

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ - ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Διευθυντής: Καθ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής

**Μεταλλάξεις *TAC1* και *ICOS*:
Επιδημιολογία και κλινικές συσχετίσεις
σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική νόσο**

ΚΥΡΙΑΚΗ ΛΙΑΔΑΚΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343/1232, άρθρο 202, παρ. 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθαίος Σπελέτας

*Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας
(επιβλέπων)*

Αναστάσιος Γερμενής

Καθηγητής Ανοσολογίας

Ζωή Δανιήλ

Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθαίος Σπελέτας

*Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας
(επιβλέπων)*

Αναστάσιος Γερμενής

Καθηγητής Ανοσολογίας

Ζωή Δανιήλ

Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

Βαμβακόπουλος Νικόλαος

Καθηγητής Βιολογίας

Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος

Καθηγητής Πνευμονολογίας

Πετεινάκη Ευθυμία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Χατζηευθυμίου Αποστολία

Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας

Στους γονείς μου, Νίκο και Μάχη

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ - Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΣΤΟ ΑΝΟΣΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	16
1.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ.....	20
1.2.1. ΧΑΠ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ Τ-ΚΥΤΤΑΡΩΝ	20
1.2.2. ΧΑΠ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ	23
1.3. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΚΔΟΧΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	26
1.4. ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΑ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΧΑΠ	28
2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ - ΤΑCΙ, ΒΑFFR ΚΑΙ ICOS	28
2.1. ΤΑCΙ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	29
2.1.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ	29
2.1.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ	31
2.1.3. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΤΑCΙ ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	34
2.2. ΒΑFFR ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	38
2.2.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ	38
2.2.2. ΈΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ	38
2.2.3. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΒΑFFR ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	40
2.3. ICOS ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	42
2.3.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ ΤΟΥ ICOS	42
2.3.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ICOS	43
2.3.3. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ICOS ΥΠΟΔΟΧΕΑ	44
3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ - TLR2 ΚΑΙ TLR4 ΣΤΗ ΧΑΠ	45
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	47
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	49
2. ΥΛΙΚΑ	51
2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ	51
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ	56
3.1. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	56
3.1.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ TNFRSF13B/TACI ΥΠΟΔΟΧΕΑ	56
3.1.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΒΑFF ΥΠΟΔΟΧΕΑ (ΒΑFFR)	57
3.1.3. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	57
3.1.4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	57
3.2. ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	58
3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	59
3.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	60
3.4.1. TNFRSF13B/TACI.....	60
3.4.2. TLR2 ΚΑΙ TLR4.....	63
3.4.3. ICOS.....	67
3.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	68

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
4.1. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ - ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TAC1 ΚΑΙ BAFFR	70
4.2. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	72
4.3. ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ- ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	76
4.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	77
4.4.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>TAC1</i> , <i>TLR2</i> ΚΑΙ <i>TLR4</i> , ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΛΜΕΙΨΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>ICOS</i>	77
5. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
5.1. ΛΕΜΦΟΠΕΝΙΑ.....	81
5.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ	83
5.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΝΗΘΕΙΑΣ	87
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	100
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	102
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Κυριακή Ν. Λιαδάκη

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 18 Μαΐου 1982

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Βόλος

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμη

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Παρασκευοπούλου 30, Ν.Ιωνία, 384 46, Βόλος

Τηλ.: 2421067029 – Κιν.: 697 6487573

E-mail: liadaki_kiki@yahoo.com

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά (άριστα)

ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

2004 Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών - Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

2006 Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής», Τμήμα Ιατρικής-Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Διπλωματική Εργασία: Μονήρεις νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του *TLR4* γονιδίου σε ασθενείς με μυελουπερπλαστικά σύνδρομα, Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

2010 Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση με τίτλο: Η έκφραση των υποδοχέων TAC1 και BAFF-R σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ρόδος

2010 Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση με τίτλο: Η έκφραση των υποδοχέων TAC1 και BAFF-R σε ασθενείς με Σαρκοείδωση. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ρόδος

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **ΛΙΑΔΑΚΙ Κ**, PETINAKI E, SKOULAKIS C, TSIREVELOU P, KLAPSA D, GERMENIS AE, SPELETAS M. TLR4, but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* *Clin Vaccine Immunol* 2011, 8(2):217-22

2. SPELETAS M, MERENTITI V, KOSTIKAS K, **LIADAKI K**, MINAS M, GOURGOULIANIS K, GERMENIS AE. Association of TLR4-T399I polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease in smokers *Clin Dev Immunol* 2009;2009:260286 Epub 2010 Feb 15
3. ΠΑΠΑΙΩΑΝΝΟΥ ΑΙ, ΚΟΥΤΣΟΚΕΡΑ Α, ΤΑΝΟΥ Κ, ΚΙΡΟΠΟΥΛΟΣ ΤΣ, ΤΣΙΛΙΟΝΙ Ι, ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΙ Σ, **LIADAKI K**, ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ Σ, GOURGOULIANIS ΚΙ, ΚΟΣΤΙΚΑΣ Κ. The acute effect of smoking in healthy and asthmatic smokers *Eur J Clin Invest* 2010, 40(2):103-9, Epub 2009 Nov 12
4. SPELETAS M, **LIADAKI K**, ΚΑΛΑΛΑ F, ΔΑΙΟΥ C, ΚΑΤΟΔΡΙΤΟΥ Ε, ΜΑΝΔΑΛΑ Ε, ΚΟΡΑΝΤΖΙΣ Ι, ΡΙΤΙΣ Κ, ΖΙΝΤΖΑΡΑΣ Ε, GERMENIS AE. TLR4 single nucleotide polymorphisms and thrombosis risk in patients with myeloproliferative disorders *Thromb Res* 2008,122(1):27-32, Epub 2007 Nov 14

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

1. **ΛΙΑΔΑΚΗ Κ**, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΜΑΜΑΡΑ Α, ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Ι.Κ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Η έκφραση των πρωτεϊνών TAC1 και BAFF-R σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμοπάθεια. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ρόδος 21-24 Οκτωβρίου 2010, *ΠΝΕΥΜΩΝ 2010*, 23(1):9
2. ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ, ΔΑΝΙΗΛ Ζ, ΑΝΤΩΝΙΟΥ Κ, ΜΑΜΑΡΑ Α, **ΛΙΑΔΑΚΗ Κ**, ΜΑΛΛΗ Φ, ΒΑΣΣΑΛΟΥ Ε, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Ι. Κ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Η έκφραση των πρωτεϊνών TAC1 και BAFF-R σε ασθενείς με σαρκοείδωση. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Ρόδος 21-24 Οκτωβρίου 2010, *ΠΝΕΥΜΩΝ 2010*, 23(1):13
3. SPELETAS M, ΜΑΜΑΡΑ Α, ΚΑΛΑΛΑ F, **LIADAKI K**, ΡΑΠΑΔΟΥΛΙΣ Ν, ΚΙΟΥΜΙ Α, ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΑΣ Ν, ΛΑΦΙΟΝΙΑΤΙΣ Σ, ΛΟΥΚΙΔΙΣ Κ, ΜΑΤΣΟΥΚΑ Ρ, ΚΑΡΤΑΣΙΣ Ζ, GERMENIS Α. TNFRSF13B gene expression and molecular analysis in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. 14th European Hematology Association Congress. Berlin 4-7 June 2009, *Haematologica* 2009, 94(Suppl.2):593
4. ΠΑΠΑΙΩΑΝΝΟΥ Α, ΤΑΝΟΥ Κ, ΚΟΥΤΣΟΚΕΡΑ Α, ΚΥΡΟΠΟΥΛΟΣ Τ, ΤΣΙΛΙΩΝΗ Ι, ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΗ Σ, **ΛΙΑΔΑΚΗ Κ**, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΚΩΣΤΙΚΑΣ Κ. Άμεσες επιδράσεις του καπνίσματος σε υγιείς και ασθματικούς καπνιστές. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα, 20-23 Νοεμβρίου 2008, *ΠΝΕΥΜΩΝ 2008*, supp;16
5. SPELETAS M, ΠΛΑΣΤΙΡΑΣ Δ, ΚΑΛΑΛΑ F, **LIADAKI K**, ΚΑΤΟΔΡΙΤΟΥ Ε, ΜΑΝΔΑΛΑ Ε, ΔΑΙΟΥ C, ΡΙΤΙΣ Κ, ΚΟΡΑΝΤΖΙΣ Ι, GERMENIS AE. Innate immunity and thrombosis: association of TLR4-D299G and TLR4-T399I single nucleotide polymorphisms (SNPs) with thromboembolic disease in patients with myeloproliferative disorders (MPDs). 21st

