόν διαταραχές των T και NK λεμφοκυττάρων, ενώ τέλος μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο κάποιας αιματολογικής κακοήθους διαταραχής. (115)

III.3.α. Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια: Φαινότυποι

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια συνιστά μία ετερογενή συλλογή διαταραχών όπου κοινό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό είναι αδυναμία αντισωματικών απαντήσεων. Η CVID αποτελεί την πιο κοινή διάγνωση εντός της ομάδας των πρωτοπαθών αντισωματικών ανεπαρκειών και αποτελεί την πλειοψηφούσα διάγνωση (57%) των συμπτωματικών πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στην καταγραφή της ESID.(101)

Η CVID αποτελεί μία σημαντική νόσο όχι μόνο λόγω του επιπολασμού της (1/25.000-50.000) αλλά και εξαιτίας της απαίτησης για συχνή ιατρική παρακολούθηση και παρέμβαση. Η νοσηρότητα επιδεινώνεται σε μεγάλο βαθμό εξαιτίας της καθυστέρησης της διάγνωσης η οποία κατά μέσο όρο προσεγγίζει τα 6-7 έτη, μέχρι την έναρξη της θεραπείας.(116)

Η διάγνωση κατά την παιδική ηλικία δυσχαιρένεται καθώς τίθεται στη διαφορική διάγνωση η παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της παιδικής ηλικίας, η οποία δεν μπορεί παρά να ελεγχθεί στην πάροδο του χρόνου και να τεθεί εν τέλει διάγνωση μετά το πέρας του 4^{ου} ηλικιακού έτους.(117)

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η τεχνολογική πρόοδος στα μέσα γενετικής διάγνωσης επέτρεψε την ταυτοποίηση διακριτών γονιδίων που αιτιολογούν την πλειοψηφία των πιο καλά περιγεγραμμένων ανοσοανεπαρκειών. Έχουν υπάρξει σημαντικοί πρόοδοι στην κατανόηση της μοριακής βάσης σοβαρών συνδυασμένων ανοσοανεπαρκειών και της επιρρέπειας σε μυκοβακτηριδιακές λοιμώξεις. Στις αντισωματικές ανεπάρκειες έχουν ταυτοποιηθεί οι μεταλλάξεις που αιτιολογούν το 90% των βλαβών των πρώιμων Β-λεμφοκυττάρων και ομοίως στα σύνδρομα υπερ-IgM έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια για το 70%-80% των περιπτώσεων. (118)

Η κατηγοριοποίηση της CVID σε κλινικούς φαινότυπους πραγματοποιείται προκειμένου να καταστεί εφικτή η καλύτερη πρόγνωση της πορείας της νόσου και οι επιπλοκές και κατ'επέκταση ο καλύτερος χειρισμός των ασθενών, ιδιαίτερα όταν δεν έχει ταυτοποιηθεί η υποκείμενη γενετική βλάβη γι'αυτούς τους ασθενείς.

Επιπρόσθετα οι διακριτοί κλινικοί φαινότυποι επιτρέπουν τη σύγκριση πιο ομογενών ομάδων ασθενών εντός της ίδιας μελέτης. Οι κλινικοί φαινότυποι έχουν περιγραφεί μετά από ανάλυση μεγάλων κοορτών ασθενών και διακρίνονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες.(119)

- 1) Μόνο λοιμώξεις- χωρίς άλλες επιπλοκές.
- 2) Κυτταροπενίες (θρομβοπενία, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και/ή ουδετεροπενία)
- 3) Πολυκλωνική λεμφοϋπερπλασία (κοκκιωματώδης νόσος, διάμεση πνευμονία με λεμφοκυτταρικές διηθήσεις, εμμένουσα, ανεξήγητη λεμφαδενοπάθεια)
- 4) Ανεξήγητη εντεροπάθεια.

Είναι αναμενόμενο το γεγονός ότι αυτοί οι φαινότυποι σχετίζονται και με διαφορετικούς βιολογικούς μηχανισμούς, ενώ η παρουσία μίας μόνο μη-λοιμώδους επιπλοκής οδηγεί σε αύξηση της θνητότητας σχεδόν 11 φορές παραπάνω.

Οι ασθενείς που δεν παρουσίαζαν άλλες κλινικές εκδηλώσεις πλην των λοιμώξεων, παρουσίασαν μακροπρόθεσμη επιβίωση της τάξης του 95% συγκριτικά με αυτούς που παρουσίασαν και άλλες εκδηλώσεις, όπου το ποσοστό επιβίωσης ανέρχεται στο 42%.

Ανάλυση διακριτών κοορτών διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης έδειξε μεγάλη ποικιλομορφία με τους Σουηδούς π.χ. να παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερο επιπολασμό (12%) λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών, συγκριτικά με τους Τσέχους (54%). Αυτές οι διαφορές υποδεικνύουν τις πιθανές διαφορές γενετικού υποβάθρου οι οποίες εκφράζονται σε φαινοτυπικό επίπεδο αν και πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός

της διαφορετικής θεραπευτικής προσέγγισης και της ενδεχόμενης επίπτωσης που έχει στην έκφραση του κλινικού φαινοτύπου (π.χ. εκτεταμένη χρήση προφυλακτικής αντιβιοτικής αγωγής).(119)

Όταν οι αυτοάνοσες εκδηλώσεις διακρίνονται σε οργανοειδικές και σε κυτταροπενίες, διαπιστώνεται ότι η μειωμένη βιωσιμότητα σχετίζεται με τις κυτταροπενίες, αν και υπάρχουν μελέτες που δεν έδειξαν μείωση της βιωσιμότητας σχετιζόμενη με την αυτοανοσία.(120)

Η λεμφοϋπερπλαστική επέκταση των κυττάρων στους ιστούς εκδηλώνεται ως μη-νεκρωτικά κοκκιώματα, κυρίως στους πνεύμονες, στους λεμφαδένες, στο ήπαρ, στον σπλήνα, αλλά και σε άλλα σημεία συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου. Η εύρεση κοκκιοματωδών βλαβών δυσχεραίνει τη διάγνωση καθώς συχνά μπορεί να θεωρηθεί εσφαλμένα ως σαρκοείδωση.(121)

Η σπληνομεγαλία, μπορεί να είναι μεγάλη στην CVID και να απαιτεί τη διενέργεια σπληνεκτομής λόγω κυτταροπενιών και πόνου και έχει δείχθει αποτελεσματική προσέγγιση αν και έχει δείχθει ότι και η χρήση του rituximab είναι αποτελεσματική έναντι των κυτταροπενιών και μπορεί να μειώσει την ανάγκη σπληνεκτομής. (120)

Από την άλλη η θεραπεία λεμφοϋπερπλαστικών και φλεγμονωδών επιπλοκών, ιδιαίτερα όταν αυτές επηρεάζουν τους πνεύμονες, το έντερο, το ήπαρ, αποτελεί πρόκληση καθώς πρέπει να βρεθεί η κρίσιμη ισορροπία χορήγησης ανοσοκατασταλτικών θεραπειών σε έδαφος όμως ανοσοανεπαρκειών.(122)

Η εργαστηριακή διερεύνηση όπως έχει προταθεί από το EUROClass σύστημα ταξινόμησης των B-λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής, έχει αναδείξει την κύρια παρατήρηση παθολογίας, η οποία αφορά σε σοβαρή μείωση των B-λεμφοκυττάρων μνήμης με ισοτυπική μεταστροφή, (SmB^- ορίζονται όταν τα $IgD^+IgM^+CD27^+$ αποτελούν $<2\%$ των $CD19^+B^-$ κυττάρων) στην πλειοψηφία των ασθενών με CVID.(115)

Η μείωση των κυττάρων μνήμης με ισοτυπική μεταστροφή υποδεικνύει ανεπάρκεια λειτουργίας του βλαστικού κέντρου η οποία αποτελεί προαπαιτούμενο για τον T-εξαρτώμενο σχηματισμό αντισωμάτων.

Παρόλ' αυτά τα μειωμένα επίπεδα των B-κυττάρων μνήμης με ισοτυπική μεταστροφή δεν αποτελούν δείκτη αποκλειστικά της CVID καθώς χαρακτηρίζουν και άλλες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες όπως το φυλοσύνδετο υπερ-IgM σύνδρομο, το σύνδρομο Wiskott-Aldrich, το φυλοσύνδετο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο, την ιδιοπαθή CD4-λεμφοπενία καθώς και τη χρόνια κοκκιοματώδη νόσο. (123)

Ο SmB⁻ φαινότυπος έχει σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σπληνομεγαλίας και κοκκιωματώδους νόσου.

Επέκταση των μεταβατικών B-λεμφοκυττάρων (Tr^{hi}>9% CD38^{hi} IgM^{hi}) στους SmB⁻ ασθενείς έχει συνδεθεί με λεμφαδενοπάθεια, ενώ επέκταση των CD21^{low} B-λεμφοκυττάρων σε ποσοστό >10% έχει συνδεθεί με τη σπληνομεγαλία. Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της CVID είναι η ανεπαρκής τελική διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων μνήμης και οι πολύ χαμηλοί αριθμοί πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών, στους λεμφαδένες και στο έντερο. Οι ασθενείς με ανεπάρκεια BAFFR εμφανίζουν επέκταση των μεταβατικών B-λεμφοκυττάρων (>20%), εύρημα το οποίο μπορεί να αποτελέσει ένδειξη που να προσανατολίζει προς αυτή τη διάγνωση. (124)

Η ετερογένεια της CVID όπως αυτή εκδηλώνεται στους κλινικούς φαινοτύπους και στους βιοδείκτες, υποστηρίζεται περαιτέρω από μία μεγάλη μελέτη GWAS, η οποία έδειξε σημαντική συσχέτιση με τα MHC γονίδια και το ADAM). Αναλύσεις αριθμού αντιγράφων ποικιλομόρφων (CNV) έχουν ταυτοποιήσει ένα εύρος νέων ελλείψεων και διπλασιασμών γενετικών περιοχών που σχετίζονται με τη νόσο. (125)

Η κύρια ανοσοβιολογική βλάβη της CVID είναι η δυσλειτουργία των B-λεμφοκυττάρων με την επακόλουθη υπογαμμασφαιριναιμία. Παρόλ'αυτά γενετικές βλάβες και δείκτες ευαισθησίας σχετιζόμενα με ανεπαρκείς B-λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις δεν έχουν αναγνωριστεί παρά στο 10-15% των CVID. (109)

Έχει ταυτοποιηθεί μια σειρά διαταραχών στις T-λεμφοκυτταρικές μεσολαβούμενες ανοσιακές αποκρίσεις στους ασθενείς με CVID. Αυτές περιλαμβάνουν τον μειωμένο πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων που επάγεται από μιτογόνα και αντιγόνα, αυξημένη απόπτωση, διαταραγμένη παραγωγή κυτταροκινών, μειωμένη έκφραση του συνδιεγερτικού μορίου CD40 στα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, και ανεπαρκή παραγωγή T-λεμφοκυττάρων που έχουν υποστεί πρωταρχική διέγερση μετά από προφυλακτικό εμβολιασμό.(126)

Πολλαπλές T-λεμφοκυτταρικές διαταραχές σχετίζονται με μειωμένα επίπεδα παρθένων CD4+ T-λεμφοκυττάρων και αυξημένη σοβαρότητα της νόσου.

Η σοβαρή B-λεμφοπενία που αποτελεί χαρακτηριστικό της CVID έχει συσχετισθεί με παράλληλη μείωση των CD4+ υποστηρίζοντας τη θεωρία ότι η βοήθεια από τα CD4+ είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων και την επακόλουθη παραγωγή αντισωμάτων υψηλής συγγένειας.(126)

Μελέτες οι οποίες διερευνούν τον ρόλο του συμπληρώματος στην παθογένεση της CVID δεν έχουν βρει σημαντικές ανεπάρκειες στο κλασσικό ή στο εναλλακτικό

μονοπάτι του συμπληρώματος. Η αυξημένη ενεργοποίηση αυτών των μονοπατικών έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη φλεγμονωδών και αυτοάνοσων επιπλοκών στους ασθενείς με CVID.(127)

Μειωμένα επίπεδα λειτουργικής MBL, που είναι βασικό συστατικό του μονοπατιού της λεκτίνης μπορεί να προδιαθέτει τους CVID ασθενείς στις αναπνευστικές λοιμώξεις και ακολούθως στην ανάπτυξη μακροπρόθεσμων αναπνευστικών επιπλοκών.(128)

Πολυμορφισμοί στον μόνο υποδοχέα φαγοκυττάρωσης (FcγRIIa) ικανό να αλληλεπιδρά με πολύπλοκα μόρια IgG2 την κύρια υποτάξη της IgG που παράγεται ως απόκριση στα πολυσακχαριτικά αντιγόνα των Gram+ βακτηρίων έχουν συσχετισθεί με υποτροπιάζουσες βακτηριακές λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού.(129)

Μία πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι τα ουδετερόφιλα ασθενών με CVID μπορούν να παρουσιάζουν ανεπάρκεια στην επιτέλεση μιας σειράς βακτηριοκτόνων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της φαγοκυττάρωσης, της αποκοκκίωσης και της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου.(130)

Η ακριβής αιτιολογία της CVID στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι άγνωστη. Περίπου το 90% των ασθενών δεν παρουσιάζουν οικογενειακό ιστορικό ανοσοανεπάρκειας. Η έλλειψη κληρονομικότητας σε συνδυασμό με τη σχετική ώριμη ηλικία εμφάνισης της νόσου, υποστηρίζει την υπόθεση ότι περιβαλλοντικοί και ανοσολογικοί παράγοντες εμπλέκονται στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου.(109)

Η πνευμονική νόσος στην CVID.

Κατά την αξιολόγηση των ασθενών με CVID, ο κλινικός ιατρός καλείται να αντιμετωπίσει την εξής πρόκληση: Πρέπει να προσδιορίζει εάν η έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας οφείλεται σε λοίμωξη, ή εάν οφείλεται σε φλεγμονή μη-σχετιζόμενη με λοίμωξη. Το 90% των ασθενών με CVID εμφανίζουν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, όπου το 73% των περιπτώσεων αφορά στους πνεύμονες και στα ιγμόρια. Οι αναπνευστικές επιπλοκές που έχουν συσχετισθεί με την CVID περιλαμβάνουν την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD), άσθμα, χρόνια ιγμορίτιδα. Παρόλ'αυτά η κύρια πνευμονική νόσος που διαγιγνώσκεται σε αυτούς τους ασθενείς είναι οι βρογχεκτασίες. Η βρογχεκτασία είναι μία χρόνια νόσος των αεραγωγών η οποία χαρακτηρίζεται από άτυπη διαστολή των βρόγχων και των βρογχιολίων. Αυτή η διαταραχή σχετίζεται με επαναλαμβανόμενα επεισόδια λοιμώξεων και φλεγμονής τα

οποία καταλήγουν στην καταστροφή των αεραγωγών και του πνευμονικού παρεγχύματος με επακόλουθη μείωση της πνευμονικής λειτουργίας. Τα ευρήματα που αφορούν στην πνευμονική λειτουργία ασθενών με COVID είναι η βρογχιεκτασία κυρίως στους κατώτερους και μέσους λοβούς και η διάμεση πνευμονική νόσος. (131) Τα πιο συχνά ιστολογικά ευρήματα αφορούν σε κοκκιωματώδη πνευμονική νόσο, λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία, μη-ειδική διάμεση πνευμονία, και οργανούμενη πνευμονία αν και ενδέχεται τα διάφορα πρότυπα να αλληλεπικαλύπτονται. Κοκκιωματώδη και λεμφοϋπερπλαστικά πρότυπα μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται και ομαδοποιούνται υπό τον όρο «κοκκιωματώδης λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονική νόσος (Granulomatous lymphocytic interstitial lung disease- GLILD). (132)

Αιτία λοιπόν για την επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας μπορεί να είναι η διάμεση πνευμονική νόσος και όχι οι λοιμώξεις αυτές καθ'εαυτές και η σχετιζόμενη βρογχιεκτασία. (133)

Παρόλο που η ευαισθησία στις συστηματικές βακτηριακές λοιμώξεις μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφόρων πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, η πλειοψηφία των ασθενών υποφέρει από χρόνιες λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. (134)

Οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις τις ρινικής και της αναπνευστικής οδού συνιστούν το πιο κοινό κλινικό χαρακτηριστικό της COVID. Η πνευμονία η οποία οφείλεται σε βακτηριακές λοιμώξεις της κατώτερης αναπνευστικής οδού είναι η πιο κοινή κλινική εκδήλωση η οποία αναγνωρίζεται σε ασθενείς με COVID πριν και κατά την οριστική διάγνωση του συνδρόμου. Εξαιτίας των σχετιζόμενων επιπλοκών για το περισσότερο από το 50% των ασθενών που παρουσιάζονται με πνευμονία απαιτείται νοσηλεία. Η οξεία πνευμονία γενικά αντιμετωπίζεται εμπειρικά με τη χορήγηση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος.

Τα πιο συχνά παθογόνα που απομονώνονται από καλλιέργειες των αεραγωγών περιλαμβάνουν *H. Influenzae*, *S. Pneumonia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* και *Mycoplasma*. Σε έναν μικρό αριθμό ασθενών έχει απομονωθεί και το άτυπο μυκοβακτηρίδιο *Mycobacterium avium*. (131)

Αδενοϊοί, ο κυτταρομεγαλοϊός, ρινοϊός, EBV, HHV8, έχουν ανιχνευθεί από τους κατώτερους αεραγωγούς των ασθενών με PADs.

Η ακραία επέκταση των CD8+ ως απόκριση στην ενεργό λοίμωξη από CMV έχει ενοχοποιηθεί για σοβαρές φλεγμονώδεις επιπλοκές σε μια κατηγορία COVID ασθενών.

Η παρουσία HHV8 σε βιοψίες πνεύμονα CVID ασθενών έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη διάμεσης πνευμονικής νόσου, B-λεμφωμάτων και με αυξημένο κίνδυνο πρώιμης θνησιμότητας. (135)

Η θεραπεία υποκατάστασης μειώνει την ανάπτυξη πνευμονολογικών επιπλοκών, όπως η βρογχεκτασίες, μειώνοντας τη συχνότητα των λοιμώξεων.

Η πνευμονική λειτουργία υποχωρεί στους ασθενείς με CVID με σχεδόν διπλάσιο ρυθμό συγκριτικά με υγιείς μη-καπνιστές ενήλικες παρόλο που βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης και σε ορισμένους ασθενείς η εξέλιξη της νόσου συνεχίζει και λαμβάνει χώρα.(131)

Έχει διατυπωθεί μια σειρά υποθέσεων που εξηγούν τη σχετική αποτυχία της θεραπείας υποκατάστασης σε ορισμένους ασθενείς. Αυτές περιλαμβάνουν μη αποτελεσματική μεταφορά της παρεντερικής IgG στις επιφάνειες του βλεννογόνου καθώς και τη μειωμένη ημιζωή της IgG. Είναι επίσης πιθανόν η έλλειψη ενός αντισώματος ειδικού έναντι παθογόνων που σχετίζονται συνήθως με τις λοιμώξεις του αναπνευστικού στη CVID όπως ο *H. Influenza* και ο *S. Pneumoniae* να μπορούν να συνεισφέρουν σε αυτό το φαινόμενο. Παρόλ'αυτά η αδυναμία κλινικής βελτίωσης που παρατηρείται σε ασθενείς με CVID μετά από θεραπεία υποκατάστασης υπονοεί ότι ανεπαρκείς ανοσιακές άμυνες που δεν σχετίζονται με την ανεπάρκεια της Ig μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στην εκδήλωση της διαταραχής. (136)

Παρά τη θεραπεία με αντιβιοτικά και τη θεραπεία υποκατάστασης με σφαιρίνη η χρόνια πνευμονική νόσος αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας στους ασθενείς με CVID.

Η προοδευτική επιδείνωση της κλινικής εικόνας υποδηλώνει ότι πολλαπλές ανοσολογικές βλάβες και/ή δυνητικά παθογόνα τα οποία δεν αποκρίνονται στη θεραπεία υποκατάστασης ή στα αντιβιοτικά μπορούν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της πνευμονικής νόσου σε ασθενείς με CVID.(109)

Εντερική νόσος στην CVID

Οι εκδηλώσεις της γαστρεντερικής οδού στη CVID μπορούν κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες. Αυτές που οφείλονται σε λοιμώξεις, αυτές που οφείλονται σε φλεγμονή ή αυτοάνοσες εκδηλώσεις και τέλος η νεοπλασματική νόσος της γαστρεντερικής οδού.

Η κύρια εκδήλωση γαστρεντερικού σε ασθενείς με CVID είναι η παροδική ή εμμένουσα διάρροια, η οποία παρουσιάζεται στο 21%-57% των ασθενών. Όπου βέβαια είναι σημαντικό πρωταρχικά να αποκλειστεί η λοίμωξη. Οι φλεγμονώδεις επιπλοκές του εντέρου επηρεάζουν το 19%-32% των ασθενών, όπου μακροσκοπικά χαρακτηριστικά όπως λεμφοκυτταρικοί όζοι και η λεμφοκυτταρική οζώδης υπερπλασία εντοπίζονται συχνά ενδοσκοπικά. Βιοπτικά υλικά από λεπτό έντερο χαρακτηρίζονται συχνά από επιπέδωση και ατροφία των εντερικών λαχνών που μπορεί να αποτελούν ένδειξη κοιλιοκάκης. Παρόλ' αυτά το διαφοροποιό στοιχείο στην CVID είναι η πλήρης απουσία πλασματοκυττάρων και η οζώδης λεμφοκυτταρική υπερπλασία, όπου οι συσσωρεύσεις λεμφοκυττάρων αφορούν σε Β-λεμφοκύτταρα.(137)

Ηπατική νόσος εκδηλώνεται στο 10% των ασθενών όπου ιστολογικές μελέτες έχουν δείξει συχνά οζώδη αναγεννητική υπερπλασία ήπατος και κοκκιωματώδη ηπατίτιδα. Οι αυτοάνοσες εκδηλώσεις με επιπτώσεις στον γαστρεντερικό σωλήνα περιλαμβάνουν την κακοήθη αναιμία, την πρωτοπαθή χολική κίρρωση, την ηπατίτιδα και την κίρρωση αγνώστου αιτιολογίας, γεγονός που καθιστά τον έλεγχο για εκδήλωση πυλαίας υπέρτασης και άλλων εκδηλώσεων τέτοιου υποβάθρου, αναγκαία. (133)

Επιπρόσθετα δεν είναι σπάνια και η έλλειψη βιταμινών, όπως η Β12 λόγω κακοήθους αναιμίας, ή αβιταμινώσεις λόγω δυσαπορρόφησης, οι οποίες οδηγούν σε επιπρόσθετες επιπλοκές όπως π.χ. νευρολογικές εκδηλώσεις σε περίπτωση έλλειψης βιταμίνης Ε. ενώ έλλειψη βιταμίνης Α επηρεάζει τη λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων μέσω των TLRs. (133)

Κακοήθεις εκδηλώσεις

Υπάρχει αυξημένη συχνότητα κακοήθων εκδηλώσεων στην CVID, με την πιο συχνή εκδήλωση να αφορά στη λεμφική σειρά. Τα λεμφώματα είναι κυρίως Β-αρχής, με τα πιο συχνά να είναι τα non-Hodgkin, ακολουθούν τα Hodgkin και τα MALT να αποτελούν την πλειοψηφία των υπόλοιπων. (119)

Με την πάροδο του χρόνου φαίνεται να υπάρχει μείωση γαστρικού καρκινώματος, μάλλον λόγω της αντιμετώπισης του *Helicobacter pylori*. Παρόλ' αυτά και ανεξάρτητα από τον κίνδυνο κακοήθους αναιμίας, οι ασθενείς με CVID εμφανίζουν 10 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου στο στομάχι. Ο καρκίνος του μαστού

συνιστά την πιο συχνή μη-λεμφοκυτταρική κακοήθη εκδήλωση στη CVID, ενώ ακολουθούν με χαμηλότερη συχνότητα του στόματος, οισοφάγου και του παχέος εντέρου.(119)

III.4. Μονογονιδιακές βλάβες ανοσιακής ρύθμισης και B-λεμφοκυτταρικής λειτουργίας

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν ταυτοποιηθεί ένας αριθμός μονογονιδιακών βλαβών σε ασθενείς με CVID. Σε μία κοόρτη της Νέας Υόρκης το 30% των ασθενών παρουσίασε υπόβαθρο μονογονιδιακής αιτιολογίας. Έχουν αναδειχθεί δύο ευρείες κατηγορίες γενετικών βλαβών: Η πρώτη αφορά σε μεταλλάξεις γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε διάφορα στάδια της B-κυτταρικής επιβίωσης, ενεργοποίησης και ωρίμανσης στο στάδιο του πλασματοκυττάρου. (106)

Η δεύτερη κατηγορία αφορά σε γονίδια τα οποία ελέγχουν εν γένει την ανοσιακή ρύθμιση. Οι ασθενείς που φέρουν βλάβες σε γονίδια της δεύτερης κατηγορίας εμφανίζουν επιπρόσθετες αυτοάνοσες και άλλες φλεγμονώδεις εκδηλώσεις.

Αυτές οι μονογονιδιακές βλάβες έχουν οδηγήσει στη διαλεύκανση μοριακών μονοπατιών που οδηγούν ταυτόχρονα σε αντισωματική ανεπάρκεια αλλά και σε ευρύτερη ανοσιακή απορρύθμιση σε επιλεγμένους ασθενείς, ενώ έχουν βοηθήσει και στο σχεδιασμό στοχευμένων θεραπειών.

Στις κοόρτες ασθενών CVID της Ευρώπης και της Αμερικής, οι πιο συχνές βλάβες ρυθμιστικών ανοσογονιδίων αφορούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 του NFκB (NF-kB1).(106)

Η οικογένεια των NFκ-B μεταγραφικών παραγόντων αποτελείται από 5 σχετικές πρωτεΐνες, c-Rel, p65(RelA), RelA, p50 (NF-kB1) και η p52 (NF-kB2), οι οποίες σχηματίζουν ομο και ετερο-διμερή ρυθμίζοντας την έκφραση ενός μεγάλου εύρους γονιδίων στόχων.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του NFκ-B εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων της B-κυτταρικής διαφοροποίησης και λειτουργίας καθώς και της ανοσιακής απόκρισης σε μικροβιακά και φλεγμονώδη ερεθίσματα. Οι βλάβες του NF-kB1 σε ασθενείς με CVID εμφανίζουν αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομικότητας με ποικίλη διεισδυτικότητα. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν αντισωματική ανεπάρκεια και φαινότυπο B-λεμφοκυττάρων χαρακτηριστικό της

CVID. Σε κλινικό επίπεδο οι μη-λοιμώδεις επιπλοκές είναι κοινές, αντικατοπτρίζοντας την ευρύτερη επίπτωση που έχει η σηματοδότηση του NF-κΒ όταν αυτή είναι ελαττωματική. Οι επιπλοκές αυτές αφορούν στην εκδήλωση αυτοανοσίας, λεμφοϋπερπλασίας, πνευμονικής νόσου, εντεροπάθειας, ηπατικής νόσου, κοκκιωμάτων και κακοήθειας.

Αυτοσωμικές επικρατείς, ετερόζυγες βλάβες του NF-κΒ2 έχουν επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με CVID. Αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν υπογαμμασφαιριναιμία πρώιμης έναρξης, με αυτοάνοσες εκδηλώσεις και επινεφριδιακή ανεπάρκεια. Σε δύο οικογένειες έχουν περιγραφεί ανεμηνεύσιμες μεταλλάξεις του NF-κΒ2, οι οποίοι παρουσίασαν υπογαμμασφαιριναιμία, λεμφοπενία και βλάβες των T-λεμφοκυττάρων. (138)

Οι πρωτεΐνες LRBA και CTLA4 είναι στενά σχετιζόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν T-λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις και μεταλλάξεις αυτών έχουν εντοπιστεί σε κοόρτες ασθενών με CVID.

Το LRBA εντοπίζεται στα κυστίδια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και διαθέτει επικράτειες όμοιες με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυστιδιακή μεταφορά. Η λειτουργία του είναι στενά συνδεδεμένη με αυτή του CTLA4, καθώς αποτρέπει τη λυσοσωμική αποδόμησή του. Ως εκ τούτου ασθενείς με ανεπάρκεια LRBA, χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα CTLA4. Το CTLA4 είναι ανασταλτική πρωτεΐνη των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων και των T-ρυθμιστικών (T-regs) λεμφοκυττάρων. Ασκεί ανοσορρυθμιστική λειτουργία ανταγωνιζόμενο με το T-λεμφοκυτταρικό συν-διεγερτικό μόριο CD28 για τους προσδέτες CD80 και CD86 στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ή απομακρύνοντας αυτούς τους συνδέτες μέσω trans-ενδοκύττωσης έχοντας ως αποτέλεσμα μειωμένη APC-μεσολαβούμενη T-κυτταρική ενεργοποίηση. Το CTLA4 είναι απαραίτητο για τη λειτουργία των Treg κυττάρων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ανοχής και της ανοσιακής ομοιόστασης. (139)

Ομόζυγες υπολειπόμενες μεταλλάξεις του LRBA έχουν περιγραφεί σε νόσο με αρχή κατά την παιδική ηλικία, ενώ σε ενήλικες ασθενείς CVID έχουν περιγραφεί καταστάσεις διπλής ετεροζυγωτίας. Στους ασθενείς με LRBA ανεπάρκεια συνυπάρχουν βλάβες των B-λεμφοκυττάρων (διαταραχές διαφοροποίησης, ενεργοποίησης και σχηματισμού πλασμαβλαστών), οι οποίες επιφέρουν ως κλινικές εκδηλώσεις την υπογαμμασφαιριναιμία και απορρύθμιση T-λεμφοκυττάρων, συνεισφέροντας σε φλεγμονώδεις επιπλοκές. Κλινικά αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν αυτοανοσία, λεμφοϋπερπλασία, και σοβαρή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου.

Από την άλλη ετερόζυγες μεταλλάξεις στο CTLA4, οδηγούν σε απλοανεπάρκεια, ελλιπή διμερισμό της πρωτεΐνης, ή ελλιπή σύνδεση με προσδέτη, οδηγώντας σε ένα αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο με ποικίλη διεισδυτικότητα. . Κλινικά αυτό το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από αντισωματική ανεπάρκεια, λεμφοϋπερπλασία, αυτοάνοσες κυτταροπενίες, καθώς επίσης και από πνευμονικές και γαστρεντερολογικές εκδηλώσεις. Η διαλεύκανση αυτού του μοριακού μονοπατιού και η διαθεσιμότητα CTLA4 χημικών πρωτεϊνών (abatacept, belatacept), έχουν δώσει τη δυνατότητα για στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Σε ορισμένες περιπτώσεις η απώλεια του CTLA4 λόγω ανεπάρκειας LRBA έχει θεραπευτεί επιτυχώς με abatacept ενώ επίσης ορισμένες περιπτώσεις CTLA4 απλοανεπάρκειας παρουσίασαν θετική κλινική πορεία μετά από χορήγηση abatacept ή belatacept.(140)

Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα αντισωματικής ανεπάρκειας στα πλαίσια γενικότερης απορρύθμισης του ανοσιακού, αποτελούν οι βλάβες στην PI3K που προκαλούν το σύνδρομο APDS (activated PI3Kδ σύνδρομο), το οποίο είναι ένα CVID-like ή όμοιο του hyper-IgM.(141) Άλλες αξιοσημείωτες μονογονιδιακές βλάβες οι οποίες οδηγούν σε αντισωματικές ανεπάρκειες με ταυτόχρονη παρουσία μη-λοιμωδών επιπλοκών είναι οι μεταλλάξεις GOF του STAT3, οι ανεπάρκειες ICOS, IKAROS και IRF2BP2. (142)

Από την άλλη πρωτοπαθείς βλάβες των B-λεμφοκυττάρων λόγω γενετικών μεταλλάξεων έχουν σχετισθεί με αυτοανοσία και φλεγμονή στην CVID, αν και τα μοριακά μονοπάτια που οδηγούν σε αυτούς τους φαινοτύπους δεν είναι προφανή.

Η πρωτεΐνη TACI κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFRSF13B και αποτελεί υποδοχέα των B-λεμφοκυττάρων. Αποτελεί υποδοχέα των κυτταροκινών BAFF και APRIL και συμμετέχει στην ισοτυπική μεταστροφή, στη διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων και στην έκκριση ανοσοσφαιρινών σε μετέπειτα στάδια B-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης.(118) Το 8%-10% των ασθενών CVID παρουσιάζουν μεταλλάξεις του TACI και έχουν συσχετισθεί σημαντικά με την εκδήλωση αυτοανοσίας και λεμφοϋπερπλασίας, υποδεικνύοντας επιπρόσθετο ρόλο για την πρωτεΐνη στην θεμελίωση της ανοσιακής ανοχής. Παρόλ' αυτά μεταλλάξεις του TACI εντοπίζονται και στον υγιή πληθυσμό καθώς και σε υγιείς συγγενείς ασθενών CVID. Ως εκ τούτου η μελέτη της λειτουργικής επίπτωσης των ετερόζυγων μεταλλάξεων του TACI συνιστά ένα ενεργό πεδίο μελέτης.(143)

IV. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Οι πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες συνιστούν μία ετερογενή ομάδα διαταραχών όπου το κοινό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό τους έγκειται στην αδυναμία των Β-λεμφοκυττάρων να διαφοροποιηθούν και να παραγάγουν αντισώματα. Η πιο κοινή και αντισωματική ανεπάρκεια με τη μεγαλύτερη κλινική σημασία είναι η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια, η οποία είναι σποραδική με άγνωστη γενετική αιτιολογία για την πλειοψηφία (περίπου 80%) των περιπτώσεων. Οι ασθενείς πάσχουν από συχνές και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, ενώ επιπρόσθετα επιδεικνύουν υψηλή συχνότητα αυτοάνοσων εκδηλώσεων, κοκκιωματώδους φλεγμονής, καλοήθους λεμφοϋπερπλασίας και κακόηθων εκδηλώσεων, ιδιαίτερα λεμφώματος. Η θεραπεία εκλογής είναι η υποκατάσταση με γ-σφαιρίνη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συχνότητας και της σοβαρότητας των λοιμώξεων, αλλά έχει μειωμένη αποτελεσματικότητα στη διαχείριση των άλλων φλεγμονωδών εκδηλώσεων της νόσου.(109)

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η φυσική ανοσία συνεισφέρει στην παθογένεση της νόσου, καθώς έχουν αναφερθεί διαταραχές σε επίπεδο ανοσοφαινοτυπικό και λειτουργικό σε μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK), σε ασθενείς με CVID.(144–147) Παρόλ' αυτά ο ρόλος των πολυμορφοπύρηνων ουδετεροφίλων στην CVID δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, καθώς ελάχιστες μελέτες διερευνούν και έχουν αναλύσει τον ανοσοφαινότυπο και τη λειτουργία των ουδετεροφίλων καταλήγοντας μάλιστα πολλές φορές σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. (130,148–152)

Τα ουδετερόφιλα είναι τα κύρια δραστικά κύτταρα της άμυνας του ξενιστή έναντι των εισβαλλόντων μικροοργανισμών, συνεισφέροντας ωστόσο στην ενεργοποίηση και τη ρύθμιση της Β-λεμφοκυτταρικής ομοιόστασης και διαφοροποίησης, μέσω της παραγωγής κυτταροκινών όπως ο BAFF και ο APRIL.(90) Βλάβες στα πολυμορφοπύρηννα οδηγούν σε σοβαρές και καλά χαρακτηρισμένες ανοσοανεπάρκειες, όπως η ανεπάρκεια προσκόλλησης λεμφοκυττάρων (LAD), η χρόνια κοκκιωματώδης νόσος (CGD), και το σύνδρομο Chediak-Higashi (ανασκόπηση από Dinayer).(71) Από την άλλη τα πολυμορφοπύρηννα σε οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η σήψη επιδεικνύουν διαταραγμένες και ανεπαρκείς λειτουργίες οδηγώντας στην εμφάνιση του συνδρόμου της οξείας συστηματικής φλεγμονώδους

απόκρισης (SIRS),(51) σε ανοσοπαράλυση και εν τέλει στην επιδείνωση της κλινικής κατάστασης του ασθενούς.(66)

Ως εκ τούτου συνιστά πρόκληση η διερεύνηση της πιθανής συνεισφοράς των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων στην παθογένεση των PAD και/ή στο φαινότυπο, καθώς η κατανόηση αυτού του φαινομένου μπορεί να συνεισφέρει ουσιαστικά στην βελτιωμένη γνώση της νόσου όπως και της διαχείρισης των ασθενών.

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, έχουν δείξει διαταραχή της NETosis σε ασθενείς με PADs, φαινόμενο το οποίο φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία σκευασμάτων IVIG *in vitro*. Η παρατήρηση αυτή έδειξε ότι η υπόθεση για τον ρόλο της φυσικής ανοσίας στις PAD είναι έγκυρη και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.(153) Παρόλ' αυτά υπάρχουν πολλές προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν κατά τη μελέτη της φυσικής ανοσίας σε ασθενείς με PAD, ιδιαίτερα σε αυτούς που πάσχουν από COVID.

Η πρώτη και πιο σημαντική πρόκληση είναι η ποικιλόμορφη φύση της νόσου η οποία αντικατοπτρίζεται και στον ποικιλόμορφο φαινότυπο των ασθενών.(119) Αυτή η ποικιλία φαινοτύπων μπορεί να αποτελεί και την αιτία για τα διαφορετικά και πολλές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα στα οποία καταλήγουν πολλές μελέτες, οδηγώντας και σε αποκλίνοντα συμπεράσματα.

Η δεύτερη πρόκληση που καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε είναι η σπάνια φύση των νοσημάτων αυτών, η οποία επηρεάζει την ισχύ των στατιστικών αναλύσεων.(105) Επιπρόσθετα οι ασθενείς με COVID απαιτούν άμεση έναρξη θεραπείας υποκατάστασης με ανοσοσφαιρίνη. Ως εκ τούτου ο αριθμός των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών οι οποίοι δεν λαμβάνουν θεραπεία είναι ακόμα μικρότερος. Συνεπώς η πλειοψηφία των δημοσιευμένων μελετών αφορούν σε ασθενείς υπό θεραπεία.

Η τρίτη πρόκληση αλλά όχι και με τη μικρότερη σημασία είναι η επίπτωση των πειραματικών χειρισμών στη φυσιολογία και στον φαινότυπο των ουδετεροφίλων, τα οποία συνιστούν κύτταρα με σύντομο χρόνο ζωής *in vivo* και είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε φαινοτυπικές αλλαγές *in vitro*.(154–157)

V. ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα αντικρουόμενα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας, ο σκοπός της μελέτης μας ήταν να διαλευκάνουμε περαιτέρω εάν τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας και συγκεκριμένα τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, επηρεάζονται και/ή συνεισφέρουν στον κλινικό φαινότυπο των ασθενών με PAD.

Για το σκοπό αυτό αξιολογήσαμε με κυτταρομετρία ροής το πρότυπο έκφρασης ειδικών δεικτών στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα, οι οποίοι είναι ενδεικτικοί του σταδίου ωρίμανσης καθώς και της ικανότητάς τους για χημειοταξία, προσκόλληση, οψωνινοποίηση, μετανάστευση στους ιστούς καθώς επίσης και φαγοκυττάρωση. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάσαμε να διερευνήσουμε μόρια της κυτταρικής επιφάνειας των ουδετεροφίλων σε ήρεμη φάση και σε κατάσταση ενεργοποίησης. Γι' αυτό το λόγο αξιολογήσαμε τον φαινότυπο των ουδετεροφίλων σε συνθήκες ολικού αίματος και μετά από επώαση ολικού αίματος παρουσία ή απουσία του βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη LPS. Κατ' αυτόν τον τρόπο θα μπορούσαμε να εξετάσουμε πιθανές διαφορές μεταξύ των ασθενών με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες και υγιών μαρτύρων, διαφορές μεταξύ των διακριτών κλινικών φαινοτύπων σε ουδετερόφιλα ήρεμης φάσης καθώς και διαφορές στο τελικό αποτέλεσμα της κυτταρικής ενεργοποίησης. Επιπρόσθετα θα μπορούσαμε να εξετάσουμε την ικανότητα ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων σε συνθήκες καλλιέργειας.