European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Barcelona, Spain, 5-7 May 2007, *Tissue Antigens* 2007, 69:373–532

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. BARDAKA F, DANIIL Z, MAMARA A, **ΛΙΑΔΑΚΙ Κ**, MALLI F, GOURGOULIANIS K I, SPELETAS M. TAC1 and BAFFR expression in sarcoidosis. European Respiratory Society Conference, 18-22 September, Barcelona, Spain 2010, Book of Abstracts, p.:196
2. ΜΑΜΑΡΑ Α, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΚΑΡΤΣΙΟΣ Χ, **ΛΙΑΔΑΚΗ Κ**, ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ, ΕΦΡΑΙΜΙΔΟΥ Σ, ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ Ν, ΜΑΤΣΟΥΚΑ Π, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Ταυτόχρονη έκφραση κ και λ ελαφρών αλυσων σε Β-λεμφοπαραγωγά σύνδρομα. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, 29/04-2/05 2010, Αργοστόλι Κεφαλλονιάς, Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας, Βιβλίο περιλήψεων, σελ.:176
3. ΜΑΜΑΡΑ Α, ΜΠΑΡΔΑΚΑ Φ, **ΛΙΑΔΑΚΗ Κ**, ΜΠΟΥΚΑΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Χαμηλή έκφραση BAFF-R ως αίτιο κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, 29/04-2/05 2010, Αργοστόλι Κεφαλλονιάς, Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας, Βιβλίο περιλήψεων, σελ.:180
4. ΜΑΜΑΡΑ Α, ΚΑΛΑΛΑ Φ, **ΛΙΑΔΑΚΗ Κ**, ΠΑΠΑΔΟΥΛΗΣ Ν, ΜΑΝΔΑΛΑ Ε, ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ Ε, ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΑΣ Ν, ΠΑΛΑΣΣΟΠΟΥΛΟΥ Μ, ΛΑΦΙΩΝΙΑΤΗΣ Σ, ΚΙΟΥΜΙ Α, ΚΟΡΑΝΤΖΗΣ Ι, ΚΑΡΤΑΣΗΣ Ζ, ΙΩΑΝΝΟΥ Μ, ΜΑΤΣΟΥΚΑ Ρ, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ. Μελέτη του γονιδίου *TNFRSF13B* σε ασθενείς με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα. 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 19-22 Νοεμβρίου, Αθήνα 2008 Βιβλίο περιλήψεων, σελ.:122
5. ΡΑΡΑΙΟΑΝΝΟΥ Α, ΚΟΥΤΣΟΚΕΡΑ Α, ΤΑΝΟΥ Κ, ΚΙΡΟΠΟΥΛΟΣ Τ, ΤΣΙΛΙΟΝΙ Ι, ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΙ Σ, **ΛΙΑΔΑΚΙ Κ**, GOURGOULIANIS K, ΚΟΣΤΙΚΑΣ Κ. Acute effect of smoking in normal and asthmatic smokers. European Respiratory Society Conference, 5 October 2008 Berlin, Germany Book of Abstracts, p.:195
6. ΑΘΑΝΑΣΟΥΛΑ Α, **ΛΙΑΔΑΚΗ Κ**, ΛΑΖΑΡΟΥ Δ, ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΑΙ. Επίδραση της διατροφής με σιτάμι σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης. 26^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, 27-30 Μαΐου 2004, Βόλος, Ελλάδα. Βιβλίο περιλήψεων, σελ.:6-7

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ΧΑΠ είναι μια συνήθης και δαπανηρή νόσος, η οποία, παρ' όλη την πρόοδο της Ιατρικής, αποτελεί σήμερα τη μόνη σημαντική αιτία θανάτου που ο επιπολασμός της παγκοσμίως αυξάνει. Πρόκειται για μια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη φλεγμονώδη απάντηση των αεραγωγών κατά την οποία ο καπνός των τσιγάρων -ο κύριος προκλητικός παράγοντας- καταστρέφει τους επιθηλιακούς σχηματισμούς της αναπνευστικής οδού. Ωστόσο, διαπιστώθηκε πως η καταστροφή αυτή αφενός προκαλεί την ενεργοποίηση της μη ειδικής ανοσίας, αφετέρου δε έχει την ικανότητα να επάγει την ειδική ανοσιακή απάντηση και να οδηγήσει σε σοβαρότερα στάδια της νόσου. Ειδικότερα, ολοένα και μεγαλύτερος αριθμός μελετών αναφέρει τη διήθηση των αεραγωγών και των κυψελιδικών τοιχωμάτων από T- και B-κύτταρα καθώς και την οργάνωση των τελευταίων σε λεμφοζίδια. Επομένως, κρίνεται απαραίτητο να μελετηθεί περαιτέρω το ανοσιακό σύστημα των ασθενών, ιδιαίτερα στο πλαίσιο των B-κυττάρων, ο ρόλος των οποίων δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Με την παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η έκφραση των υποδοχέων της ειδικής ανοσίας TAC1 και BAFFR στην επιφάνεια των B-κυττάρων, στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΧΑΠ και αντίστοιχων υγιών μαρτύρων. Παράλληλα, σε όλα τα άτομα της μελέτης έγινε ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος και προσδιορισμός της συγκέντρωσης ανοσοσφαιρινών. Επιπρόσθετα, ανιχνεύθηκε η παρουσία γενετικών βλαβών-παραλλαγών στα γονίδια της ειδικής ανοσίας *TNFRSF13B/TAC1* και *ICOS* που δεν έχουν προηγουμένως μελετηθεί σε ασθενείς με ΧΑΠ. Τα παραπάνω γονίδια μελετήθηκαν σε συνδυασμό με πολυμορφισμούς στα γονίδια της μη ειδικής ανοσίας *TLR2* και *TLR4*, λαμβάνοντας υπόψη πως φορείς κοινών πολυμορφισμών του *TLR4* εμφανίζουν μεγαλύτερη προδιάθεση ανάπτυξης της νόσου.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς της Πνευμονολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας και φύλου.

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής: τον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Γερμενή που με δέχτηκε στο εργαστήριο του, για την ευκαιρία που μου έδωσε και για τη στήριξη του σε σημαντικές για την ζωή μου αποφάσεις· την Επικ. Καθηγήτρια κ. Ζωή Δανιήλ για την άψογη συνεργασία που είχαμε αυτά τα χρόνια· ιδιαίτερα, τον επιβλέποντα Επικ. Καθηγητή κ. Ματθαίο Σπελέτα για την υποστήριξη και την προσωπική συμβολή του σε όλα

τα στάδια της διδακτορικής μου διατριβής ώστε να είναι δυνατή η ολοκλήρωση της. Ακόμη περισσότερο τον ευχαριστώ για τα μαθήματα ζωής, το ειλικρινές ενδιαφέρον του καθώς και την πλούσια επιστημονική του εμπειρία την οποία μοιράστηκε μαζί μου αυτά τα χρόνια.

Η έρευνα αυτή, εξαιτίας της πολλαπλότητας και πολυπλοκότητας των πειραμάτων, δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς τη σημαντική υποστήριξη πολλών ανθρώπων.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής Καθηγητή κ. Κων/νο Ι. Γουργουλιάνη για την αμέριστη συμπαράστασή του. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κ. Νόρα Κερενίδη και τον κ. Μάρκο Μηνά για όλη τη βοήθειά τους αλλά και τις ώρες που περάσαμε μαζί ώστε να συλλεχθεί το δείγμα των ασθενών. Επίσης, ευχαριστώ την Βαϊα Κωνσταντικάκη, την Ελένη Καρέτση, τη Μάρθα Λαδά και τη Φωτεινή Μάλλη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και παλαιά μέλη της Πνευμονολογικής κλινικής με τα οποία συνεργαστήκαμε στην αρχή της διδακτορικής μου διατριβής: τον κ. Κώστα Κωστικά και τον κ. Κώστα Μπαρτζιώκα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το λοιπό ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Πνευμονολογικής Κλινικής για την βοήθεια και την άψογη συνεργασία τους κατά τη συλλογή του υλικού των ασθενών.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την Αντιγόνη Μαμάρα και την Φωτεινή Μπαρδάκα για τις ατελείωτες ώρες συνεργασίας μας, τη βοήθεια, την υποστήριξη και την χαρά να μοιραζόμαστε, σχεδόν αδελφικά, τις δύσκολες και τις ευχάριστες στιγμές της ζωής μας.

Ευχαριστώ τη Φανή Καλαλά που μοιράστηκε τις γνώσεις της στην κυτταρομετρία ροής, την Νίκη Αργέντου για όλη τη βοήθεια της, τη Μαρία Ζαμανάκου, την Ευαγγελία Σίσκα, το Στέφανο Τσόχα, τον Γιώργο Ιορδανάκη, τον Κώστα Τσολή, τη Λίτσα Καραμούτη, την Ελένη Κλέτσου καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου. Ιδιαίτερη αναφορά θέλω να κάνω στην ανεκτίμητη συμβολή της αγαπημένης μου φίλης, διδάκτορος κ. Βασίλκας Μερεντίτη, με την οποία στο παρελθόν μοιραστήκαμε ώρες παραγωγικής εργασίας και η οποία συμπαραστάθηκε με ειλικρινές ενδιαφέρον σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διατριβής μου αλλά και σε όλες τις φάσεις της ζωής μου γενικότερα. Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς, την Κατερίνα, τον Βασίλη, τον Έκτορα, την Ελένη, την Αθηνά και τον Νίκο που με στήριξαν.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAT (A ₁ -antitrypsin)	A ₁ -αντιθρυψίνη
AP-1 (Activator protein-1)	Πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1
APRIL (A proliferation inducing ligand)	Συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό
AS-PCR (Allele specific PCR)	Ειδική για το αλληλίο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
b2m (b2-microglobulin)	β2-μικροσφαιρίνη
BAFF (B-cell activating factor)	Παράγοντας ενεργοποίησης των Β-κυττάρων
BALF (Bronchoalveolar lavage fluid)	Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα
BALT (Bronchial associated lymphoid tissue)	Λεμφικός ιστός σχετιζόμενος με τους βλεννογόνους των βρόγχων
BcR (B-cell receptor)	Υποδοχέας των Β-κυττάρων
CAML (Calcium modulating ligand)	Συνδέτης που συμμετέχει στην ρύθμιση του ασβεστίου
CCR (CC Chemokine Receptor)	Υποδοχέας για τις CC χημειοκίνες
cIAP (Cellular inhibitor of apoptosis protein)	Κυτταρικός αναστολέας της απόπτωσης
CpG (Cytosine-phosphate-guanosine)	Δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανοσίνης
CRDs (Cysteine rich domains)	Πεδία πλούσια σε κυστεΐνες
CRP (C-reactive protein)	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CTL (Cytolytic T Lymphocyte)	CD8 T κυτταρολυτικός κλώνος
COVID (Common variable immunodeficiency)	Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια
DNA (Deoxyribonucleic acid)	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
ECM (Extracellular matrix)	Εξωκυττάριο στρώμα
EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid)	
FA-PBS (Formaldehyde-PBS)	Διάλυμα φορμαλδεΰδης-PBS
FEF25-75% (Forced expiratory flow during the middle half of the FVC)	μέση βίαια εκπνεόμενη ροή
FEV₁ (Forced expiratory volume at one second)	βίαια εκπνεόμενος όγκος σε ένα δευτερόλεπτο
FITC (Fluorescein)	Φλουοροσκεΐνη
FDC (Follicular dendritic cells)	Λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα
FVC (Forced vital capacity)	βίαια εκπνεόμενη ζωτική χωρητικότητα
HEV (High endothelial venules)	Φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο
Het (Heterozygous)	Ετερόζυγος
Hom (Homozygous)	Ομόζυγος
ICOS (Inducible T-cell co-stimulator)	Επαγόμενος συνδιεγέρτης των Τ-κυττάρων
IFN (Interferon)	Ιντερφερόνη
IL (Interleukin)	Ιντερλευκίνη
IκB-α (Inhibitor kappa B-alpha)	Αναστολέας κB-α
JNK (c-Jun amino-terminal kinase)	Jun-κινάση
LBP (LPS-binding protein)	Πρωτεΐνη συνδέουσα LPS

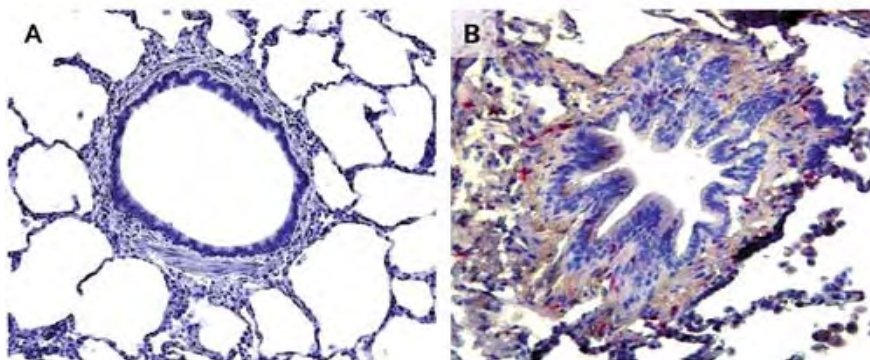
LPS (Lipopolysaccharide)	Λιποπολυσακχαρίτες
mAb (Monoclonal Antibody)	Μονοκλωνικό αντίσωμα
MHC (Major Histocompatibility Complex)	Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
NF-AT (Nuclear factor of activated T-cells)	Πυρηνικός παράγοντας ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων
NF-κB (Nuclear factor-kappa B)	Πυρηνικός παράγοντας-κΒ
NK (Natural Killer)	Φυσικά κυτταροκτόνο κύτταρο
PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns)	Μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με την παθογονικότητα
PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells)	Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος
PEF (Peak expiratory flow)	Μέγιστη εκπνευστική ροή
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Ουδέτερο διάλυμα φωσφορικού άλατος
PC5 (Phycoerythrin-Cyanine-5)	Φυκοερυθρίνη-κυανίνη-5
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PE (Phycoerythrin)	Φυκοερυθρίνη
RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	Πολυμορφισμός τμημάτων περιορισμένου μήκους
Rpm (Rounds per minute)	Στροφές ανά λεπτό
PRRs (Pattern recognition receptors)	Υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων
RT (Room Temperature)	Θερμοκρασία δωματίου
Scid (Severe combined immunodeficiency)	Βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
TBS (TRAF binding site)	Σημείο πρόσδεσης των TRAF πρωτεϊνών
TCR (T Cell Receptor)	Υποδοχέας των Τ-κυττάρων
TGF-β (Transforming growth factor-β)	Αυξητικός παράγοντας της βλαστικής μεταμόρφωσης-β
THC (TAC1 highly conserved)	Υψηλά διατηρημένο πεδίο του TAC1 υποδοχέα
TI (Thymus independent)	Θυμοανεξάρτητη
TIR domain (Toll/IL-1 receptor domain)	Πεδίο των υποδοχέων Toll/IL-1
TLRs (Toll-like receptors)	Ανάλογοι των Toll υποδοχείς
TM (Transmembrane)	Διαμεμβρανικός
TNF-α (Tumor Necrosis Factor -α)	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α
TNF (Tumor necrosis factor)	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων
TNFR (TNF receptors)	TNF υποδοχείς
Treg (T Regulatory Cell)	T ρυθμιστικό κύτταρο
U (Units)	Μονάδες ενζύμου
Ub (Ubiquitin)	Ουβικουιτίνη
Wt (Wild type)	Άγριου τύπου
PA	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
ΣΕΛ	Συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος
ΧΑΠ	Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΧΑΠ αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας σε όλο τον κόσμο. Μάλιστα, έως το 2020, αναμένεται να είναι η τρίτη αιτία θανάτου, αφενός λόγω της εκτεταμένης διάδοσης του καπνίσματος -του σημαντικότερου παράγοντα κινδύνου- και αφετέρου, λόγω του συνεχώς αυξανόμενου προσδόκιμου ζωής [1]. Σήμερα, είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε μερικούς από τους μηχανισμούς παθογένεσης της νόσου, ωστόσο, πολλά ερωτήματα παραμένουν ακόμη αναπάντητα. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, παρά το γεγονός ότι ένα σημαντικό ποσοστό των καπνιστών θα νοσήσει κάποια στιγμή [2], φαίνεται πως υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που φαίνεται να συμμετέχουν στην εμφάνιση της νόσου, όπως η γενετική προδιάθεση, η περιβαλλοντική ρύπανση, η έκθεση σε βιοκαύσιμα, βακτηριακές ή ιογενείς λοιμώξεις, καθώς και η βρογχική υπεραντιδραστικότητα [3].