Το πρότυπο έκφρασης μορίων τα οποία είναι ειδικοί δείκτες των κοκκιοκυττάρων και είναι σημαντικά για λειτουργίες όπως η χημειοταξία, η κυτταρική προσκόλληση και η οψωνινοποίηση, η μετανάστευση και η φαγοκυττάρωση αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Αυτά τα μόρια ως επί το πλείστον συντίθενται στην πορεία της ωρίμανσης των κοκκιοκυττάρων όπου και αποθηκεύονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία φερόμενα στις μεμβράνες τους. Μετά από κυτταρική ενεργοποίηση, με την αποκοκκίωση οι μεμβράνες των κοκκίων συντήκονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και έτσι τα εν λόγω μόρια εκτίθενται στην κυτταρική επιφάνεια. Αλλαγές λοιπόν στα επίπεδα έκφρασης των μορίων αυτών στην επιφάνεια των κοκκιοκυττάρων μπορούν να αξιολογηθούν ως ένας ποσοτικός δείκτης κυτταρικής ενεργοποίησης μετά από επώαση των κυττάρων με διάφορους διεγέρτες ή μπορούν να ερμηνευθούν ως φαινόμενο πρωταρχικής ενεργοποίησης-ευαισθητοποίησης των κυττάρων όταν αξιολογούνται τα ουδετερόφιλα σε ήρεμη φάση.(11,17) Οι δείκτες αυτοί είναι επίσης χρήσιμοι για την εκτίμηση του σταδίου ωρίμανσης των κοκκιοκυττάρων καθώς

εκφράζονται διαφορεικά σε κάθε στάδιο στην πορεία της ωρίμανσης και κατ'επέκταση μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα αναφορικά με μία πιθανή αριστερή στροφή, ή βλάβη κατά την διαδικασία της ωρίμανσης.(158)

Στόχος αυτών των χειρισμών ήταν η διερεύνηση της υπόθεσης εάν η ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων σχετίζεται με το χρόνια φλεγμονώδες στρες που αποτελεί τυπικό χαρακτηριστικό αυτών των διαταραχών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Μελέτη της επίπτωσης πειραματικών χειρισμών: υγιείς μάρτυρες

Για τη μελέτη της επίπτωσης των πειραματικών χειρισμών στον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων, αξιολογήθηκε ολικό περιφερικό αίμα 14 υγιών μαρτύρων. (Α/Θ: 4/10, μέση ηλικία: 41,5 έτη, εύρος: 21-65). Οι υγιείς μάρτυρες δεν είχαν ιστορικό αυτοανοσίας, χρόνιας φλεγμονώδους νόσου ή νεοπλασματικής νόσου. Κατά την περίοδο που έλαβε χώρα η αιμοληψία, δεν ελάμβαναν κάποια φαρμακευτική αγωγή, εκτός από δύο άτομα τα οποία ελάμβαναν κοινά αντι-υπερτασικά. Η απουσία λοίμωξης και φλεγμονής επιβεβαιώθηκε μετά από κλινική αξιολόγηση και με τη μέτρηση επιπέδων CRP χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμες ανοσοφαινομετρικές δοκιμασίες (Immulite-2000, Siemens Medical Solutions, Llanberis, Gwynedd, UK), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μελέτη της φυσικής ανοσίας: ομάδες ασθενών και υγιών μαρτύρων

Αναλύθηκαν εικοσιπέντε (25) ασθενείς με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (Α/Θ= 9/16), μέση ηλικία: 41,3 έτη, εύρος: 14-66) (Πίνακας 2). Από αυτούς οι 23 πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια της CVID, ενώ δύο ασθενείς ταυτοποιήθηκαν τελικά ως πάσχοντες από CTLA4 απλοανεπάρκεια, ή αλλιώς CTLA4-μεσολαβούμενο σύνδρομο απορρύθμισης του ανοσιακού συστήματος, καθώς έφεραν συγκεκριμένες μεταλλάξεις οι οποίες περιγράφηκαν και σε πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη του εργαστηρίου μας.(159) Έξι ασθενείς (24%, όλοι πάσχοντες με CVID, ομάδα Α), αναλύθηκαν στη φάση της διάγνωσης (Α/Θ: 2/4, μέση ηλικία: 44,5, εύρος: 14-66), ενώ οι υπόλοιποι δεκαεννέα (19) ασθενείς (76%, Α/Θ:7/12, μέση ηλικία: 40,3 έτη, εύρος: 19-65)-(ομάδα Β), ελάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης είτε υποδόρια (IVIg, 3 ασθενείς), είτε υποβοηθούμενη υποδόρια ανοσοσφαιρίνη (fSCIG, 16 ασθενείς.) . Εννέα ασθενείς (36%, 2 νεοδιαγνωσθέντες) έπασχαν από χρόνια αναπνευστική νόσο (CRD, αποφρακτική και/ή περιοριστική νόσο) λαμβάνοντας εισπνεόμενα βρογχοδιασταλτικά και 12 ασθενείς (48%, 3 νεοδιαγνωσθέντες) παρουσίαζαν βρογχιεκτασίες, με την πλειοψηφία αυτών-10 από τους 12 (83,3%) να επιδεικνύουν CRD. Έξι ασθενείς (24%, 2 νεοδιαγνωσθέντες) παρουσίαζαν εντεροπάθεια, 5 ασθενείς

(20,0%, όλοι υπό θεραπεία υποκατάστασης) κοκκιωματώδη νόσο, ένας ασθενής υπό IVIG (4%), είχε επιπλοκές από οξώδη αναγεννητική υπερπλασία ήπατος, ενώ δύο είχαν ιατρικό ιστορικό νεοπλασιών, όπου ο ένας είχε παρουσιάσει λέμφωμα και ο άλλος νεοδιαγνωσθείς με αδenoκαρκίνωμα ορθού. Δώδεκα ασθενείς (48%, ένας νεοδιαγνωσθείς) επεδείκνυαν καλοήγη λεμφοϋπερπλασία (σπληνομεγαλία και/ή λεμφαδενοπάθεια), ενώ τρεις επιπλέον είχαν υποβληθεί σε σπληνεκτομή στο παρελθόν (δύο για διαγνωστικούς σκοπούς. Αναλυτικότερα ο ένας είχε εξεσημασμένη σπληνομεγαλία με υπερσπληνισμό με διαφορεική διάγνωση λεμφώματος και ο άλλος για την αντιμετώπιση ανθεκτικής αυτοάνοσης θρομβοπενικής πορφύρας (ATP)). Επιπρόσθετα, 11 ασθενείς (44%, 2 νεοδιαγνωσθέντες) είχαν εκδηλώσει μία ή περισσότερες αυτοάνοσες εκδηλώσεις, συμπεριλαμβανομένων εννέα (36%), με θυροειδοπάθεια, 3 (12%) με ATP, 3 (12%), ένας με μεγαλοβλαστική αναιμία, ένας με ψωρίαση (με επιπλοκή ψωριασικής αρθρίτιδας), ένας με μυελίτιδα, ένας με αρθρίτιδα, ένας με λεύκη και ένας με υποτροπιάζουσα αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία.

Στη φάση της ανάλυσης ένας ασθενής λάμβανε ανοσοκατασταλτική θεραπεία λόγω ανθεκτικής/υποτροπιάζουσας ATP (2g mycophenolate morphetil την ημέρα) και ένας άλλος ελάμβανε χαμηλή δόση πρεδνιζολόνης (10mg/ημέρα), λόγω έξαρσης περιοριστικής CRD. Τρεις ασθενείς με CVID έφεραν την *TNRSF13B/TACI*-p.C104R μετάλλαξη σε ετερόζυγη κατάσταση, ένας άλλος ασθενής έφερε την *IKZF1*-p.His191Tyr μετάλλαξη επίσης σε ετερόζυγη κατάσταση, ενώ τέσσερις από τους έξι νεοδιαγνωσθέντες CVID ασθενείς αναλύθηκαν επίσης τουλάχιστον πέντε μήνες (μέσος τιμή: 6 μήνες, εύρος: 5-7), μετά την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ασθενών με PAD, συγκρίθηκαν με μία κοόρτη δώδεκα (12) υγιών μαρτύρων με αντιστοίχιση φύλου και ηλικίας (A/Θ: 4/8, μέση ηλικία: 40,8 έτη, εύρος: 23-67). Αναλύθηκαν επιπλέον 4 ασθενείς με σήψη από την Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (A/Θ: 3/1, μέση ηλικία: 65,5 έτη, εύρος: 61-72), δύο χωρίς και δύο υπό θεραπεία με κορτικοειδή κατά τη συλλογή του υλικού. Η ομάδα των ασθενών με σήψη χρησίμευσε ως ομάδα ελέγχου νόσου.

Το υλικό των ασθενών με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες, προήλθε από τα εξωτερικά ιατρεία ανοσοανεπαρκειών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας στα πλαίσια της προσέλευσης αυτών κατά τη διάγνωση, ή στα πλαίσια της τακτικής παρακολούθησης και θεραπείας. Τα δείγματα των ασθενών με σήψη προήλθαν από την Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού

Νοσοκομείου Λάρισας. Η λήψη του υλικού πραγματοποιήθηκε μετά από συγκατάθεση των ασθενών και όπου αυτό δεν ήταν εφικτό ή επιβαλλόταν από τον νόμο, μετά από τη σύμφωνη γνώμη αυτών και τη συγκατάθεση συγγενών-κηδεμόνων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της διακήρυξης του Ελσίνκι και ακολουθήθηκαν όλα τα προβλεπόμενα μέτρα για την τήρηση της ανωνυμίας και την προστασία των δεδομένων προσωπικού χαρακτήρα.

Πίνακας 2: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με PAD.

No	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	Φύλο	Ηλικία	Μεταλλάξεις	Αυτοανοσία	CRD	Βρογχεκτασία	Εντεροπάθεια	Κοκκιοματώδης νόσος	Νεοπλασία	Σπληνομεγαλία
1	D.K. ⁺	Χωρίς θεραπεία	A	14	IKZF1-p.H191Y	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
2	H.A.	Χωρίς θεραπεία	A	48	Άγνωστη	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
3	K.M. [^]	Χωρίς θεραπεία	Θ	53	Άγνωστη	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
4	M.M. [^]	Χωρίς θεραπεία	Θ	43	Άγνωστη	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Σπληνεκτομή
5	S.M. [^]	Χωρίς θεραπεία	Θ	66	Άγνωστη	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
6	T.D. [^]	Χωρίς θεραπεία	Θ	43	Άγνωστη	Ναι	Όχι	No	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι
7	A.A.	fSCIG	A	48	Άγνωστη	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
8	D.M.	fSCIG	Θ	38	Άγνωστη	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι
9	T.H.	IVIG	Θ	40	Άγνωστη	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι
10	K.A.	fSCIG	Θ	34	Άγνωστη	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι
11	K.M.	fSCIG	Θ	36	Άγνωστη	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
12	K.B.	fSCIG	Θ	56	Άγνωστη	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
13	K.Z.	fSCIG	Θ	65	Άγνωστη	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι
14	K.M.	fSCIG	Θ	39	Άγνωστη	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι
15	K.M.	IVIG	A	51	TACI-p.C104R	Ναι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Σπληνεκτομή
16	K.S.	fSCIG	A	28	Άγνωστη	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι
17	M.D.	fSCIG	Θ	19	CTLA4-p.Y89X	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
18	B.K.	fSCIG	Θ	49	Άγνωστη	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
19	N.B.	IVIG	Θ	58	Άγνωστη	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι
20	N.E.	IVIG	Θ	42	Άγνωστη	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι
21	S.N.	fSCIG	A	30	TACI-p.C104R	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι
22	F.I.*	fSCIG	A	23	CTLA4-p.Y139C	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Σπληνεκτομή
23	M.E.	fSCIG (χαμηλή δόση κορτικοειδών)	Θ	38	Άγνωστη	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι
24	P.A.	fSCIG (και μυκοφαινολικό)	A	21	Άγνωστη	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι
25	M.D.	fSCIG	A	51	TACI-p.C104R	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι

Συντημήσεις: A: Άρρεν, Θ: Θήλυ, CRD: chronic respiratory disease, fSCIG, facilitated subcutaneous immunoglobulin; IVIG, intravenous immunoglobulin; SCIG, subcutaneous immunoglobulin. ⁺

Για τον ασθενή 1, πραγματοποιήθηκε γενετικός έλεγχος του πατέρα (**DE.DH.**), της μητέρας (**DR.LY.**), και του αδερφού του (**D.P.**). [^] Οι ασθενείς 3-6 αναλύθηκαν επιπρόσθετα και μετά την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης * Ο ασθενής 22 (FL) έφερε επίσης τη μετάλλαξη JAK3-p.R840C (*Frontiers in Immunology* 2017;8:1824).

II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

II.1. Καλλιέργειες και Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση

7-8 ml ολικού περιφερικού αίματος με ηπαρίνη χωρίστηκαν σε τρία μέρη. (Εικόνα 5) Το πρώτο μέρος (2ml) χρησιμοποιήθηκε άμεσα για ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας (πολυμορφοπύρρηνα-PMN και μονοκύτταρα) σε ήρεμη φάση.

Το δεύτερο μέρος (4ml) χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση των πολυμορφοπύρρηνων μέσω φυγοκέντρησης με χρήση διαβάθμισης φικόλης σε θερμοκρασία δωματίου.

Το τρίτο (0,5-1,0 ml) χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασίες καλλιέργειας με στόχο την αξιολόγηση της απόκρισης των ουδετεροφίλων σε διεγέρτες. Συγκεκριμένα 2×10^5 PMN ολικού αίματος, τοποθετήθηκαν σε πλάκα 24 βοθρίων αραιωμένα σε τελικό όγκο 500μL θρεπτικού υλικού Iscoves Basal Medium (Biochrom, Berlin, Germany), παρουσία 6% φυσιολογικού ανθρώπινου ορού containing 6% (heat-inactivated normal human serum-NHS), παρουσία ή απουσία (LPS) (100 ng/ml - *E. Coli* ορότυπος 026:B6, Sigma- Aldrich) και επώαστηκαν σε θάλαμο σταθερής παροχής CO₂ και υγρασίας (37°C, 8% CO₂) για μία ώρα.

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο Coulter FC-500 (Epics XL-MCL, 4 color analysis, Beckman-Coulter/BC, Hialeah, FL, USA), χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα πολλαπλών χρώσεων και εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια. Για τη χρώση χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα από ποντικό έναντι ανθρώπινων αντιγονικών επιτόπων, ισotyπου IgG και IgM, χρησιμοποιώντας κατάλληλα αρνητικά control αντίστοιχου ισotyπου και φθοριοχρώματος. Αναλυτικότερα τα αντισώματα-δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: CD10 (clone: ALB1), CD11b (clone: Bear1), CD11c (clone: BU15), CD14 (clone: RMO52), CD16 (clone: 3G8), CD18 (clone: 7E4), CD64 (clone: 22), and CD66b (clone: 80H3). Όλα τα αντισώματα ήταν παρασκευής της εταιρείας Beckman Coulter και ήταν συζευγμένα με τα κατάλληλα φθοριοχρώματα fluorochrome (fluorescein isothiocyanate, FITC; phycoerythrin, PE; PE-cyanine5 PE-Cy5).

Η λύση των ερυθροκυττάρων πραγματοποιήθηκε με διάλυμα λύσης NH₄Cl/KHCO₃. Ακολούθησε δύο φορές πλύση με PBS 1X/φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και χρώση των κυττάρων με τα προαναφερθέντα

αντισώματα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 10 μL από το εκάστοτε αντίσωμα και η επώαση έλαβε χώρα για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Με το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε πλύση με PBS 1X/φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ανασύσταση σε 300 μL PBS 1X και άμεση ανάλυση από τον κυτταρομετρητή ροής.

Σε κάθε περίπτωση αξιολογήθηκε το ποσοστό έκφρασης του εκάστοτε δείκτη στον κυτταρικό πληθυσμό ενδιαφέροντος καθώς επίσης και η μέση ένταση φθορισμού του δείκτη (MFI), διορθωμένη ως προς τον φθορισμό υποβάθρου με τη βοήθεια των αντίστοιχων FITC, PE και PE-Cy5-συζευγμένων αντισωμάτων ελέγχου (isotype control).

Τα δεδομένα που αναλύθηκαν ήταν η ποσοστιαία έκφραση (%) του κάθε δείκτη και η ένταση έκφρασης η οποία ορίζεται από την εξίσωση: (%) έκφρασης \times MFI / 100. Για την ανάλυση των φυσιολογικών μαρτύρων, στα πλαίσια της διερεύνησης της επίπτωσης των πειραματικών χειρισμών, πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετα αξιολόγηση της κυτταρικής ενεργοποίησης μέσω της ανάλυσης της σχετικής αύξησης της έκφρασης του εκάστοτε δείκτη στις δεδομένες συνθήκες. Συγκεκριμένα: **Relative increase = Intensity of expression B/ Intensity of expression A**, όπου B ορίζεται η εκάστοτε συνθήκη ενεργοποίησης και A η συνθήκη αναφοράς. Το αποτέλεσμα του πηλίκου αφορά στις τάξεις μεγέθους αύξησης (fold increase).

Στην περίπτωση των μονοκυττάρων η έκφραση των δεικτών αξιολογήθηκαν μόνο σε ήρεμη φάση.

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα από την άλλη αξιολογήθηκαν σε 4 διαφορετικές συνθήκες. Αναλυτικότερα:

- 1) Σε ήρεμη φάση (resting/basal state), σε συνθήκες ολικού αίματος, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα.
- 2) Μετά από απομόνωση με φικόλη, χωρίς επίδραση κάποιου παράγοντα. Αυτή η κατάσταση αντικατοπτρίζει τις φαινοτυπικές αλλαγές που υφίστανται τα κύτταρα λόγω του πειραματικού χειρισμού/της διαδικασίας απομόνωσης. Τα ουδετερόφιλα αυτά αναφέροντα ως ουδετερόφιλα φυσιολογικής πυκνότητας (Normal Density Neutrophils-NDNS)(160).
- 3) Σε φάση καλλιέργειας, χωρίς την επίδραση κάποιου διεγέρτη. Ο φαινότυπος των κυττάρων αυτών αντικατοπτρίζει αλλαγές που λαμβάνουν χώρα λόγω

πειραματικού χειρισμού/επώαση σε συνθήκες καλλιέργειας (Culture-control PMN).

- 4) Σε φάση καλλιέργειας, μετά από επίδραση LPS. Ο φαινότυπος των κυττάρων αυτών αντικατοπτρίζει αλλαγές που λαμβάνουν χώρα λόγω της διέγερσης με τον βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη.(161)

II.2. Απομόνωση ουδετεροφίλων

Η απομόνωση των ουδετεροφίλων πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία απομόνωσης στιβάδας κυττάρων, μετά από φυγοκέντρηση δείγματος αίματος σε διαβάθμιση πυκνότητας φικόλης.(156)

3 ml περιφερικού αίματος αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X) μέχρι τελικού όγκου 6 ml.

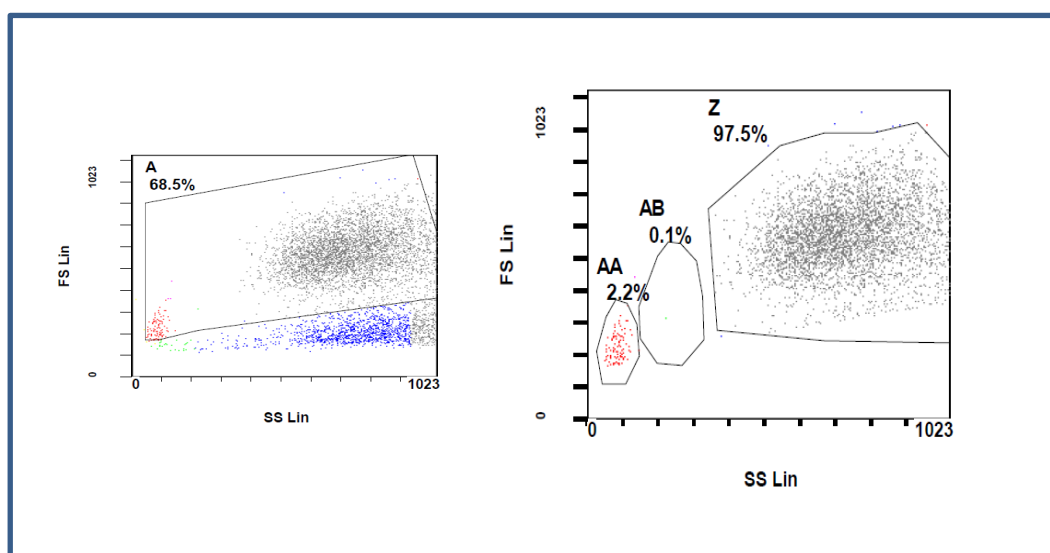
Σε falcon tube τοποθετήθηκαν 3 ml φικόλης πυκνότητας 1,119 mg/ml (Histopaque 1119 – Sigma) και στη συνέχεια επιστιβάχθηκαν 3 ml φικόλης πυκνότητας 1,077 mg/ml (Biochrom Biocoll Separating Solution), με τέτοιο τρόπο ώστε να μην αναμειχθούν τα δύο διαλύματα. Τέλος επιστιβάχθηκαν 6 ml αραιωμένου αίματος. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται με τέτοια ταχύτητα έτσι ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο, η διάχυση μεταξύ των διαλυμάτων. Μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος για 30 λεπτά, με ταχύτητα 2000 rpm, επιτυγχάνεται διαχωρισμός των έμμορφων συστατικών του αίματος με βάση την πυκνότητά τους, χάρη στη διαφορετική ταχύτητα καθίζησης που αναπτύσσουν κατά τη διαδικασία της φυγοκέντρησης και λόγω ωσμωτικών φαινομένων. Συγκεκριμένα, με το πέρας της φυγοκέντρησης το υλικό έχει διαχωριστεί στις εξής διακριτές φάσεις: Η ανώτερη φάση αποτελεί το πλάσμα του αίματος, το οποίο είναι εμπλουτισμένο με αιμοπετάλια. Ακολουθεί η κυτταρική στιβάδα των μονοπύρηνων λευκοκυττάρων, στην οποία θεωρητικά αναμένεται και ο εντοπισμός των ουδετεροφίλων χαμηλής πυκνότητας (Low Density Neutrophils-LDNs)(88) η φάση διαλύματος φικόλης πυκνότητας 1,077 mg/ml και η κυτταρική στιβάδα των πολυμορφοπύρηνων ουδετεροφίλων. Τέλος της στιβάδας των ουδετεροφίλων υπόκειται το διάλυμα φικόλης πυκνότητας 1,119 mg/ml και τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Μετά από απόρριψη των υπερκείμενων φάσεων μέσω αναρρόφησης με πιπέτα Pasteur, λαμβάνεται με τον ίδιο τρόπο η επιθυμητή στιβάδα των μονοπύρηνων και αυτή των

ουδετεροφίλων, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε νέο falcon tube, με στόχο την πλύση των κυττάρων για την απομάκρυνση υπολειμμάτων διαλύματος φικόλης. Η πλύση πραγματοποιείται μετά από προσθήκη 10 ml PBS (1X), και φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων για 10 λεπτά, με ταχύτητα 1600 rpm. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η λήψη ιζήματος μονοπύρηνων-PBMCs και ουδετεροφίλων τα οποία μετά από απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, επαναδιαλύεται σε θρεπτικό υλικό Iscove's Basal Medium (Biochrom) για περαιτέρω πειραματική μεταχείριση. Σε περιπτώσεις παρουσίας ερυθρών αιμοσφαιρίων στο ίζημα, προηγήθηκε λύση αυτών με διάλυμα λύσης $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KHCO}_3$, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Ακολούθησε άμεση χρώση με αντισώματα και ανοσοφαινοτυπική ανάλυση.

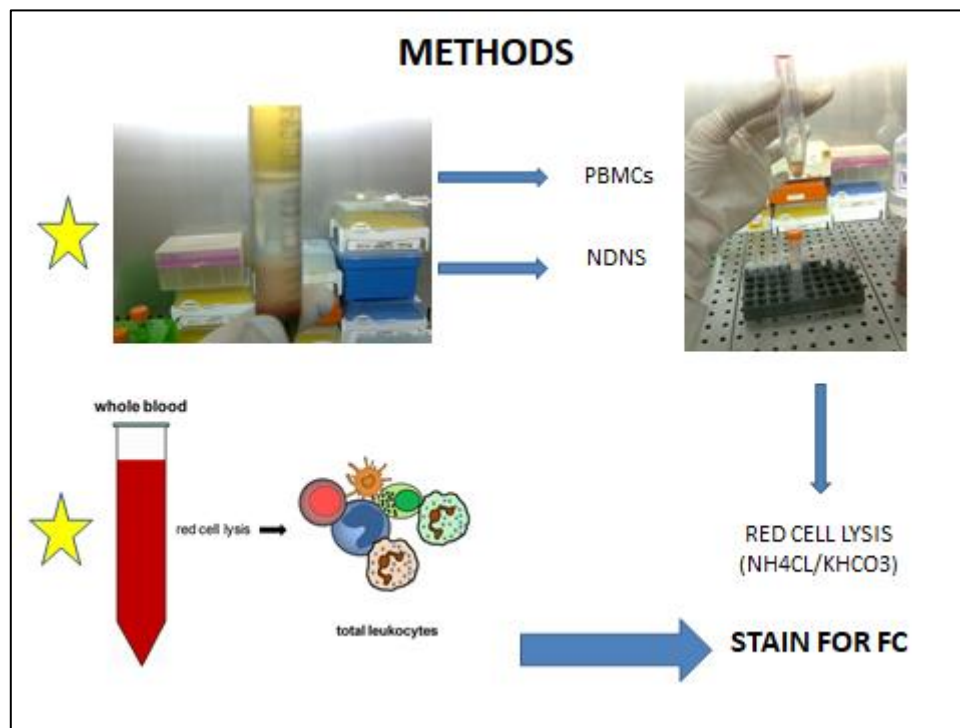
Π.2.α. Εκτίμηση καθαρότητας απομονωμένου κυτταρικού πληθυσμού και βιωσιμότητας κυττάρων

Προκειμένου να εκτιμηθεί η καθαρότητα του απομονωμένου κυτταρικού πληθυσμού, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρική αξιολόγηση και συγκεκριμένα ταυτοποίηση των κυτταρικών τύπων με κριτήριο το μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων (Εικόνα 4). Σε όλες τις διαδικασίες απομόνωσης των ουδετεροφίλων που πραγματοποιήθηκαν η καθαρότητα του πληθυσμού ήταν μεγαλύτερη από 95% (> 95%).

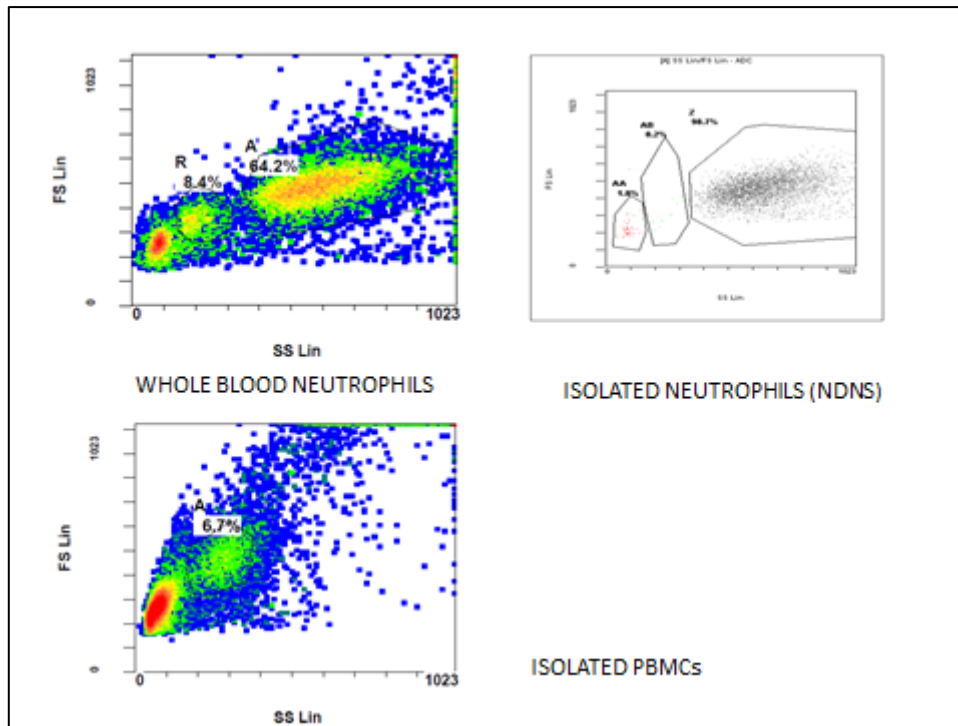


Εικόνα 4: Κυτταρομετρική αξιολόγηση καθαρότητας πληθυσμού, απομονωμένων ουδετεροφίλων. Τα ουδετερόφιλα (Z), εμφανίζουν μεγαλύτερο μέγεθος και κοκκίωση από τα μονοκύτταρα (AB) και από τα λεμφοκύτταρα (AA). Τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 97,5% του πληθυσμού.

Η βιωσιμότητα των ουδετεροφίλων και των PBMCs αξιολογήθηκε μετά από χρώση τους με τη χρωστική Trypan Blue και παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο, με τη βοήθεια αιμοκυτταρομέτρου (πλάκας Neubauer). Η βιωσιμότητα σε όλες τις περιπτώσεις υπολογίστηκε τουλάχιστον 99% (>99%).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση βασικών σταδίων της μεθοδολογίας τη έρευνας. PBMCs: Στιβάδα μονοπύρηνων κυττάρων, NDNS: Στιβάδα ουδετεροφίλων φυσιολογικής πυκνότητας, Whole blood: ολικό περιφερικό αίμα, Red cell lysis: Λύση ερυθροκυττάρων, FC: κυτταριομετρία ροής



Εικόνα 6: Στικτογράμματα κυτταρομετρίας ροής των βασικών λευκοκυτταρικών πληθυσμών που αναλύθηκαν στην μελέτη. Απεικονίζονται οι λευκοκυτταρικοί πληθυσμοί που αναλύθηκαν με βάση τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά τους (συνάρτηση μεγέθους και κοκκίωσης). Whole blood neutrophils: ανάλυση ουδετεροφίλων σε συνθήκη ολικού αίματος. Isolated neutrophils: ανάλυση ουδετεροφίλων μετά από απομόνωση με φικόλη. Isolated PBMCs: Απεικόνιση μονοπύρηνων (μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα), μετά από απομόνωση με χρήση φικόλης.

Πίνακας 3: Δείκτες επιφανείας που αξιολογήθηκαν στα ουδετερόφιλα ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων με κυτταρομετρία ροής, στις πειραματικές συνθήκες της μελέτης.

MONOCLONAL Ab	WHOLE BLOOD REST	NORMAL DENSITY NEUTROPHILS	WHOLE BLOOD CULTURE CONTROL	WHOLE BLOOD CULTURE LPS
CD10	√	√	√	√
CD11b	√	√	√	√
CD11c	√	√	X	X
CD14	√	√	√	√
CD15	√	√	√	√
CD16	√	√	√	√
CD18	√	√	√	√
CD64	√	√	√	√
CD66b	√	√	√	√
CD62L	X	X	√	√

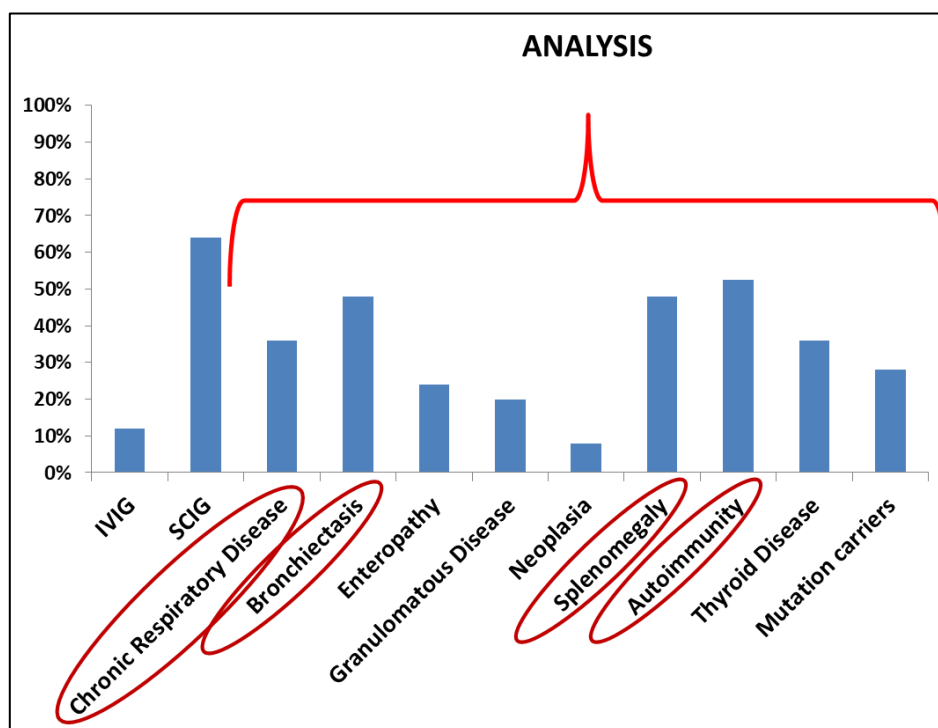
Monoclonal Ab: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Whole blood rest: Ουδετερόφιλα ήρεμης φάσης σε συνθήκη ολικού αίματος. Normal density neutrophils: Ουδετερόφιλα φυσιολογικής πυκνότητας μετά από απομόνωση. Whole blood culture control: Καλλιέργεια σε συνθήκη ολικού αίματος χωρίς LPS. Whole blood culture LPS: Καλλιέργεια σε συνθήκη ολικού αίματος χωρίς LPS.

Πίνακας 4: Βασικά συγκεντρωτικά δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με PAD και των φυσιολογικών μαρτύρων της μελέτης.

	N	%	M/F	ΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ	ΕΥΡΟΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ	25		9/16	41.3	14-66
ΧΩΡΙΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	6	24%	2/4	44.5	14-66
ΥΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	19	76%	7/12	40.3	19-65
IVIG	3	16%			
SCIG	16	84%			
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	12		4/8	40.8	23-67

Πίνακας 5: Συχνότητα κλινικών φαινοτύπων των ασθενών με PAD της μελέτης.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ PAD	N	%
IVIG	3	12%
SCIG	16	64%
Χρόνια αναπνευστική νόσος	9	36%
Βρογχιεκτασία	12	48%
Εντεροπάθεια	6	24%
Κοκκιοματώδης νόσος	5	20%
Νεοπλασία	2	8%
Σπληνομεγαλία	12	48%
Αυτοανοσία	11	44%
Θυρεοειδοπάθεια	9	36%
Φορείς μεταλλάξεων	6	24%



Εικόνα 7: Γραφική απεικόνιση της κατανομής συχνότητων των φαινοτύπων των ασθενών με PAD της μελέτης.

II.3. Στατιστική Ανάλυση

Για τη σύγκριση των διαφορετικών ομάδων μελέτης, εφαρμόστηκε Wilcoxon matched paired ανάλυση, non-parametric Mann-Whitney test και Spearman correlation ανάλυση.

Η στατιστική ανάλυση και ο σχεδιασμός των γραφημάτων έγιναν με το λογισμικό GraphPad-6 Prism (6^η έκδοση, CA, USA). Σε όλες τις αναλύσεις ως όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε $\alpha=0,05$ (2-sided).

II.4. Ανάλυση εξονίου 5 του γονιδίου IKZF1

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 200 μL περιφερικού αίματος μετά από λήψη σε φιαλίδια με αντιπηκτικό K3EDTA. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA με το EXTRACT ME Genomic DNA Kit (Birt, Poland), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το DNA μετά την έκλυση, αποθηκεύτηκε στους -20°C , μέχρι περαιτέρω χρήσης.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής τύπου Applied Biosystems Verity Thermal Cycler, και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων' σε κάθε πείραμα

Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 2%, στην οποία είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο, ενώ για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Αναλυτικότερα η αντίδραση PCR για την ενίσχυση του εξονίου 5 του *IKZF1* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της DFS Taq πολυμεράσης (Bioron), με συνοδά ρυθμιστικά διαλύματα και προσθήκη μείγματος δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs 100 mM, Invitrogen).

Για την εκλεκτική ενίσχυση της περιοχής-στόχου, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές με τη βοήθεια του λογισμικού Oligo6 και της ελεύθερης εφαρμογής Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Η αλληλουχία των εκκινητών και οι συνθήκες της PCR παρατίθεται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 6: Αλληλουχία εκκινητών για την ενίσχυση με PCR του εξονίου 5 του γονιδίου *IKZF1*.

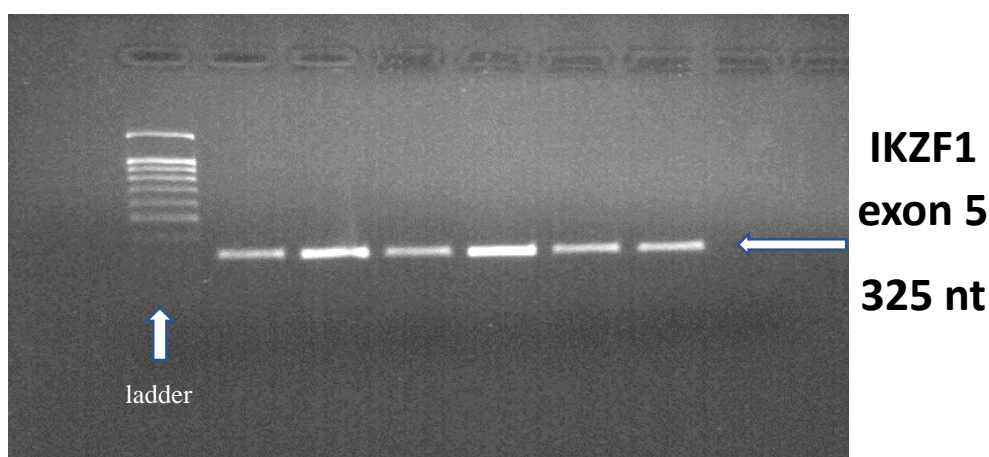
Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος (nt)
IKZF1 exon 5F	5'-CTTTCTCGTAGCATCGTCCTC-3'	21
IKZF1 exon 5R	5'-AAGGACACAATCCGGGACC -3'	19

Πίνακας 7: Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του εξονίου 5 του γονιδίου *IKZF1*:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	2 λεπτά
Αποδιάταξη	94°C	30 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός	57°C	30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72°C	30 δευτερόλεπτα
Τελική Επιμήκυνση	72°C	5 λεπτά

} 30 κύκλοι

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των σχετικών προϊόντων παρατίθεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 8):



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης με PCR του εξονίου 5 του *IKZF1*.

Στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων με το EXTRACTME DNA CLEANUP kit (Blirt), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση κατά Sanger.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης (χρωματογραφήματα), αναλύθηκαν ως ab1 file, με το ελεύθερο λογισμικό Snapgene viewer, η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με την

ελεύθερη εφαρμογή LALIGN server (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html) και ως αγρίου τύπου αλληλουχία χρησιμοποιήθηκε το μετάγραφο IKZF1-201 ENST00000331340.8 από τη βάση της Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

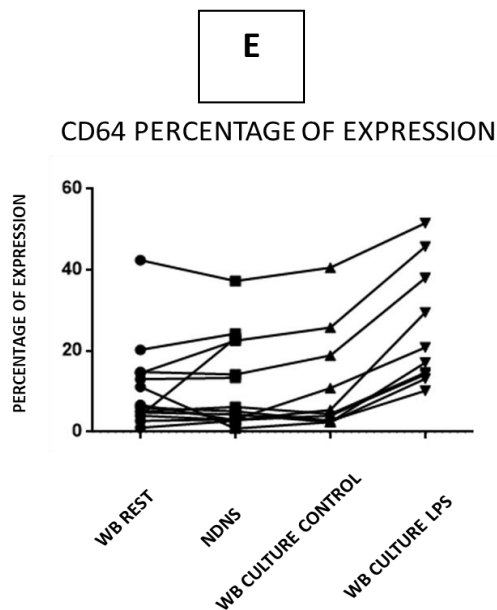
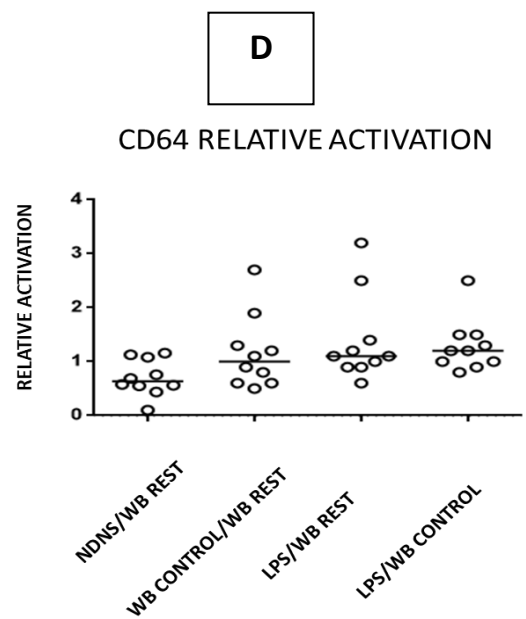
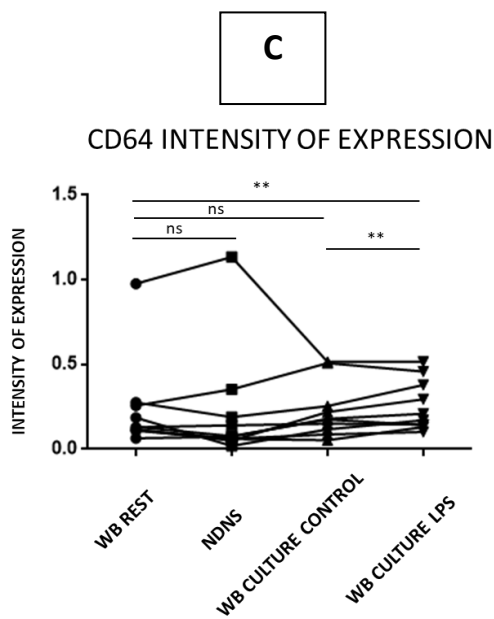
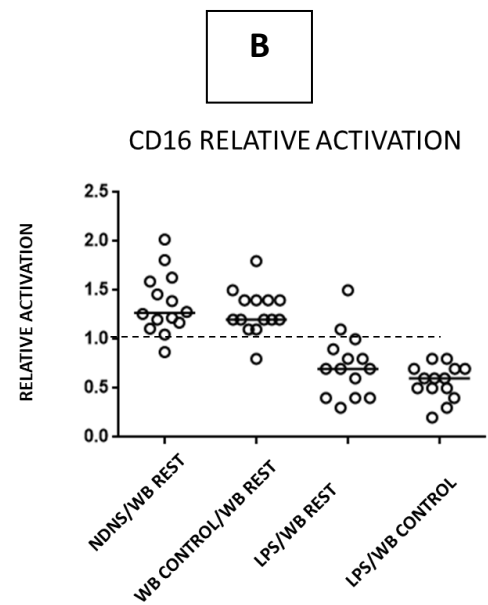
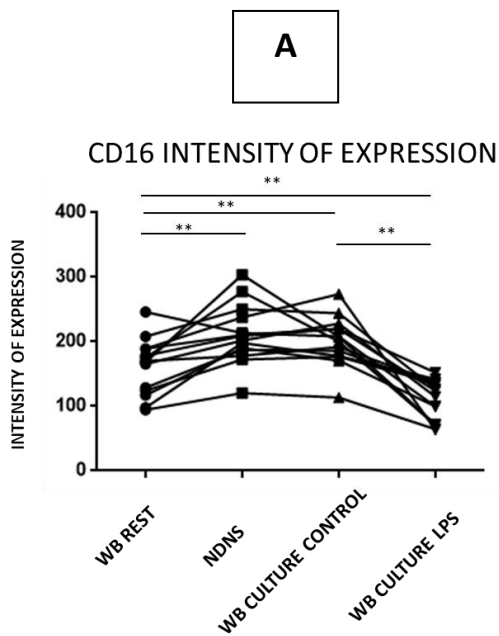
III.1. Η επίπτωση των πειραματικών χειρισμών στον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων υγιών μαρτύρων

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη δοκιμασιών, όπου μελετώνται τα ουδετερόφιλα στα πλαίσια φλεγμονωδών διαταραχών και πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Σε αυτές τις δοκιμασίες, η έκφραση μορίων της κυτταρικής μεμβράνης, όπως είναι τα μόρια προσκόλλησης, υποδοχείς ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος, διερευνώνται σε συνάρτηση και με τις λειτουργικές αποκρίσεις σε φλεγμονώδη ερεθίσματα. Προκειμένου να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα όταν διερευνούμε την λειτουργία των ουδετεροφίλων σε συνθήκες ομοιόστασης και νόσου, τα δεδομένα που προκύπτουν από τις *in vitro* μελέτες πρέπει να αντανακλούν τη συμπεριφορά τους *in vivo*. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένοι πειραματικοί χειρισμοί των ουδετεροφίλων μπορούν να επάγουν αλλαγές στα πρότυπα έκφρασης αρκετών επιφανειακών αντιγόνων. (162,163) Γι' αυτό σκοπός της μελέτης ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφορετικών πειραματικών χειρισμών (όπως η απομόνωση με χρήση φικόλης αλλά και η επώασή τους παρουσία ή απουσία φλεγμονωδών ερεθισμάτων) στον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων υγιών δοτών περιφερικού αίματος, αξιολογώντας τα πρότυπα έκφρασης ειδικών δεικτών κοκκιοκυττάρων, οι οποίοι είναι σημαντικοί για λειτουργίες όπως η χημειοταξία, η προσκόλληση, η οψωνινοποίηση, η μετανάστευση και η φαγοκυττάρωση.

III.1.a. Έκφραση υποδοχέων ανοσοσφαιρινών

Μετά από τη διαδικασία απομόνωσης, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της έντασης έκφρασης του CD16, καθώς επίσης και μετά από επώαση ολικού αίματος σε συνθήκες καλλιέργειας απουσία LPS (($p = 0.001$ και $p = 0.002$ αντίστοιχα) Παρόλ' αυτά μετά από επώαση με LPS, επέδειξαν χαμηλότερη ένταση έκφρασης συγκριτικά με τα ουδετερόφιλα σε συνθήκες καλλιέργειας απουσία LPS ($p=0,001$) και με τα ουδετερόφιλα συνθήκης basal state ($p=0,005$).

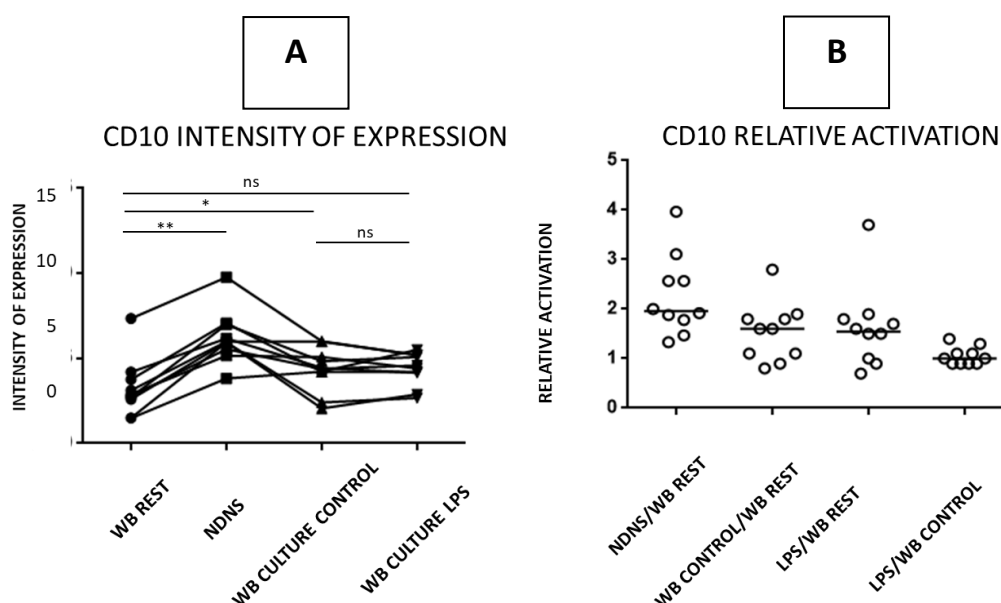
Το CD64 από την άλλη δεν εμφάνισε μεταβολή έκφρασης σε καμία από τις εξεταζόμενες συνθήκες. (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Ένταση έκφρασης και σχετική μεταβολή της έκφρασης υποδοχέων ανοσοσφαιρινών στα ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων στις πειραματικές συνθήκες της μελέτης. A, C: ένταση έκφρασης του CD16 και CD64 αντίστοιχα. B και D σχετική μεταβολή της έκφρασης του CD16 και CD64 αντίστοιχα. E: Ποσοστό έκφρασης CD64. WB REST: Ουδετερόφιλα ολικού αίματος σε ήρεμη φάση. NDNS: Ουδετερόφιλα μετά από απομόνωση με φικόλη, WB CULTURE CONTROL: Ουδετερόφιλα ολικού αίματος σε καλλιέργεια χωρίς επίδραση LPS. WB CULTURE LPS: Ουδετερόφιλα ολικού αίματος σε καλλιέργεια μετά από επίδραση με LPS.

III.1.β. Έκφραση δεικτών ωρίμανσης (CD10)

Η πλειοψηφία των ουδετεροφίλων των υγιών μαρτύρων εμφάνισαν έκφραση CD10 σε όλες τις συνθήκες, ενώ η ένταση έκφρασης αυξήθηκε σημαντικά μετά από τη διαδικασία απομόνωσης ($p < 0,001$). Από την άλλη, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις άλλες πειραματικές συνθήκες. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10: Ένταση έκφρασης (A) και σχετική μεταβολή έκφρασης-σχετική ενεργοποίηση του δείκτη ωρίμανσης CD10 στα ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων στις πειραματικές συνθήκες της μελέτης.

III.1.γ. Έκφραση μορίων προσκόλλησης (CD11b, CD18 και CD66b)

Η ένταση έκφρασης του CD18 ήταν υψηλότερη μετά από απομόνωση των ουδετεροφίλων ($p < 0,001$) και επώαση των ουδετεροφίλων με ($p < 0,001$) ή χωρίς LPS ($p = 0,002$) συγκριτικά με τα κύτταρα ήρεμης φάσης. Υπό συνθήκες καλλιέργειας δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά.

Από την άλλη οι υγιείς μάρτυρες δεν εμφάνισαν σημαντικές αλλαγές στη σχετική ενεργοποίηση, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες.

Όσον αφορά στο CD11b, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασής του, σε όλες τις συνθήκες. Επιπρόσθετα όταν πραγματοποιούνται συγκρίσεις της σχετικής αύξησης της έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών, παρατηρείται ότι οι συνθήκες καλλιέργειας χωρίς παρουσία διεγέρτη οδηγούν σε υψηλότερη αύξηση της

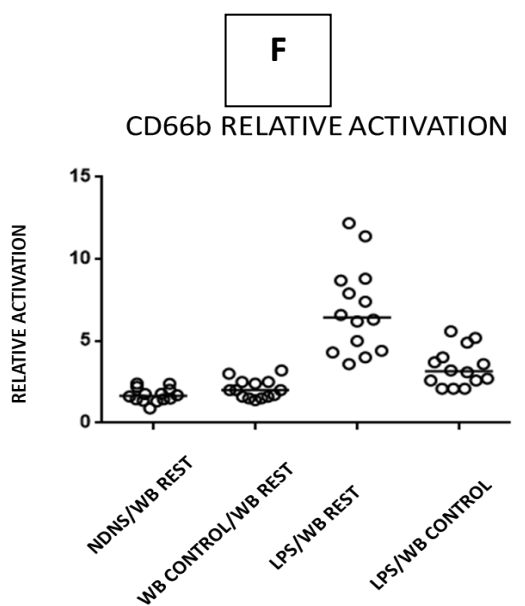
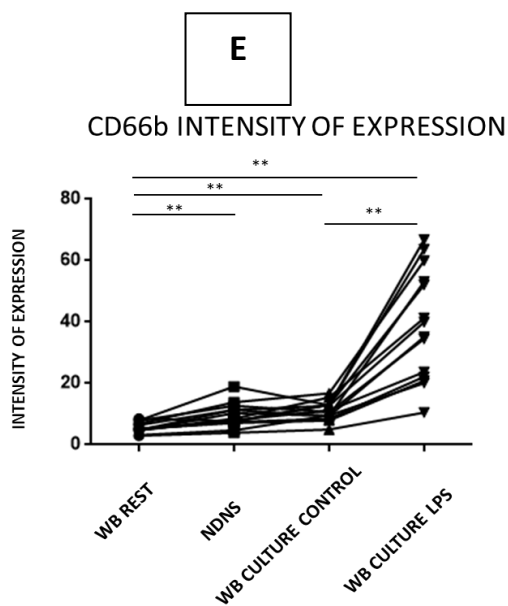
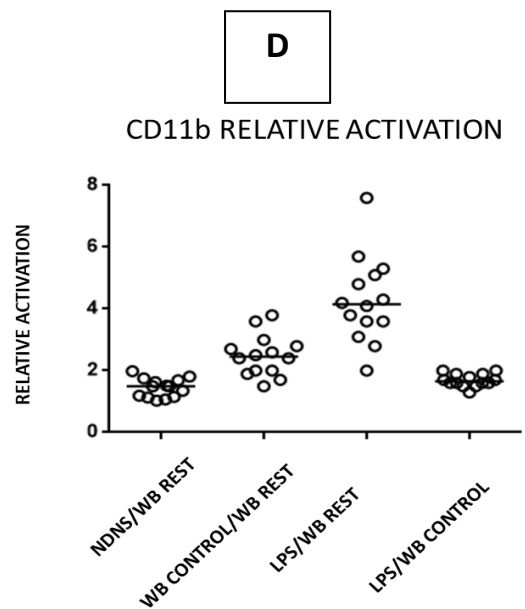
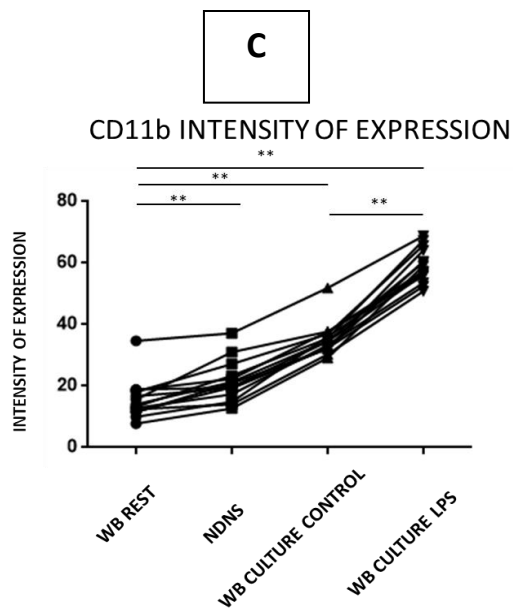
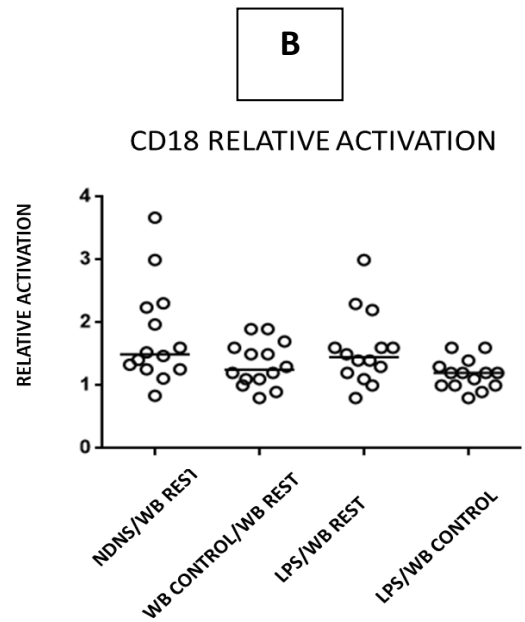
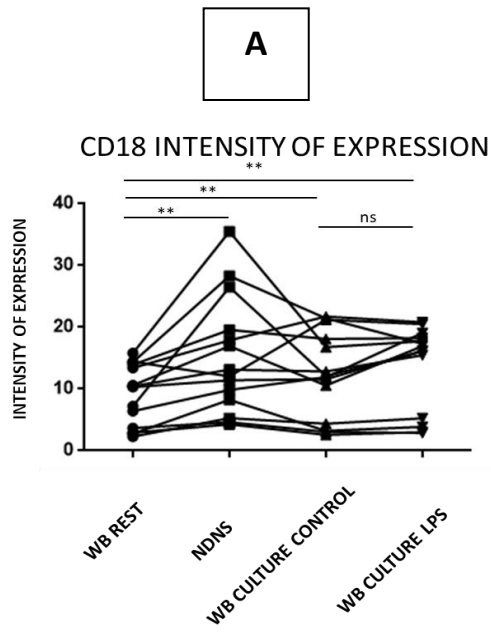
έκφρασης συγκριτικά με αυτήν που προκύπτει μετά τη διαδικασία απομόνωσης, χρησιμοποιώντας ως αναφορά της ένταση έκφρασης κατά την ήρεμη φάση (2.493 fold vs 1.450, $p < 0.001$). Η παρουσία του LPS οδήγησε σε επαγωγή ακόμα μεγαλύτερης σχετικής αύξησης συγκριτικά με τη διαδικασία απομόνωσης (4.286 vs 1.450, $p < 0.001$). Παρόλ'αυτά λόγω της επίδρασης που ασκούν οι συνθήκες καλλιέργειας αυτές καθ'αυτές (αν και όχι στατιστικά σημαντικές), η σχετική αύξηση μετά από επίδραση με LPS συγκριτικά με την κατάσταση χωρίς LPS, είναι χαμηλότερη από την αύξηση που μετράται όταν ληφθεί σαν μέτρο η συνθήκη ήρεμης φάσης.

Το CD66b (OMIM: 615747), είναι ένας ειδικός δείκτης κοκκιοκυττάρων του οποίου η έκφραση αυξάνεται μετά από έκθεση σε LPS, αντανakλώντας φαινόμενο αποκοκκίωσης. Ανήκει στην οικογένεια του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEACAM) και η δέσμευσή του οδηγεί στην επαγωγή της οξειδωτικής έκρηξης αυξάνοντας την προσκόλληση των ουδετεροφίλων μέσω ενός CD18-μεσολαβούμενου μονοπατιού.(164)

Μετά από απομόνωση των ουδετεροφίλων διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του CD66b αυξήθηκαν σημαντικά ($p = 0.0002$), καθώς επίσης και μετά από επώαση σε συνθήκες ολικού αίματος χωρίς διεγέρτη ($p = 0.0002$), και μετά από επώαση παρουσία LPS ($p < 0.001$) όπου και παρατηρείται η ισχυρότερη επίδραση στα επίπεδα του μορίου συγκριτικά με την έκφρασή του στα ουδετερόφιλα ήρεμης φάσης($p = 0.0001$).

Τέλος τα ουδετερόφιλα έδειξαν σημαντικά υψηλότερη σχετική αύξηση της έκφρασης του CD66b μετά από επίδραση με LPS ($p < 0.001$) αναφορικά με τα ουδετερόφιλα ήρεμης φάσης, αλλά η συγκριτική αύξηση ήταν χαμηλότερη αναφορικά με τη συνθήκη καλλιέργειας χωρίς παρουσία LPS. (LPS/WB REST vs CULTURE CONTROL/WB REST $p < 0.001$) (Εικόνα 11)

Εικόνα 11: Ένταση έκφρασης και σχετική μεταβολή της έκφρασης μορίων προσκόλλησης στα ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων στις πειραματικές συνθήκες της μελέτης. A, C, E: ένταση έκφρασης του CD18, CD11b και CD66b αντίστοιχα. B, D, F: σχετική μεταβολή της έκφρασης του CD18, CD11b και CD66b αντίστοιχα. WB REST: Ουδετερόφιλα ολικού αίματος σε ήρεμη φάση. NDNs: Ουδετερόφιλα μετά από απομόνωση με φικόλη, WB CULTURE CONTROL: Ουδετερόφιλα ολικού αίματος σε καλλιέργεια χωρίς επίδραση LPS. WB CULTURE LPS: Ουδετερόφιλα ολικού αίματος σε καλλιέργεια μετά από επίδραση με LPS.

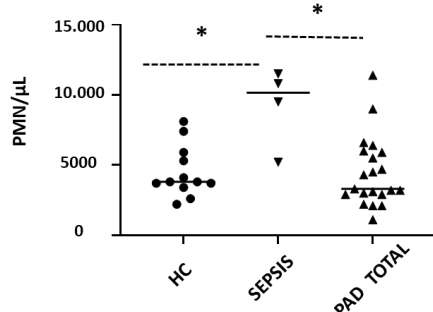


III.2. Η ενεργοποίηση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας σε ασθενείς με PAD.

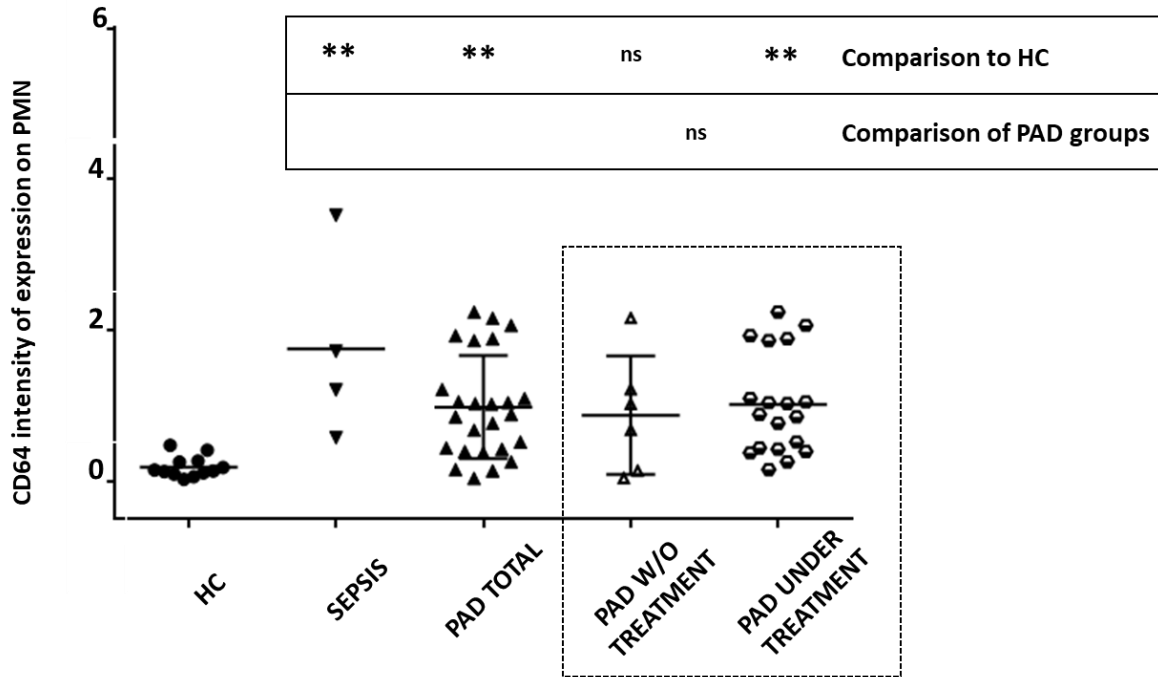
Το σημαντικότερο εύρημα της μελέτης ήταν η ένδειξη μιας σταθερής κατάστασης ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων ασθενών με PAD.

Συγκεκριμένα στη συνθήκη ολικού αίματος σε ήρεμη φάση (basal state) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη έκφραση CD64 στα ουδετερόφιλα (Εικόνα 13 και 14) και CD16 στα μονοκύτταρα συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Η αύξηση της έκφρασης των δεικτών αυτών υφίσταντο παρά την απουσία οξείας λοίμωξης όπως αυτή είχε επιβεβαιωθεί από τα επίπεδα της CRP τα οποία ήταν εντός φυσιολογικών ορίων για την πλειοψηφία των ασθενών, εκτός από την περίπτωση ορισμένων ασθενών οι οποίοι είχαν CRD. Επιπρόσθετα ο απόλυτος αριθμός των ουδετεροφίλων ανά μικρόλιτρο περιφερικού αίματος των ασθενών με PAD δεν διέφερε σημαντικά συγκριτικά με αυτόν των φυσιολογικών μαρτύρων, σε αντίθεση με τους ασθενείς με σήψη οι οποίοι εμφάνισαν υψηλότερες τιμές και από τους φυσιολογικούς μάρτυρες και από τους ασθενείς με PADs (Εικόνα 12). Όπως απεικονίζεται στις εικόνες 13, 14, 16 και 19 το πρότυπο έκφρασης και των δύο μορίων σε ασθενείς με PAD ομοιάζε με αυτό που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με σήψη.

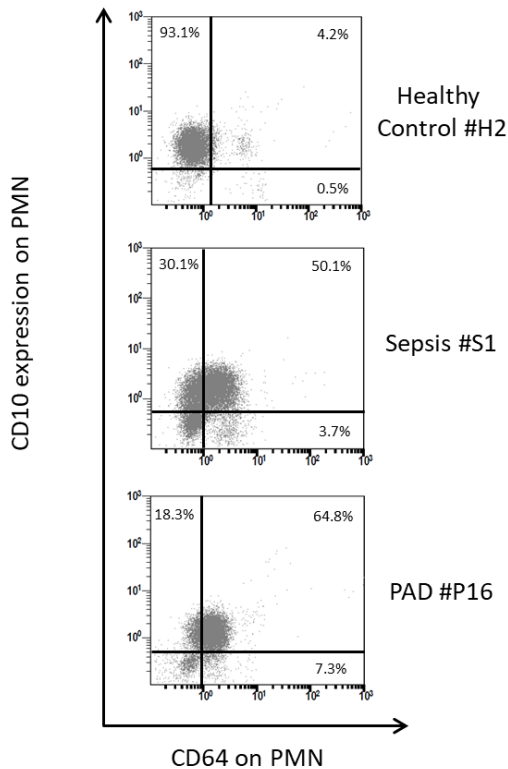
Το CD64 (FcγRI) αποτελεί υποδοχέα υψηλής συγγένειας της IgG, στα ώριμα ουδετερόφιλα εκφράζεται μόνο σε κατάσταση ενεργοποίησης αυτών και ειδικότερα συνιστά ένα χρήσιμο δείκτη ενδεικτικό καταστάσεων λοίμωξης και σήψης.(31) Όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες, η έκφραση του CD64 στα ουδετερόφιλα παραμένει γενικά αμετάβλητη ακόμα και μετά από απομόνωση, ή επώαση σε συνθήκη καλλιέργειας. Ως εκ τούτου τα επίπεδα του CD64 στα ουδετερόφιλα των ασθενών με PAD, διέφεραν σημαντικά και στις υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες, δηλαδή μετά από απομόνωση και μετά από επώαση παρουσία ή μη LPS. (Εικόνα 15)



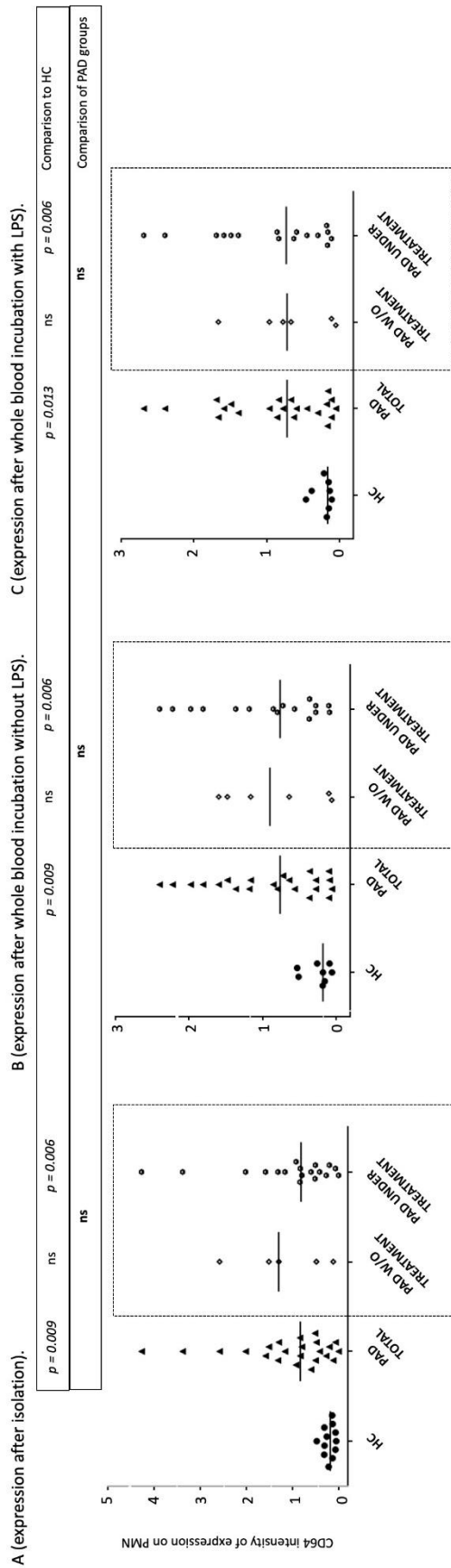
Εικόνα 12: Απόλυτοι αριθμοί ουδετεροφίλων (PMN) ανά μL περιφερικού αίματος σε 12 υγιείς μάρτυρες, 4 ασθενείς με σήψη και 25 ασθενείς με PAD. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό.



Εικόνα13: Ένταση έκφρασης CD64 στα ουδετερόφιλα ήρεμης φάσης σε ολικό αίμα φυσιολογικών μαρτύρων (HC), ασθενών με σήψη (sepsis), του συνόλου των ασθενών με PAD (PAD TOTAL), των ασθενών με PAD οι οποίοι δεν ελάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης (PAD W/O TREATMENT) και των ασθενών με PAD υπό θεραπεία (PAD UNDER TREATMENT). Comparison to HC: Σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, Comparison of PAD groups: Σύγκριση μεταξύ των ασθενών χωρίς και υπό θεραπεία υποκατάστασης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό.



Εικόνα 14: Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα απεικόνισης του προτύπου συνέκφρασης CD64 και CD10 στα ουδετερόφιλα φυσιολογικών μαρτύρων (Healthy Control #H2), ασθενών με σήψη (Sepsis #S1) και ασθενών με PAD (PAD #P16)



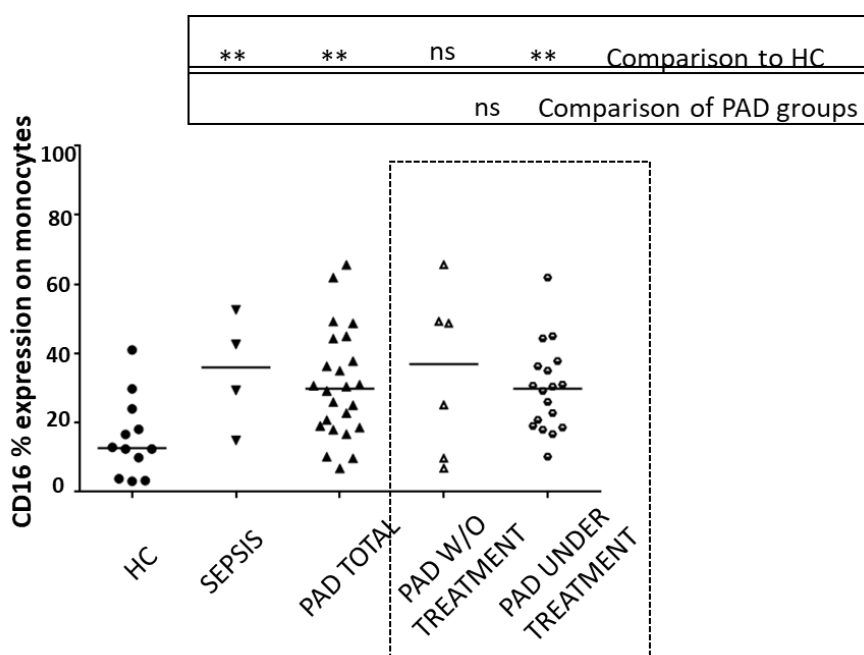
Εικόνα 15: Ένταση έκφρασης του CD64 στα ουδετερόφιλα φυσιολογικών μαρτύρων (HC), ασθενών με σήψη (sepsis), του συνόλου των ασθενών με PAD (PAD TOTAL), των ασθενών με PAD οι οποίοι δεν ελάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης (PAD W/O TREATMENT) και των ασθενών με PAD υπό θεραπεία (PAD UNDER TREATMENT). Comparison to HC: Σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, Comparison of PAD groups: Σύγκριση μεταξύ των ασθενών χωρίς και υπό θεραπεία υποκατάστασης. A: Έκφραση μετά από απομόνωση με φικόλη, B: έκφραση μετά από επώαση σε συνθήκες ολικού αίματος σε καλλιέργεια χωρίς LPS. C: Έκφραση μετά από επώαση σε συνθήκες ολικού αίματος σε καλλιέργεια παρουσία LPS.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό.

Από την άλλη, το CD16 (FcγRIII), αποτελεί έναν υποδοχέα IgG χαμηλής συγγένειας. Υπάρχουν δύο ισομορφές του CD16: 1) Η GPI-αγκυροβολημένη ισομορφή του CD16b, η οποία εκφράζεται στα ουδετερόφιλα. Η δέσμευση του υποδοχέα οδηγεί στην αποκοκκίωση των ουδετεροφίλων και στην ενεργοποίηση της αναπνευστικής έκρηξης. 2) Η CD16a ισομορφή εκφράζεται στα μονοκύτταρα στα μακροφάγα και στα NK-λεμφοκύτταρα.(34,35)

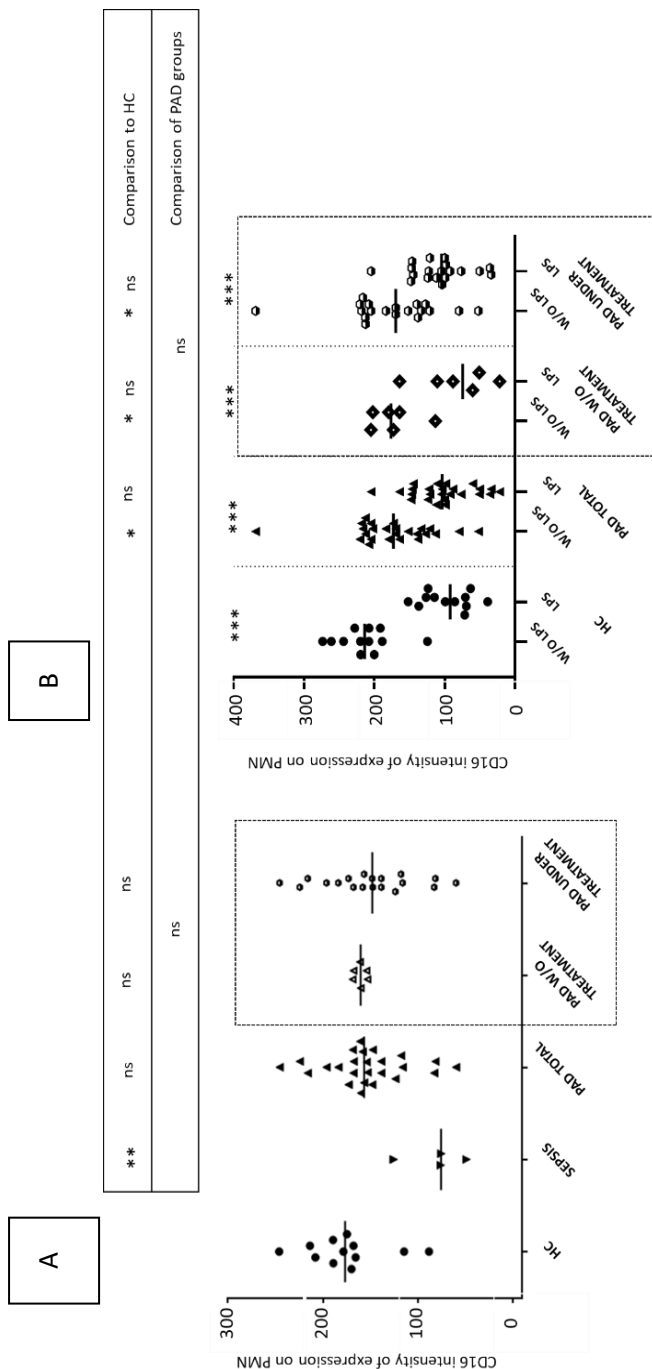
Το CD16 είναι ενδεικτικό της ταυτότητας των ώριμων ουδετεροφίλων, ενώ εκφράζεται και σε ενεργοποιημένα μονοκύτταρα. Η μείωση της έκφρασής του στα ουδετερόφιλα είναι ενδεικτική της ενεργοποίησης αυτών.

Οι ασθενείς με PAD που μελετήθηκαν, επέδειξαν σημαντικά αυξημένο ποσοστό έκφρασης του CD16 στα μονοκύτταρα, γεγονός που υποδεικνύει τη σταθερά ενεργοποιημένη κατάσταση αυτών. (Εικόνα 16)



Εικόνα 16: Ποσοστό έκφρασης CD16 στα μονοκύτταρα φυσιολογικών μαρτύρων (HC), ασθενών με σήψη (sepsis), του συνόλου των ασθενών με PAD (PAD TOTAL), των ασθενών με PAD οι οποίοι δεν λάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης (PAD W/O TREATMENT) και των ασθενών με PAD υπό θεραπεία (PAD UNDER TREATMENT). Comparison to HC: Σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, Comparison of PAD groups: Σύγκριση μεταξύ των ασθενών χωρίς και υπό θεραπεία υποκατάστασης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό

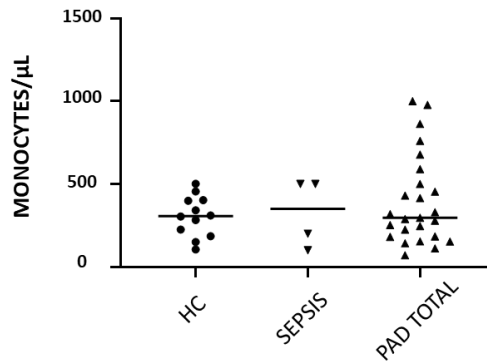
Αναφορικά με την έκφραση του CD16 στα ουδετερόφιλα αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με σήψη παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη ένταση έκφρασης σε ήρεμη φάση, γεγονός που είναι επίσης ενδεικτικό της *in vivo* ενεργοποίησης αυτών. Οι ασθενείς με PAD όμως εμφάνισαν πτώση της έκφρασης αυτού μόνο μετά από επώαση σε συνθήκη καλλιέργειας χωρίς LPS. Παρόλο που ακόμα και στα ουδετερόφιλα ήρεμης φάσης εμφάνισαν το ίδιο πρότυπο με τους σηπτικούς ασθενείς, η διαφορά συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες δεν ήταν στατιστικά σημαντική. (Εικόνα 17)



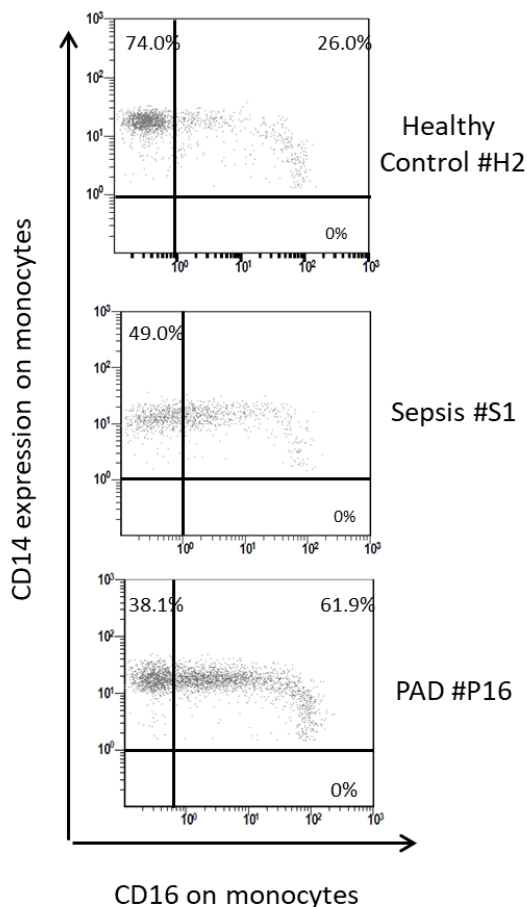
Εικόνα 17: Ένταση έκφρασης του CD16 στα ουδετερόφιλα φυσιολογικών μαρτύρων (HC), ασθενών με σήψη (sepsis), του συνόλου των ασθενών με PAD (PAD TOTAL), των ασθενών με PAD οι οποίοι δεν ελάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης (PAD W/O TREATMENT) και των ασθενών με PAD υπό θεραπεία (PAD UNDER TREATMENT). Comparison to HC: Σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, Comparison of PAD groups: Σύγκριση μεταξύ των ασθενών χωρίς και υπό θεραπεία υποκατάστασης. A: Έκφραση σε συνθήκη ήρεμης φάσης, σε ολικό αίμα. B: έκφραση μετά από επώαση σε συνθήκες ολικού αίματος σε καλλιέργεια με ή χωρίς LPS.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test και Wilcoxon matched-paired analysis * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό.