Σύμφωνα με τα κριτήρια της GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease), κύριο χαρακτηριστικό της ΧΑΠ είναι η ελάττωση της μέγιστης εκπνευστικής ροής αέρα, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη, συνήθως επιδεινώνεται προοδευτικά και σχετίζεται με εκσεσημασμένη φλεγμονώδη απάντηση στους μικρούς αεραγωγούς και τις κυψελίδες [4]. Η νόσος είναι δυνατό να προληφθεί και να αντιμετωπιστεί θεραπευτικά, αλλά πολύ συχνά έχει συστηματικές επιπτώσεις που μεταβάλλουν τη βαρύτητά της [5]. Οι κυρίαρχες ανωμαλίες που παρατηρούνται στους μικρούς αεραγωγούς είναι η παρουσία φλεγμονώδους κυτταρικού διηθήματος και η αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών [6] (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Δείγμα μικρών αεραγωγών υγιούς πνεύμονα μη καπνιστή (A) και καπνιστή με ΧΑΠ (B). Στην (A) διακρίνονται τα λεπτά τοιχώματα των αεραγωγών και οι ανέπαφες κυψελίδες, ενώ στην (B) η διάμετρος των αεραγωγών είναι περιορισμένη, το τοίχωμα τους διευρυμένο, πολλές από τις παρακείμενες κυψελίδες έχουν καταστραφεί, ενώ κύτταρα της ειδικής ανοσίας (κόκκινο) έχουν διηθήσει την πάσχουσα περιοχή (από Cosio MG και συν., [7]).

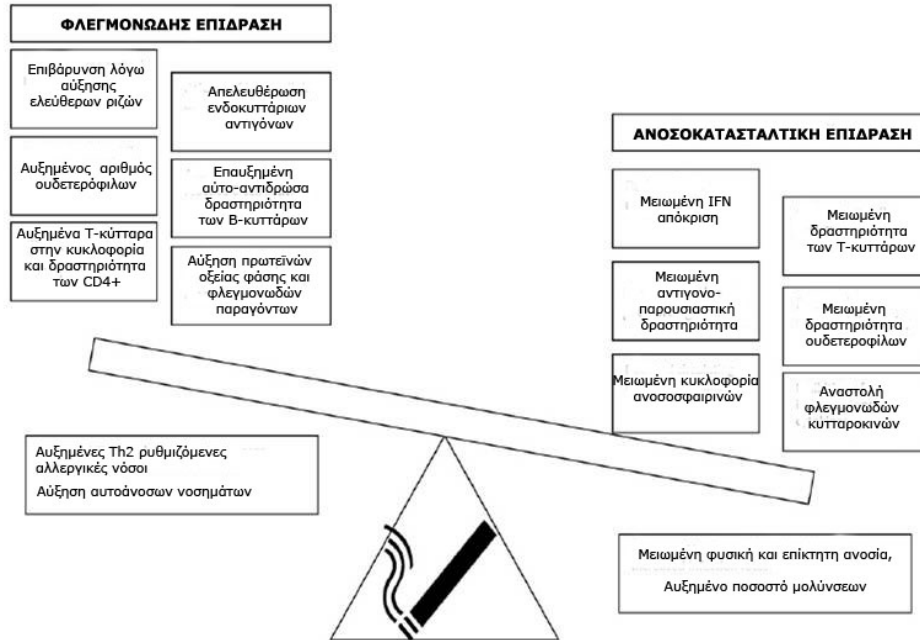
Να σημειωθεί ότι η κοινή δήλωση πως μόνο το 15-20% των καπνιστών θα αναπτύξει κλινικά σημαντική ΧΑΠ [8] είναι παραπλανητική, δεδομένου ότι ένα πολύ υψηλότερο ποσοστό καπνιστών μπορεί να αναπτύξει κάποια στιγμή ανώμαλη πνευμονική λειτουργία εάν συνεχίσει την καπνιστική του συνήθεια [9]. Για να είναι δυνατόν να γίνουν τα ερευνητικά μας ερωτήματα κατανοητά, θα γίνει αναφορά στην υπάρχουσα γνώση όσον αφορά τη συμμετοχή της μη ειδικής και της ειδικής ανοσίας στην έναρξη, την παθογένεση και την πρόοδο της νόσου.

1.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ - Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΣΤΟ ΑΝΟΣΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, το βρογχικό επιθήλιο διατρέχει όλη την αναπνευστική οδό, αποτελώντας ένα φυσικό εμπόδιο για εισπνεόμενες ερεθιστικές και τοξικές ουσίες και κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την ενίσχυση των μηχανισμών άμυνας του ξενιστή [10]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι επιφάνειες των βλεννογόνων στους πνεύμονες βρίσκονται σε άμεση και συνεχή επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον και κατά συνέπεια με μεγάλο αριθμό δυνητικών αντιγόνων (στους δε καπνιστές εκτίθεται συνεχώς στον καπνό), υπάρχει η ανάγκη ενός άρρηκτα συνδεδεμένου δικτύου συνεργασίας ανάμεσα σε πλήθος διαφορετικών κυττάρων, πρωτεϊνών και γενετικών σημάτων [10].

Οι μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού διακρίνονται σε αυτούς της μη ειδικής (φυσικής) και ειδικής (επίκτητης) ανοσίας. Η μη ειδική ανοσία βασίζεται σε υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων (PRRs), που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν αντίστοιχα μοριακά πρότυπα των παθογόνων (PAMPs) [11]. Οι πιο γνωστοί PRRs είναι οι TLRs, οι οποίοι προσδίδουν την δυνατότητα στη μη ειδική ανοσιακή απάντηση να δρα άμεσα, χωρίς ειδικότητα, με περιορισμένη ποικιλομορφία και χωρίς μνήμη. Αν και η απουσία μνήμης τελευταία αμφισβητείται [12], θα μπορούσε κανείς παρόλα αυτά να υποστηρίξει την ύπαρξη «εξελικτικής μνήμης», δεδομένης της παρουσίας τέτοιων διατηρημένων υποδοχέων από τα έντομα μέχρι τα θηλαστικά [13].

Παρά το γεγονός ότι, το κάπνισμα είναι ο κεντρικός παράγοντας της ΧΑΠ, δεν είναι ευρέως γνωστό πως επηρεάζει τις ποικίλες εκφάνσεις της ανοσιακής απάντησης στον οργανισμό (**Εικόνα 2**). Έχει ωστόσο προταθεί ότι το κάπνισμα οδηγεί σε αύξηση των φλεγμονωδών, αλλεργικών και αυτοάνοσων αντιδράσεων, καθώς και σε μείωση της συστηματικής απάντησης του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων [10].



Εικόνα 2: Το κάπνισμα επηρεάζει το ανοσιακό σύστημα με ποικίλους τρόπους, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση φλεγμονωδών, αλλεργικών, αυτοάνοσων αντιδράσεων και μείωση της συστηματικής απάντησης του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων (από Rao T & Richardson B, με τροποποιήσεις [14]).

Ωστόσο, από τα παραπάνω προκύπτει η εξής απορία: Πώς μπορεί ο καπνός του τσιγάρου να ενεργοποιεί την μη ειδική ανοσιακή απάντηση και κατ' επέκταση την ειδική απάντηση από την στιγμή που είναι ένας μη μολυσματικός παράγοντας και άρα οι υποδοχείς της μη ειδικής ανοσίας δεν μπορούν να τον αναγνωρίσουν; Μια εύλογη εξήγηση θα μπορούσε να αποτελέσει η «θεωρία κινδύνου» (danger hypothesis) της Polly Matzinger, σύμφωνα με την οποία το ανοσιακό σύστημα «ενδιαφέρεται» περισσότερο για την «βλάβη» παρά για την «προέλευσή» της, προτείνοντας ότι τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος ενεργοποιούνται από «σήματα κινδύνου» που εκλύονται από τα «τραυματισμένα» κύτταρα [15]. Ειδικότερα, κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε παθογόνα, τοξίνες ή που υπόκεινται σε κυτταρικό στρες ή ιστική βλάβη, μπορούν να απελευθερώσουν τέτοια σήματα [15].