Όπως αναφέρθηκε, ασθενείς με PAD εμφάνισαν σημαντική αύξηση στην έκφραση του CD16 στα μονοκύτταρα (σε ποσοστό και σε απόλυτους αριθμούς, ενδεικτική της σταθερής κατάστασης ενεργοποίησης (εικόνα 16) Οι απόλυτοι αριθμοί των μονοκυττάρων ανά μικρόλιτρο περιφερικού αίματος, δεν διέφερε μεταξύ φυσιολογικών μαρτύρων και ασθενών. (Εικόνα 18)

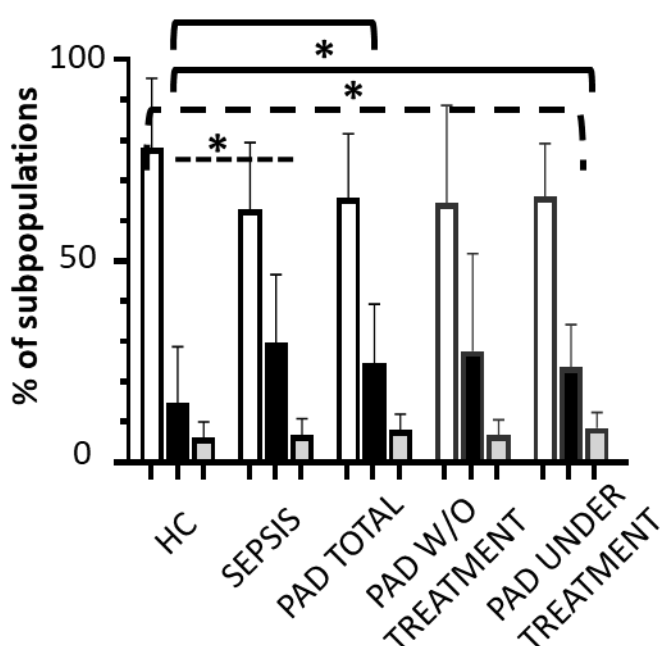


Εικόνα 18: Απόλυτοι αριθμοί μονοκυττάρων ανά μικρόλιτρο περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων (HC), ασθενών με σήψη (Sepsis) και ασθενών με PAD (PAD total) της μελέτης.



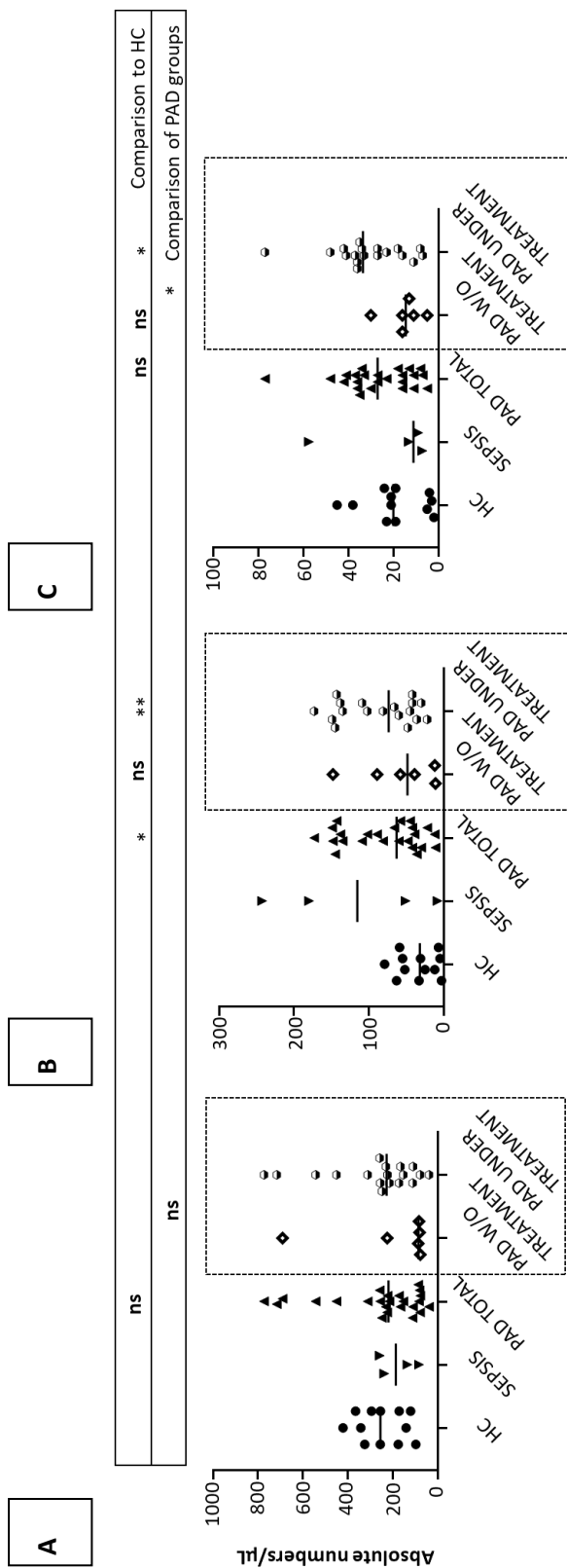
Εικόνα 19: Αντιπροσωπευτικά σικτογράμματα με πρότυπα συνέκφρασης CD14 και CD16 σε μονοκύτταρα ήρεμης φάσης σε ολικό αίμα υγιούς μάρτυρα (Healthy control #H2), ασθενούς με σήψη (Sepsis #S1) και ασθενούς με PAD (PAD#P16)

Περαιτέρω ανάλυση των υποπληθυσμών των μονοκυττάρων σύμφωνα με τα πρότυπα συνέκφρασης των CD14 και CD16 έδειξε, ότι ασθενείς με PAD υπό θεραπεία υποκατάστασης εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά και απόλυτους αριθμούς «ενδιάμεσων» (intermediate monocytes, CD14⁺⁺/CD16⁺) και μη-κλασσικών μονοκυττάρων (non-classical, CD14⁺/CD16⁺), σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Από την άλλη, παρά τις διαφορές στα ποσοστά, δεν αποδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον απόλυτο αριθμό των «κλασσικών μονοκυττάρων» (classical monocytes, CD14⁺⁺/CD16⁻) των ασθενών με PAD συγκριτικά με αυτόν των υγιών μαρτύρων (Εικόνα 20 και 21).



Εικόνα 20: Ποσοστά έκφρασης των κλασσικών (classical) CD14⁺⁺/CD16⁻ μονοκυττάρων (λευκές μπάρες), B: των ενδιάμεσων (intermediate) CD14⁺⁺/CD16⁺ μονοκυττάρων (μαύρες μπάρες) και C: των μη-κλασσικών (non-classical) CD14⁺/CD16⁺ μονοκυττάρων (γκρι μπάρες), υγιών μαρτύρων (HC), ασθενών με σήψη (sepsis), του συνόλου των ασθενών με PAD (PAD TOTAL), των ασθενών με PAD οι οποίοι δεν ελάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης (PAD W/O TREATMENT) και των ασθενών με PAD υπό θεραπεία (PAD UNDER TREATMENT). Τα ποσοστά αφορούν τις σχετικές αναλογίες εντός του μονοκυτταρικού πληθυσμού για την κάθε ομάδα μελέτης.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test. * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό.



Εικόνα 21: Απόλυτοι αριθμοί ανά μικρόλιτρο περιφερικού αίματος A: των κλασικών CD14+/CD16- μονοκυττάρων, B: των ενδιάμεσων (intermediate) CD14+/CD16+ μονοκυττάρων και C: των μη-κλασικών (non-classical) CD14+/CD16+ μονοκυττάρων, υγιών μαρτύρων (HC), ασθενών με σήψη (sepsis), του συνόλου των ασθενών με PAD (PAD TOTAL), των ασθενών με PAD οι οποίοι δεν ελάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης (PAD W/O TREATMENT) και των ασθενών με PAD υπό θεραπεία (PAD UNDER TREATMENT). Comparison to HC: Σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, Comparison of PAD groups: Σύγκριση μεταξύ των ασθενών χωρίς και υπό θεραπεία υποκατάστασης.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test. * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό.

Αναφορικά με τα υπόλοιπα μόρια που αναλύθηκαν ανοσοφαινοτυπικά δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ PAD ασθενών και υγιών μαρτύρων. Παρόλ'αυτά οι ασθενείς με σήψη εμφάνισαν σημαντική αύξηση του CD66b, καθώς επίσης και μειωμένη ένταση έκφρασης των CD10 και CD16 συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες, ομοίως με παρελθούσες μελέτες.

Τα απομονωμένα ουδετερόφιλα που διερευνήσαμε στη μελέτη μας αφορούν σε ουδετερόφιλα φυσιολογικής πυκνότητας και όχι σε αυτά χαμηλής πυκνότητας (Low Density Neutrophils), που εντοπίζονται μετά την απομόνωση με φικόλη στη στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων. Τα τελευταία περιγράφονται και διερευνάται η φυσιολογία τους σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις.(6,45) Παρόλ'αυτά στη δικιά μας κοόρτη ασθενών η συχνότητα αυτού του πληθυσμού ήταν εξαιρετικά χαμηλή (0,2-0,5%), συχνότητα που βρίσκεται στα όρια του «artifact». Ως εκ τούτου θεωρήσαμε ότι αυτοί οι πληθυσμοί δεν ήταν επαρκείς για περαιτέρω στατιστική επεξεργασία.

III.2.a. Η επίδραση της θεραπείας υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη στο φαινότυπο των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων σε ασθενείς με PADs.

Από τους ασθενείς με PAD που αναλύθηκαν κατά τη διάγνωση, οι 4 επαναξιολογήθηκαν ανοσοφαινοτυπικά και 5-7 μήνες μετά την έναρξη θεραπείας υποκατάστασης.

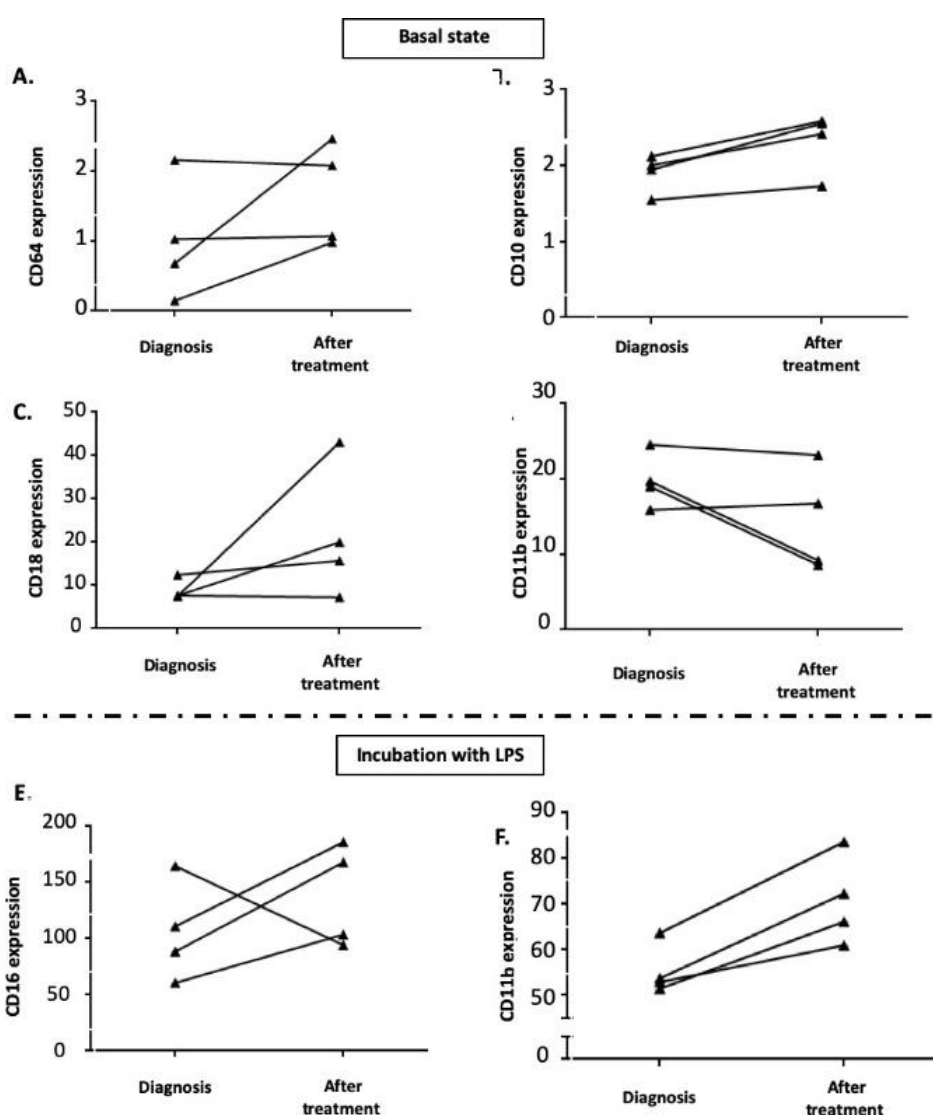
Είναι άξιο ενδιαφέροντος το γεγονός ότι οι 2 από τους 4 ασθενείς, εμφάνισαν αύξηση της έντασης έκφρασης του CD64, μετά την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης.

Όσον αφορά στους υπόλοιπους δείκτες, διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη αύξηση της έντασης έκφρασης του CD10 στα ουδετερόφιλα ήρεμης φάσης. Δύο ασθενείς εμφάνισαν πτώση της έντασης του CD11b και αύξηση του CD18., ενώ οι υπόλοιποι δείκτες, συμπεριλαμβανομένου του CD16 στα μονοκύτταρα, δεν ακολούθησαν ένα σταθερό πρότυπο μεταβολής.

Μετά από επώαση με LPS, τα ουδετερόφιλα των ασθενών αυτών εμφάνισαν μεγαλύτερη ένταση έκφρασης CD11b και CD16, συγκριτικά με αυτή που επέδειξαν πριν την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης. Το CD11b, αντιπροσωπεύει μία ιντεγκρίνη που σε σύζευξη με το μόριο CD18, σχηματίζουν υποδοχέα συμπληρώματος, που δεσμεύει το C3bi, επάγοντας τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης των οψωνινοποιημένων παθογόνων.(165) Επιπρόσθετα, το CD11b μαζί με το CD66b,

εντοπίζονται στα ειδικά κοκκία των πολυμορφοκυττάρων και η μεταβολή της έκφρασής τους είναι χαρακτηριστικός δείκτης ενεργοποίησης και αποκοκκίωσης.(166)

Συνεπώς η αυξημένη ένταση έκφρασης του CD11b που διαπιστώθηκε στα ουδετερόφιλα των ασθενών μετά από επώαση με LPS, αφού είχαν ξεκινήσει τη θεραπεία υποκατάστασης, συνιστά ένδειξη πιο επαρκούς ικανότητας ενεργοποίησης αυτών *in vitro*. Τέλος, σε αυτούς τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των Fc υποδοχέων (CD16 και CD64 στα ουδετερόφιλα και CD16 στα μονοκύτταρα) και των επιπέδων των IgG μετά τη θεραπεία υποκατάστασης ($p>0,05$, σε όλες τις περιπτώσεις). (Εικόνα 22)



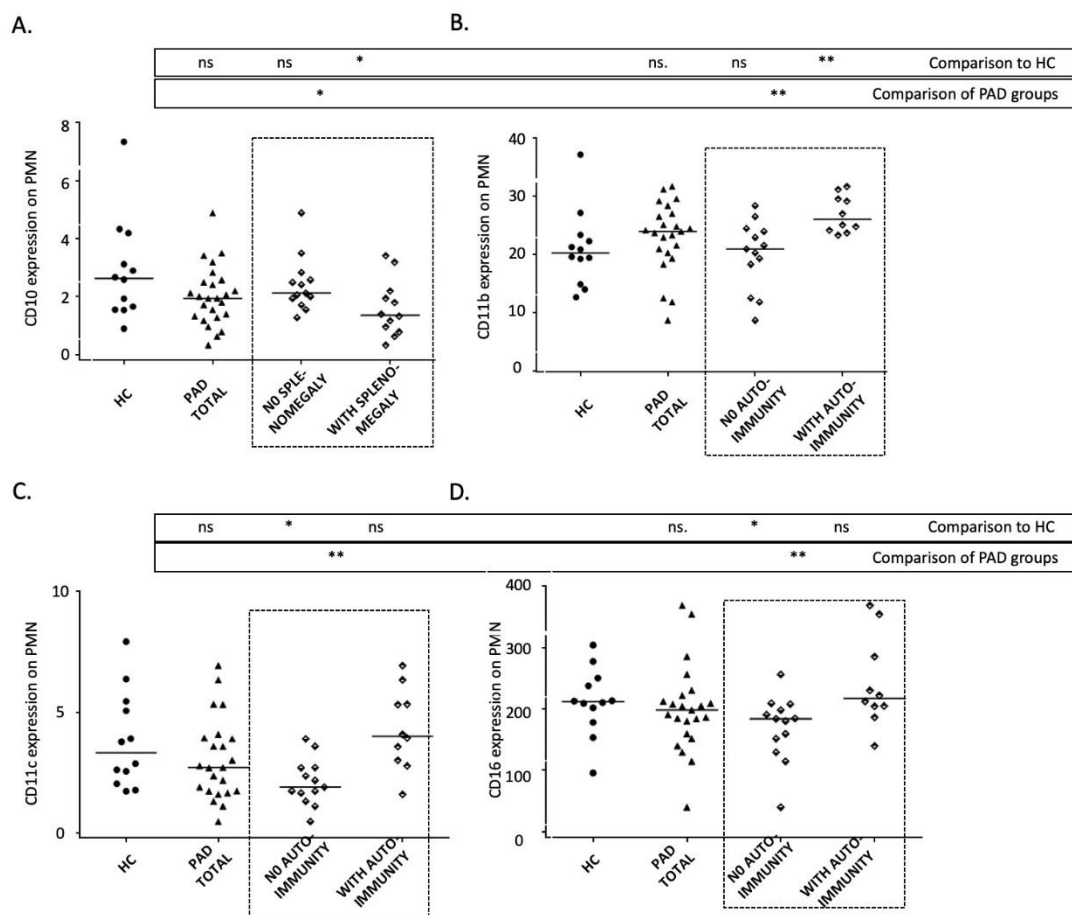
Εικόνα 22: Ένταση έκφρασης των επιφανειακών δεικτών CD64 (A), CD10 (B), CD18 (C), CD11b (D) στα ουδετερόφιλα ολικού αίματος σε ήρεμη φάση (basal state) 4 ασθενών κατά τη διάγνωση (diagnosis) και μετά την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης (after treatment). Ένταση έκφρασης των επιφανειακών δεικτών CD16 (E) και CD11b (F) στα ουδετερόφιλα ολικού αίματος μετά από καλλιέργεια παρουσία LPS ασθενών κατά τη διάγνωση (diagnosis) και μετά την έναρξη της θεραπείας

υποκατάστασης (after treatment). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε Wilcoxon matched-paired analysis * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό. Οι διαφορές είναι στατιστικά μη σημαντικές.

ΠΙ.2.β. Σχέση των κλινικών χαρακτηριστικών με τον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων.

Καθώς οι PAD συνιστούν μία ετερογενή ομάδα διαταραχών, διερευνήσαμε περαιτέρω την υπόθεση εάν συγκεκριμένοι κλινικοί φαινότυποι σχετίζονται με τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων της φυσικής ανοσίας.

Πράγματι, διαπιστώσαμε ότι οι ασθενείς με σπληνομεγαλία επέδειξαν χαμηλότερη ένταση έκφρασης CD10 συγκριτικά με αυτούς που δεν είχαν ($p=0,03$). Επιπρόσθετα, στα ουδετερόφιλα μετά από διαδικασία απομόνωσης, παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση των ασθενών με αυτοάνοσες εκδηλώσεις, η ένταση έκφρασης CD11b, CD11c και CD16 ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p=0,001$, $p=0,001$ και $p<0,001$, αντίστοιχα). Τέλος η έκφραση δεικτών στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα δεν διέφερε σημαντικά στους υπόλοιπους κλινικούς φαινοτύπους των ασθενών με PAD σε όλες τις πειραματικές συνθήκες ($p>0,05$, σε όλες τις περιπτώσεις). (Εικόνα 23)



Εικόνα 23: Σύγκριση της έντασης έκφρασης επιφανειακών δεικτών των ουδετεροφίλων CD10 (A) σε κατάσταση ολικού αίματος ήρεμης φάσης, και CD11b (B), CD11c (C), και CD16 (D) σε ουδετερόφιλα μετά από απομόνωση σε κλινικούς φαινοτύπους. Splenomegaly: σπληνομεγαλία, Autoimmunity: αυτοανοσία. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test *: όταν $p < 0.05$; **: όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό. Η μαύρες οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν τη διάμεση τιμή.

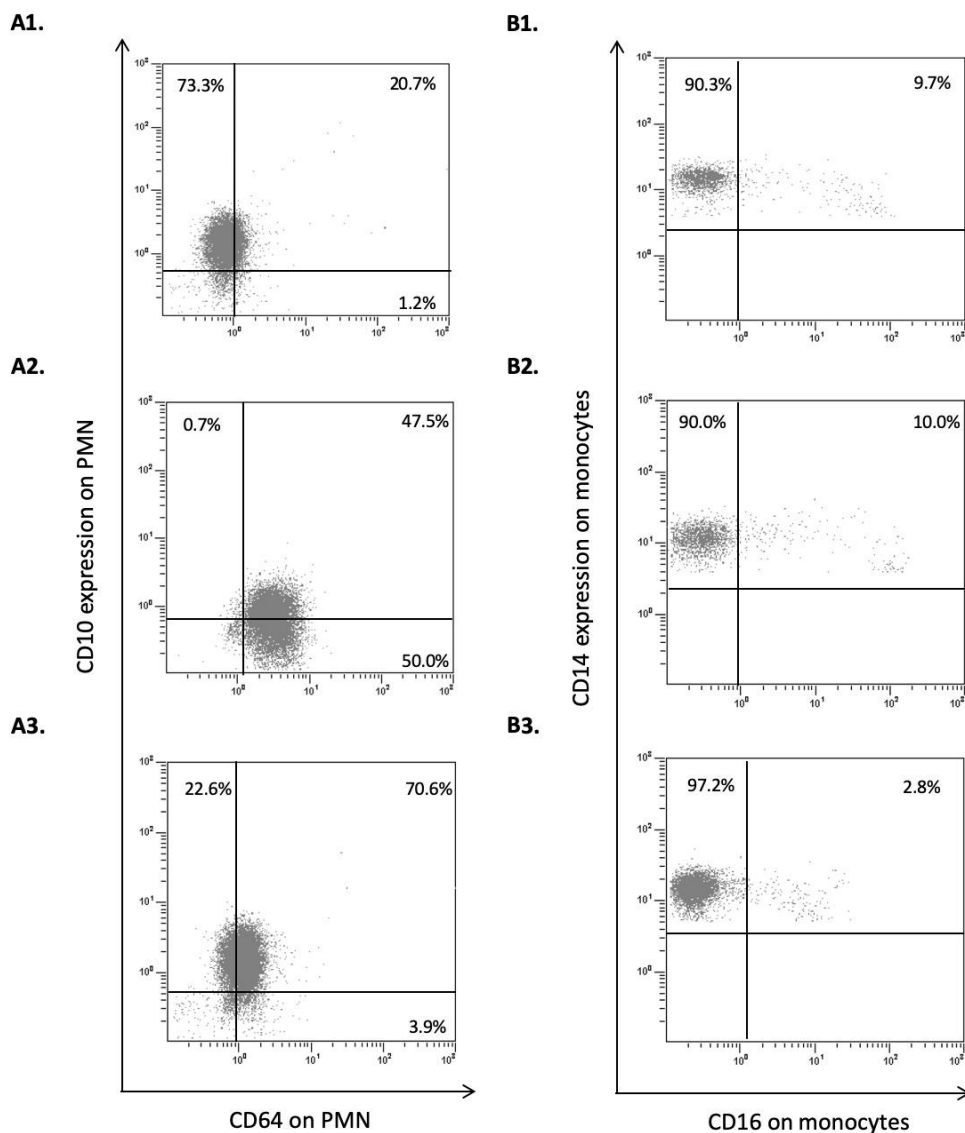
III.2.γ. Μελέτη ασθενούς σε διαφορετικές κλινικές καταστάσεις.

Μεταξύ των ασθενών που μελετήθηκαν, είχαμε την δυνατότητα να διερευνήσουμε και έναν νεοδιαγνωσθέντα ασθενή με CVID, με σοβαρή υπογαμμασφαιριναιμία και απουσία αντισωματικών απαντήσεων μετά από εμβολιασμό, χωρίς ιστορικό υποτροπιάζουσών και χρόνιων λοιμώξεων. Ο ασθενής αυτός προσήλθε για κλινική εξέταση και εργαστηριακές αναλύσεις στο ιατρείο ανοσοανεπαρκειών του ΠΓΝΛ όπως και οι γονείς αυτού, στα πλαίσια διερεύνησης μελών της οικογένειας ασθενών με CVID, καθώς στον αδερφό του είχε ήδη τεθεί η διάγνωση CVID, πληρώντας τα κριτήρια. Επειδή ο αδερφός του λάμβανε ανοσοκατασταλτική θεραπεία με κορτικοειδή

λόγω υποτροπιάζουσας αυτοάνοσης θρομβοπενικής πορφύρας, τέθηκε εκτός της μελέτης καθώς η λήψη κορτικοειδών ήταν ένα από τα κριτήρια αποκλεισμού εφόσον επηρεάζουν τη φυσική ανοσία και γενικότερα τη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος.

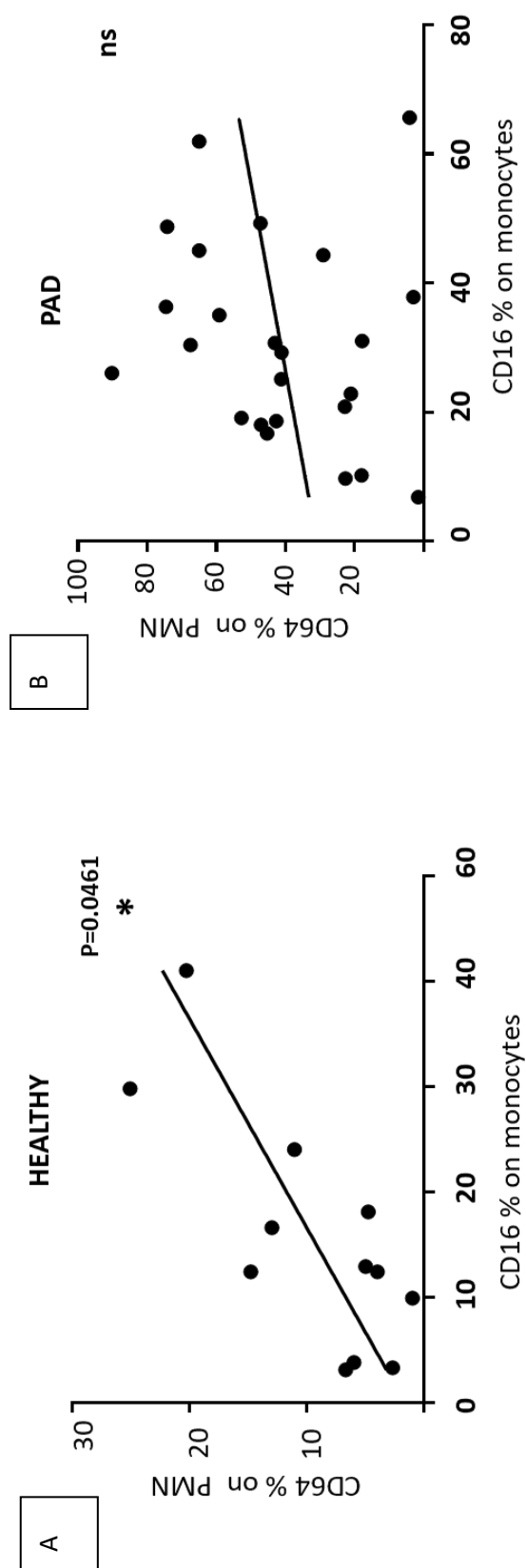
Ο ασθενής που μελετήσαμε δεν ελάμβανε θεραπεία υποκατάστασης λόγω άρνησης αυτής. Αξιολογήσαμε τον ανοσοφαινότυπο ολικού περιφερικού αίματος σε διάφορες κλινικές καταστάσεις. Συγκεκριμένα: 1) Κατά την διάγνωση, με απουσία λοίμωξης, 2) σε φάση λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού με παρουσία εξανθήματος, 3) χωρίς παρουσία λοίμωξης, οχτώ μήνες μετά την αρχική διάγνωση.

Μετά από ανοσοφαινοτυπική ανάλυση διαπιστώσαμε ότι ενώ η έκφραση των μορίων CD64 και CD10 μεταβλήθηκε σημαντικά αναλογικά με την εκάστοτε κλινική κατάσταση, η έκφραση του CD16 στα μονοκύτταρα έμεινε αμετάβλητη και μάλιστα σε χαμηλά επίπεδα. Κατά τη λοίμωξη παρατηρήσαμε αύξηση της έκφρασης του CD64 που συνιστά δείκτη διέγερσης και πτώση του CD10, μόριο ενδεικτικό της ωριμότητας των ουδετεροφίλων, γεγονός που υποδεικνύει την αναμενόμενη «στροφή προς τα αριστερά» που παρατηρείται στις λοιμώξεις. Πέντε μήνες μετά τη λοίμωξη, όταν επαναλήφθηκε η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση σε ήρεμη φάση, διαπιστώθηκε ότι ενώ η έκφραση του CD10 επανήλθε στα αρχικά επίπεδα, η έκφραση του CD64 παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα. (Εικόνα 24)



Εικόνα 24: Στικτογράμματα συνάρτησης έκφρασης CD64 και CD10 στα ουδετερόφιλα (A1, A2, B2) και συνάρτησης έκφρασης CD16 και CD14 στα μονοκύτταρα στον ασθενή PAD #1 D.K. . A1 και B1: συνθήκη χωρίς λοίμωξη, A2 και B2 συνθήκη υπό λοίμωξη. A3 και B3: συνθήκη μήνες μετά το πέρας της λοίμωξης.

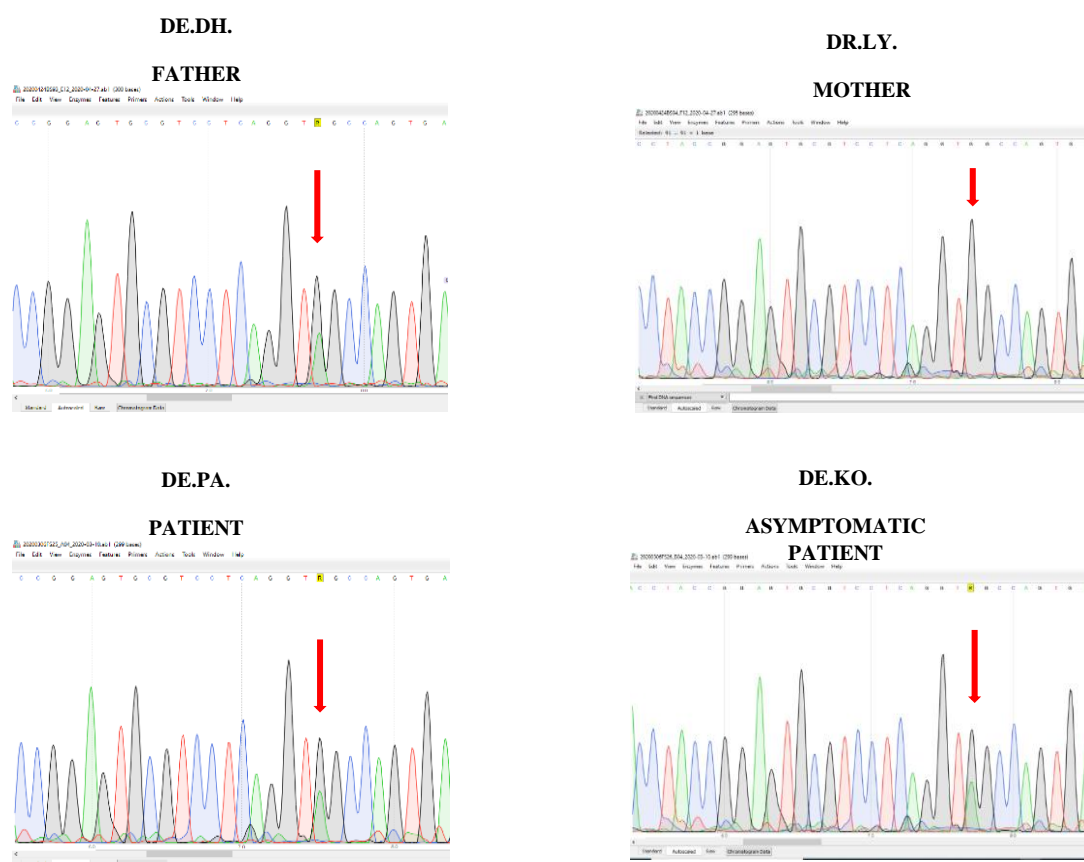
Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που η έκφραση του CD64 στα PMN συσχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα έκφρασης του CD16 στα μονοκύτταρα υγιών μαρτύρων, υπήρχαν ορισμένοι ασθενείς, όπως αυτός που περιγράφηκε παραπάνω που εμφάνισαν υψηλή έκφραση CD64 στα PMN αλλά χαμηλή έκφραση του CD16 στα μονοκύτταρα, ή το αντίθετο. (Εικόνα 25)



Εικόνα 25: Συνάρτηση έκφρασης ποσοστού έκφρασης CD64 στα ουδετερόφιλα και CD16 στα μονοκύτταρα ήρεμης φάσης, φυσιολογικών μαρτύρων (A) και ασθενών με PAD (B) σε συνθήκη ολικού αίματος. Η στατιστική ανάλυση έγινε με Spearman correlation ανάλυση. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε $\alpha=0,05$ (2-sided).

Εφόσον οι δύο ασθενείς είναι συγγενείς πρώτου βαθμού (αδέρφια) και πάσχουν από το ίδιο νόσημα αν και με διαφορετική κλινική εικόνα, τίθεται έντονα η υπόνοια για την ύπαρξη κοινού γενετικού υποβάθρου που οδηγεί στην εκδήλωση του συνδρόμου και μάλιστα κληρονομικής φύσης. Σε πρώτη φάση αναλύθηκαν με αλληλούχιση κατά Sanger τα γονίδια TACI και CTLA4 που απαντώνται βλάβες μονογονιδιακής αιτιολογίας με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με CVID και σύνδρομο απορρύθμισης του ανοσιακού συστήματος, και διαπιστώθηκε φυσιολογικός γονότυπος. Εν συνεχεία το γενετικό υλικό του ασθενούς με τη σοβαρότερη κλινική εικόνα αναλύθηκε με αλληλούχιση νέας γενιάς, NGS (CEMIA SA), όπου διαπιστώθηκε η μετάλλαξη c.571C>T, p.His191Tyr σε κατάσταση ετεροζυγωτίας, στο γονίδιο *IKZF1*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Ikaros. Έτσι τέθηκε πλέον η οριστική διάγνωση για ανεπάρκεια Ikaros (CVID13)

Στη συνέχεια αναλύθηκαν με αλληλούχιση κατά Sanger ο αδερφός του ασθενούς που ήταν ενταγμένος στη μελέτη μας καθώς και οι γονείς των ασθενών. (Εικόνα 26)



Εικόνα 26: Χρωματογραφήματα ανάλυσης κατά Sanger του εξονίου 5 του γονιδίου *IKZF1* Απεικονίζεται η ανάλυση της οικογένειας του ασθενούς PAD#1, D.K. DE. DH. FATHER: Πατέρας

ασθενούς. DR.LY: Μητέρα ασθενούς. DE.PA.: Αδερφός ασθενούς με ανεπάρκεια *IKZF1-CVID13*.
DE.KO.: Ασθενής μελέτης PAD#1.. Με το κόκκινο βέλος υποδεικνύεται η θέση της μετάλλαξης.

Διαπιστώθηκε ότι και ο αδερφός έφερε την εν λόγω μετάλλαξη σε ετερόζυγη κατάσταση, ενώ αυτή είχε κληρονομηθεί από τον πατέρα ο οποίος ήταν ασυμπτωματικός και την έφερε και αυτός σε ετερόζυγη κατάσταση. (Εικόνα 26)

Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ένα βαθύτερο ρόλο των κυττάρων της φυσικής ανοσίας στις PAD που αναλύεται στο κεφάλαιο της συζήτησης.

IV. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας Ι. Ποσοστά (Α) και απόλυτοι αριθμοί (Β) υποπληθυσμών μονοκυττάρων στους ασθενείς με PAD και στις ομάδες ελέγχου της μελέτης.

A. ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (%)				HC vs PAD	HC vs SEPSIS	PAD VS SEPSIS
	HC (n=12)	PAD (n=25)	SEPSIS (n=4)	p	p	p
Classical (mean, SDEV)	78.1 ± 17.3	65.6 ± 16.0	62.9 ± 16.5	0.018	0.133	0.818
Intermediate (mean, SDEV)	14.6 ± 14.1	24.7 ± 14.6	29.6 ± 17.0	0.018	0.103	0.584
Non classical (mean, SDEV)	6.1 ± 4.0	8.1 ± 3.8	6.8 ± 4.0	0.106	0.684	0.671

B. ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (x10 ⁹ /L περιφερικού αίματος)				HC vs PAD	HC vs SEPSIS	PAD VS SEPSIS
	HC	PAD	SEPSIS	p	p	p
Απόλυτος αριθμός του συνόλου του μονοκυττάρων (mean, SDEV)	0.305 ± 0.123	0.375 ± 0.245	0.325 ± 0.206	0.772	0.932	0.825
Classical (mean, SDEV)	0.247 ± 0.105	0.263 ± 0.215	0.179 ± 0.083	0.402	0.262	0.865
Intermediate (mean, SDEV)	0.035 ± 0.025	0.080 ± 0.050	0.120 ± 0.109	0.010	0.262	0.542
Non classical (mean, SDEV)	0.018 ± 0.013	0.026 ± 0.016	0.021 ± 0.023	0.185	>0.999	0.382

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ: HC, healthy controls: υγιείς μάρτυρες. PAD, primary antibody deficiencies: πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες. PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν p < 0.05; ** : όταν p < 0.01; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό.

Η p αναφέρεται στη σύγκριση των ασθενών με PAD με τους υγιείς μάρτυρες, των ασθενών με σήψη με τους υγιείς μάρτυρες και των ασθενών με PAD με τους ασθενείς με σήψη.

Πίνακας II: Έκφραση επιφανειακών δεικτών στα ουδετερόφιλα ολικού αίματος σε ήρεμη φάση.