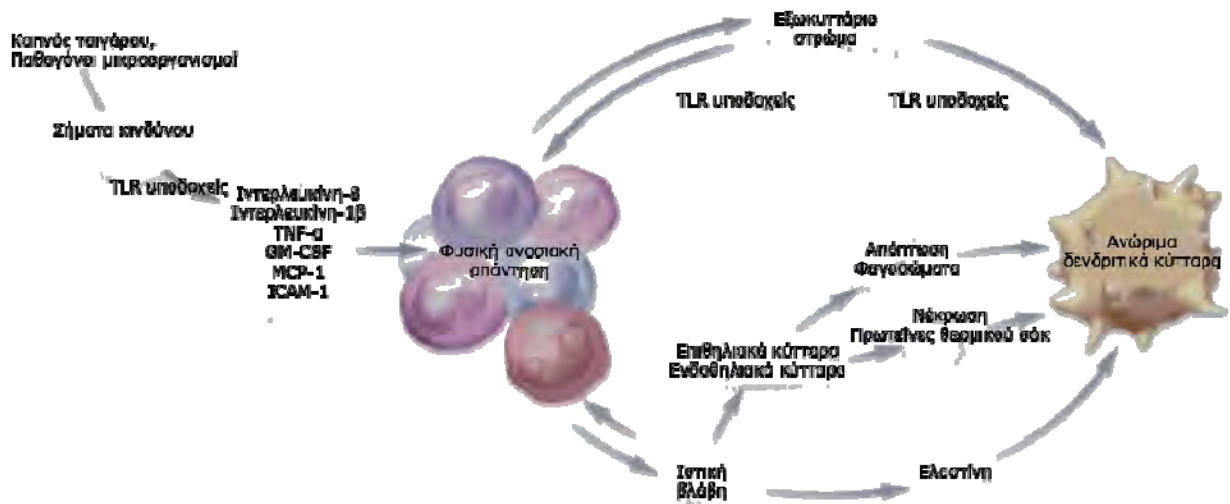
Είναι αξιοσημείωτο ότι στον καπνό περιέχονται περισσότερα από 2000 ξеноβιωτικά συστατικά και 10^{14} ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνοντας αρωματικούς υδρογονάνθρακες, γλυκοπρωτεΐνες και μέταλλα, που βλάπτουν τα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα σε βαθμό ανάλογο με την συγκέντρωσή τους [16,17,18,19]. Επομένως, προϊόντα που προκύπτουν κατά τον τραυματισμό των επιθηλιακών κυττάρων (π.χ. κατακερατωμένη υαλουρονάνη) μπορούν να δράσουν ως συνδέτες υποδοχέων της μη ειδικής ανοσίας, όπως οι TLR2, TLR4

και TLR9 [20,21]. Μέσω αυτών των υποδοχέων, ενεργοποιούνται καίριας σημασίας μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο NF-κΒ και εν τέλει μεσολαβητές της φλεγμονής [22]. Με την σειρά τους, οι μεσολαβητές αυτοί ενεργοποιούν μακροφάγα και ουδετερόφιλα, τα οποία στην συνέχεια εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, που σε συνεργασία με τις ελεύθερες ρίζες, επιδεινώνουν περαιτέρω την ιστική βλάβη στους πνεύμονες [19]. Επομένως, ο αμετάκλητος εκφυλισμός του πνευμονικού ιστού, που προκύπτει από την ιστική βλάβη η οποία παρατηρείται στη ΧΑΠ, μπορεί να είναι αποτέλεσμα ενός «καταρράκτη» κύκλων θετικής ανάδρασης (positive feedback loops). Δηλαδή, της φλεγμονής που προάγουν τα μακροφάγα, έπειτα από αναγνώριση των «σημάτων κινδύνου» μέσω των TLR υποδοχέων και της απόπτωσης των κυψελιδικών κυττάρων, ενώ η αδυναμία επιδιόρθωσης της επιθηλιακής βλάβης πιθανόν να ευθύνεται για τα κλινικά συμπτώματα της νόσου [23].

Από τα παραπάνω, προκύπτει πως η στρατολόγηση και η ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων, όπως μακροφάγων και ουδετερόφιλων είναι ιδιαίτερα σημαντική στη ΧΑΠ [24,25]. Μάλιστα, πρόσφατα διαπιστώθηκε πως τα κυψελιδικά μακροφάγα καπνιστών με ΧΑΠ παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του BAFF συνδέτη συγκριτικά με μη καπνιστές και πως τα BAFF⁺ μακροφάγα συσχετίστηκαν αντίστροφα με τον δείκτη FEV₁ [26]. Να σημειωθεί ότι ο BAFF θεωρείται σημαντικός για την ανοσιακή ενεργοποίηση, ενώ στην ΧΑΠ δεν έχει μέχρι σήμερα διευκρινιστεί ο ρόλος των BAFF υποδοχέων (TAC1, BAFFR, BCMA). Ωστόσο, η πιθανή έκφραση του BAFFR σε κυψελιδικά μακροφάγα. περιστασιακά [26]. προτείνει ένα νέο πεδίο μελέτης στη νόσο.

Πρόσφατα, οι Sarkota και συν., με αφορμή προηγούμενες μελέτες, που έδειχναν την συσχέτιση του καπνίσματος με την αποίκιση από παθογόνα βακτήρια και τον αυξημένο κίνδυνο πνευμονικών λοιμώξεων, μελέτησαν την παρουσία βακτηριακών μεταγονιδιωμάτων (metagenomes) σε εμπορικά διαθέσιμα τσιγάρα [27]. Συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν γενετικό υλικό το οποίο ανακτήθηκε απευθείας από αυτά και στην συνέχεια, εφήρμοσαν μικροσυστοιχίες για ειδικά βακτηριακά γονίδια (16srRNA), υπερκεράζοντας, έτσι, τα προβλήματα των παραδοσιακών καλλιέργειών και της ανίχνευσης περιορισμένου αριθμού μικροβίων. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν 15 διαφορετικές τάξεις βακτηρίων και ένα μεγάλο εύρος πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών, όπως τα *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, και *Serratia*, τα οποία ανευρίσκονταν σε ποσοστό άνω του 90% των δειγμάτων τσιγάρων [27]. Αν και τα γενικότερα συμπεράσματα αυτών των ευρημάτων είναι πρώιμα, εντούτοις μπορούν πολύ λογικά να εξηγήσουν την περαιτέρω ενεργοποίηση της μη ειδικής ανοσίας μέσω των TLR υποδοχέων και την προαγωγή της φλεγμονής στο περιβάλλον του πνεύμονα σε άτομα που καπνίζουν.

Επιπρόσθετα, η έκθεση στους προαναφερθέντες μολυσματικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, η ιστική βλάβη, το οξειδωτικό στρες ή ο κυτταρικός θάνατος μπορούν να προκαλέσουν την απελευθέρωση τροποποιημένων πρωτεϊνών, μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί βλάβη, αλλά και DNA από αποπτωτικά κύτταρα [28,29]. Η επαγόμενη ανοσιακή απάντηση πιθανώς αποτελεί το πρώτο βήμα στην πρόοδο της ΧΑΠ. Στους περισσότερους καπνιστές η διαδικασία αυτή δεν σταματά, αλλά αν η μη ειδική φλεγμονή περιοριστεί ή ελεγχθεί, τότε η νόσος δεν εξελίσσεται περαιτέρω (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3: Η αρχική απόκριση στον καπνό του τσιγάρου - το πρώτο βήμα για την εκδήλωση της ΧΑΠ. Ο καπνός του τσιγάρου και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί βλάπτουν τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία απελευθερώνουν «σήματα κινδύνου», που δρουν ως συνδέτες για τους TLR υποδοχείς της φυσικής ανοσίας. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή χημειοκινών και κυτταροκινών που συντελούν στην μη ειδική φλεγμονή (*innate inflammation*). Προϊόντα των κυττάρων της φλεγμονής μπορούν να βλάψουν το εξωκυττάριο στρώμα και να οδηγήσουν στην απελευθέρωση ενδογενών TLR συνδετών, όπου η ακόλουθη ενεργοποίηση των υποδοχέων τους θα προάγει περαιτέρω την φλεγμονή και την ιστική βλάβη. Αυτή η αλυσίδα γεγονότων μπορεί να «ωριμάσει» τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία θα μεταναστεύσουν σε τοπικά λεμφικά όργανα και να αρχίσει η ενεργοποίηση T-κυττάρων. Αν η μη ειδική φλεγμονή περιοριστεί ή ελεγχθεί, δεν θα υπάρξει πρόοδος σε ειδική ανοσιακή απάντηση και η νόσος μπορεί να μην εξελιχθεί. Η παραπάνω διαδικασία είναι τυπική για τους ασυμπτωματικούς καπνιστές χωρίς ΧΑΠ (από Cosio MG και συν., με τροποποιήσεις [7]).

1.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

Αν η μη ειδική ανοσία δεν κατορθώσει να εξουδετερώσει την έκθεση του οργανισμού στις ξένες ουσίες, στην προκειμένη περίπτωση παθογόνα και προϊόντα ιστικής βλάβης, κινητοποιούνται άλλοι μηχανισμοί εξαιρετικά ειδικοί. Οι μηχανισμοί αυτοί συνιστούν την ειδική ανοσία, η οποία εμπλέκεται καθυστερημένα, με μεγάλη ειδικότητα, ετερογένεια και μνήμη [11]. Στο πλαίσιο αυτό, τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, εξυπηρετούν την λειτουργία επιτήρησης (surveillance) των περιφερικών ιστών, συμπεριλαμβάνοντας τις επιφάνειες βλεννογόνων (mucosa) του πνεύμονα και των αεραγωγών [30]. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι η στρατολόγηση και η ενεργοποίηση T- και B- κυττάρων, αυξάνεται κατά την πρόοδο της νόσου [24,25]. Στη συνέχεια, θα γίνει αναφορά σε μελέτες που εμπλέκουν τους υποπληθυσμούς των T-κυττάρων και των B-κυττάρων στην ΧΑΠ.

1.2.1. ΧΑΠ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ T-ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στους καπνιστές με ΧΑΠ, υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση των ώριμων δενδριτικών κυττάρων στους περιφερικούς αεραγωγούς [31] και στους πνεύμονες [32], ενώ για να παρουσιάσουν επαρκώς το αντιγόνο στα T-κύτταρα είναι απαραίτητη η μετανάστευσή τους στους περιφερικούς λεμφαδένες [30]. Είναι συνεπώς πιθανό, προϊόντα νεκρωτικών και αποπτωτικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν από τα δενδριτικά κύτταρα και να παρουσιαστούν στην συνέχεια από ΜHC τάξης I ή II, να είναι άφθονα [33]. Έχει μάλιστα διαπιστωθεί ότι η αυξημένη απόπτωση και νέκρωση των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί σε μόνιμες και μη αναστρέψιμες βλάβες [34,35]. Ειδικότερα, ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων φαίνεται να αυξάνεται με την ένταση του καπνίσματος, ενώ σχετίζεται και με τον αριθμό των CD8⁺ T-κυττάρων στους πνεύμονες [36]. Συνεπώς, η αυξημένη απόπτωση επιθηλιακών ή ενδοθηλιακών κυττάρων στις κυψελίδες και τους αεραγωγούς των ασθενών με ΧΑΠ, μπορεί να αποτελεί σημαντικό μηχανισμό παθογένεσης της νόσου, ενώ η αδυναμία αναγέννησης του επιθηλίου, με ανάλογη αύξηση του πολλαπλασιασμού των παραπάνω κυττάρων, μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος και σε ανάπτυξη εμφυσήματος [37].

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα παρθένα (naïve), καθώς και τα μη ενεργοποιημένα (quiescent) T-κύτταρα δεν μπορούν να εισέλθουν στο πνευμονικό παρέγχυμα μέσω των αιμοφόρων αγγείων, ωστόσο, μετά την ενεργοποίησή τους μεταφέρονται μέσω των ειδικών υποδοχέων χημειοκινών που εκφράζουν [38]. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων CCR5, CXCR3 και CXCR6 στην επιφάνεια των CD8⁺ T-κυττάρων είναι υψηλότερα στους ασθενείς με ΧΑΠ ανάλογα με την σοβαρότητα της νόσου [39]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα CD8⁺ T-κύτταρα είναι τα κυρίαρχα κύτταρα στους

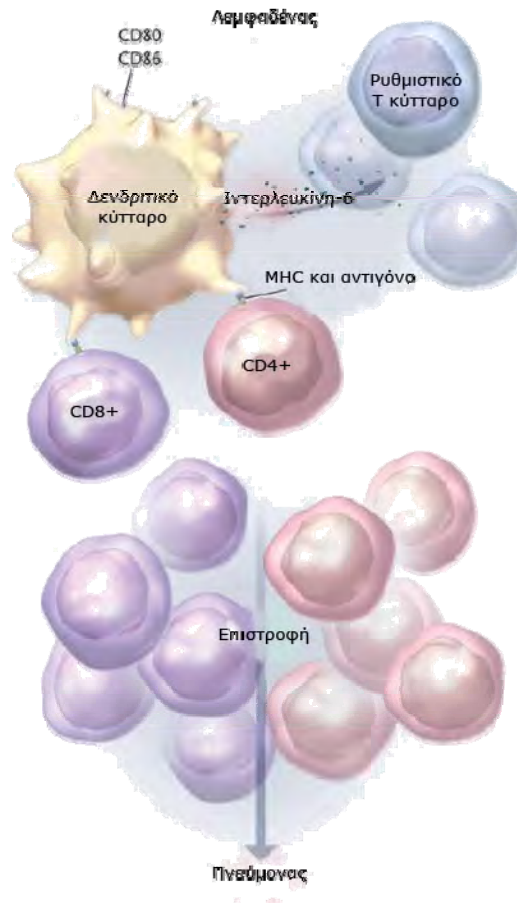
μεγάλους και μικρούς αεραγωγούς, καθώς και στο πνευμονικό παρέγχυμα, ασθενών με ΧΑΠ [40,41,42]. Ο αριθμός τους σχετίζεται με τον βαθμό απόφραξης και το βαθμό εμφυσήματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς τα κύτταρα αυτά μπορεί και να επιδεινώνουν την ιστική βλάβη [41]. Παράλληλα, όταν μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεολυτικών ενζύμων, κοκκιοενζύμων (Granzymes)-A και -B και περφορίνης, βρέθηκε ότι η έκφραση τους είναι υψηλότερη σε πνευμονοκύτταρα ασθενών με ΧΑΠ σε σύγκριση με αυτή υγιών, καπνιστών ή μη [43,44]. Ωστόσο, παρά την ισχυρή συσχέτιση της ΧΑΠ με τον αυξημένο αριθμό CD8⁺ T-κυττάρων, δεν είναι πλήρως ευδιάκριτη η λειτουργική σημασία τους.

Από την άλλη πλευρά, και τα CD4⁺ T-κύτταρα βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό στους αεραγωγούς και στο πνευμονικό παρέγχυμα καπνιστών με ΧΑΠ [24,45]. Ολιγοκλωνικοί πληθυσμοί CD4⁺ T-κυττάρων ανευρίσκονται στον πνεύμονα αλλά όχι στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΧΑΠ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκέντρωσή τους είναι αποτέλεσμα διέγερσης από αντιγόνα που υπάρχουν στον πνεύμονα [46]. Απόδειξη αυτής της αντιγονικής ενεργοποίησης είναι η έκφραση IFN- γ , καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα STAT4, από CD4⁺ T-κύτταρα στους πνεύμονες καπνιστών με ΧΑΠ [47]. Μάλιστα, ο αριθμός τους σχετίζεται με τον βαθμό της απόφραξης [47], γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά, μαζί με CD8⁺ T-κύτταρα, πιθανώς συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου [41,47].

Τέλος, μια άλλη ομάδα CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ κυττάρων, τα Tregs, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του ανοσιακού συστήματος και των φλεγμονωδών αποκρίσεων [48]. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι οι καπνιστές με φυσιολογική πνευμονική λειτουργία και οι ασθενείς με ΧΑΠ χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό Tregs στους κεντρικούς αεραγωγούς σε σύγκριση με τους μη καπνιστές [49]. Επίσης, στους ασθενείς με ΧΑΠ διαπιστώθηκε αυξημένος αριθμός Tregs στα λεμφοζήδια, αλλά όχι υποεπιθηλιακά [50]. Ωστόσο, στους μικρούς αεραγωγούς οι ασθενείς με ΧΑΠ έχουν μειωμένο αριθμό FOXP3⁺ κυττάρων σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς και τους μη καπνιστές [49], αν και παραδόξως παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση σε κύτταρα του BALf σε σχέση με τους μη καπνιστές [51].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τα μακροφάγα, παρόμοια τα δενδριτικά και τα T-κύτταρα εκφράζουν τον BAFF συνδέτη [52,53]. Ειδικότερα, η έκφραση του BAFF αυξάνεται σε CD4⁺ και CD8⁺ υποπληθυσμούς έπειτα από ενεργοποίησή τους. Επίσης, BAFF υποδοχείς (TAC1, BAFFR) πιθανόν να εκφράζονται στα T-κύτταρα έπειτα από ενεργοποίησή τους [54,55] χωρίς ωστόσο, να έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί ο ρόλος τους στη ΧΑΠ.