Δείκτες	HC (n 12)	Patients with sepsis (n 4)	PAD patients (n 25)	<i>p</i> ₁	<i>p</i> ₂
Absolute number (x10 ⁹ /L) (mean, SDEV)	4.5 ± 1.8	9.3 ± 2.8	4.5 ± 2.5	0.586	0.011
CD16 (mean, SDEV)	175.6 ± 41.7	81.6 ± 32.0	153.7 ± 43.0	0.052	0.004
CD18 (mean, SDEV)	9.2 ± 4.3	10.9 ± 4.9	9.7 ± 4.3	0.747	0.684
CD11b (mean, SDEV)	15.6 ± 7.0	14.9 ± 3.9	16.4 ± 4.9	0.336	0.951
CD66b (mean, SDEV)	5.6 ± 1.5	12.6 ± 5.9	6.2 ± 2.1	0.387	0.002
CD64 (mean, SDEV)	0.2 ± 0.1	1.8 ± 1.3	1.0 ± 0.7	< 0.001	0.001
CD10 (mean, SDEV)	2.9 ± 1.8	0.9 ± 0.9	2.0 ± 1.0	0.160	0.019
CD11c (mean, SDEV)	2.2 ± 1.2	1.9 ± 1.0	1.7 ± 1.0	0.195	0.782

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ: HC, healthy controls: υγιείς μάρτυρες. PAD, primary antibody deficiencies: πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες. PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό.

*p*₁: Σύγκριση ασθενών με PAD με HC. *p*₂: Σύγκριση ασθενών με σήψη με τους HC.

Πίνακας III. Έκφραση επιφανειακών δεικτών των ουδετεροφίλων μετά από απομόνωση.

Δείκτες	HC (n 12)	PAD patients (n 23)	<i>p</i>
CD16 (mean, SDEV)	212.1 ± 54.9	200.7 ± 71.1	0.293
CD18 (mean, SDEV)	14.4 ± 7.7	16.2 ± 7.6	0.493
CD11b (mean, SDEV)	21.0 ± 6.5	23.0 ± 6.0	0.139
CD66b (mean, SDEV)	9.1 ± 2.8	8.5 ± 4.1	0.716
CD64 (mean, SDEV)	0.2 ± 0.1	1.1 ± 1.1	< 0.001
CD10 (mean, SDEV)	5.7 ± 2.4	4.6 ± 2.3	0.151
CD11c (mean, SDEV)	3.8 ± 2.0	3.1 ± 1.7	0.262

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ: HC, healthy controls: υγιείς μάρτυρες. PAD, primary antibody deficiencies: πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες. PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν $p < 0.05$.

0.05; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό. p : Σύγκριση ασθενών με PAD με HC.

Πίνακας IV. Έκφραση επιφανειακών δεικτών των ουδετεροφίλων μετά από επώαση ολικού αίματος χωρίς LPS.

Δείκτες	HC (n 12)	PAD patients (n 25)	p
CD16 (mean, SDEV)	214.2 ± 38.5	174.6 ± 61.0	0.012
CD18 (mean, SDEV)	12.5 ± 7.1	12.5 ± 6.1	0.736
CD11b (mean, SDEV)	35.3 ± 5.8	36.1 ± 10.1	0.630
CD66b (mean, SDEV)	11.1 ± 3.3	12.0 ± 6.5	0.783
CD64 (mean, SDEV)	0.2 ± 0.2	0.9 + 0.7	0.009
CD10 (mean, SDEV)	4.4 ± 1.5	3.6 ± 1.8	0.393

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ: HC, healthy controls: υγιείς μάρτυρες. PAD, primary antibody deficiencies: πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες. PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό. p : Σύγκριση ασθενών με PAD με HC.

Πίνακας V. Έκφραση επιφανειακών δεικτών ουδετεροφίλων μετά από καλλιέργεια ολικού αίματος παρουσία LPS.

Δείκτες	HC (n 12)	PAD patients (n 25)	p
CD16 (mean, SDEV)	96.3 ± 34.8	102.5 ± 44.4	0.723
CD18 (mean, SDEV)	14.2 ± 6.8	13.5 ± 5.8	0.266
CD11b (mean, SDEV)	60.0 ± 5.7	59.1 ± 15.3	0.630
CD66b (mean, SDEV)	39.3 ± 18.4	34.3 ± 18.0	0.431
CD64 (mean, SDEV)	0.2 ± 0.1	0.9 + 0.8	0.013
CD10 (mean, SDEV)	4.3 ± 1.1	3.3 ± 1.7	0.107

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ: HC, healthy controls: υγιείς μάρτυρες. PAD, primary antibody deficiencies: πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες. PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Mann-Whitney U test * : όταν $p < 0.05$; ** : όταν $p < 0.01$; ns: not significant, μη στατιστικά σημαντικό. p : Σύγκριση ασθενών με PAD με HC.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

V.1. Η επίπτωση των πειραματικών χειρισμών στον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων.

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι τα επιφανειακά μόρια τα οποία είναι πιο ευαίσθητα στην μη ειδική μεταβολή της έκφρασης εξαιτίας της διαδικασίας της απομόνωσης είναι τα CD10 και CD16. Μόρια προσκόλλησης όπως τα CD11b και CD66b είναι πιο επιρρεπή σε αλλαγές των επιπέδων έκφρασης σε συνθήκες καλλιέργειας ακόμα και απουσία διεγέρτη. Το CD66b δείχνει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων στην έκφρασή του ως απόκριση των ουδετεροφίλων στην επίδραση LPS. Το CD64 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων και η έκφρασή του δεν επηρεάζεται από την πειραματική μεταχείριση ούτε από την παρουσία LPS όπως αναμενόταν, καθώς συνιστά μόριο το οποίο διατηρεί σταθερό πρότυπο έκφρασης εκτός εάν η έκφρασή του επαχθεί από κυτταροκίνες όπως η IFN- γ και ο G-CSF.(167,168)

Τα ουδετερόφιλα ως τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα στην περιφέρεια, η ρύθμιση του περιεχομένου τους λαμβάνει χώρα στον μυελό των οστών και χαμηλή έκφραση γονιδίων παρατηρείται στις ώριμες μορφές. Αυτή αφορά κυρίως στην παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών που ρυθμίζουν τη φλεγμονή.(3) Ως εκ τούτου η πρωταρχική διέγερση (priming) και η κατάσταση ενεργοποίησης συνίσταται ως επί το πλείστον από φαινόμενα κυτταροσκελετικών αναδιαμορφώσεων, αποκοκκίωσης και παραγωγής ROS.(52) Η αποκοκκίωση έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση των περιεχομένων τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον καθώς και στην πλασματική μεμβράνη μετά από τη σύντηξη των κοκκίων με αυτή. Έτσι τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων κοκκιοκυτταρικών δεικτών συνήθως προσεγγίζει το μέγιστο έκφρασης στα φυσιολογικά ουδετερόφιλα και δεν μεταβάλλονται από μετέπειτα ερεθίσματα.(80)

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια περιέχονται στα ουδετεροφιλικά κοκκία. Η εκλεκτική αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων κοκκίων είναι ενδεικτική του φαινομένου της αποκοκκίωσης. (76)Για τον εκάστοτε δείκτη είναι γνωστό το ειδικό κυστιδιακό διαμέρισμα στο οποίο αυτός εδράζεται. Ως εκ τούτου μπορούμε να κάνουμε υποθέσεις αναφορικά με τα αντιμικροβιακά πεπτίδια με τα οποία σχετίζονται αυτοί οι δείκτες. Αυτά τα μόρια ως επί το πλείστον είναι προ-συντιθεμένα και εμπεριέχονται στις μεμβράνες των ουδετεροφιλικών κοκκίων. Μετά από την σύντηξη των μεμβρανών των

κοκκίων με την πλασματική μεμβράνη αυτά τα μόρια εκτίθενται στην κυτταρική επιφάνεια.(14)

Οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης μπορούν να αξιοποιηθούν ως ένα μέτρο ποσοτικοποίησης της ενεργοποίησης, μετά από επίδραση διαφόρων διεγερτών, ή εναλλακτικά μπορούν να ερμηνευθούν ως κατάσταση πρωταρχικής ενεργοποίησης του κυττάρου.(15,23,27)

Ως εκ τούτου όταν διερευνάται η λειτουργία των ουδετεροφίλων *in vitro*, συνήθως τίθεται το ερώτημα της καλύτερης μεθόδου που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τον σκοπό αυτό. Τα ουδετερόφιλα είναι ευαίσθητα κύτταρα στο χειρισμό, με μεγάλη πλαστικότητα και ταχέως μπορούν να υποστούν μη ειδική ενεργοποίηση, θέτοντας ένα μείζονα προβληματισμό όταν αξιολογούνται λειτουργικές αλλαγές καθώς και αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης επιφανειακών δεικτών.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές οι οποίες αναλύουν την επίπτωση στον ανοσοφαινότυπο, διαφορετικών μεθόδων απομόνωσης των ουδετεροφίλων, διαφορετικών αντιπηκτικών,(156) μονιμοποιητικών μέσων(163) και θερμοκρασιακών συνθηκών.(163) Αυτές οι μέθοδοι επηρεάζουν και λειτουργικές αποκρίσεις όπως η ομοιόσταση ασβεστίου, η παραγωγή ROS, η φαγοκυττάρωση και η πέψη βακτηριακών προϊόντων. (156)

Αυτές οι μελέτες αφορούν σε απομονωμένα ουδετερόφιλα, η συστήματα ολικού αίματος σε συνθήκες καλλιέργειας ή μη. Παρόλ'αυτά δεν υπάρχει κάποια συμφωνία αναφορικά με τη καλύτερη μέθοδο για την μελέτη των κυττάρων αυτών, οδηγώντας στο πρόβλημα ότι τα προκύπταντα δεδομένα από διαφορετικές μελέτες δεν μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους και κυρίως οδηγούν σε αντιφατικά και αντίθετα αποτελέσματα.

Στην δική μας μελέτη, διερευνήσαμε ταυτόχρονα την επίπτωση διαφορετικών πειραματικών συνθηκών, οι οποίες είναι οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες και αναφερόμενες στη βιβλιογραφία.

Επικεντρωθήκαμε στον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων καθώς συνιστά μία μέθοδο ταχείας ανίχνευσης πιθανών βλαβών και οι αλλαγές της έκφρασης των επιφανειακών δεικτών συνιστούν ένδειξη λειτουργικών αλλαγών.(169) Ως εκ τούτου μπορούμε να αντλήσουμε χρήσιμες πληροφορίες.

Στο πείραμά μας ενσωματώσαμε τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες τεχνικές και αναλύσαμε την έκφραση πολλαπλών επιφανειακών δεικτών που επίσης είναι οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενοι.

Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι οι πειραματικοί χειρισμοί μεταβάλλουν σημαντικά τον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων, φαινόμενο το οποίο θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν όταν διεξάγονται λειτουργικές μελέτες οι οποίες διερευνούν φαινόμενα ανοσιακής απορρύθμισης. Σε οποιαδήποτε περίπτωση, η αξιολόγηση των ουδετεροφίλων σε ήρεμη φάση σε συνθήκες ολικού αίματος θα πρέπει να διεξάγεται. Προκειμένου να διερευνηθεί η λειτουργική ικανότητα των ουδετεροφίλων, η ελάχιστη πειραματική μεταχείριση θα πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να αποφεύγεται η μη-ειδική διέγερση και να εξάγονται ασφαλέστερα συμπεράσματα όταν ανάγονται *in vitro* δεδομένα για την ερμηνεία *in vivo* φαινομένων.

V.2. Η λειτουργία των ουδετεροφίλων σε ασθενείς με PAD

Στη μελέτη μας δείχνουμε ότι οι ασθενείς με PAD επιδεικνύουν μία εμμένουσα κατάσταση ενεργοποίησης στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα, ενδεικτικής της χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης που αποτελεί χαρακτηριστικό της νόσου. Η υποκατάσταση με γ-σφαιρίνη δεν επιφέρει σημαντική τροποποίηση σε αυτήν την κατάσταση ενεργοποίησης, αλλά φαίνεται να αποκαθιστά μία πιο επαρκή ικανότητα των ουδετεροφίλων να αποκρίνονται στη διέγερση με LPS και κατ'επέκταση σε παθογόνα.

Διαταραχές στο τμήμα της φυσικής ανοσίας μπορεί να σχετίζονται με τον φαινότυπο των PAD. Διαταραχές της φυσιολογίας των ουδετεροφίλων, είτε εγγενείς, είτε ως επιφαινόμενα, μπορεί να συνεισφέρουν στην αυξημένη επιρρέπεια των ασθενών με PAD στις λοιμώξεις, παρά τη λήψη θεραπείας υποκατάστασης. Αυτό μπορεί να συμβαίνει μέσω διάφορων μηχανισμών επηρεάζοντας άμεσα την απόκριση στα παθογόνα λόγω διαταραχών στους μηχανισμούς της φαγοκυττάρωσης, της χημειοταξίας, της διακυτταρικής μετανάστευσης κ.α. Από την άλλη, αυτές οι διαταραχές μπορεί να επηρεάζουν τη διαλεκτική επικοινωνία των ουδετεροφίλων με τα άλλα σκέλη του ανοσιακού συστήματος, συνεισφέροντας κατ'αυτόν τον τρόπο στην ανάδυση και/ή στην επιδείνωση και χρονιότητα των άλλων φλεγμονωδών εκδηλώσεων της νόσου.

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι τα ουδετερόφιλα των ασθενών με PAD, επιδεικνύουν έναν πιο άωρο φαινότυπο συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες.

Επιπρόσθετα επιδεικνύουν κατάσταση ενεργοποίησης, αν και σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτά των ασθενών με σήψη.

Κατά το σχεδιασμό της μελέτης, τέθηκε το ζήτημα της χρήσης επιπλέον ομάδων ασθενών, στα πλαίσια της αξιολόγησης της επίδρασης της θεραπείας υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη, όπως οι ασθενείς με νευρολογικές παθολογίες (π.χ. πολλαπλή σκλήρυνση).(172) Αφού όμως και αυτές οι καταστάσεις συνιστούν ανοσομεσολαβούμενα νοσήματα, η ένταξη τέτοιων ασθενών δε θα μπορούσε να είναι αντιπροσωπευτική για το υπό μελέτη φαινόμενο, αυτό δηλαδή της επίδρασης της γ-σφαιρίνης στη φυσιολογία των κυττάρων της φυσικής ανοσίας. Επιπρόσθετα, άλλα συστηματικά νοσήματα που επηρεάζουν τη φυσιολογία των ουδετεροφίλων θα μπορούσαν να αποτελέσουν ομάδες ασθενών ελέγχου.(59,173) Παρόλ'αυτά, στα πλαίσια του ότι η σήψη έχει ήδη διερευνηθεί εκτενώς σε ανοσοφαινοτυπικό επίπεδο, σε πολλές μελέτες, δίνοντας μάλιστα αναπαραγόμενα αποτελέσματα, καταλήξαμε στη συμπερίληψη αυτών των ασθενών ως την πιο αντιπροσωπευτική κλινική οντότητα ενός ανοσοποιητικού συστήματος. (51,174,175)

Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζονται και από τα ευρήματα μελετών στη βιβλιογραφία, που έχουν δείξει αύξηση της έκφρασης δεικτών ενεργοποίησης, όπως η ελαστάση και η περοξειδάση (MPO) στον ορό ασθενών με COVID,(148) ιδιαίτερα σε αυτούς που παρουσίαζαν σπληνομεγαλία, ενώ η θεραπεία υποκατάστασης οδήγησε σε περαιτέρω ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων *in vivo* και *in vitro*.(176) Στα ίδια πλαίσια, η Vlkonα και συν. περιέγραψαν πρόσφατα αυξημένες συγκεντρώσεις NGAL (gelatinase-associated lipocalin), στο πλάσμα ασθενών(149) καθώς επίσης και ανοσοφαινοτυπικές μεταβολές που αφορούν στην έκφραση υποδοχέων στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων, όπως αυξημένα επίπεδα CD11b, PD-L1 και μειωμένα επίπεδα CD16, CD62L και CD80, που είναι επίσης ενδεικτικά μίας σταθερής κατάστασης ενεργοποίησης των κυττάρων αυτών.(149) Ανάλογα ευρήματα είχε και η ομάδα των Casulί και συν., οι οποίοι έδειξαν ότι χαμηλές συγκεντρώσεις IVIG μπορούν να επάγουν την ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων υγιών ατόμων *in vitro*.(177)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το σημαντικότερο εύρημα της μελέτης ήταν το αυξημένο ποσοστό έκφρασης CD64 στα ουδετερόφιλα των ασθενών PAD, ανεξάρτητα από την κατάσταση θεραπείας. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του CD64 στα ουδετερόφιλα επάγεται από κυτταροκίνες όπως ο G-CSF και η IFN-γ.(168) Υψηλή έκφραση αυτού αναφέρεται σε μία σειρά δημοσιεύσεων που αφορούν σε καταστάσεις οξείας και χρόνιας φλεγμονής, όπως σε βακτηριακές λοιμώξεις, στη σήψη

και σε αυτοφλεγμονώδη σύνδρομα όπως ο FMF και το σύνδρομο PFAPA (Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, Adenitis).(40,167,178) Από την άλλη έχει δειχθεί ότι η έκφρασή του δεν αυξάνεται σημαντικά σε καταστάσεις φλεγμονής που σχετίζονται με αυτοάνοσες διαταραχές.(178,179) Όσον αφορά στις πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες, υπάρχει μόνο μία μελέτη στη βιβλιογραφία η οποία διερευνά την έκφραση του CD64 στα ουδετερόφιλα ασθενών με CVID η οποία καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η υψηλή έκφραση αυτού σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση και έκβαση της νόσου.(152)

Από τη άλλη υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία που αναλύουν την έκφραση του CD16 στα πολυμορφοπύρρηνα ασθενών με CVID με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Thon και συν. Έδειξαν ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του CD16 ασθενών CVID και υγιών μαρτύρων.(152) Από την άλλη οι Casuli και συν. Έδειξαν χαμηλότερη έκφραση στη δικιά τους κοόρτη ασθενών, εύρημα που συμφωνεί και με τα ευρήματα της δικιάς μας κοόρτης.(130) Επιπρόσθετα οι Prezzo και συν. δεν παρατήρησαν διαφορές στην έκφραση του CD16 σε ασθενείς υπό θεραπεία, των οποίων η συγκριτική αξιολόγηση έλαβε πριν τη λήψη της δόσης υποκατάστασης και αμέσως μετά τη λήψη αυτής, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η γ-σφαιρίνη δεν ασκεί κάποια επίδραση τη λειτουργία των ουτεροφίλων.(180)

Ένα πλεονέκτημα της μελέτης μας ήταν ότι είχαμε την ευκαιρία να μελετήσουμε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, πριν την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης και αρκετούς μήνες μετά την έναρξη αυτής. Αυτό καθιστά τα ευρήματα πιο αντιπροσωπευτικά της επίδρασης της θεραπείας με ανοσοσφαιρίνη στη λειτουργία των ουτεροφίλων. Σε αυτά τα πλαίσια, παρατηρήσαμε ότι μήνες μετά την έναρξη θεραπείας υποκατάστασης, οι ασθενείς με PAD επιδεικνύουν μία αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης της ιντεγκρίνης CD11b καθώς και του CD16 μετά από επώαση παρουσία LPS, φαινόμενο που υποδεικνύει καλύτερη ικανότητα ενεργοποίησης μετά την έναρξη θεραπείας. Τα αποθηκευτικά κυστίδια των ουτεροφίλων δεν αποτελούν μόνο πηγές πρωτεολυτικών και βακτηριοκτόνων πρωτεϊνών, αλλά συνιστούν και σημαντικές παρακαταθήκες μεμβρανικών πρωτεϊνών οι οποίες ενσωματώνονται στη μεμβράνη των πολυμορφοπυρήνων όταν τα οργανίδια συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη και εξωκυττώνουν το περιεχόμενό τους.(11) Το CD11b εδράζεται στα εκκριτικά κυστίδια και στα κοκκία ζελατινάσης ενώ το CD66b βρίσκεται στη μεμβράνη των ειδικών κοκκίων.(76) Τα συστατικά των κοκκίων συντίθενται και αποθηκεύονται κατά την διαφοροποίηση των ουτεροφίλων στον μυελό των οστών.

Η *de novo* μεταγραφή του CD11b και του CD66b στο αίμα είναι απύσα. Από ανοσολογικής/βιολογικής άποψης τα πιο σημαντικά δεδομένα είναι η αλλαγή της επιφανειακής έκφρασης (ανεξάρτητα των ενδοκυττάρων επιπέδων) καθώς επιτρέπουν την προσκόλληση και την αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον. (181)

Ως εκ τούτου, συμπεραίνουμε ότι τα συμπεράσματά μας είναι πιο αντιπροσωπευτικά αναφορικά με την επίδραση της θεραπείας υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη στον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων της φυσικής ανοσίας σθενών με PAD.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό έκφρασης CD16 στα μονοκύτταρα ασθενών με σήψη και PAD, συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Τα CD16+ μονοκύτταρα αντιπροσωπεύουν τον επονομαζόμενο υποπληθυσμό των φλεγμονωδών μη-κλασσικών μονοκυττάρων.(182,183) Αυτός παρατηρείται σε υψηλό ποσοστό σε καταστάσεις gram αρνητικής σήψης και χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή TNFα και χαμηλά επίπεδα IL-10.(184) Όπως διαπιστώσαμε και στη δικιά μας μελέτη, οι Barbosa και συν. ανέφεραν αυξημένα ποσοστά CD16+ μονοκυττάρων στη CVID αλλά όχι σε ασθενείς με XLA, διατυπώνοντας τη θέση ότι η παρουσία αυτού του πληθυσμού δεν επάγεται λόγω των υψηλών επιπέδων LPS αλλά λόγω των λειτουργικών διαταραχών που είναι κοινές σε ασθενείς με CVID.(185)

Στη μελέτη εντάχθηκαν και δύο ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο CTLA4. Αυτοί οι ασθενείς είχαν αρχικά διαγνωσθεί ως πάσχοντες με CVID, πληρώντας τα διαγνωστικά κριτήρια(101) (υπογαμμασφαιριναιμία, απουσία ειδικών αντισωματικών απαντήσεων σε εμβόλια, αποκλεισμός δευτερογενών αιτιών ανοσοανεπάρκειας), επιδεικνύοντας επιπρόσθετα λεμφοϋπερπλασία και αυτοάνοσες εκδηλώσεις, ενώ λάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης έτη πριν την ανίχνευση των μεταλλάξεων. Όπως είναι ευρέως γνωστό, οι μοριακές βλάβες που προκαλούν CVID είναι άγνωστες για την πλειοψηφία των ασθενών, καθώς η νόσος είναι μία συλλογή διαταραχών με κοινά κλινικά χαρακτηριστικά και εργαστηριακά ευρήματα.(105) Συνεπώς είναι συχνό το φαινόμενο ορισμένοι ασθενείς όπου αρχικά είχε τεθεί η διάγνωση CVID, μετά από μοριακό έλεγχο να διαπιστώνεται ότι αφορούν σε άλλη νόσο, όπως οι ασθενείς που πάσχουν από CTLA4-επαγόμενη ανοσοανεπάρκεια.(186) Οι ασθενείς με μεταλλάξεις του CTLA4, αρχικά θεωρούντο ότι πάσχουν από το σύνδρομο CHAI(187) και πλέον το σύνδρομο κατηγοριοποιείται στα σύνδρομα απορρύθμισης του ανοσιακού συστήματος.(186) Παρόλ'αυτά όπως διαπιστώθηκε για τους ασθενείς της κοόρτης με μεταλλάξεις του CTLA4, τα κλινικά και τα εργαστηριακά τους ευρήματα δεν διέφεραν ουσιαστικά από αυτά των άλλων ασθενών με CVID, γι'αυτό και δεν αποκλείστηκαν εν

τέλει από τη μελέτη μας. Επιπρόσθετα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ούτε στα ανοσοφαινοτυπικά ευρήματα των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες.

Η ποικίλη φύση της νόσου έχει τη βάση της στο διακριτό γενετικό υπόβαθρο το οποίο αποτελεί την αιτία και/ή επηρεάζει τον κλινικό φαινότυπο. Αυτή η ποικιλομορφία αντανακλάται και στα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος,(119) διαπίστωση που προκύπτει και από τα πειράματα που περιγράφηκαν παραπάνω. Πράγματι ασθενείς με PAD με σπληνομεγαλία, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης CD10 στα ουδετερόφιλά τους, υποδεικνύοντας φαινότυπο πιο άωρου κυττάρου. Από την άλλη, ασθενείς με αυτοάνοσες εκδηλώσεις παρουσίασαν φαινότυπο μεγαλύτερης ενεργοποίησης (επιδεικνύοντας αυξημένη έκφραση CD11b και CD16 στα απομονωμένα ουδετερόφιλα), γεγονός το οποίο συνεπάγεται και αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης στο ενδοθήλιο με την επακόλουθη εξαγγείωση καθώς επίσης και αυξημένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης. Στο ίδιο πλαίσιο οι Maggadottir και συν. πρόσφατα περιέγραψαν πολυμορφισμούς στο γονίδιο *ITGAM* που κωδικοποιεί το CD11b, η παρουσία των οποίων εμφάνισε ισχυρή συσχέτιση με τη CVID, υποδεικνύοντας ένα σημαντικότερο ρόλο αυτής της ιντεγκρίνης στην παθογένεση της νόσου και στη διαμόρφωση του κλινικού φαινοτύπου.(188)

Από την άλλη υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι η χρόνια ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, επιδεινώνει την ιστική βλάβη μέσω της παραγωγής των ROS. Η επακόλουθη απελευθέρωση των τοξικών περιεχομένων και των κυτταροκινών που επάγουν τη φλεγμονή, μπορεί να οδηγούν στη συνεχή έκθεση ίδιων επιτόπων και κατ'επέκταση στην προδιάθεση για εμφάνιση αυτοάνοσων εκδηλώσεων.(70)

V.3. Η επίδραση του γενετικού υποβάθρου στη φυσική ανοσία ασθενών με PAD.

Περιγράφηκε επιπρόσθετα ασθενής της κοόρτης ο οποίος αποδείχθηκε ότι πάσχει από CVID13 λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο *IKZF1*. Βλάβες στο γονίδιο *IKZF1* κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα ενώ όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία μπορεί να έχουν χαμηλή διεισδυτικότητα(189), γεγονός που υποδεικνύεται και από το παρόν οικογενειακό δέντρο όπου ο πατέρας είναι ασυμπτωματικός. Ο παρόν τύπος κληρονομικότητας υποδεικνύει ότι συνιστά περίπτωση βλάβης απώλειας λειτουργίας που οδηγεί σε απλοανεπάρκεια(190) όπως συμβαίνει και σε άλλα σχετικά ανοσογονίδια όπως είναι το CTLA4.

Η βλάβη βρίσκεται στο εξόνιο 5 του γονιδίου και αφορά την αντικατάσταση της κυτοσίνης στη θέση 571 της κωδικής αλληλουχίας από μία θυμίνη, η οποία έχει ως συνέπεια την αντικατάσταση του αμινοξέως ιστιδίνη στη θέση 191 της αμινοξικής αλληλουχίας από μία τυροσίνη. Δηλαδή έχουμε αντικατάσταση ενός βασικού αμινοξέως από ένα αρωματικό.

Η εν λόγω βλάβη δεν έχει περιγραφεί σε ασθενείς με CVID ή αιματολογικές κακοήθειες ή μη διαταραχές, δεν αναφέρεται στις βάσεις ExaC και 1000G. Αναφέρεται στη βάση COSMIC, ως σωματική βλάβη σε περίπτωση καρκίνου της γαστροαναπνευστικής οδού.

In silico ανάλυση με το βιοπληροφορικό εργαλείο Mutation Taster (www.mutationtaster.org) δείχνει ότι πρόκειται για παθογόνο βλάβη (disease causing). Επιπρόσθετα, έχει αναπτυχθεί ζωικό μοντέλο ποντικού όπου η πρωτεΐνη Ikaros φέρει στη θέση 191 της αμινοξικής αλληλουχίας, αντί για το αμινοξύ ιστιδίνη (βασικό) το αμινοξύ αργινίνη (βασικό-φορτισμένο), (p.H191R). Τα ποντίκια αυτά δείχθηκε ότι εμφανίζουν υψηλό ρίσκο για την εμφάνιση T- λεμφώματος, όταν φέρουν τη βλάβη σε ετερόζυγη κατάσταση, αλλά σε κατάσταση ομοζυγωτίας η βλάβη είναι θνησιγόνος λόγω της αναιμίας που προκύπτει εξαιτίας της δυσερυθροποίησης.(191)

Σύμφωνα με αυτήν τη μελέτη των Parathanasiou και συν., η υποκατάσταση διαταράσσει τη συντηρημένη επικράτεια Cys2His2, η οποία κανονικά συντονίζει τετραεδρικά ένα ιόν ψευδαργύρου μεταξύ της αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας και της α-έλικας του δακτύλου ψευδαργύρου. Ως εκ τούτου η μετάλλαξη επιδρά στην τεταρτοταγή δομή του δακτύλου ψευδαργύρου 3 του αμινοτελικού άκρου που είναι απαραίτητος για την πρόσδεση του παράγοντα στο DNA.(191)

Η βλάβη αυτή αναφέρεται και στη βάση Uniprot (www.uniprot.org), όπου επιπρόσθετα αναφέρεται ότι η αμινοξική αλληλουχία 180-195 a.a. διαμορφώνει μία επικράτεια η οποία συνιστά το δάκτυλο ψευδαργύρου-3 και είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με υψηλή συγγένεια στο DNA καθώς και για την εντόπιση αυτής σε περικεντρομεριδιακές περιοχές της ετεροχρωματίνης. Υποκατάσταση της ιστιδίνης από αργινίνη οδηγεί σε μείωση της ικανότητας σύνδεσης στο DNA και διάχυτη πυρηνική εντόπιση.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *IKZF1* έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με CVID(189,192) και συνιστούν συγκεκριμένα την κατηγορία CVID13 (OMIM: # 616873), ενώ σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.(192)

Οι μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί στην CVID13, αφορούν ως επί το πλείστον σε παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις σε περιοχές του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης Ikaros,(189) που οδηγούν σε απώλεια της ικανότητας σύνδεσης και κατ'επέκταση έχουν ως συνέπεια διαταραχές στη μεταγραφή γονιδίων που αφορούν στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση κυρίως της λεμφικής σειράς,(193) επηρεάζοντας ωστόσο και σε μικρότερο βαθμό τη φυσική ανοσία(191) και κυρίως τη διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων. (194)

Στον ασθενή που διερευνήσαμε στην μελέτη, διαπιστώθηκε χαμηλό ποσοστό μη-κλασσικών φλεγμονωδών μονοκυττάρων (CD16+), πληθυσμός που δεν μεταβλήθηκε ούτε σε φάση λοίμωξης. Πιθανή αιτιολογία γι' αυτό το φαινόμενο είναι η μετάλλαξη στο γονίδιο *IKZF1*, καθώς υπάρχει επιπρόσθετα πληθώρα αναφορών στη βιβλιογραφία οι οποίες υποστηρίζουν την παρουσία χαμηλού ποσοστού των μη-κλασσικών μονοκυττάρων και αδυναμίας διαφοροποίησης δενδριτικών κυττάρων (194) σε ασθενείς με CVID13. Η ελαττωματική διαφοροποίηση και ο φαινότυπος των δενδριτικών κυττάρων είναι ένα χαρακτηριστικό των ασθενών με CVID το οποίο έχει περιγραφεί σε αρκετές μελέτες,(146,195,196) Παρόλ' αυτά αν και τίθεται το ζήτημα του γενετικού υποβάθρου ως πρωτοπαθές αίτιο για αυτό το φαινόμενο, αυτό δεν είχε διερευνηθεί ποτέ. Η ανάλυση του ασθενούς που περιγράφηκε παραπάνω, αποτελεί παράδειγμα της σημασίας της διερεύνησης του γενετικού προφίλ τέτοιων ασθενών για τη διαλεύκανση των πιθανών παθογενετικών μηχανισμών που οδηγούν στην έκφραση συγκεκριμένων κλινικών και κυτταρικών φαινοτύπων.

Αρκετές σημαντικές κλινικές καταστάσεις σχετίζονται με την υπερ- ή υπο-ενεργοποίηση του πληθυσμού των ουδετεροφίλων. Από τη μια, χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η ΧΑΠ, και οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως το σύνδρομο

της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης, σχετίζονται με την υπερενεργοποίηση των ουδετεροφίλων. Υπό τέτοιες καταστάσεις είναι πιθανόν η καταστολή των ουδετεροφίλων προκειμένου να αποφευχθούν οι κλινικές επιπλοκές οι οποίες επάγονται από ένα υπερενεργοποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα, να είναι ευνοϊκή για τον ασθενή. Ανάλογη παρεμπόδιση της δράσης των ουδετεροφίλων μπορεί να είναι ευνοϊκή σε ασθενείς όπου τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα φαίνεται να καταστέλλουν αντικαρκινική δράση του ανοσιακού συστήματος *ex vivo*, όπως σε περιπτώσεις καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. (170)

Από την άλλη, η ανεπαρκής ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων σε κλινικές καταστάσεις όπως το σύνδρομο της αντισταθμιστικής αντιφλεγμονώδους απόκρισης, σε ασθενείς με πολλαπλά τραύματα ή μετά από σοβαρό χειρουργείο μπορεί να ενεργοποιήσει αυτά τα κύτταρα προς την αποτροπή της ανάπτυξης σοβαρών φλεγμονωδών επιπλοκών όπως η σήψη. Ο όρος CARS χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά καθώς η «υποφλεγμονή» φαίνεται να λαμβάνει χώρα παράλληλα σχεδόν με τη διαδικασία της SIRS. Η λογική πίσω από το φαινόμενο της υποφλεγμονής», έγκειται στο γεγονός ότι πιθανά αποτρέπει την επιδείνωση της ιστικής βλάβης και επάγει διαδικασίες επούλωσης. Παρόλ'αυτά δεν έχει δειχθεί άμεσα.(56)

Είναι ξεκάθαρο ότι ο χρόνος χορήγησης θεραπειών που τροποποιούν τις ανοσιακές αποκρίσεις είναι σημαντικός, καθώς η υπο- αλλά και η υπερενεργοποίηση των ουδετεροφίλων λαμβάνουν χώρα σε ασθενείς με οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις.

Από την άλλη πλευρά τα ουδετερόφιλα εμπλέκονται στην παθογένεση μιας πληθώρας φλεγμονωδών νόσων και μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να καταστέλλουν τις αντικαρκινικές αποκρίσεις. Ως εκ τούτου είναι σαφές ότι μπορούν να αποτελέσουν στόχο μελλοντικών θεραπειών για την καταστολή της υπερφλεγμονής καθώς και της υποφλεγμονής ανάλογα με τη φύση της νόσου. Η διαλεύκανση των μηχανισμών που υπόκεινται αυτών των ανταγωνιστικών διαδικασιών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων δυναμικών θεραπειών οι οποίες θα στοχεύουν συγκεκριμένους υποπληθυσμούς ουδετεροφίλων χωρίς να επηρεάζουν τις ευνοϊκές λειτουργίες άλλων υποπληθυσμών. Ο χειρισμός του κύκλου ζωής των ουδετεροφίλων μπορεί να επιτρέψει στην διατήρηση της διάρκειας ορισμένων ευνοϊκών λειτουργιών μπλοκάροντας άλλες καταστροφικές παθολογικές καταστάσεις. Καθώς αναπτύσσεται η κατανόησή μας για τη δυναμική και τις φυσιολογικές λειτουργίες των ουδετεροφίλων, νέες θεραπευτικές στρατηγικές μπορούν να προκύψουν που θα αξιοποιούν τα μοναδικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων. (48,171)

VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Απ' όλα τα παραπάνω μπορούμε να συνάγουμε ότι ορισμένα φαινοτυπικά ευρήματα σε ασθενείς με PAD, μπορεί να σχετίζονται με το πρωταρχικό ή τα πρωταρχικά γενετικά αίτια στα οποία οφείλεται (αιτιολογικά) η νόσος.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με PAD, επιδεικνύουν μια εμμένουσα ενεργοποίηση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας, η οποία μπορεί να είναι συνέπεια είτε των εγγενών βλαβών που οδηγούν στην πρωτοπαθή αντισωματική ανεπάρκεια ή και της χρόνιας φλεγμονής που συνιστά σύνηθες χαρακτηριστικό αυτής της νόσου. Επιπρόσθετα οι πειραματικοί χειρισμοί των ανοσοκυττάρων, καθώς επίσης και τα διακριτά κλινικά χαρακτηριστικά και η κατάσταση της θεραπείας των ασθενών με PAD, πρέπει πάντα να λαμβάνονται υπόψη, προκειμένου να εξάγονται ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με τα *in vivo* φαινόμενα, βασιζόμενοι στα *in vitro* δεδομένα.

Η λειτουργία των ουδετεροφίλων και εν γένει των κυττάρων της φυσικής ανοσίας θα πρέπει να εξετάζεται σε παθολογικές καταστάσεις όπου το πρωτοπαθές αίτιο φαίνεται να έγκειται στα Β-λεμφοκύτταρα για την καλύτερη διαχείριση των ασθενών αυτών. Η διαλεύκανση των μηχανισμών και των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων επικοινωνίας αυτών μπορεί να διαλευκάνει παθογενετικά αίτια αυτών των νοσημάτων και η στόχευση και λεπτή ρύθμιση αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί να αποτελέσει στόχο μελλοντικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol* [Internet]. 2019;40(7):584–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013>
2. Alexanian R, Donohue DM. Neutrophilic granulocyte kinetics in normal man. *J Appl Physiol*. 1965;20(4):803–8.
3. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* [Internet]. 2010;33(5):657–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
4. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*. 2013;94(4):595–601.
5. Rožman S, Yousefi S, Oberson K, Kaufmann T, Benarafa C, Simon HU. The generation of neutrophils in the bone marrow is controlled by autophagy. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):445–56.
6. Hong CW. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw*. 2017;17(5):298–306.
7. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, et al. B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* [Internet]. 2011 Dec 25 [cited 2018 Jan 18];13(2):170–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197976>
8. Hyun Y, Hong C. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *J Leukoc Biol*. 2017;102(3):617–29.
9. DONOHUE DM, REIFF RH, HANSON ML, BETSON Y, FINCH CA. Quantitative measurement of the erythrocytic and granulocytic cells of the marrow and blood. *J Clin Invest*. 1958;37(11):1571–6.
10. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(6):427–39. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2779>

11. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1317–27.
12. Keszei M, Westerberg LS. Congenital defects in neutrophil dynamics. *J Immunol Res.* 2014;2014.
13. Elghetany MT, Peterson B, MacCallum J, Nelson DA, Varney JF, Sullivan AK, et al. Deficiency of neutrophilic granule membrane glycoproteins in the myelodysplastic syndromes: A common deficiency in 216 patients studied by the cancer and leukemia group B. *Leuk Res.* 1997;21(9):801–6.
14. Ramadass M, Catz SD. Molecular mechanisms regulating secretory organelles and endosomes in neutrophils and their implications for inflammation. *Immunol Rev.* 2016;273(1):249–65.
15. Borregaard N, Kjeldsen L, Rygaard K, Bastholm L, Nielsen MH, Sengelov H, et al. Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J Clin Invest.* 1992;90(1):86–96.
16. Institutet K. Expression and Regulation of Antimicrobial Peptides in Mucosal Immunity. 2012.
17. Fletcher MP, Seligmann BE. Monitoring human neutrophil granule secretion by flow cytometry: Secretion and membrane potential changes assessed by light scatter and a fluorescent probe of membrane potential. *J Leukoc Biol.* 1985;37(4):431–47.
18. Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, et al. Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity.* 2018;48(2):364-379.e8.
19. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxidants Redox Signal.* 2013;18(6):642–60.
20. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol.* 2018;9(FEB):1–17.

21. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* [Internet]. 1997;89(10):3503–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160655>
22. Mårdh CK, Root J, Uddin M, Stenvall K, Malmgren A, Karabelas K, et al. Targets of Neutrophil Influx and Weaponry: Therapeutic Opportunities for Chronic Obstructive Airway Disease. *J Immunol Res*. 2017;2017.
23. Sengeløv H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 ($\alpha\text{M}\beta\text{2}$) in human neutrophils. *J Clin Invest*. 1993;92(3):1467–76.
24. Manuscript A. Tethers and Slings. 2014;55(1):59–69.
25. Vikentiou M, Psarra K, Kapsimali V, Liapis K, Michael M, Tsionos K, et al. Distinct neutrophil subpopulations phenotype by flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(3):401–9.
26. Sundd P, Gutierrez E, Koltsova EK, Kuwano Y, Fukuda S, Pospieszalska MK, et al. Slings enable neutrophil rolling at high shear. Vol. 488, *Nature*. 2012. p. 399–403.
27. Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelov H, Diamond MS, Springer TA, Anderson HC, et al. Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 1994;56(1):80–7.
28. Dransfield I, Cabañas C, Barrett J, Hogg N. Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function. *J Cell Biol*. 1992;116(6):1527–35.
29. Tan S. The leucocyte β2 (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Biosci Rep* [Internet]. 2012;32(3):241–69. Available from: <http://bioscirep.org/cgi/doi/10.1042/BSR20110101>
30. Balsam LB, Liang TW, Parkos CA, Bordier C, Maridonneau-Parini I. Functional mapping of CD11b/CD18 epitopes important in neutrophil-epithelial interactions: a central role of the I domain. *J Immunol* [Internet]. 1998 May 15 [cited 2018 Jan 31];160(10):5058–65. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590256>

31. Wang Y, Jönsson F. Expression, role, and regulation of neutrophil Fc γ receptors. *Front Immunol*. 2019;10(AUG):1–13.
32. van Rees DJ, Szilagyi K, Kuijpers TW, Matlung HL, Van den Berg TK. Immunoreceptors on neutrophils. *Semin Immunol*. 2016;28(2):94–108.
33. Otten MA, Leusen JHW, Rudolph E, van der Linden JA, Beelen RHJ, van de Winkel JGJ, et al. FcR γ -Chain Dependent Signaling in Immature Neutrophils Is Mediated by Fc α RI, but Not by Fc γ RI. *J Immunol*. 2007;179(5):2918–24.
34. Robinson JI, Baxter EW, Owen RL, Thomsen M, Tomlinson DC, Waterhouse MP, et al. Affimer proteins inhibit immune complex binding to Fc γ RIIIa with high specificity through competitive and allosteric modes of action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(1):E72–81.
35. Yeap WH, Wong KL, Shimasaki N, Teo ECY, Quek JKS, Yong HX, et al. CD16 is indispensable for antibodydependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(September). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep34310>
36. Lood C, Arve S, Ledbetter J, Elkon KB. TLR7/8 activation in neutrophils impairs immune complex phagocytosis through shedding of Fc γ RIIA. *J Exp Med*. 2017;214(7):2103–19.
37. Gericke GH, Ericson SG, Pan L, Mills LE, Guyre PM, Ely P. Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Leukoc Biol* [Internet]. 1995;57(3):455–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533820>
38. ten Oever J, Netea MG, Kullberg BJ. Utility of immune response-derived biomarkers in the differential diagnosis of inflammatory disorders. *J Infect* [Internet]. 2016;72(1):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.007>
39. Bae MH, Park SH, Park CJ, Cho EJ, Lee BR, Kim YJ, et al. Flow cytometric measurement of respiratory burst activity and surface expression of neutrophils

- for septic patient prognosis. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2016;90(4):368–75.
40. Li S, Huang X, Chen Z, Zhong H, Peng Q, Deng Y, et al. Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: A meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2013;17(1).
 41. Rollet-Labelle E, Vaillancourt M, Marois L, Newkirk MM, Poubelle PE, Naccache PH. Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. *J Inflamm [Internet]*. 2013;10(1):27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902799> <http://www.journal-inflammation.com/content/pdf/1476-9255-10-27.pdf>
 42. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol [Internet]*. 2013;13(3):159–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>
 43. Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi ALT, Lam SW, Hietbrink F, et al. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol*. 2010;88(1):211–20.
 44. Onsum M, Rao C V. A mathematical model for neutrophil gradient sensing and polarization. *PLoS Comput Biol*. 2007;3(3):0436–50.
 45. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep [Internet]*. 2015;10(4):562–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.039>
 46. Al-Gwaiz LA, Babay HH. The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections. *Med Princ Pract*. 2007;16(5):344–7.
 47. Elghetany MT, Lacombe F. Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy, race, and stress. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):157–62.
 48. Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatté J, Geffner J. Mechanisms regulating

- neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol.* 2013;35(4):423–37.
49. Navarini AA, Lang KS, Verschoor A, Recher M, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(17):7107–12.
 50. Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: A critical review. *Blood Cells, Mol Dis.* 2002;28(2):260–74.
 51. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis M-A, Plassais J, Jallades L, et al. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol.* 2015;98(6):1081–90.
 52. Van Eeden SF, Klut ME, Walker BAM, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods.* 1999;232(1–2):23–43.
 53. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol [Internet].* 2013;13(12):862–74. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3552>
 54. Shpacovitch VM, Varga G, Strey A, Gunzer M, Mooren F, Buddenkotte J, et al. Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *J Leukoc Biol.* 2004;76(2):388–98.
 55. Tarlowe MH, Duffy A, Karman KB, Itagaki K, Lavery RF, Livingston DH, et al. Prospective study of neutrophil chemokine responses in trauma patients at risk for pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med [Internet].* 2005 Apr 1 [cited 2020 Oct 23];171(7):753–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15618463/>
 56. Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care [Internet].* 2016;20(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1250-4>
 57. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family [Internet]. Vol. 12, *Annual Review of Immunology.* Annual Reviews Inc.; 1994 [cited 2020 Oct 23].

- p. 991–1045. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8011301/>
58. Rühle PF, Fietkau R, Gaipl US, Frey B. Development of a modular assay for detailed immunophenotyping of peripheral human whole blood samples by multicolor flow cytometry. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8).
 59. Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SEM, Sallenave JM. Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am J Respir Crit Care Med [Internet].* 2006 Dec 1 [cited 2020 Oct 24];174(11):1189–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16959917/>
 60. Bank U, Ansorge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J Leukoc Biol [Internet].* 2001 Feb 1 [cited 2020 Oct 24];69(2):197–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11272269>
 61. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, et al. Proinflammatory Clearance of Apoptotic Neutrophils Induces an IL-12 low IL-10 high Regulatory Phenotype in Macrophages . *J Immunol [Internet].* 2010 Aug 15 [cited 2020 Oct 24];185(4):2044–50. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/185/4/2044><http://www.jimmunol.org/content/185/4/2044.full#ref-list-1>
 62. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [Internet]. Vol. 9, *Nature Reviews Immunology*. NIH Public Access; 2009 [cited 2020 Oct 24]. p. 162–74. Available from: </pmc/articles/PMC2828349/?report=abstract>
 63. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood [Internet].* 2007 Feb 15 [cited 2020 Oct 24];109(4):1568–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17023580/>
 64. Pillay J, Kamp VM, Van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest.* 2012;122(1):327–36.

65. Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, Davis JS, McNeil YR, Chen Y, et al. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care*. 2014;18(4):1–12.
66. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil Paralysis in Sepsis. *Shock* [Internet]. 2010;34(Suppl 1):15–21. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-201009001-00003>
67. Etzioni A. Adhesion molecule deficiencies and their clinical significance. *Cell Commun Adhes*. 1994;2(3):257–60.
68. Sullivan KE. Neutropenia as a sign of immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2019;143(1):96–100. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.018>
69. Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol*. 2001;54(1):7–19.
70. Németh T, Mócsai A, Lowell CA. Neutrophils in animal models of autoimmune disease. *Semin Immunol*. 2016;28(2):174–86.
71. Dinayer MC. Primary immune deficiencies with defects in neutrophil function. *Hematology* [Internet]. 2016 [cited 2020 Oct 24];2016(1):43–50. Available from: </pmc/articles/PMC6142438/?report=abstract>
72. Malech HL, Hickstein DD. Genetics, biology and clinical management of myeloid cell primary immune deficiencies: chronic granulomatous disease and leukocyte adhesion deficiency. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2007;14(1):29–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17133097
73. Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K. Neutrophil rolling at high shear: Flattening, catch bond behavior, tethers and slings [Internet]. Vol. 55, *Molecular Immunology*. Mol Immunol; 2013 [cited 2020 Oct 22]. p. 59–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23141302/>
74. Kerr MA, Craig Stocks S. The role of CD15-(Lex)-related carbohydrates in

- neutrophil adhesion. *Histochem J.* 1992;24(11):811–26.
75. Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1250(1):50–5.
 76. Kuijpers TW, Tool ATJ, Van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJM, Roos D, et al. Membrane surface antigen expression on neutrophils: A reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood.* 1991;78(4):1105–11.
 77. Uddin M, Seumois G, Lau LC, Ryttila P, Davies DE, Djukanović R. Enhancement of neutrophil function by the bronchial epithelium stimulated by epidermal growth factor. *Eur Respir J.* 2008;31(4):714–24.
 78. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Worthen GS, et al. Polarization of TAN phenotype by TGF β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell.* 2010;16(3):183–94.
 79. Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M. CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *J Transl Med.* 2004;2:1–9.
 80. Welin A, Amirbeagi F, Christenson K, Björkman L, Björnsdóttir H, Forsman H, et al. The Human Neutrophil Subsets Defined by the Presence or Absence of OLFM4 Both Transmigrate into Tissue In Vivo and Give Rise to Distinct NETs *In vitro*. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 29 [cited 2020 Oct 25];8(7). Available from: [/pmc/articles/PMC3726694/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22187488/)
 81. Clemmensen SN, Bohr CT, Rørvig S, Glenthøj A, Mora-Jensen H, Cramer EP, et al. Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2020 Oct 25];91(3):495–500. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22187488/>
 82. Hajishengallis G, Moutsopoulos NM, Hajishengallis E, Chavakis T. Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss. *Semin Immunol.* 2016;28(2):146–58.
 83. Sônego F, Castanheira FV e. S, Ferreira RG, Kanashiro A, Leite CAVG, Nascimento DC, et al. Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: Protective and deleterious. *Front Immunol.* 2016;7(APR):1–7.

84. Steinhagen F, Schmidt S V., Schewe JC, Peukert K, Klinman DM, Bode C. Immunotherapy in sepsis - brake or accelerate? Vol. 208, Pharmacology and Therapeutics. Elsevier Inc.; 2020. p. 107476.
85. Yang F, Feng C, Zhang X, Lu J, Zhao Y. The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections. *Inflammation*. 2017;40(1):311–23.
86. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: Immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(8):1155–67.
87. Kamp VM, Pillay J, Lammers J-WJ, Pickkers P, Ulfman LH, Koenderman L. Human suppressive neutrophils CD16 bright /CD62L dim exhibit decreased adhesion . *J Leukoc Biol*. 2012;92(5):1011–20.
88. Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev*. 2016;273(1):48–60.
89. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014;124(5):710–9.
90. Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2013 Jun [cited 2018 Jan 18];24(3):203–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684423>
91. Schwaller J, Schneider P, Mhawech-Fauceglia P, McKee T, Myit S, Matthes T, et al. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2020 Oct 25];109(1):331–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17190854/>
92. Theodorou M, Speletas M, Mamara A, Papachristopoulou G, Lazou V. Identification of a STAT5 Target Gene, Dpf3, Provides Novel Insights in

- Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(10):76155. Available from: www.plosone.org
93. Coquery CM, Wade NS, Loo WM, Kinchen JM, Cox KM, Jiang C, et al. Neutrophils contribute to excess serum BAFF levels and promote CD4 + T cell and B cell responses in lupus-prone mice. *PLoS One*. 2014;9(7).
 94. Thieblemont N, Wright HL, Edwards SW, Witko-Sarsat V. Human neutrophils in auto-immunity. *Semin Immunol*. 2016;28(2):159–73.
 95. Nagelkerke SQ, Aan De Kerk DJ, Jansen MH, Van Den Berg TK, Kuijpers TW. Failure to detect functional neutrophil B Helper cells in the human spleen. *PLoS One*. 2014;9(2):1–6.
 96. Costa S, Bevilacqua D, Cassatella MA, Scapini P. Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes. *Immunology*. 2019;156(1):23–32.
 97. Cerutti A, Puga I, Magri G. The B cell helper side of neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2013;94(4):677–82.
 98. Hampton HR, Bailey J, Tomura M, Brink R, Chtanova T. Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes. *Nat Commun* [Internet]. 2015;6(May):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8139>
 99. Lindau D, Mussard J, Rabsteyn A, Ribon M, Kötter I, Igney A, et al. TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2020 Oct 25];73(12):2199–207. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24013727/>
 100. Sangaletti S, Tripodo C, Vitali C, Portararo P, Guarnotta C, Casalini P, et al. Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphomas. *Cancer Discov* [Internet]. 2014 Jan [cited 2020 Oct 25];4(1):110–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24189145/>
 101. Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, van Montfrans J, et

- al. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(6):1763–70.
102. Gallo V, Dotta L, Giardino G, Cirillo E, Lougaris V, D'Assante R, et al. Diagnostics of primary immunodeficiencies through next-generation sequencing. *Front Immunol.* 2016;7(NOV):1–10.
103. Nijman IJ, Van Montfrans JM, Hoogstraat M, Boes ML, Van De Corput L, Renner ED, et al. Targeted next-generation sequencing: A novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2):529–35.
104. Al-Mousa H, Abouelhoda M, Monies DM, Al-Tassan N, Al-Ghonaïm A, Al-Saud B, et al. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol [Internet].* 2016;137(6):1780–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1310>
105. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2020;40(1):24–64.
106. de Valles-Ibáñez G, Esteve-Solé A, Piquer M, Azucena González-Navarro E, Hernandez-Rodríguez J, Laayouni H, et al. Evaluating the genetics of common variable immunodeficiency: Monogenetic model and beyond. *Front Immunol.* 2018;9(MAY):1–15.
107. Fudenberg HH, Good RA, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM, Rosen FS, et al. Classification of the Primary Immune Deficiencies: Who Recommendation [Internet]. Vol. 283, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society ; 1970 [cited 2020 Oct 25]. p. 656–7. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197009172831211>
108. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2018;38(1):96–128.

109. Speletas, Matthaïos GAE. Primary antibody deficiencies in adults: A contemporary clinical approach. *Arch Hell Med* [Internet]. 2013 [cited 2020 Oct 25];30(4):420–435. Available from: <https://www.mednet.gr/archives/2013-4/420per.html>
110. Jolles S, Chapel H, Litzman J. When to initiate immunoglobulin replacement therapy (IGRT) in antibody deficiency: a practical approach. *Clin Exp Immunol*. 2017;188(3):333–41.
111. Chinen J, Shearer WT. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010;125(2 SUPPL. 2):S195–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.040>
112. Kaveri S V., Maddur MS, Hegde P, Lacroix-Desmazes S, Bayry J. Intravenous immunoglobulins in immunodeficiencies: More than mere replacement therapy. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(SUPPL. 2):2–5.
113. Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 SUPPL. 2):297–305.
114. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood*. 2010;116(1):7–15.
115. Bright P, Grigoriadou S, Kamperidis P, Buckland M, Hickey A, Longhurst HJ. Changes in B cell immunophenotype in common variable immunodeficiency: Cause or effect - is bronchiectasis indicative of undiagnosed immunodeficiency? *Clin Exp Immunol*. 2013;171(2):195–200.
116. Yong PFK, Thaventhiran JED, Grimbacher B. “A Rose is a Rose is a Rose,” but CVID is Not CVID. Common Variable Immune Deficiency (CVID), What do we Know in 2011? [Internet]. 1st ed. Vol. 111, *Advances in Immunology*. Elsevier Inc.; 2011. 47–107 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00002-7>
117. Alkan G, Keles S, Reisli İ. Evaluation of Clinical and Immunological Characteristics of Children with Common Variable Immunodeficiency. *Int J Pediatr*. 2018;2018:1–8.
118. Sathkumara HD, De Silva NR, Handunnetti S, De Silva AD. Genetics of

- common variable immunodeficiency: Role of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor. *Int J Immunogenet.* 2015;42(4):239–53.
119. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: A disease of complex phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. 2013;1(6):545–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2013.09.015>
120. Podjasek JC, Abraham RS. Autoimmune cytopenias in common variable immunodeficiency. *Front Immunol.* 2012;3(JUL):1–7.
121. Prasse A, Kayser G, Warnatz K. Common variable immunodeficiency-associated granulomatous and interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2013;19(5):503–9.
122. Gangemi S, Allegra A, Musolino C. Lymphoproliferative disease and cancer among patients with common variable immunodeficiency. *Leuk Res* [Internet]. 2015;39(4):389–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.02.002>
123. Al Kindi M, Mundy J, Sullivan T, Smith W, Kette F, Smith A, et al. Utility of peripheral blood B cell subsets analysis in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(2):275–81.
124. Kutukculer N, Gulez N, Karaca NE, Aksu G, Berdeli A. Three different classifications, B lymphocyte subpopulations, TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF-R), TNFSF13 (APRIL) gene mutations, CTLA-4 and ICOS gene polymorphisms in turkish patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2012;32(6):1165–79.
125. Orange JS, Glessner JT, Resnick E, Sullivan KE, Lucas M, Ferry B, et al. Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2011;127(6):1360-1367.e6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.039>
126. Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier JL, Fieschi C, Vince N, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol.* 2010;30(5):746–55.

127. Fevang B, Mollnes TE, Holm AM, Ueland T, Heggelund L, Damås JK, et al. Common variable immunodeficiency and the complement system; low mannose-binding lectin levels are associated with bronchiectasis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2005 Dec [cited 2018 Jan 18];142(3):576–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16297171>
128. Litzman J, Freiburger T, Grimbacher B, Gathmann B, Salzer U, Pavlík T, et al. *Mannose-binding lectin* gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2018 Jan 18];153(3):324–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637104>
129. Nagelkerke SQ, Kuijpers TW. Immunomodulation by IVIg and the role of Fc-gamma receptors: Classic mechanisms of action after all? *Front Immunol*. 2015;6(JAN).
130. Casulli S, Coignard-Biehler H, Amazzough K, Shoai-Tehrani M, Bayry J, Mahlaoui N, et al. Defective functions of polymorphonuclear neutrophils in patients with common variable immunodeficiency. *Immunol Res* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2018 Jan 18];60(1):69–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24981124>
131. Mooney D, Edgar D, Einarsson G, Downey D, Elborn S, Tunney M. Chronic lung disease in common variable immune deficiency (CVID): A pathophysiological role for microbial and non-B cell immune factors. *Crit Rev Microbiol*. 2017;43(4):508–19.
132. Maglione PJ, Overbey JR, Radigan L, Bagiella E, Cunningham-Rundles C. Pulmonary radiologic findings in common variable immunodeficiency: Clinical and immunological correlations. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2014;113(4):452–9.
133. Ho HE, Cunningham-Rundles C. Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis. *Front Immunol*. 2020;11(February):1–14.

134. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Lévy Y, Kaveri S V. Common variable immunodeficiency: The immune system in chaos. *Trends Mol Med*. 2005;11(8):370–6.
135. Ebbo M, Gérard L, Carpentier S, Vély F, Cypowyj S, Farnarier C, et al. Low Circulating Natural Killer Cell Counts are Associated With Severe Disease in Patients With Common Variable Immunodeficiency. *EBioMedicine* [Internet]. 2016;6:222–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.025>
136. Paquin-Proulx D, Sandberg JK. Persistent Immune Activation in CVID and the Role of IVIg in Its Suppression. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2018 Jan 18];5:637. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566250>
137. Uzzan M, Ko HM, Mehandru S, Cunningham-Rundles C. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD). *Curr Gastroenterol Rep*. 2016;18(4).
138. Wright HL, Thomas HB, Moots RJ, Edwards SW. RNA-Seq Reveals Activation of Both Common and Cytokine-Specific Pathways following Neutrophil Priming. *PLoS One*. 2013;8(3).
139. Guffroy A, Mourot-Cottet R, Gérard L, Gies V, Lagresle C, Pouliet A, et al. Neutropenia in Patients with Common Variable Immunodeficiency: a Rare Event Associated with Severe Outcome. *J Clin Immunol*. 2017;37(7):715–26.
140. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* (80-) [Internet]. 2015 Jul 24 [cited 2020 Oct 25];349(6246):436–40. Available from: www.sciencemag.org/content/349/6246/432/suppl/DC1
141. Elgizouli M, Lowe DM, Speckmann C, Schubert D, Hülsdünker J, Eskandarian Z, et al. Activating PI3K δ mutations in a cohort of 669 patients with primary immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2016;183(2):221–9.
142. Maffucci P, Filion CA, Boisson B, Itan Y, Shang L, Casanova JL, et al. Genetic diagnosis using whole exome sequencing in common variable immunodeficiency. *Front Immunol*. 2016;7(JUN).

143. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F, et al. TNFRSF13B/TACI Alterations in Greek Patients with Antibody Deficiencies. *J Clin Immunol* [Internet]. 2011 Aug 6 [cited 2018 Jan 18];31(4):550–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547394>
144. Trujillo CM, Muskus C, Arango J, Patiño PJ, Montoya CJ. Quantitative and functional evaluation of innate immune responses in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(3):207–15.
145. Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, Tendeiro R, Melo AC, Pedro E, et al. Monocyte activation is a feature of common variable immunodeficiency irrespective of plasma lipopolysaccharide levels. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2018 Jan 18];169(3):263–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22861366>
146. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood*. 2004;104(8):2441–3.
147. Aspalter RM, Sewell WA, Dolman K, Farrant J, Webster AD. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2000 Sep [cited 2018 Jan 18];121(3):506–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10971518>
148. Litzman J, Chovancová Z, Bejdák P, Litzman M, Hel Z, Vlková M. Common variable immunodeficiency patients display elevated plasma levels of granulocyte activation markers elastase and myeloperoxidase. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2019;33.
149. Vlkova M, Chovancova Z, Nechvatalova J, Connelly AN, Davis MD, Slanina P, et al. Neutrophil and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated T Cell Suppression Significantly Contributes to Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Immunol*. 2019;202(1):93–104.

150. Lewandowicz-Uszyńska A, Polańska B, Świerkot J, Kazimierowska-Niemczuk M, Szechiński J, Jankowski A. Neutrophil function in the patient with common variable immunodeficiency - Case report. *Cent J Immunol.* 2009;34(2):113–7.
151. Litzman J, Nechvatalova J, Xu J, Ticha O, Vlkova M, Hel Z. Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia. *Clin Exp Immunol.* 2012;170(3):321–32.
152. Thon V, Vlková M, Freiburger T, Litzman J, Lokaj J. The expression of Fc gamma receptors on leukocytes and clinical course of common variable immunodeficiency (CVID). *Scr Medica Fac Medicae Univ Brun Masaryk.* 2005;78(6):315–22.
153. Τσιντή Γ. Η λειτουργία των ουδετεροφίλων στις αντισωματικές ανεπάρκειες [Internet]. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας; 2014 [cited 2020 Oct 26]. Available from: <https://ir.lib.uth.gr/xmlui/handle/11615/42961;jsessionid=A9AC9754E4665EFD09CB7E9F57DCB206>
154. Mosca T, Forte WCN. Comparative Efficiency and Impact on the Activity of Blood Neutrophils Isolated by Percoll, Ficoll and Spontaneous Sedimentation Methods. *Immunol Invest [Internet].* 2016;45(1):29–37. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08820139.2015.1085393>
155. Freitas M, Porto G, Lima JLFC, Fernandes E. Optimization of experimental settings for the analysis of human neutrophils oxidative burst *in vitro*. *Talanta.* 2009;78(4–5):1476–83.
156. Freitas M, Porto G, Lima JLFC, Fernandes E. Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin Biochem.* 2008;41(7–8):570–5.
157. Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC, Ethridge S, Palini A, Vogt R, et al. Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. *Cytometry.* 1992;13(1):68–74.
158. Elghetany MT, Ge Y, Patel J, Martinez J, Uhrova H. Flow Cytometric Study of Neutrophilic Granulopoiesis in Normal Bone Marrow Using an Expanded Panel

- of Antibodies: Correlation with Morphologic Assessments. *J Clin Lab Anal.* 2004;18(1):36–41.
159. Sic H, Speletas M, Cornacchione V, Seidl M, Beibel M, Linghu B, et al. An Activating Janus Kinase-3 Mutation Is Associated with Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4-Dependent Immune Dysregulation Syndrome. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2020 Oct 26];8(DEC):1824. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01824/full>
 160. Cloke T, Munder M, Bergin P, Herath S, Modolell M, Taylor G, et al. Phenotypic Alteration of Neutrophils in the Blood of HIV Seropositive Patients. *PLoS One.* 2013;8(9):1–7.
 161. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, Dower SK. Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses. *J Immunol.* 2002;168(9):4701–10.
 162. Youssef PP, Mantzioris BX, Roberts-Thompson PJ, Ahern MJ, Smith MD. Effects of ex-vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. *J Immunol Methods.* 1995;186:217–24.
 163. Macey MG, Jiang XP, Veys P, McCarthy D, Newland AC. Expression of functional antigens on neutrophils: Effects of preparation. *J Immunol Methods* [Internet]. 1992;149(1):37–42. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(12\)80046-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(12)80046-9)
 164. Nair KS, Zingde SM. Adhesion of neutrophils to fibronectin: Role of the CD66 antigens. *Cell Immunol.* 2001;208(2):96–106.
 165. Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988 Oct [cited 2018 Jan 31];85(20):7734–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2971974>
 166. Rönnefarth VM, Erbacher AIM, Lamkemeyer T, Madlung J, Nordheim A, Rammensee H-G, et al. TLR2/TLR4-Independent Neutrophil Activation and

- Recruitment upon Endocytosis of Nucleosomes Reveals a New Pathway of Innate Immunity in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 2006;177(11):7740–9.
167. Hokibara S, Kobayashi N, Kobayashi K, Shigemura T, Nagumo H, Takizawa M, et al. Markedly elevated CD64 expression on neutrophils and monocytes as a biomarker for diagnosis and therapy assessment in Kawasaki disease. *Inflamm Res.* 2016;65(7):579–85.
 168. Michon JM, Gey A, Moutel S, Tartour E, Meresse V, Fridman W, et al. In vivo induction of functional Fc γ RI (CD64) on neutrophils and modulation of blood cytokine mRNA levels in cancer patients treated with G-CSF (rMetHuG-CSF). *Br J Haematol.* 1998;100(3):550–6.
 169. Gomes NE, Brunialti MKC, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Brazilian J Med Biol Res.* 2010;43(9):853–9.
 170. van der Linden M, Meyaard L. Fine-tuning neutrophil activation: Strategies and consequences. *Immunol Lett* [Internet]. 2016;178:3–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.05.015>
 171. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: What controls its onset? *Front Immunol.* 2016;7(APR).
 172. Tjon ASW, Van Gent R, Geijtenbeek TB, Kwekkeboom J. Differences in anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin between mice and men: More than meets the eye. *Front Immunol.* 2015;6(APR):1–12.
 173. Cockx M, Gouwy M, Godding V, De Boeck K, Van Damme J, Boon M, et al. Neutrophils from patients with primary ciliary dyskinesia display reduced chemotaxis to CXCR2 ligands. *Front Immunol.* 2017;8(SEP).
 174. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin Exp Immunol.* 2008;154(1):87–97.

175. Martire-Greco D, Rodriguez-Rodrigues N, Landoni VI, Rearte B, Isturiz MA, Fernández GC. Interleukin-10 controls human peripheral PMN activation triggered by lipopolysaccharide. *Cytokine* [Internet]. 2013;62(3):426–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.03.025>
176. Quinti I, Mitrevski M. Modulatory effects of antibody replacement therapy to innate and adaptive immune cells. *Front Immunol*. 2017;8(JUN):1–6.
177. Casulli S, Topçu S, Fattoum L, von Gunten S, Simon HU, Teillaud JL, et al. A differential concentration-dependent effect of IVIg on neutrophil functions: Relevance for anti-microbial and anti-inflammatory mechanisms. *PLoS One*. 2011;6(10):1–8.
178. Migita K, Agematsu K, Yamazaki K, Suzuki A, Yazaki M, Jiuchi Y, et al. Expression of CD64 on polymorphonuclear neutrophils in patients with familial Mediterranean fever. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(3):365–72.
179. Bakke AC, Allen E, Purtzer MZ, Deodhar A. Neutrophil CD64 expression distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Clin Appl Immunol Rev*. 2001;1(5):267–75.
180. Prezzo A, Cavaliere FM, Bilotta C, Iacobini M, Quinti I. Intravenous immunoglobulin replacement treatment does not alter polymorphonuclear leukocytes function and surface receptors expression in patients with common variable immunodeficiency. *Cell Immunol* [Internet]. 2016;306–307:25–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.05.006>
181. Ruchaud-Sparagano MH, Stocks SC, Turley H, Dransfield I. Activation of neutrophil function via CD66: differential effects upon beta 2 integrin mediated adhesion. *Br J Haematol* [Internet]. 1997;98(3):612–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9332316>
182. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):584–92.
183. Passlick B, Flieger D, Loms Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74(7):2527–34.

184. Gainaru G, Papadopoulos A, Tsangaris I, Lada M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Pistiki A. Increases in inflammatory and CD14dim/CD16pos/CD45pos patrolling monocytes in sepsis: correlation with final outcome. *Crit Care* [Internet]. 2018 Dec 3 [cited 2020 Oct 26];22(1):56. Available from: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-018-1977-1>
185. Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, Tendeiro R, Melo AC, Pedro E, et al. Monocyte activation is a feature of common variable immunodeficiency irrespective of plasma lipopolysaccharide levels. *Clin Exp Immunol*. 2012;169(3):263–72.
186. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2020 Oct 26];20(12):1410–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.3746>
187. Lo B, Fritz JM, Su HC, Uzel G, Jordan MB, Lenardo MJ. CHAI and LATAIE: New genetic diseases of CTLA-4 checkpoint insufficiency. *Blood* [Internet]. 2016 Aug 25 [cited 2020 Oct 26];128(8):1037–42. Available from: </pmc/articles/PMC5000841/?report=abstract>
188. Maggadottir SM, Li J, Glessner JT, Li YR, Wei Z, Chang X, et al. Rare variants at 16p11.2 are associated with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2020 Oct 26];135(6):1569–77. Available from: </pmc/articles/PMC4461447/?report=abstract>
189. Eskandarian Z, Fliegauf M, Bulashevskaya A, Proietti M, Hague R, Smulski CR, et al. Assessing the functional relevance of variants in the Ikaros family zinc finger protein 1 (IKZF1) in a cohort of patients with primary immunodeficiency. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 26];10(MAR). Available from: </pmc/articles/PMC6477086/?report=abstract>
190. Bogaert DJ, Kuehn HS, Bonroy C, Calvo KR, Dehoorne J, Vanlander A V., et al. A novel IKAROS haploinsufficiency kindred with unexpectedly late and variable B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2020 Oct 26];141(1):432-435.e7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6588539/>
191. Papathanasiou P, Perkins AC, Cobb BS, Ferrini R, Sridharan R, Hoyne GF, et

- al. Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the ikaros transcription factor. *Immunity*. 2003 Jul 1;19(1):131–44.
192. Kuehn HS, Boisson B, Cunningham-Rundles C, Reichenbach J, Stray-Pedersen A, Gelfand EW, et al. Loss of B cells in patients with heterozygous mutations in IKAROS. *N Engl J Med*. 2016;374(11):1032–43.
193. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, et al. The ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* [Internet]. 1994 Oct 7 [cited 2020 Oct 26];79(1):143–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7923373/>
194. Cytlak U, Resteu A, Bogaert D, Kuehn HS, Altmann T, Gennery A, et al. Ikaros family zinc finger 1 regulates dendritic cell development and function in humans. *Nat Commun*. 2018;9(1).
195. Scott-Taylor TH, Green MR, Raeiszadeh M, Workman S, Webster AD. Defective maturation of dendritic cells in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(3):420–7.
196. Sharifi L, Tavakolinia N, Kiaee F, Rezaei N, Mohsenzadegan M, Azizi G, et al. A Review on Defects of Dendritic Cells in Common Variable Immunodeficiency. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets* [Internet]. 2017 Sep 11 [cited 2018 Jan 18];17(2):100–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28641569>

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής

- 1) **Gerasimina Tsinti**, Demosthenes Makris, Anastasios E. Germeis, Matthaios Speletas. (2020) Persistent activation of innate immunity in patients with primary antibody deficiencies. *Journal of Immunology Research* (***accepted***)
- 2) **Tsinti G**, Germeis A.E., Speletas M. (2018) The impact of experimental manipulation on neutrophil immunophenotyping. *Biomed Res Clin Prac* 3. doi: 10.15761/BRCP.1000169

The impact of experimental manipulation on neutrophil immunophenotyping

Gerasimina Tsinti, Anastasios E Germeis and Matthaïos Speletas*

Department of Immunology and Histocompatibility, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larissa, Greece

Abstract

The interest of developing functional and other experimental procedures on polymorphonuclear neutrophils (PMN) for the study of inflammatory disorders and primary immunodeficiencies is constantly increased. However, these experimental manipulations may induce significant changes on neutrophils' immunophenotyping and function. For this purpose, we investigated the effect of different experimental procedures (such as resting state, isolation and incubation with and without inflammatory stimuli) on the immunophenotype of PMN of healthy individuals, evaluating the expression pattern of specific granulocytic markers, important for chemotaxis, adhesion, opsonization, migration and phagocytosis. Our results indicate that the effect of experimental manipulation on PMN should always be taken into consideration in order to avoid misinterpreting the experimental findings.

Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are major effector cells in innate host defense against invading microorganisms. They migrate towards the site of infection and inflammation in order to confront the pathogens. PMN recognize pathogens through various receptors, such as scavenger, complement and immunoglobulin receptors, eliminating them either through mechanisms that involve degranulation, phagocytosis and oxidative killing into the phagosomes, or through the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) [1,2].

During recent years there is an increasing interest in the development of procedures, where human PMN are being studied in the context of inflammatory disorders and primary immunodeficiencies [3,4]. In these procedures, the expression of cell surface molecules, such as adhesion molecules, immunoglobulin and complement receptors, is investigated along with functional responses to inflammatory stimuli [3–5]. In order to safely draw conclusions when investigating the role of PMN in health and disease, the *in vitro* data should reflect the *in vivo* behavior. A few previous studies have shown that specific experimental manipulation of PMN might induce changes in the expression pattern of several surface antigens [6–8].

Therefore, the aim of our study was to investigate more precisely the impact of different experimental procedures, such as isolation and incubation with and without inflammatory stimuli, on the immunophenotype of PMN of healthy individuals, evaluating the expression pattern of specific granulocytic markers, important for chemotaxis, adhesion, opsonization, migration and phagocytosis.

Material and methods

Subjects

Eight milliliters of peripheral blood were collected using heparinized syringe from 14 healthy individuals (male/female: 4/10, mean age: 41.5 years, range: 21–65) with no history of autoimmunity, chronic inflammatory disorder, or malignancy. All individuals were receiving no medication during blood collection, except from two

subjects under common anti-hypertensive treatment. The absence of infection/inflammation was also verified after clinical examination and the measurement of C-reactive protein (CRP) serum levels, using commercially available immunonephelometric assays (Immulite-2000, Siemens Medical Solutions, Llanberis, Gwynedd, UK), according to the manufacturer's instructions. All subjects provided written informed consent. The study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration and was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital of Larissa, Greece.

Flow cytometry analysis

Immunophenotyping was performed by flow cytometry on Coulter FC-500 instrument (Epics XL-MCL, 4 color analysis, Beckman-Coulter/BC, Hialeah, FL, USA) using a multistaining protocol and commercially available reagents. Mouse anti-human immunoglobulin G (IgG) monoclonal antibodies were used for the detection of CD10 (clone: ALB1), CD11b (clone: Bear1), CD14 (clone: RMO52), CD16 (clone: 3G8), CD18 (clone: 7E4), CD64 (clone: 22), and CD66b (clone: 80H3). All the above antibodies were purchased by BC and were conjugated with the appropriate fluorochrome (fluorescein isothiocyanate, FITC; phycoerythrin, PE; PE-cyanine5 PE-Cy5). The percentage of fluorescent cells and the mean fluorescence intensity (MFI) were determined in each case corrected for background fluorescence, using FITC, PE, and PE-Cy5-labelled control antibodies. All lysis and staining procedures were performed at room temperature. The data analyzed were the percentile (%) expression of each marker and the intensity of expression determined by the equation: (%) expression \times MFI /100. In particular, we evaluated the expression pattern of the aforementioned markers on PMN in four different conditions: (1) resting (basal) state,

*Correspondence to: Matthaïos Speletas, Department of Immunology and Histocompatibility, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larissa, Greece, Tel: +302410685687; E-mail: maspel@med.uth.gr

Key words: polymorphonuclear neutrophil, immunophenotyping, isolation, LPS

Received: July 05, 2018; **Accepted:** July 19, 2018; **Published:** July 23, 2018

where PMN had not undergone any treatment, (2) normal density PMN, where neutrophil phenotype reflects changes due to the isolation procedure, (3) culture-control PMN, where neutrophil phenotype reflects changes under culture conditions without any trigger, and (4) culture-lipopolysaccharide (LPS) PMN, where neutrophil phenotype reflects changes under LPS trigger. Experimental manipulation of specimens was always begun into two hours after blood collection.

Therefore, the heparinized whole-blood samples were separated in three parts. The first part (approximately 2 mL) was immediately used for immunophenotyping of PMN at resting (basal) state. The second part (4 mL) was used for PMN isolation and the third part (approx. 0.5-1 mL) was used in culture assays, as described below:

In resting (basal) state, the erythrocytes were initially removed using $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KHCO}_3$ lysis solution, and white blood cells (WBC) were washed twice with $1\times$ PBS. After resuspension, WBC were stained with the specific monoclonal antibodies (CD10, CD11b, CD14, CD16, CD18, CD64, and CD66b) for 15 minutes. After being washed with PBS, WBCs were re-suspended in PBS and a flow cytometric evaluation in basal state was performed. Approximately 10,000 PMN were acquired per sample and cells were initially gated according to forward and side scatter characteristics.

PMN isolation was performed using the double ficoll-gradient density centrifugation. More specifically 3 mL of Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) were layered on top of 3 mL Histopaque 1077 g/ml (Sigma-Aldrich). Four mL of blood specimen were diluted with 2 mL of $1\times$ PBS (in a total volume of 6 mL) and were layered on the top of the ficoll layers. After a centrifugation step at room temperature for 30 minutes at 2,000rpm, the PMN were isolated from the interface between the two ficoll layers and washed with $1\times$ PBS for 10 minutes at 1.600 rpm. Finally, cells were re-suspended in $1\times$ PBS for subsequent immunophenotyping with the specific monoclonal antibodies, as described above. In case that erythrocytes were present, a lysis step with $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KHCO}_3$, before staining procedure, was performed.

PMN culture assays: In a 24-well tissue culture plate, 2×10^5 WBC (containing at least $1-1.5\times 10^5$ PMN) were seeded in a total volume of 500 μL Iscoves Basal Medium (Biochrom, Berlin, Germany), containing 6% normal human serum (NHS) with or without the presence of LPS (100 ng/mL, *E.Coli* serotype 026:B6, Sigma-Aldrich). After 10 minutes of pre-incubation in order to let the cells rest in a humidified atmosphere (37°C, 8% CO_2), WBC were treated with LPS for 1h. Afterwards, cells were collected, washed, lysed in order to remove erythrocytes, stained with the specific antibodies and the proper isotype controls, and evaluated by flow cytometry, as described above.

Statistical analysis

Wilcoxon non-parametric match-paired analysis was performed for the comparison of different experimental conditions. Presented data refer to Intensity of expression defined by the formula: Intensity of expression = % of expression \times MFI. Statistical analyses and graphs were made on GraphPad-6 Prism software (CA, USA). For all analyses, alpha was set at 0.05 (2-sided).

Results

Expression of immunoglobulin receptors (CD16, CD64)

The Fc receptor with low affinity for IgG (FCGR3 or CD16; OMIM *610665) is expressed constitutively on mature PMN, and its crosslinking leads to degranulation and activation of the respiratory

burst [9]. As presented in Figure 1A, CD16 was significantly upregulated after isolation, as well as after incubation of whole blood without any trigger ($p = 0.001$ and $p = 0.002$, respectively). However, when PMN were treated with LPS, they exhibited a lower intensity of expression comparing to both untreated incubated PMN ($p = 0.001$) and PMN in resting (basal) state ($p = 0.005$). CD64 is a high affinity IgG receptor (OMIM *601502) that is expressed only in activated granulocytes and is a useful marker in infectious conditions [10,11], and sepsis [12]. We did not find any remarkable CD64 expression in all experimental conditions, apart from two (2) individuals exhibiting over 20% expression in basal state (20.3% and 42.4%, respectively), with its intensity of expression to being decreased during both incubation conditions (with and without LPS, Figure 1B).