Με βάση τα παραπάνω είναι πιθανόν, η ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας (ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων να ενεργοποιούν T-κύτταρα) στη χρόνια αποφρακτική νόσο, να αποτελεί το δεύτερο βήμα για την εκδήλωση της. Οι ασθενείς με ΧΑΠ που χαρακτηρίζονται ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας, με αποτυχία να τη ρυθμίσουν ή να την περιορίσουν, ανήκουν στα στάδια 1 (ήπια) και 2 (μέτρια) κατά GOLD της νόσου (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4: Ενεργοποίηση των T-κυττάρων - το δεύτερο βήμα που οδηγεί στην ΧΑΠ (;) Ώριμα δενδριτικά κύτταρα μεταναστεύουν στα τοπικά λεμφικά όργανα όπου έπειτα από διέγερση των TLRs οδηγούνται σε αυξημένη έκφραση CD80/CD86 και κυτταροκινών, δημιουργώντας το ευνοϊκό περιβάλλον για αντιγονοπαρουσίαση και ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Η IL-6, που εκκρίνεται από τα δενδριτικά κύτταρα, ευνοεί την παραγωγή δραστικών T-κυττάρων, υπερκεράζοντας την κατασταλτική δράση των Tregs. Έπειτα από την ενεργοποίησή τους, τα T-κύτταρα εκφράζουν συγκεκριμένους υποδοχείς χημειοκινών και μεταναστεύουν στους πνεύμονες. Οι μηχανισμοί ανοσιακής ρύθμισης ή ανοχής θα καθορίσουν σε αυτό το στάδιο το βαθμό πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων, την επιστροφή τους στον πνεύμονα και τελικά, την σοβαρότητα της νόσου. Η απουσία ανοχής συνδέεται με τα στάδια 3 ή 4, μέτρια ανοχή με το στάδιο 2 και πλήρη ανοχή με το στάδιο 1. (από Cosío MG και συν, με τροποποιήσεις [7]).

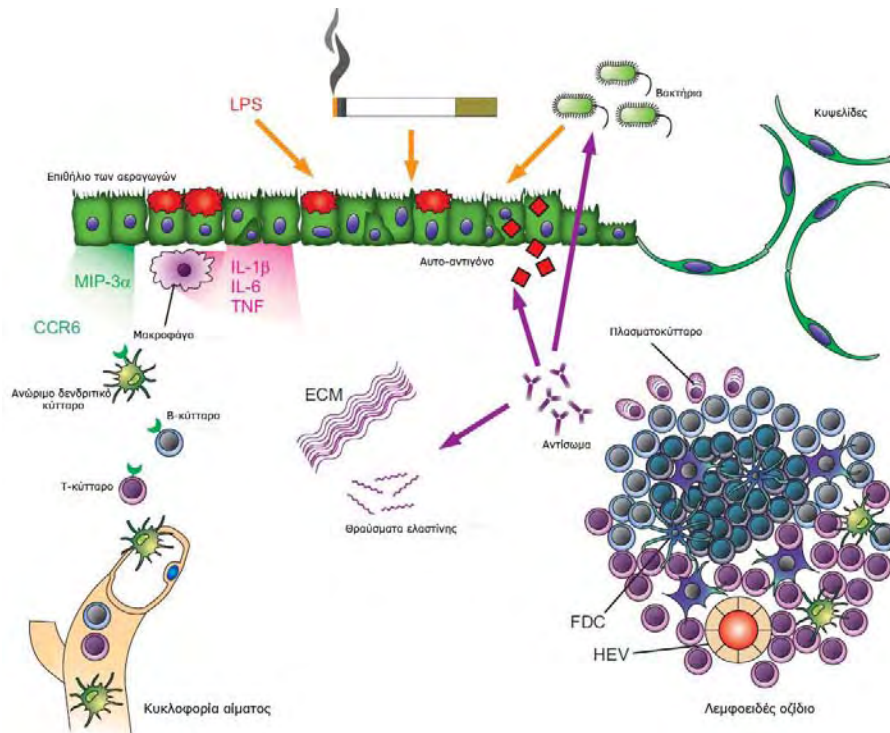
1.2.2. ΧΑΠ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα Β-κύτταρα έχουν ως τελικό στάδιο διαφοροποίησής τους, τα πλασματοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα) αποτελούν το σκέλος της ειδικής ανοσιακής απάντησης που χαρακτηρίζεται ως χυμική ανοσία [56]. Η χυμική ανοσία είναι «υπεύθυνη» για την εξουδετέρωση κυρίως εξωκυττάρων παθογόνων, όπως *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa*, τα οποία κατά κύριο λόγο ευθύνονται για τις υποτροπιάζουσες λοιμώξεις και τις παροξύνσεις των ασθενών με ΧΑΠ [57]. Οι πνεύμονες σε φυσιολογικές καταστάσεις φιλοξενούν σχετικά μικρό αριθμό Β-κυττάρων, που εντοπίζονται υποεπιθηλιακά στους βρόγχους, σε ειδικές θέσεις που ονομάζονται BALT [11].

Ο ρόλος των Β-κυττάρων στην παθογένεση, αλλά και την πρόγνωση της ΧΑΠ δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι πιθανώς ο ρόλος τους είναι σημαντικός. Συγκεκριμένα, οι Bosken και συν., στην προσπάθειά τους να αναγνωρίζουν φλεγμονώδη κύτταρα στους περιφερικούς αεραγωγούς ασθενών με ΧΑΠ, διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με ΧΑΠ είχαν περισσότερα Β-κύτταρα υποεπιθηλιακά στους μικρούς αεραγωγούς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [58]. Παρόμοια, άλλες ερευνητικές ομάδες παρατήρησαν αυξημένο αριθμό Β-κυττάρων στους μικρούς και κεντρικούς αεραγωγούς, σε βαθμό ανάλογο με την πρόοδο και το στάδιο της νόσου [45,58]. Εξαιρετικά ενδιαφέρον είναι επίσης το εύρημα της ανάπτυξης λεμφοζιδίων και της παρουσίας βλαστικών κέντρων στο πνευμονικό παρέγχυμα (κύρια) και στους αεραγωγούς των ασθενών με ΧΑΠ [45,59], γεγονός που υποδηλώνει εντονότερη ανοσοεπιτήρηση των βλεννογόνων τους.

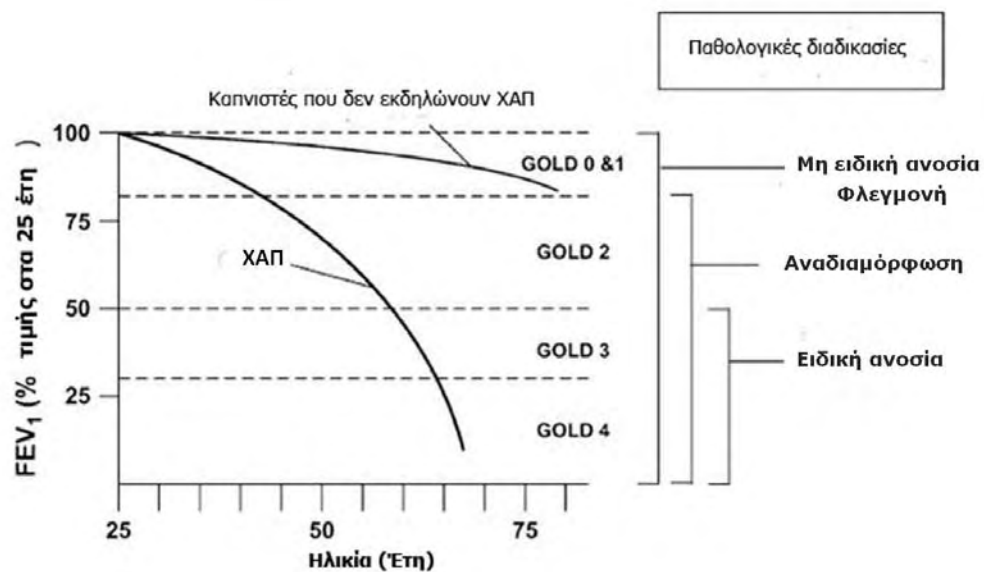
Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και σε μελέτες σε πειραματόζωα (επίμυες), όταν εκτέθηκαν σε καπνό, όπου επίσης ο αριθμός διήθησης των πνευμόνων τόσο με Β-κύτταρα όσο και με άλλα κύτταρα φλεγμονής (κύρια ουδετόφιλα και μακροφάγα), ήταν ανάλογος με τον χρόνο έκθεσης [60]. Επιπρόσθετα, η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών σε κλώνους Β-κυττάρων των παραπάνω λεμφοζιδίων, έδειξε την παρουσία μεταλλάξεων στην μεταβλητή περιοχή τους, υποδεικνύοντας μια αντιγόνο-εξαρτώμενη διαδικασία επιλογής τους [60]. Ωστόσο, η ανάπτυξη λεμφοζιδίων στους πνεύμονες δεν παρατηρείται μόνο σε ασθενείς με ΧΑΠ, αλλά και σε άλλες χρόνιες παθήσεις των αεραγωγών και των πνευμόνων, όπως πολλών λοιμωδών νοσημάτων, βρογχεκτασιών, θυλακιώδους βρογχιολίτιδας, λεμφοκυτταρικής διάμεσης πνευμονίτιδας, πνευμονικής ίνωσης, αλλά και αυτοάνοσων νοσημάτων [60].