Expression of maturation markers (CD10)

CD10 (OMIM *120520) is a specific marker that is indicative of maturation state of PMN [13]. We observed that the majority of PMN express CD10 in all cases, and the intensity of its expression is significantly increased after PMN isolation ($p < 0.001$) (Figure 1C). On the other hand, no significant differences were observed considering the other experimental conditions (Figure 1C).

Expression of adhesion molecules (CD11b, CD18, and CD66b)

CD18 (OMIM *600065) is the beta subunit of 12-integrins. It forms heterodimers with four distinct alpha subunits (CD11a, CD11b, CD11c, CD11d), creating surface receptors that are involved in cell adhesion, but function also as complement receptors [14,15]. CD11b (OMIM *120980), along with CD18 forms the macrophage-1 antigen (MAC-1), one of the most important structures mediating the arrest of neutrophils during their adhesion to the activated endothelium [16,17]. Moreover, the CD11b/CD18 complex represents the complement receptor 3 (CR3) that recognizes iC3b when bound to the surface of foreign cells, as well as several bacterial saccharides, like LPS [18].

We observed that the intensity of CD18 expression was higher after isolation ($p < 0.001$) and incubation of whole blood neutrophils, with ($p < 0.001$) or without LPS ($p = 0.002$), comparing to resting cells. The difference of expression was not significant when the comparison was made between neutrophils under culture conditions ($p = 0.090$) (Figure 1D). Furthermore, a remarkable increase of the intensity of CD11b expression was also observed in all experimental conditions (Figure 1E).

CD66b (OMIM: 615747) is a specific granulocytic marker that is upregulated after LPS activation, reflecting a degranulation phenomenon [19]. It belongs to Carcino-Embryonic Antigen Cell Adhesion Molecule (CEACAM) family and its stimulation induces oxidative burst and increases neutrophil adhesion via a CD18- dependent pathway [20]. We observed that CD66b expression was also significantly increased in all experimental conditions, compared to resting cells (Figure 1F). In addition, a remarkable increase of CD66b expression was found in LPS-treated PMN compared to untreated ones in culture conditions ($p < 0.001$), although a notable variation of CD66b expression was observed after LPS exposure (as presented in detail, in Figure 1F).

Discussion and conclusion

PMN are cells of the innate immune system comprising the first line host defense against invading microorganisms. Their life begins in the bone marrow, where progenitor cells of myeloid origin differentiate into mature PMN, entering the circulation as terminally differentiated

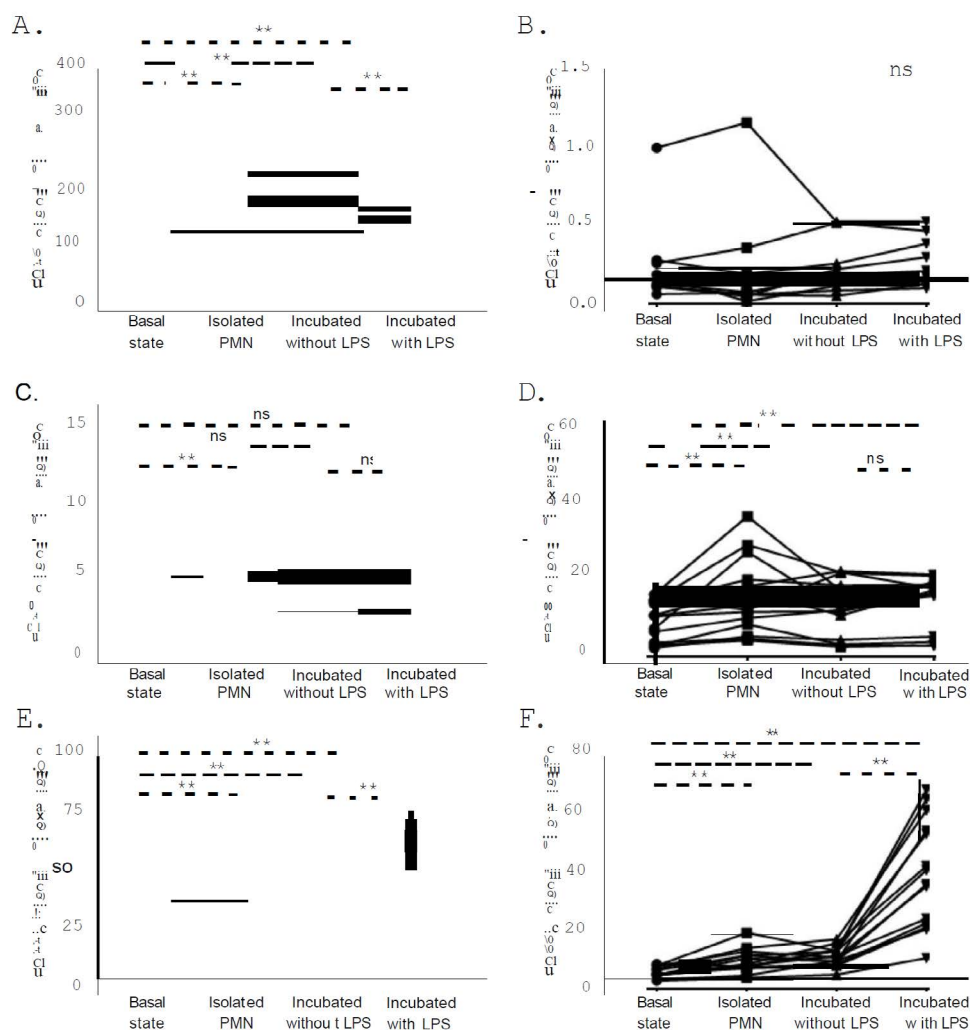


Figure 1. Immunophenotyping of polymorphonuclear cells. A. CD16 absolute intensity of expression. B. CD64 absolute intensity of expression. C. CD10 absolute intensity of expression. D. CD18 absolute intensity of expression. E. CD11b absolute intensity of expression. F. CD66b absolute intensity of expression. Basal State: Whole Blood neutrophils at resting state. Isolated PMN: Resting state neutrophils, after isolation procedure. Incubated without LPS: Whole Blood Neutrophils in culture conditions without any trigger. Incubated with LPS: Whole Blood neutrophils in culture conditions treated with LPS. Intensity of expression = (% of expression \times MFI)/100. Each dot represents one subject; each subject's treatment condition is connected with lines. **: $p < 0.01$. *: $p < 0.5$. ns: $p > 0.5$

cells. They die by apoptotic cell death, having a short lifespan of 6-12 hours in the periphery, unless they enter the tissue phase following an inflammatory stimulus, where they display a prolonged lifespan. After exposure to inflammatory stimuli, PMN can produce cytokines and chemokines, regulating inflammation [21,22]. There is increased evidence that changes in the expression of several molecules can be used as a quantifiable index of PMN activation, after treatment with different stimuli, or can be interpreted as a "primed" status of the cell [21]. PMN activation and degranulation result in the exposure of their contents in both the plasma membrane and the extracellular milieu; however, the level of expression of different PMN markers usually reaches a plateau and it is not altered by subsequent stimuli [23].

In our study, we investigated simultaneously the effect of common experimental conditions on healthy individuals' PMN. Our findings indicate that the expression of PMN surface molecules are affected by their experimental manipulation. In particular, we observed that CD10 and CD16 are more prone to unspecific priming due to isolation procedure, while the adhesion molecules CD11b and CD66b are more

susceptible to culture conditions, even in the absence of any trigger. On the other hand, CD66b expression exhibits a great variation of its intensity in response to LPS, while CD64 is expressed in low levels on PMN and it is not affected by experimental manipulation, even by LPS exposure. These findings should be taken into consideration when studying PMN defects, since abnormalities of PMN compartment have been implicated in the pathogenesis and/or phenotype of several diseases, including sepsis [24] and immunodeficiencies [25]. PMN defects can affect the response to pathogens through several mechanisms, like phagocytosis, chemotaxis and transmigration [26], or disturb the dialectic communication of neutrophils with the other counterparts of the immune system [27]. There are several reports in the literature analyzing the effect of several experimental conditions on PMN functions, including isolation [28,29], the usage of different anticoagulants [8], the method of fixation or the effect of temperature alterations [21] on PMN immunophenotyping, or functional responses to Ca^{2+} homeostasis, ROS production, phagocytosis and/or bacterial ingestion [28]. However, the data from different studies cannot be compared and most importantly they lead to controversial and opposite

findings. In our study, we focused on PMN immunophenotyping, as it is a fast procedure to detect possible defects, and for this purpose we analyzed common surface markers indicative of PMN functional capacity. According to the data presented herein, we recommend that a minimal experimental manipulation of PMN should be chosen when investigate their functional capacity, to both avoid the unspecific priming and to draw safer conclusions when interpreting in vivo phenomena.

Acknowledgments

We would like to thank the volunteers and Ms Ioanna Papamargariti (nurse of the Primary Immunodeficiency Outpatient Clinic of University Hospital of Larissa) for blood collection.

References

- Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33: 657-670. [[Crossref](#)]
- Papayannopoulos V, Zychlinsky A (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 30: 513-521. [[Crossref](#)]
- von Bernuth H, Ku CL, Rodriguez-Gallego C, Zhang S, Garty BZ, et al. (2006) A fast procedure for the detection of defects in Toll-like receptor signaling. *Pediatrics* 118: 2498-2503. [[Crossref](#)]
- Bouma G, Doffinger R, Patel SY, Peskett E, Sinclair JC, et al. (2009) Impaired neutrophil migration and phagocytosis in IRAK-4 deficiency. *Br J Haematol* 147: 153-156. [[Crossref](#)]
- Elghetany ME (2002) Surface antigen changes during normal neutrophilic development: A critical review. *Blood Cells Mol Dis* 28: 260-274. [[Crossref](#)]
- Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJ, et al. (1991) Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 78: 1105-1111. [[Crossref](#)]
- Youssef PP, Mantzioris BX, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD (1995) Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. *J Immunol Methods* 186: 217-224. [[Crossref](#)]
- Freitas M, Porto G, Lima JL, Fernandes E (2008) Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin Biochem* 41: 570-575. [[Crossref](#)]
- Rollet-Labelle E, Vaillancourt M, Marois L, Newkirk MM, Poubelle PE, et al. (2013) Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. *J Inflamm (Lond)* 10: 27. [[Crossref](#)]
- Li S, Huang X, Chen Z, Zhong H, Peng Q, et al. (2013) Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis. *Int J Infect Dis* 17: e12-23. [[Crossref](#)]
- Qian W, Huang GZ (2016) Neutrophil CD64 as a marker of bacterial infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol Invest* 45: 490-503. [[Crossref](#)]
- Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC (2006) Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med* 130: 654-661. [[Crossref](#)]
- Orr Y, Taylor JM, Bannon PG, Geczy C, Kritharides L (2005) Circulating CD10-/CD16low neutrophils provide a quantitative index of active bone marrow neutrophil release. *Br J Haematol* 131: 508-519. [[Crossref](#)]
- Arnaut MA (1990) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050. [[Crossref](#)]
- Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, et al. (1988) Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7734-7738. [[Crossref](#)]
- Balsam LB, Liang TW, Parkos CA (1998) Functional mapping of CD11b/CD18 epitopes important in neutrophil-epithelial interactions: a central role of the I domain. *J Immunol* 160: 5058-5065. [[Crossref](#)]
- Tan SM (2012) The leukocyte $\beta 2$ (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Biosci Rep* 32: 241-269. [[Crossref](#)]
- Ross GD, Vetvicka V (1993) CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol* 92: 181-184. [[Crossref](#)]
- Schmidt T, Brodesser A, Schnitzler N, Gruger T, Brandenburg K, et al. (2015) CD66b Overexpression and loss of C5a receptors as surface markers for staphylococcus aureus-induced neutrophil dysfunction. *PLoS One* 10: e0132703. [[Crossref](#)]
- Ruchaud-Sparagano MH, Stocks SC, Turley H, Dransfield I (1997) Activation of neutrophil function via CD66: differential effects upon beta 2 integrin mediated adhesion. *Br J Haematol* 98: 612-620. [[Crossref](#)]
- Németh T, Mócsai A (2016) Feedback Amplification of Neutrophil Function. *Trends Immunol* 37: 412-424. [[Crossref](#)]
- Naranbhai V, Fairfax BP, Makino S, Humburg P, Wong D, et al. (2015) Genomic modulators of gene expression in human neutrophils. *Nat Commun* 6: 7545. [[Crossref](#)]
- Macey MG, Jiang XP, Veys P, McCarthy D, Newland AC (1992) Expression of functional antigens on neutrophils. Effects of preparation. *J Immunol Methods* 149: 37-42. [[Crossref](#)]
- Sônego F, Castanheira FV, Ferreira RG, Kanashiro A, Leite CA, et al. (2016) Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. *Front Immunol* 7: 155. [[Crossref](#)]
- Malech HL, Hickstein DD (2007) Genetics, biology and clinical management of myeloid cell primary immune deficiencies: chronic granulomatous disease and leukocyte adhesion deficiency. *Curr Opin Hematol* 14: 29-36. [[Crossref](#)]
- Keszei M, Westerberg LS (2014) Congenital defects in neutrophil dynamics. *J Immunol Res* 2014: 303782. [[Crossref](#)]
- Robb CT, Regan KH, Dorward DA, Rossi AG (2016) Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. *Semin Immunopathol* 38: 425-448. [[Crossref](#)]
- Macey MG, McCarthy DA, Vordermeier S, Newland AC, Brown KA (1995) Effects of cell purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leucocytes. *J Immunol Methods* 181: 211-219. [[Crossref](#)]
- Mosca T, Forte WC (2016) Comparative Efficiency and Impact on the Activity of Blood Neutrophils Isolated by Percoll, Ficoll and Spontaneous Sedimentation Methods. *Immunol Invest* 45: 29-37. [[Crossref](#)]

Copyright: ©2018 Tsinti G. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Research Article

Persistent Activation of Innate Immunity in Patients with Primary Antibody Deficiencies

Gerasimina Tsinti,¹ Demosthenes Makris,² Anastasios E. Germentis,¹ and Matthaïos Speletas¹

¹Department of Immunology & Histocompatibility, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larissa, Greece

²Department of Critical Care Medicine, University Hospital of Larissa, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larissa, Greece

Correspondence should be addressed to Matthaïos Speletas; maspel@med.uth.gr

Received 30 April 2020; Revised 13 September 2020; Accepted 19 October 2020; Published 20 November 2020

Academic Editor: Alvaro González

Copyright © 2020 Gerasimina Tsinti et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Primary antibody deficiencies (PAD) represent a heterogeneous group of disorders, with common variable immunodeficiency being the most common with clinical significance. The main phenotypic defect resides in the inability of B cells to produce antibodies, and the cornerstone of therapy is immunoglobulin replacement treatment in order to fight infections. However, the management of the other inflammatory manifestations is inadequate, reinforcing the hypothesis that a complex genetic background affecting additional cell populations, such as polymorphonuclear cells (PMN) and monocytes, influences the expression of the clinical phenotype of the disease. In this study, we investigated by flow cytometry in different conditions (resting state, and after isolation and incubation, with and without stimuli) the expression pattern of several markers on PMN and monocytes, indicative of their maturation, capacity for chemotaxis, adhesion, opsonization, migration, and phagocytosis in 25 PAD patients, 12 healthy blood donors, and 4 septic patients. In this context, we also analyzed patients before and after the initiation of replacement treatment, as well as an untreated patient in different clinical conditions. Interestingly, we observed that PAD patients exhibit a chronic activation status of the innate immunity compartment, along with several differences in the expression of activation, maturation, and adhesion markers, with respect to different clinical conditions. Moreover, immunoglobulin replacement treatment had a favorable effect on PMN, as it was expressed by a more mature and less activated phenotype on basal state cells, and an enhanced activation capacity after LPS exposure. Thus, we conclude that PAD patients display a persistent innate immune cell activation, which is probably associated with the chronic inflammatory stress, usually observed in these disorders.

1. Introduction

Primary antibody deficiencies (PAD) are a heterogeneous group of disorders where the common characteristic and main phenotypic defect resides in the inability of B cells to differentiate and produce antibodies. The most common and clinically important PAD is common variable immunodeficiency (CVID), which is sporadic with unknown genetic etiology in the majority (approximately 80%) of cases [1–3]. Affected patients suffer from frequent and recurrent infec-

tions, while they also display a high prevalence of auto-immune manifestations, granulomas formation, benign lymphoproliferation, and malignancies, especially lymphomas [1, 2]. Immunoglobulin replacement therapy is the cornerstone for the management of PAD patients, resulting in a substantial reduction of the frequency and the severity of infections, but it has a limited effect on the manipulation of the other inflammatory manifestations of the disease [1, 3].

Recent studies support the notion that the innate immunity might contribute to disease pathogenesis, since altered

phenotype and function of monocytes [4], dendritic cells (DCs) [5], and natural killer cells [6] have been reported in CVID patients. However, the contribution of polymorphonuclear cells (PMN) in CVID remains rather obscure, since until now only a few studies have analyzed PMN immunophenotyping and function in disease pathogenesis and/or phenotype, with contradictory results [7–11].

PMN are the major effector cells in host defense against invading microorganisms, contributing also to the activation and regulation of B cell homeostasis and differentiation, through the production of appropriate cytokines such as BAFF and APRIL [12]. PMN defects result in the emergence of severe and well-characterized immunodeficiencies, such as leukocyte adhesion deficiencies (LAD), chronic granulomatous disease (CGC), and Chediak-Higashi syndrome (reviewed by Dinayer) [13]. On the other hand, PMN during severe inflammatory conditions, such as sepsis, exhibit disturbed and impaired functions leading to SIRS, immunoparalysis, and eventually to the deterioration of patients' clinical state [14]. Thus, it is a challenge to explore the possible contribution of PMN to PAD pathogenesis and/or phenotype, since such an understanding might substantially affect the improved knowledge of the disease and patients' management.

However, there are many challenges to be faced when studying the innate immunity in PAD patients, especially those suffering from CVID. The first and most important is the variable nature of the disease that is reflected in a diverse clinical phenotype of the affected patients [1, 15]. This varied phenotype may be the cause for the different, and even contradicting, results of several studies, leading to divergent conclusions. The second challenge is the rare nature of the disease that affects the power of the statistical comparisons. Moreover, CVID patients usually require immediate immunoglobulin replacement therapy, and, as a consequence, the number of newly diagnosed patients not receiving therapy is even smaller. As a result, the great majority of the published studies refer to patients under immunoglobulin replacement treatment [9–11, 16]. The third challenge, but not less important, is the effect of experimental manipulation of PMN, since they are short-lived cells *in vivo* and extremely sensitive to phenotypic changes *in vitro*, as described [17–19].

Bearing in mind the contradictory results in the literature, the aim of our study was to further elucidate whether the innate immune cells, especially PMN and monocytes, are affected and/or contribute to the clinical phenotype of PAD patients. For this purpose, we evaluated by flow cytometry the expression pattern of specific markers on PMN and monocytes, indicative of their maturation stage, as well as of their capacity for chemotaxis, adhesion, opsonization, migration, and phagocytosis in different conditions (resting state, and after isolation and incubation, with and without stimuli), in order to assess whether the activation of these cells is associated with the chronic inflammatory stress that is rather a typical characteristic of these disorders.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects. Twenty-five PAD patients (male/female: 9/16, mean age: 41.3 years, range: 14–66) were enrolled in the

study (Table S1). Among them, 23 patients fulfilled the diagnostic criteria of CVID [20], while two patients were eventually recognized as suffering from CTLA4-dependent immune dysregulation syndrome, carrying specific mutations, as described by us recently [21]. Six patients (24.0%, all with CVID, group A) were analyzed at diagnosis (male/female: 2/4, mean age: 44.5 years, range: 14–66), while the remaining 19 patients (76.0%, male/female: 7/12, mean age: 40.3 years, range: 19–65) were receiving either intravenous (IVIG, 3 patients) or facilitated subcutaneous immunoglobulin (fSCIG, 16 patients) replacement treatment (group B). Nine patients (36.0%, 2 newly diagnosed) suffered from chronic respiratory disease (CRD, obstructive and/or restrictive disease) receiving inhaled bronchodilators, and 12 patients (48.0%, 3 newly diagnosed) had bronchiectasis, with the majority of them—10 out of 12 (83.3%)—displaying CRD. Six patients (24.0%, 2 newly diagnosed) had enteropathy, 5 patients (20.0%, all under replacement treatment) exhibited granulomatous disease, one patient under IVIG (4.0%) had complications from nodular regenerative hyperplasia (NRH) of the liver, and 2 (8.0%) had a medical history of neoplasia, including a patient with lymphoma and a newly diagnosed patient with colon adenocarcinoma. Twelve patients (48.0%, 1 newly diagnosed) displayed benign lymphoproliferation (splenomegaly and/or lymphadenopathy), while three more had been subjected to splenectomy in the past (two for diagnostic purposes, i.e., a massive splenomegaly with hypersplenism and a differential diagnosis of lymphoma, and one more for the management of resistant autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP)). Additionally, 11 patients (44.0%, 2 newly diagnosed) experienced one or multiple autoimmune manifestations, including nine (36.0%) with thyroid disease, three (12.0%) with ATP, three (12.0%) with pernicious anemia, one with psoriasis (complicated also by psoriatic arthritis), one with myelitis, one with arthritis, one with vitiligo, and one with recurrent autoimmune hemolytic anemia.

At the time of analysis, one patient was receiving immunosuppressive treatment due to resistant/recurrent ATP (2 g mycophenolate mofetil per day) and another one was receiving a low dose of prednisolone (10 mg per day) due to an exacerbation of restrictive CRD. Three CVID patients carried the *TNRSF13B/TACI*-p.C104R mutation in heterozygous state [22], another one patient carried the *IKZF1*-p.His191-Tyr mutation also in heterozygous state, while four out of six newly diagnosed CVID patients were also analyzed at least five months (mean: 6 months, range: 5–7) after the initiation of replacement treatment.

The results of the analysis of PAD patients were compared to a cohort of 12 age- and sex-matched (male/female: 4/8, mean age: 40.8 years, range: 23–67) healthy individuals, while 4 septic patients from an intensive care unit (ICU) (male/female: 3/1, mean age: 65.5 years, range: 61–72), two without and two under corticosteroid medication at the time of blood collection, served as a disease control group.

The study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki declaration and was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital of Larissa. Written informed consent was obtained from each

individual or an accompanying relative, as in patients where consent was not legally applicable; the procedures followed were in accordance with institutional guidelines.

2.2. Culture Assays and Immunophenotyping. Seven to eight milliliters (mL) of heparinized whole-blood samples were separated in three parts. The first part (2 mL) was immediately used for immunophenotyping of innate immune cells (polymorphonuclear cells/PMN and monocytes) at resting (basal) state. The second part (4 mL) was used for PMN isolation by 1077/1119 Histopaque double-gradient density centrifugation (Histopaque; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) at room temperature (RT), and the immunophenotyping was performed on the cells of the lower interface (normal density PMN). The third part (0.5-1 mL) was used in culture assays in order to evaluate the response of PMN to stimuli; in particular, 2×10^5 whole blood cells, including at least $1 - 1.5 \times 10^5$ PMN, were seeded on a 24-well tissue culture plate, in a total volume of 500 microliters (μ L) Iscove's Basal Medium (Biochrom, Berlin, Germany), containing 6% heat-inactivated normal human serum, with and without lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml, *E. Coli* serotype 026:B6, Sigma- Aldrich), and were incubated in a humidified atmosphere (37°C, 8% CO₂) for one hour.

Immunophenotyping was performed by flow cytometry on Coulter FC-500 instrument (Epics XL-MCL, 4 color analysis, Beckman-Coulter/BC, Hialeah, FL, USA) using a multi-staining protocol and commercially available reagents. Mouse anti-human immunoglobulin G (IgG) and M (IgM) monoclonal antibodies were used to detect molecules that reacted with CD10 (clone: ALB1), CD11b (clone: Bear1), CD11c (clone: BU15), CD14 (clone: RMO52), CD16 (clone: 3G8), CD18 (clone: 7E4), CD64 (clone: 22), and CD66b (clone: 80H3). All of the above antibodies were purchased by BC and were conjugated with the appropriate fluorochrome (fluorescein isothiocyanate, FITC; phycoerythrin, PE; PE-cyanine5 PE-Cy5). Erythrocytes were lysed using NH₄Cl/KHCO₃ lysis solution, and the cells were washed twice with PBS and stained with the aforementioned monoclonal antibodies for 15 minutes. The percentage of fluorescent cells and the mean fluorescence intensity (MFI) were determined in each case corrected for background fluorescence, using FITC, PE, and PE-Cy5-labelled control antibodies. The data analyzed were the percentile expression (%) of each marker and the intensity of expression determined by the equation: (%) expression \times MFI/100.

The expression markers on monocytes were evaluated only in resting state. On the other hand, we assessed the PMN immunophenotyping in four different conditions: (1) resting (basal) state, where PMN had not undergone any treatment; (2) normal density PMN, whose phenotype reflects changes due to the isolation procedure; (3) culture-control PMN, whose phenotype reflects changes under culture conditions without any trigger; and (4) culture-LPS PMN, whose phenotype reflects changes under LPS trigger.

2.3. Statistical Analysis. The Wilcoxon-matched paired analysis, non-parametric Mann-Whitney test, and Spearman correlation analyses were performed for the comparison of

different study groups. Statistical analyses and graphs were made on the GraphPad-6 Prism software (version 6, CA, USA). For all analyses, alpha was set at 0.05 (2-sided).

3. Results

3.1. Activation of Innate Immune Cells in PAD Patients. The most important finding of our study was the demonstration of a steady activation status of both PMN and monocytes in patients with PAD, irrespective of the patients' treatment status. In particular, PAD patients displayed at the basal state a higher CD64 expression on PMN and a higher CD16 expression on monocytes, compared to healthy controls, despite the absence of an acute infection, as it was confirmed by CRP levels that were into normal range for the majority of patients (with an exception of a slight increase in some patients with CRD). Moreover, as presented in Figures 1, and 2, the pattern of expression of both molecules in PAD patients was rather similar with those observed in sepsis ones.

As demonstrated in previous studies, including ours, CD64 expression on PMN is generally stable even after isolation or incubation conditions [18, 19]. Thus, as expected, CD64 levels on PMN of PAD patients differed significantly compared to healthy controls also in the other experimental conditions, i.e., isolation and incubation with and without LPS (Figure S1).

CD16 is expressed on both resting PMN and activated monocytes, while its downregulation on PMN is indicative of their activation [23, 24]. Considering CD16 expression on PMN in our cohort, it is worth noting that septic patients expressed significantly lower levels of CD16 at basal state (indicative also of their activation), while PAD patients displayed a significant downregulation of CD16 only on PMN after incubation, without LPS (Figure 1). Although the same pattern of CD16 expression on PMN in basal state was also observed, the difference compared to healthy controls did not reach levels to be significant (Figure 1). As mentioned above, our PAD patients displayed a significant increase in CD16 expression on monocytes (percentile and absolute numbers), indicative of their steady activation status (Figure 2, Table S2). Further analysis of monocytes subpopulations with respect to CD14 and CD16 co-expression patterns revealed that PAD patients under replacement treatment exhibited higher percentages and absolute numbers of intermediate (CD14⁺/CD16⁺) and non-classical (CD14⁺/CD16⁺) monocytes compared to healthy controls. On the other hand, despite differences in the percentages, no significant differences on the absolute numbers of classical (CD14⁺/CD16⁻) monocytes in PAD patients compared to healthy controls were observed (Figure 2 and Table S2).

Considering the other analyzed molecules, no significant differences were observed between PAD patients and controls (Tables S3-S6). However, sepsis patients displayed a significant increase of CD66b and a downregulation of CD10 and CD16 compared to HC (Tables S3-S6), similar to previous studies [25, 26].

We would like to note that the isolated PMN being analyzed in our study refer to normal density and not to low

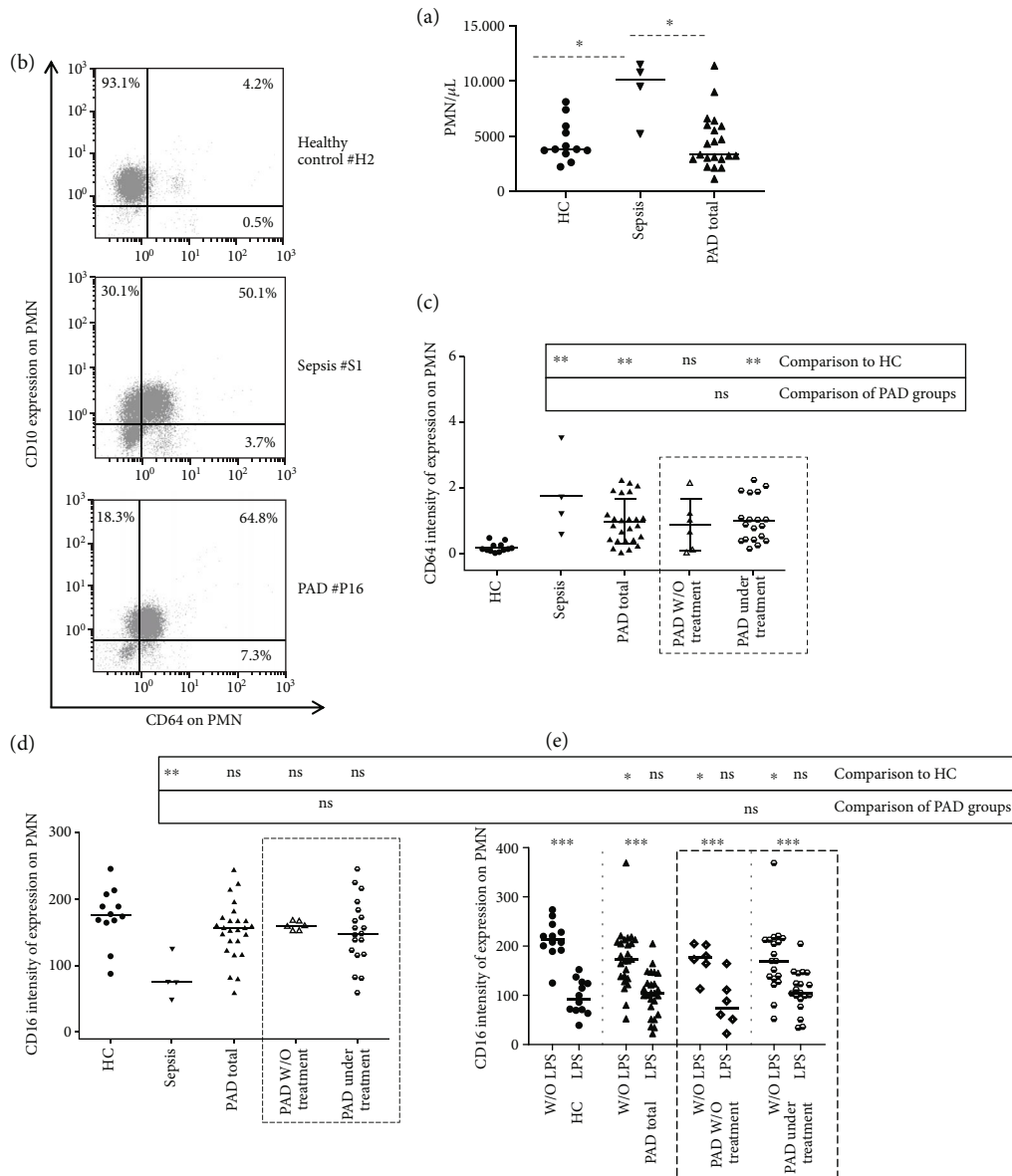


FIGURE 1: (a) PMN absolute numbers (per μL) of whole peripheral blood of the patients and controls of the study. (b) Representative dot plots of CD64 expression on PMN. (c) CD64 intensity of expression on polymorphonuclear cells (PMN) of the patients and controls of the study. (d) CD16 intensity of expression on whole-blood PMN of the patients and controls of the study at basal state. (e) After incubation of whole blood without and with LPS. The lines represent the median values. Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney U test. The Wilcoxon-matched paired analysis was performed to compare same subjects under culture conditions; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; ns, not significant.

density ones. The later PMN populations have been recognized after density gradient centrifugation in the PBMC fraction, and they have been analyzed in some pathological conditions [27, 28]. However, in our cohort, the frequency of such populations was extremely low (0.2-0.5%), namely in the limits of an artifact, and we considered that such populations were not adequate for further statistical analyses.

3.2. Effect of Immunoglobulin Replacement Treatment on the Phenotype of PMN and Monocytes in PAD Patients. As mentioned above, four PAD patients at diagnosis were re-evaluated for their PMN immunophenotype, 5-7 months after the initiation of immunoglobulin replacement treat-

ment. Interestingly, two out of four patients exhibited at basal state an upregulation of CD64 on PMN after treatment (Figure 3). Considering the other analyzed markers, a remarkable increase of CD10 expression on PMN was also observed in all patients at basal state; two out of four patients also displayed a decrease of CD11b and an increase of CD18 expression on PMN (Figure 3), while the other markers on PMN, including also CD16 on monocytes, did not follow a steady trend of expression (data not shown).

Moreover, these PAD patients after immunoglobulin replacement treatment displayed a remarkable increase of CD11b and CD16 expression on PMN after incubation with LPS (Figure 3). Consequently, the increased expression of

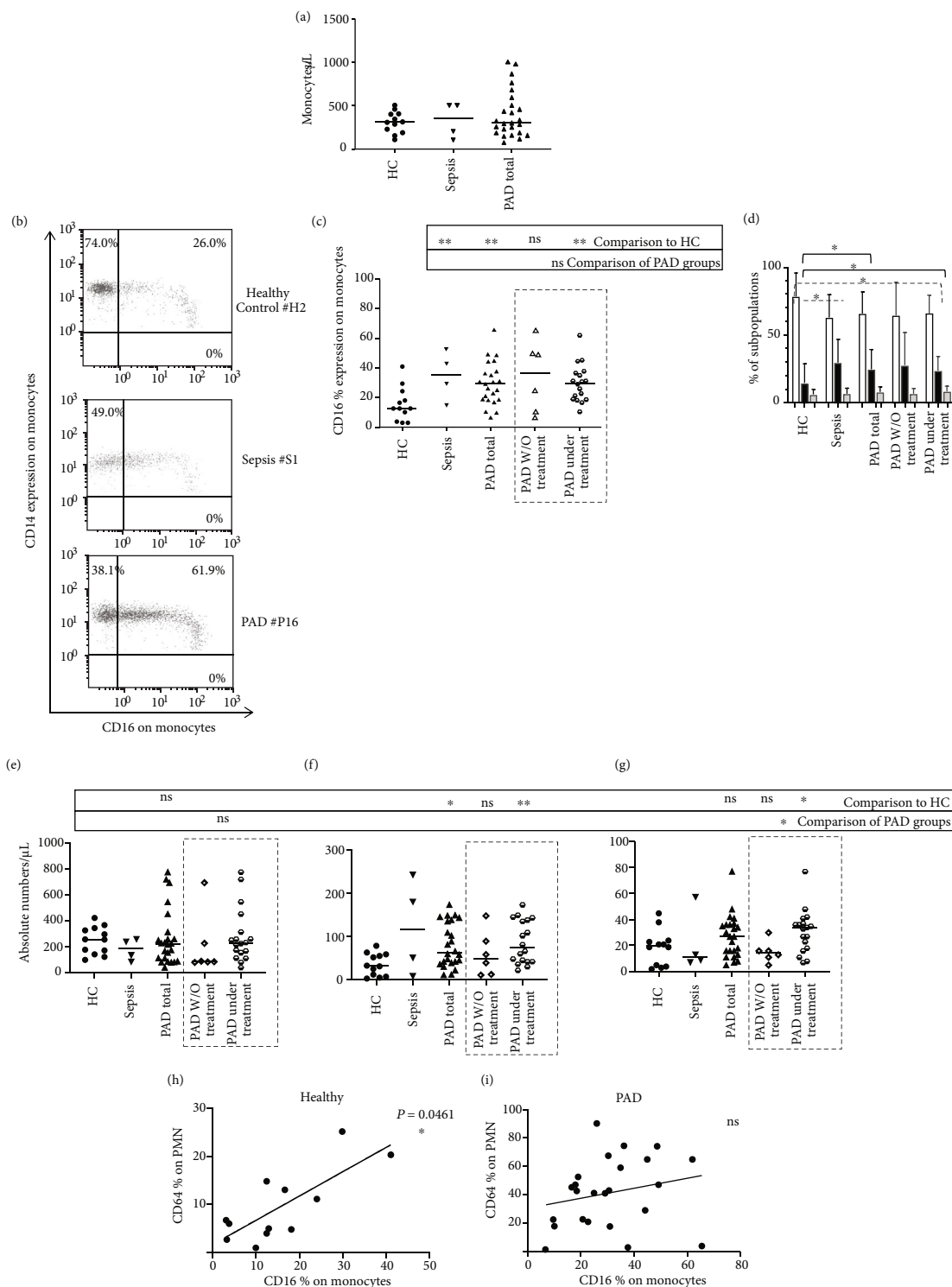


FIGURE 2: (a) Monocyte absolute numbers (per μL) of whole peripheral blood of the patients and controls of the study. (b) Representative dot plots of CD16 expression on whole-blood monocytes at basal state. (c) CD16 percentile expression on monocytes of the patients and controls of the study. (d) Percentages of classical, intermediate, and non-classical subpopulations within the monocyte population in whole-blood basal state condition, for the patients and controls of the study: White columns represent classical monocytes, black columns the intermediate monocytes, and grey columns the non-classical monocytes. (e) Absolute numbers of classical, (f) intermediate, (g) and non-classical monocytes. (h) Correlation of CD64 percentage of expression on PMN to CD16 percentage of expression on monocytes in healthy controls and (i) in PAD patients. Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney U test and Spearman correlation analysis; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns, not significant.

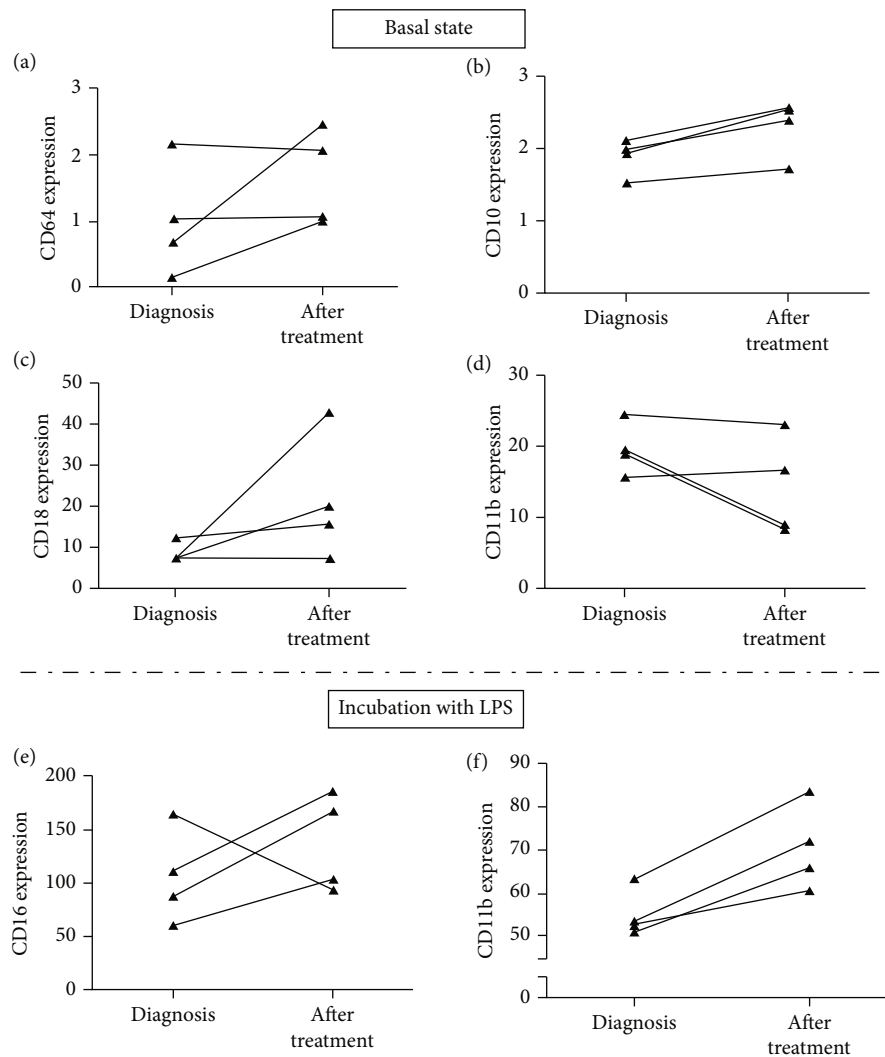


FIGURE 3: The intensity of expression of surface markers on PMN in four PAD patients before and after (5-7 months) the initiation of immunoglobulin replacement treatment. (a) CD64, (b) CD10, (c) CD18, and (d) CD11b at basal state and (e) CD16 and (f) CD11b after whole-blood incubation with LPS. Each line in the plot corresponds to data of each patient.

CD11b found in our experiments in LPS-treated PAD patients' PMN might be indicative of a more sufficient activation capacity of PMN after immunoglobulin replacement treatment. Finally, in these newly diagnosed PAD patients, no significant correlations were found between the expression of Fc receptors (CD16 and CD64 on PMN and CD16 on monocytes) and their IgG levels after replacement treatment ($p > 0.05$, in all cases).

3.3. The Effect of Clinical Characteristics on PMN Immunophenotyping. Since PAD represent a heterogeneous group of disorders, we further evaluated whether specific clinical phenotypes affect the immunophenotype of innate immune cells. Interestingly, we identified that patients with splenomegaly exhibited a lower CD10 expression on PMN compared with those without splenomegaly ($p = 0.030$, Figure S2). Moreover, after PMN isolation, we observed that PAD patients with autoimmunity displayed a higher expression of CD11b, CD11c, and CD16 on PMN

compared to patients without autoimmune manifestations ($p = 0.001$, $p = 0.001$, and $p < 0.001$, respectively; Figure S2). Finally, the expression markers on PMN and monocytes did not differ significantly in other clinical phenotypes of PAD patients in all experimental conditions ($p > 0.05$, in all cases).

3.4. Innate Immune Cell Immunophenotyping in a Patient during Different Clinical Conditions. Among the patients analyzed, we had the opportunity to evaluate a newly diagnosed CVID patient, with severe hypogammaglobulinemia and an absence of antibody responses to vaccines, without any history of recurrent or chronic infections. The patient carried the *IKZF1*-p.His191Tyr mutation in heterozygous state (as mentioned in Subjects), and his diagnosis was established when his brother (family proband) was also diagnosed with CVID due to recurrent ATP and a history of recurrent skin infections. This patient refused immunoglobulin replacement treatment, and his whole-blood immunophenotyping was

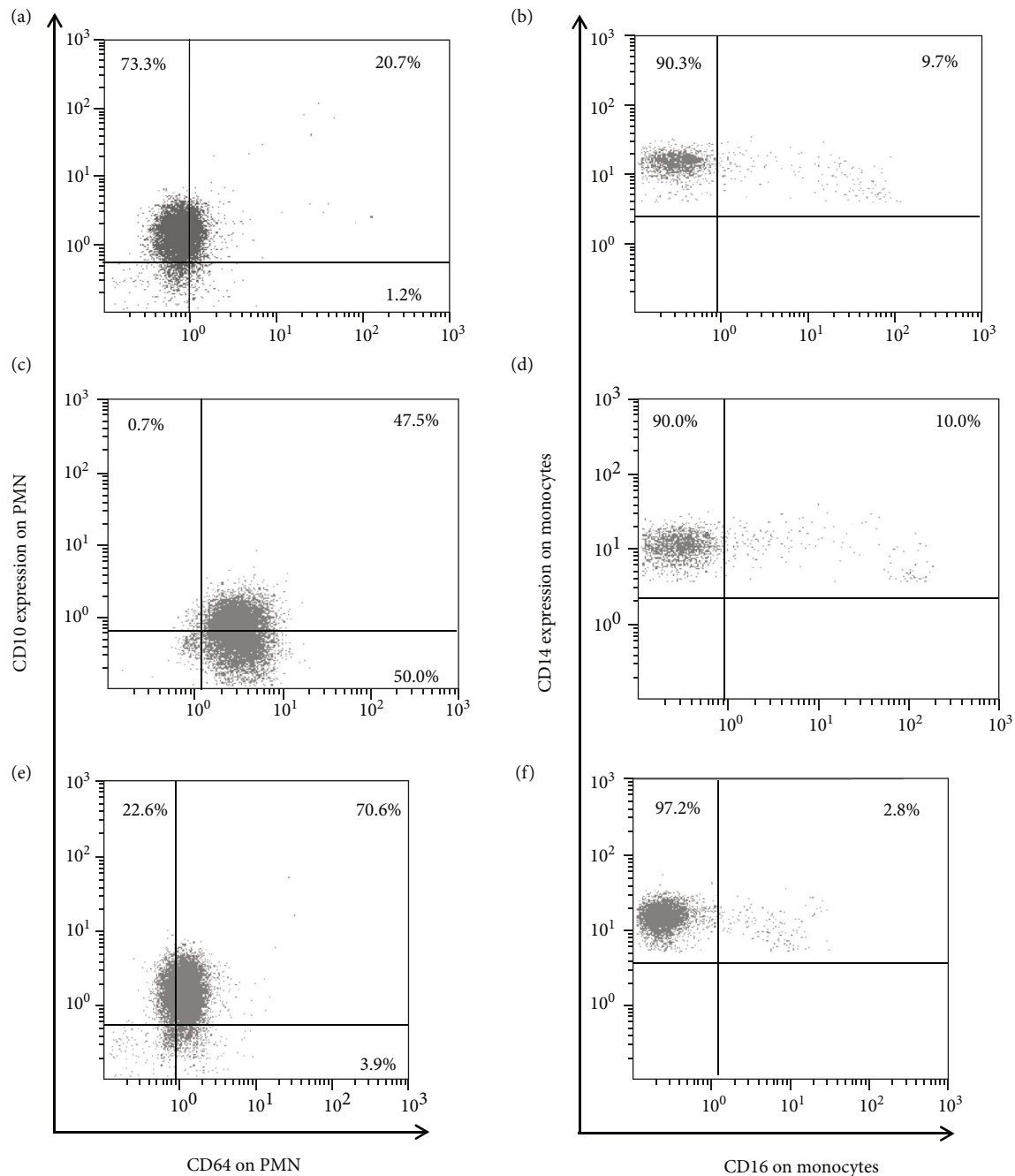


FIGURE 4: The intensity of expression of CD64 and CD10 on PMN (a, c, e) and CD14 and CD16 on monocytes (b, d, f), in a CVID patient in different clinical conditions. (a, b) At diagnosis. (c, d) Three months later during an upper respiratory infection with rash. (e, f) Rest state five months after the recovery of infection.

performed several times, in different clinical conditions, namely, (1) at diagnosis without infection, (2) during an upper respiratory infection with rash, and (3) at resting state without acute infection, eight months after the initial diagnosis. Interestingly enough, we demonstrated that the expression pattern of CD64 and CD10 on PMN differed substantially in different clinical conditions, while CD16 expression on monocytes remained low and stable (Figure 4). In particular, we observed that CD64 is upregulated and CD10 is downregulated during infection; however,

while CD10 expression reverted to initial levels, the expression of CD64 on PMN remained upregulated five months after the resolution of acute infection (Figure 4). It is worth of note that although CD64 expression on PMN was significantly correlated with CD16 expression on monocytes in healthy controls, PAD patients did not follow the same pattern (Figure 2). While the majority of PAD patients displayed a simultaneous activation of PMN and monocytes, there are some patients, like him presented above, who displayed high expression of CD64 on PMN but low expression of CD16 on

monocytes, or the opposite (Figure 2). These findings suggest a more profound role of innate immune cells immunophenotyping in PAD that is discussed in detail below.

4. Discussion

In this study, we clearly demonstrate that PAD patients display a persistent activation status of PMN and monocytes, indicative of a chronic inflammatory condition, while immunoglobulin replacement treatment does not modify substantially this activation status but seems to restore a more sufficient capacity of PMN to respond to LPS (and pathogen) exposure.

Our findings indicate that PMN of PAD patients display a more immature phenotype compared to healthy subjects. Additionally, they exhibit an activated status, although in a lower level compared to sepsis patients. In our study, we did consider the use of additional patient cohorts in order to evaluate the effect of immunoglobulin treatment, since the majority of them represent immune mediated conditions (i.e., patients with neurologic conditions, as multiple sclerosis). Although other systemic diseases affecting PMN physiology could also be considered patient control groups, we considered that the comparison of PAD patients to sepsis ones is more adequate, since sepsis has extensively been investigated in multiple studies, with reproducible data.

Our results are supported by the findings of some previous studies indicating an increased expression of activation markers, as elastase and myeloperoxidase (MPO) on PMN of CVID patients, especially in those displaying splenomegaly, while immunoglobulin treatment further induced PMN activation, in both in vivo and in vitro conditions [10]. In the same context, Vlkova et al. recently reported that CVID patients under immunoglobulin replacement treatment exhibited an increased gelatinase-associated lipocalin (NGAL) plasma concentration and immunophenotypic changes of PMN surface receptors, such as increased levels of CD11b and PD-L1, and decreased levels of CD62L, CD16, and CD80, which are also indicative of PMN steady activation status [11]. Interestingly, these findings are also supported by the results of the study of Casuli et al., suggesting that low concentrations of IVIG can induce PMN activation in healthy individuals [29].

Abnormalities observed in the innate immunity compartment might be associated PAD phenotype. PMN disturbances either inherent or epiphenomena may contribute to the increased susceptibility of PAD patients to infections, affecting directly the response to pathogens by attenuating functions such as phagocytosis, chemotaxis, and transmigration. On the other hand, these disturbances may also affect the dialectic communication of PMN with the other counterparts of the immune system, contributing also to the emergence and/or the perpetuation of the other inflammatory manifestations of the disease.

As mentioned above, the more impressive finding of our study was the upregulation of CD64 expression on PMN in our cohort of PAD patients, regardless of their treatment status. CD64 (Fc γ RI) is a high-affinity IgG receptor that is

expressed only in activated granulocytes and is a useful marker indicative of infectious and septic conditions [30, 31]. Previous studies have shown that CD64 on PMN is induced by cytokines, such as G-CSF and IFN- γ [32], while a high CD64 expression on PMN has been reported in patients with acute and chronic inflammatory conditions, such as bacterial infections, sepsis, and autoinflammatory disorders, including Familial Mediterranean Fever (FMF) and PFAPA (Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, Adenitis) syndrome [30, 31, 33, 34]. On the other hand, CD64 is not highly upregulated on PMN in the setting of autoimmunity-related inflammation, as in patients with rheumatoid arthritis or lupus [33]. Considering PAD, there is only one previous study in the literature evaluating the expression of CD64 on PMN in CVID patients, suggesting that a high CD64 expression is associated with a worse prognosis and outcome [7].

On the other hand, there are several studies in the literature analyzing the expression of CD16 on PMN in CVID patients, with contradictory results [7–11]. CD16 (Fc γ RIII) is a low-affinity IgG receptor; there are two isoforms of CD16, the GPI-anchored CD16b which is expressed on PMN and its cross-linking results in their degranulation and the activation of respiratory burst, while CD16a is expressed on monocytes, macrophages, and NK cells [23, 24, 35]. Both isoforms of CD16 interact with CD11b/CD18 molecule-regulating phagocytosis, while CD16a has also been shown to mediate cytotoxicity by monocytes and NK cells [23, 24, 36]. Thon et al. have shown no significant differences of CD16 expression on PMN between CVID patients and healthy controls [7], while Casuli et al. described a lower CD16 expression on PMN in their cohort [8], similar with our findings described above. Moreover, Prezzo et al. did not observe any difference of CD16 expression on PMN before and after a course of immunoglobulin replacement treatment, suggesting that the replacement treatment does not affect PMN function [9].

An advantage of our study was the opportunity to analyze newly diagnosed patients before the initiation of replacement treatment and also several months later, and, obviously, our findings are more indicative of the effect of immunoglobulin treatment on PMN function. In this context, we also observed that several months after the initiation of immunoglobulin replacement treatment, PAD patients display an increase in the expression of CD11b integrin molecule as well as of CD16 on PMN, after LPS incubation, which is also indicative of their enhanced activation capacity after treatment. CD11b is an integrin molecule which along with CD18 represents a complement receptor, binding to C3bi and resulting in phagocytosis of opsonized pathogens. Moreover, CD11b along with CD66b resides in the specific PMN granules, and its expression represents a characteristic activation and degranulation marker [37]. However, due to the small number of patients analyzed, we consider that no safe conclusions can be drawn, and further studies, with a large cohort of PAD patients at diagnosis and after treatment, are necessary in order to clarify the effect of immunoglobulin replacement treatment on innate immune cell immunophenotyping.

As mentioned above, we observed a high CD16 expression on monocytes of PAD and sepsis patients, compared to healthy controls (Figure 1). CD16-positive monocytes represent the so-called proinflammatory subpopulation of intermediate and non-classical monocytes, which is observed enhanced in Gram-negative sepsis [38] and characterized by increased production of TNF-alpha and minimum levels of IL-10 [39]. Similar to our study, Barbosa et al. reported increased percentages of CD16-positive monocytes in CVID but not in X-linked agammaglobulinemia patients, suggesting that this finding might not be due to high levels of LPS, but rather to T and B cell aberrancies, which are common in patients with CVID [4].

In our study, we enrolled two patients carrying *CTLA4* mutations; these patients had an initial diagnosis of CVID, fulfilling the diagnostic criteria of the disease (low immunoglobulin levels, absence of antibody responses to vaccines, and exclusion of secondary causes of immunodeficiency), exhibiting also lymphoproliferation and autoimmune manifestations [21], and they received replacement treatment for years before the demonstration of *CTLA4* mutations. As it is well known, the molecular defects causing CVID are still unknown for the majority of patients, and the disease is rather a collection of different disorders with common clinical characteristics and laboratory findings [1, 15]. Over time, several patients with an initial diagnosis of CVID have finally been diagnosed with another disease entity, such as patients with *CTLA4*-induced immunodeficiency, who were initially considered suffering from CHAI syndrome [40], and nowadays, the disease is categorized within immune dysregulation syndromes [41]. However, as we observed for our patients with *CTLA4* mutations, their clinical and laboratory findings did not differ substantially compared to other CVID patients, and for this reason, we decided not to exclude them from our study. Furthermore, we did not observe any substantial differences considering PMN and monocyte immunophenotyping between *CTLA4*-mediated immunodeficiency and the rest of the PAD patients, in all experimental conditions analyzed.

The variable nature of PAD diseases is due to the distinct genetic background that cause and/or affect their clinical phenotype [1, 15]. This variability is also reflected in immunophenotypic characteristics of immune cells, as we also observed in our experiments. Indeed, PAD patients with splenomegaly exhibited lower CD10 expression on PMN suggesting a more immature phenotype; on the other hand, patients with autoimmune manifestations exhibited a more activated phenotype (displaying an increased integrin CD11b and CD16 expression on isolated PMN), suggesting an enhanced potential for arrest on the endothelium (and subsequent extravasation), as well as an enhanced potential for phagocytosis. In this context, Maggadottir et al. have recently reported that *ITGAM* (CD11b) gene polymorphisms are significantly associated with CVID, suggesting a more important role of CD11b in disease pathogenesis and/or phenotype [42]. On the other hand, there is increased evidence that the chronic activation of PMN aggravates tissue damage via ROS production [43]; the subsequent release of both toxic contents and inflammatory cytokines may

result in a continuous exposure of self-epitopes and a predisposition to autoimmune manifestations.

In the end, we had the opportunity to evaluate a CVID untreated patient several times (Figure 4), and we demonstrated significant fluctuations in the expression of PMN markers, while the percentage of proinflammatory CD16-positive monocyte subset remained extremely low, even during inflammatory conditions. As mentioned above, this patient carried a *IKZF1* (Ikaros) mutation, and as it has been demonstrated by previous studies, CVID13 patients (carrying Ikaros mutations) show decreased percentages of CD16⁺ monocytes, as well as a defective dendritic cell maturation, affecting to a lesser degree the PMN maturation and function [44]. Consequently, we can deduce that certain phenotypic findings of immune cells in PAD patients might be associated with the primary genetic defect(s) that is (are) the cause(s) of the disease.

5. Conclusion

Our findings indicate that PAD patients exhibit a persistent activation of innate immune cells that might be the result of either intrinsic defects leading to primary immunodeficiency or/and the chronic inflammatory stress observed usually in these disorders. Moreover, the experimental manipulation of immune cells, along with the distinct clinical characteristics and the treatment status of PAD patients should always be taken into consideration, in order to draw safe conclusions for in vivo phenomena when extrapolating in vitro data.

Data Availability

All data being analyzed in this manuscript are available upon request to the corresponding author.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The study received no external funding. It was financed by the standard budget provided by The Research Committee of the University of Thessaly to the Laboratory of Immunology and Histocompatibility of Medical School of University of Thessaly. We would like to thank Ms. Ioanna Papamargariti (nurse of the Primary Immunodeficiencies Outpatient Clinic of University Hospital of Larissa) for her help in the blood collection, as well as all the patients and healthy control blood donors.

Supplementary Materials

Figure S1: CD64 intensity of expression on polymorphonuclear cells (PMN) in different experimental conditions in the patients and controls of the study: A. after PMN isolation, B. after whole-blood incubation without LPS, C. after whole-blood incubation with LPS of total PAD patients. The lines represent the median values. Statistical analyses

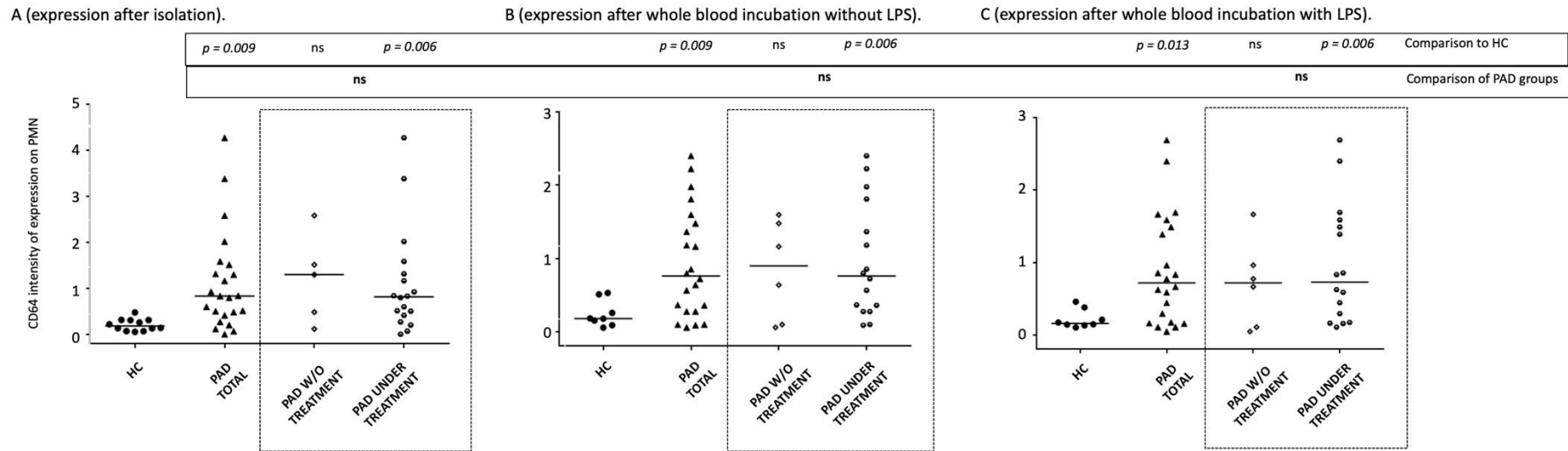
were performed by the Mann–Whitney U test; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; ns: not significant. Figure S2: A. CD10 intensity of expression on polymorphonuclear cells (PMN) at basal state according to the presence of splenomegaly. B. CD11b, C. CD11c and D. CD16 intensity of expression on PMN after their isolation, according to the presence of autoimmunity. The lines represent the median values. Statistical analyses were performed by the Mann–Whitney U test; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; ns: not significant. Table S1: demographic, genetic, and clinical data of PAD patients of the study. Abbreviations: M, male; F, female; CRD, chronic respiratory disease; fSCIG, facilitated subcutaneous immunoglobulin; IVIG, intravenous immunoglobulin; SCIG, subcutaneous immunoglobulin. ^Patients 3-6 were also analyzed after the initiation of replacement treatment (see Materials and Methods for details). *Patient FL carried also the mutation $JAK3$ -p.R840C (Ref. [21]). Table S2: monocyte counts and subpopulations in the patients and controls of the study. Abbreviations: HC, healthy controls, PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Statistical analysis was performed by the Mann–Whitney U test, while p refers to comparison of PAD patients vs. HC, sepsis patients vs. HC, and PAD patients vs. sepsis patients. Table S3: expression of surface markers on PMN at basal state. Abbreviations: HC, healthy controls, PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Statistical analysis was performed by the Mann–Whitney U test, while $p1$ refers to comparison of PAD patients vs. HC and $p2$ refers to the comparison of sepsis patients vs. HC. Table S4: expression of surface markers on PMN after isolation. Abbreviations: HC, healthy controls, PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells. Statistical analysis was performed by the Mann–Whitney U test, while p refers to comparison of PAD patients vs. HC. Table S5. Expression of surface markers on PMN after incubation without LPS. Abbreviations: HC, healthy donors, LPS, lipopolysaccharides; PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells. Statistical analysis was performed by the Mann–Whitney U test, while p refers to comparison of PAD patients vs. HC. Table S6. Expression of surface markers on PMN after incubation with LPS. Abbreviations: HC, healthy donors, LPS, lipopolysaccharides; PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells. Statistical analysis was performed by the Mann–Whitney U test, while p refers to comparison of PAD patients vs. HC. (Supplementary Materials)

References

- [1] S. Jolles, “The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes,” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology n Practice*, vol. 1, no. 6, pp. 545–556, 2013, quiz 557.
- [2] G. de Valles-Ibáñez, A. Esteve-Solé, M. Piquer et al., “Evaluating the genetics of common variable immunodeficiency: monogenetic model and beyond,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, p. 636, 2018.
- [3] D. Paquin-Proulx and J. K. Sandberg, “Persistent immune activation in COVID and the role of IVIG in its suppression,” *Frontiers in Immunology*, vol. 5, p. 637, 2014.
- [4] R. R. Barbosa, S. P. Silva, S. L. Silva et al., “Monocyte activation is a feature of common variable immunodeficiency irrespective of plasma lipopolysaccharide levels,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 169, no. 3, pp. 263–272, 2012.
- [5] L. Sharifi, N. Tavakolinia, F. Kiaee et al., “A review on defects of dendritic cells in common variable immunodeficiency,” *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, vol. 17, no. 2, pp. 100–113, 2017.
- [6] A. Chandra, F. Zhang, K. C. Gilmour et al., “Common variable immunodeficiency and natural killer cell lymphopenia caused by Ets-binding site mutation in the IL-2 receptor γ (IL2RG) gene promoter,” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 137, no. 3, pp. 940–942.e4, 2016, e4.
- [7] V. Thon, M. Vlkova, T. Freiberger, J. Litzman, and J. Lokaj, “The expression of fc gamma receptors on leukocytes and clinical course of common variable immunodeficiency (cvid),” *Scripta Medica*, vol. 78, pp. 315–322, 2005.
- [8] S. Casulli, H. Coignard-Biehler, K. Amazzough et al., “Defective functions of polymorphonuclear neutrophils in patients with common variable immunodeficiency,” *Immunologic Research*, vol. 60, no. 1, pp. 69–76, 2014.
- [9] A. Prezzo, F. M. Cavaliere, C. Milito, C. Bilotta, M. Iacobini, and I. Quinti, “Intravenous immunoglobulin replacement treatment reduces in vivo elastase secretion in patients with common variable immune disorders,” *Blood Transfusion*, vol. 17, no. 2, pp. 103–111, 2019.
- [10] J. Litzman, Z. Chovancova, P. Bejdak, M. Litzman, Z. Hel, and M. Vlkova, “Common variable immunodeficiency patients display elevated plasma levels of granulocyte activation markers elastase and myeloperoxidase,” *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 33, 2019.
- [11] M. Vlkova, Z. Chovancova, J. Nechvatalova et al., “Neutrophil and granulocytic myeloid-derived suppressor cell-mediated T cell suppression significantly contributes to immune dysregulation in common variable immunodeficiency disorders,” *Journal of Immunology*, vol. 202, pp. 93–104, 2018.
- [12] A. Cerutti, I. Puga, and G. Magri, “The B cell helper side of neutrophils,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 94, no. 4, pp. 677–682, 2013.
- [13] M. C. Dinauer, “Primary immune deficiencies with defects in neutrophil function,” *Hematology American Society of Hematology. Education Program*, vol. 2016, no. 1, pp. 43–50, 2016.
- [14] T. Rimmelé, D. Payen, V. Cantaluppi et al., “Immune cell phenotype and function in sepsis,” *Shock*, vol. 45, no. 3, pp. 282–291, 2016.
- [15] H. Chapel, M. Lucas, M. Lee et al., “Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes,” *Blood*, vol. 112, no. 2, pp. 277–286, 2008.
- [16] A. Prezzo, F. M. Cavaliere, C. Bilotta, M. Iacobini, and I. Quinti, “Intravenous immunoglobulin replacement treatment does not alter polymorphonuclear leukocytes function and surface receptors expression in patients with common variable immunodeficiency,” *Cellular Immunology*, vol. 306–307, pp. 25–34, 2016.
- [17] P. P. Youssef, B. X. Mantzioris, P. J. Roberts-Thomson, M. J. Ahern, and M. D. Smith, “Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils,”

- Journal of Immunological Methods*, vol. 186, no. 2, pp. 217–224, 1995.
- [18] C. Wagner, R. Deppisch, B. Deneffle, F. Hug, K. Andrassy, and G. M. H?nsch, "Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the FC γ receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells," *Shock*, vol. 19, no. 1, pp. 5–12, 2003.
- [19] G. Tsinti, A. E. Germenis, and M. Speletas, "The impact of experimental manipulation on neutrophil immunophenotyping," *Biomedical Research and Clinical Practice*, vol. 3, no. 3, 2018.
- [20] R. Ameratunga, S. T. Woon, D. Gillis, W. Koopmans, and R. Steele, "New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 174, no. 2, pp. 203–211, 2013.
- [21] H. Sic, M. Speletas, V. Cornacchione et al., "An activating Janus kinase-3 mutation is associated with cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent immune dysregulation syndrome," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, article 1824, 2017.
- [22] M. Speletas, A. Mamara, E. Papadopoulou-Alataki et al., "TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 31, no. 4, pp. 550–559, 2011.
- [23] J. C. Edberg, J. E. Salmon, and R. P. Kimberly, "Functional capacity of fc gamma receptor III (CD16) on human neutrophils," *Immunologic Research*, vol. 11, no. 3-4, pp. 239–251, 1992.
- [24] C. Gillis, A. Gouel-Cheron, F. Jonssön, and P. Bruhns, "Contribution of human FC γ Rs to Disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, p. 254, 2014.
- [25] M. H. Bae, S. H. Park, C. J. Park et al., "Flow cytometric measurement of respiratory burst activity and surface expression of neutrophils for septic patient prognosis," *Cytometry Part B, Clinical Cytometry*, vol. 90, no. 4, pp. 368–375, 2016.
- [26] P. S. Martins, M. K. Brunialti, L. S. Martos et al., "Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis," *Critical Care*, vol. 12, no. 1, p. R25, 2008.
- [27] T. Cloke, M. Munder, P. Bergin et al., "Phenotypic alteration of neutrophils in the blood of HIV seropositive patients," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, article e72034, 2013.
- [28] C. Carmona-Rivera and M. J. Kaplan, "Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity," *Seminars in Immunopathology*, vol. 35, no. 4, pp. 455–463, 2013.
- [29] S. Casulli, S. Topçu, L. Fattoum et al., "A differential concentration-dependent effect of IVIg on neutrophil functions: relevance for anti-microbial and anti-inflammatory mechanisms," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, article e26469, 2011.
- [30] B. H. Davis, S. H. Olsen, E. Ahmad, and N. C. Bigelow, "Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients," *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 130, pp. 654–661, 2006.
- [31] S. Hokibara, N. Kobayashi, K. Kobayashi et al., "Markedly elevated CD64 expression on neutrophils and monocytes as a biomarker for diagnosis and therapy assessment in Kawasaki disease," *Inflammation Research*, vol. 65, no. 7, pp. 579–585, 2016.
- [32] G. H. Gericke, S. G. Ericson, L. Pan, L. E. Mills, P. M. Guyre, and P. Ely, "Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 57, no. 3, pp. 455–461, 1995.
- [33] K. Migita, K. Agematsu, K. Yamazaki et al., "Expression of CD64 on polymorphonuclear neutrophils in patients with Familial Mediterranean Fever," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 164, no. 3, pp. 365–372, 2011.
- [34] T. Yamazaki, S. Hokibara, T. Shigemura et al., "Markedly elevated CD64 expressions on neutrophils and monocytes are useful for diagnosis of Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, and Cervical Adenitis (PFAPA) syndrome during flares," *Clinical Rheumatology*, vol. 33, no. 5, pp. 677–683, 2014.
- [35] J. I. Robinson, E. W. Baxter, R. L. Owen et al., "Affimer proteins inhibit immune complex binding to Fc gamma RIIIa with high specificity through competitive and allosteric modes of action," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 115, no. 1, pp. E72–E81, 2018.
- [36] W. H. Yeap, K. L. Wong, N. Shimasaki et al., "CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, article 34310, 2016.
- [37] H. Sengelov, L. Kjeldsen, M. S. Diamond, T. A. Springer, and N. Borregaard, "Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 92, no. 3, pp. 1467–1476, 1993.
- [38] G. Gainaru, A. Papadopoulos, I. Tsangaris, M. Lada, E. J. Giannellos-Bourboulis, and A. Pistiki, "Increases in inflammatory and CD14 (dim)/CD16(pos)/CD45(pos) patrolling monocytes in sepsis: correlation with final outcome," *Critical Care*, vol. 22, no. 1, p. 56, 2018.
- [39] K. L. Wong, J. J. Tai, W. C. Wong et al., "Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets," *Blood*, vol. 118, no. 5, pp. e16–e31, 2011.
- [40] H. S. Kuehn, W. Ouyang, B. Lo et al., "Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4," *Science*, vol. 345, no. 6204, pp. 1623–1627, 2014.
- [41] A. Bousfiha, L. Jeddane, C. Picard et al., "The 2017 IUIS phenotypic classification for primary Immunodeficiencies," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 38, no. 1, pp. 129–143, 2018.
- [42] S. M. Maggadottir, J. Li, J. T. Glessner et al., "Rare variants at 16p11.2 are associated with common variable immunodeficiency," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 135, no. 6, pp. 1569–1577, 2015.
- [43] G. Emmi, M. Becatti, A. Bettiol, G. Hatemi, D. Prisco, and C. Fiorillo, "Behçet's syndrome as a model of thrombo-inflammation: the role of neutrophils," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, article 1085, 2019.
- [44] D. Boutboul, H. S. Kuehn, Z. Van De Wyngaert et al., "Dominant-negative IKZF1 mutations cause a T, B, and myeloid cell combined immunodeficiency," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 128, no. 7, pp. 3071–3087, 2018.

Supplementary Material



Supplementary Figure 1. CD64 intensity of expression on polymorphonuclear cells (PMN) in different experimental conditions in the patients and controls of the study: A. after PMN isolation, B. after whole blood incubation without LPS, C. after whole blood incubation with LPS of total PAD patients. The lines represent the median values. Statistical analyses were performed by Mann-Whitney U test; * : when $p < 0.05$; ** : when $p < 0.01$; ns: not significant

Supplementary Table 1. Demographic, genetic and clinical data of PAD patients of the study

No	Patient	Treatment status	Sex	Age	Mutational status	Autoimmunity	CRD	Bronchiectasis	Enteropathy	Granulomas	Neoplasia	Splenomegaly
1	D.K.	NO treatment	M	14	IKZF1-p.H191Y	no	no	no	no	no	no	no
2	H.A.	NO treatment	M	48	Unknown	no	yes	yes	no	no	no	no
3	K.M.^	NO treatment	F	53	Unknown	no	no	no	yes	no	no	no
4	M.M. [^]	NO treatment	F	43	Unknown	yes	yes	yes	no	no	no	splenectomy
5	S.M.^	NO treatment	F	66	Unknown	no	no	yes	yes	no	no	no
6	T.D.^	NO treatment	F	43	Unknown	yes	no	no	no	no	yes	yes
7	A.A.	fSCIG	M	48	Unknown	no	yes	yes	no	no	no	no
8	D.M.	fSCIG	F	38	Unknown	no	no	no	no	yes	no	yes
9	T.H.	IVIG	F	40	Unknown	no	no	yes	no	yes	no	yes
10	K.A.	fSCIG	F	34	Unknown	no	no	no	yes	no	no	yes
11	K.M.	fSCIG	F	36	Unknown	yes	no	no	yes	no	no	no
12	K.B.	fSCIG	F	56	Unknown	no	yes	yes	no	no	no	no
13	K.Z.	fSCIG	F	65	Unknown	no	yes	no	no	yes	no	no
14	K.M.	fSCIG	F	39	Unknown	no	no	yes	no	no	no	yes
15	K.M.	IVIG	M	51	TACI-p.C104R	yes	no	yes	yes	yes	yes	splenectomy
16	K.S.	fSCIG	M	28	Unknown	yes	yes	no	no	no	no	yes
17	M.D.	fSCIG	F	19	CTLA4-p.Y89X	yes	no	no	yes	no	no	no
18	B.K.	fSCIG	F	49	Unknown	yes	no	yes	no	no	no	no
19	N.B.	IVIG	F	58	Unknown	no	no	no	no	no	no	yes
20	N.E.	IVIG	F	42	Unknown	no	yes	yes	no	no	no	yes
21	S.N.	fSCIG	M	30	TACI-p.C104R	yes	yes	yes	no	no	no	yes
22	F.I.*	fSCIG	M	23	CTLA4-p.Y139C	yes	no	no	no	no	no	splenectomy
23	M.E.	fSCIG (low CS dosage)	F	38	Unknown	no	yes	yes	no	no	no	yes
24	P.A.	fSCIG (and mycophenolate)	M	21	Unknown	yes	no	no	no	yes	no	yes
25	M.D.	fSCIG	M	51	TACI-p.C104R	yes	no	no	no	no	no	yes

Abbreviations: M, male; F, female; CRD, chronic respiratory disease; fSCIG, facilitated subcutaneous immunoglobulin; IVIG, intravenous immunoglobulin; SCIG, subcutaneous immunoglobulin

^ Patients 3-6 were also analyzed after the initiation of replacement treatment (see Materials and Methods section for details)

* Patient FL carried also the mutation *JAK3*-p.R840C (Ref. 21, *Frontiers in Immunology* 2017;8:1824)

Supplementary Table 2. Monocyte counts and subpopulations in the patients and controls of the study

A. MONOCYTES SUBPOPULATIONS (%)				HC vs PAD	HC vs SEPSIS	PAD VS SEPSIS
	HC (n=12)	PAD (n=25)	SEPSIS (n=4)	p	p	p
Classical (mean, SDEV)	78.1 ± 17.3	65.6 ± 16.0	62.9 ± 16.5	0.018	0.133	0.818
Intermediate (mean, SDEV)	14.6 ± 14.1	24.7 ± 14.6	29.6 ± 17.0	0.018	0.103	0.584
Non classical (mean, SDEV)	6.1 ± 4.0	8.1 ± 3.8	6.8 ± 4.0	0.106	0.684	0.671

B. MONOCYTES SUBPOPULATIONS (x10⁹/L of Whole Blood)				HC vs PAD	HC vs SEPSIS	PAD VS SEPSIS
	HC	PAD	SEPSIS	p	p	p
Monocytes total count (mean, SDEV)	0.305 ± 0.123	0.375 ± 0.245	0.325 ± 0.206	0.772	0.932	0.825
Classical (mean, SDEV)	0.247 ± 0.105	0.263 ± 0.215	0.179 ± 0.083	0.402	0.262	0.865
Intermediate (mean, SDEV)	0.035 ± 0.025	0.080 ± 0.050	0.120 ± 0.109	0.010	0.262	0.542
Non classical (mean, SDEV)	0.018 ± 0.013	0.026 ± 0.016	0.021 ± 0.023	0.185	>0.999	0.382

Abbreviations: HC, healthy controls, PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test, while *p* refers to comparison of PAD patients vs HC, Sepsis patients vs HC and PAD patients vs Sepsis patients.

Supplementary Table 3. Expression of surface markers on PMN at basal state

Markers	HC (n 12)	Patients with sepsis (n 4)	PAD patients (n 25)	<i>p</i> ₁	<i>p</i> ₂
Absolute number (x10 ⁹ /L) (mean, SDEV)	4.5 ± 1.8	9.3 ± 2.8	4.5 ± 2.5	0.586	0.011
CD16 (mean, SDEV)	175.6 ± 41.7	81.6 ± 32.0	153.7 ± 43.0	0.052	0.004
CD18 (mean, SDEV)	9.2 ± 4.3	10.9 ± 4.9	9.7 ± 4.3	0.747	0.684
CD11b (mean, SDEV)	15.6 ± 7.0	14.9 ± 3.9	16.4 ± 4.9	0.336	0.951
CD66b (mean, SDEV)	5.6 ± 1.5	12.6 ± 5.9	6.2 ± 2.1	0.387	0.002
CD64 (mean, SDEV)	0.2 ± 0.1	1.8 ± 1.3	1.0 ± 0.7	< 0.001	0.001
CD10 (mean, SDEV)	2.9 ± 1.8	0.9 ± 0.9	2.0 ± 1.0	0.160	0.019
CD11c (mean, SDEV)	2.2 ± 1.2	1.9 ± 1.0	1.7 ± 1.0	0.195	0.782

Abbreviations: HC, healthy controls, PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells; SDEV, standard deviation. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test, while *p*₁ refers to comparison of PAD patients vs HC and *p*₂ refers to the comparison of sepsis patients vs HC.

Supplementary Table 4. Expression of surface markers on PMN after isolation

Markers	HC (n 12)	PAD patients (n 23)	<i>p</i>
CD16 (mean, SDEV)	212.1 ± 54.9	200.7 ± 71.1	0.293
CD18 (mean, SDEV)	14.4 ± 7.7	16.2 ± 7.6	0.493
CD11b (mean, SDEV)	21.0 ± 6.5	23.0 ± 6.0	0.139
CD66b (mean, SDEV)	9.1 ± 2.8	8.5 ± 4.1	0.716
CD64 (mean, SDEV)	0.2 ± 0.1	1.1 ± 1.1	< 0.001
CD10 (mean, SDEV)	5.7 ± 2.4	4.6 ± 2.3	0.151
CD11c (mean, SDEV)	3.8 ± 2.0	3.1 ± 1.7	0.262

Abbreviations: HC, healthy controls, PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test, while *p* refers to comparison of PAD patients vs HC.

Supplementary Table 5. Expression of surface markers on PMN after incubation without LPS

Markers	HC (n 12)	PAD patients (n 25)	<i>p</i>
CD16 (mean, SDEV)	214.2 ± 38.5	174.6 ± 61.0	0.012
CD18 (mean, SDEV)	12.5 ± 7.1	12.5 ± 6.1	0.736
CD11b (mean, SDEV)	35.3 ± 5.8	36.1 ± 10.1	0.630
CD66b (mean, SDEV)	11.1 ± 3.3	12.0 ± 6.5	0.783
CD64 (mean, SDEV)	0.2 ± 0.2	0.9 + 0.7	0.009
CD10 (mean, SDEV)	4.4 ± 1.5	3.6 ± 1.8	0.393

Abbreviations: HC, healthy donors, LPS, lipopolysaccharides; PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test, while *p* refers to comparison of PAD patients vs HC.

Supplementary Table 6. Expression of surface markers on PMN after incubation with LPS

Markers	HC (n 12)	PAD patients (n 25)	<i>p</i>
CD16 (mean, SDEV)	96.3 ± 34.8	102.5 ± 44.4	0.723
CD18 (mean, SDEV)	14.2 ± 6.8	13.5 ± 5.8	0.266
CD11b (mean, SDEV)	60.0 ± 5.7	59.1 ± 15.3	0.630
CD66b (mean, SDEV)	39.3 ± 18.4	34.3 ± 18.0	0.431
CD64 (mean, SDEV)	0.2 ± 0.1	0.9 + 0.8	0.013
CD10 (mean, SDEV)	4.3 ± 1.1	3.3 ± 1.7	0.107

Abbreviations: HC, healthy donors, LPS, lipopolysaccharides; PAD, primary antibody deficiencies; PMN, polymorphonuclear cells. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test, while *p* refers to comparison of PAD patients vs HC.