Εντούτοις, δεν είναι ξεκάθαρο ποια είναι τα αντιγόνα έναντι των οποίων κατευθύνεται ο πολλαπλασιασμός των Β-κυττάρων σε ασθενείς με ΧΑΠ. Έχουν προταθεί τριών ειδών πηγές: συστατικά μικροβίων ή ιών [60], συστατικά του καπνού ή παράγωγά του [17], καθώς και προϊόντα αποδόμησης του εξωκυττάριου στρώματος [61]. Είναι γνωστό ότι προϊόντα αποδόμησης του εξωκυττάριου στρώματος (π.χ. υαλουρονικό οξύ, ελαστίνη, κολλαγόνο) μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Β-κυττάρων [61]. Ως αποτέλεσμα, είναι πιθανό να παράγονται αντι-ECM αντισώματα, τα οποία ακολούθως προσδένονται σε ανέπαφες πρωτεΐνες ή τμήματα του ECM, προκαλώντας περαιτέρω αποδόμησή του από τα φαγοκύτταρα [61] (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5: Ανάπτυξη λεμφοζιδίων στην χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Σε απάντηση στις περιβαλλοντικές προσβολές (π.χ. καπνό τσιγάρου ή βακτήρια), το επιθήλιο των αεραγωγών και τα μακροφάγα εκφράζουν κυτταροκίνες, όπως *IL-1β*, *IL-6* και *TNF-α*, και χημειοκίνες όπως *CCL20* και *MIP-3α*. Αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση ανώριμων δενδριτικών κυττάρων, Τ-κυττάρων και Β-κυττάρων στον πνεύμονα. Όταν η φλεγμονή γίνεται χρόνια, λόγω των επίμονης έκθεσης στο αντιγόνο ή της καταστροφής των ιστών, τα λεμφοκύτταρα οργανώνονται σε λεμφοζίδια με ξεχωριστές Β- και Τ-κυτταρικές περιοχές. Τα ώριμα λεμφοζίδια ενδέχεται να περιέχουν HEV, FDC και βλαστικά κέντρα με πλασματοκύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αντισώματα έναντι των βακτηρίων και/ή αυτοαντιγόνων, όπως θραύσματα του ECM. Εισπνεόμενα και συστηματικώς χορηγούμενα κορτικοστεροειδή μπορεί να παρεμβαίνουν στους διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και λειτουργία των λεμφοζιδίων (από Brusselle GG και συν., με τροποποιήσεις [60]).

Πρόσφατα διαπιστώθηκε πως σε λεμφοζίδια στον πνεύμονα ασθενών με ΧΑΠ αυξάνεται η έκφραση του BAFF συνδέτη [26]. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε η έκφραση του BAFFR υποδοχέα ανοσοϊστοχημικά στους πνεύμονες ασθενών με ΧΑΠ και υγιών (καπνιστών ή μη). Διαπιστώθηκε πως ο BAFFR υποδοχέας στον ιστό των πνευμόνων μη καπνιστών και καπνιστών ήταν ελάχιστα ανιχνεύσιμος. Αντίστροφα, παρατηρήθηκε έκφραση του BAFFR στον ιστό πνευμόνων καπνιστών με ΧΑΠ, κυρίως σε λεμφοζίδια τόσο στο πνευμονικό παρέγχυμα όσο και τους σχετιζόμενους περιφερικούς αεραγωγούς. Ποσοτική ανάλυση του BAFFR έγινε σε παρεγχυματικά λεμφοζίδια, όπου η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα ήταν στατιστικά σημαντική στους ασθενείς με ΧΑΠ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [26].



Εικόνα 6: Συσχέτιση της έναρξης των παθολογικών διαδικασιών στην ΧΑΠ και των σταδίων της νόσου. Μακροφάγα, ουδετερόφιλα και λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί διηθούν τον περιφερικό πνευμονικό ιστό καπνιστών με φυσιολογική λειτουργία. Η διήθηση αυτή αυξάνεται σε έκταση (αριθμός αεραγωγών που εμπλέκονται) και σοβαρότητα (βαθμός συγκέντρωσης κυττάρων) κατά την πρόοδο της νόσου από ήπια σε πολύ σοβαρή (GOLD 1 → GOLD 4). Επίσης, η διαδικασία αναδιαμόρφωσης (πάχυνση του τοιχώματος των αεραγωγών και απόφραξη του αυλού με φλεγμονώδη εξιδρώματα που περιέχουν βλέννα) αυξάνεται από την μέτρια (GOLD 2) στην πολύ σοβαρή ΧΑΠ (GOLD 4) ενώ η δημιουργία λεμφοζιδίων, ένδειξη συμμετοχής της ειδικής ανοσίας αυξάνεται στα τελευταία στάδια της νόσου (GOLD 3 και 4) (από Curtis και συν., με τροποποιήσεις [64]).

Τέλος, οι D'hulst και συν., θέλοντας να μελετήσουν περαιτέρω την συμμετοχή της ειδικής ανοσίας στην παθογένεση της νόσου, εξέθεσαν στον καπνό ανοσοανεπαρκείς *scid* επίμυες, δηλαδή επίμυες που δεν είχαν λειτουργικά Β- και Τ-κύτταρα αλλά είχαν

φυσιολογική διαφοροποίηση και λειτουργία μυελικών, αντιγονοπαρουσιαστικών και NK-κυττάρων [62]. Διαπίστωσαν ότι σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς, στους *scid* επίμυες δεν ανιχνεύθηκαν Β- ή Τ-κύτταρα στους πνεύμονες, ούτε αναπτύχθηκαν λεμφοζίδια, ωστόσο μπορούσε να εκδηλώθει πνευμονικό εμφύσημα [62]. Άρα, η ειδική ανοσιακή απάντηση φαίνεται ότι απαιτείται *per se* για την εκδήλωση του πνευμονικού εμφυσηματος, μετά από χρόνια έκθεση στον καπνό, και η συμμετοχή της είναι περισσότερο σύνθετη απ' ότι κανείς θα περίμενε. Με βάση όσα αναλυτικά εκτέθησαν παραπάνω για τη συμμετοχή του ανοσιακού συστήματος στην παθογένεση και την πρόοδο της ΧΑΠ, οι Curtis και συν., τροποποίησαν το κλασικό διάγραμμα πτώσης του FEV₁ των Fletcher και συν., [63] ώστε να απεικονίζεται η συμμετοχή της μη ειδικής και ειδικής ανοσιακής απάντησης στα διάφορα στάδια της νόσου [64] (**Εικόνα 6**).

1.3. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΚΔΟΧΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αν και σήμερα είναι γνωστοί κάποιοι από τους μηχανισμούς παθογένεσης της ΧΑΠ, δεν έχει μέχρι σήμερα διευκρινιστεί γιατί η βλάβη στον πνεύμονα συνεχίζει ακόμα και μετά την απομάκρυνση του προκλητικού παράγοντα (κάπνισμα). Μια σύνοψη της βιβλιογραφίας ωστόσο, υποδεικνύει κύρια χαρακτηριστικά της νόσου τα οποία είναι: α) όλοι οι καπνιστές εκδηλώνουν φλεγμονή στους αεραγωγούς, β) το φαινόμενο αυτό (της φλεγμονής) εντείνεται στους ασθενείς με ΧΑΠ, ιδίως κατά την διάρκεια παροξύνσεων, γ) υπάρχει άμεση σχέση της σοβαρότητας της νόσου και της έντασης της φλεγμονής, δ) το οξειδωτικό στρες λόγω καπνίσματος είναι πολύ σημαντικό στην παθογένεση της νόσου, ε) η φλεγμονή των αεραγωγών εμμένει παρά την διακοπή του καπνίσματος, στ) τόσο στους αεραγωγούς όσο και στο πνευμονικό παρέγχυμα των ασθενών με ΧΑΠ ανευρίσκονται όλοι οι τύποι των φλεγμονωδών κυττάρων (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, NK-κύτταρα), και ζ) πολλοί μεσολαβητές, που απελευθερώνονται από τα κύτταρα αυτά, μπορούν να βλάψουν την δομή του πνεύμονα. Στο πλαίσιο αυτό λοιπόν, τα ερωτήματα που προκύπτουν είναι τα εξής: Γιατί ορισμένοι μόνο καπνιστές εκδηλώνουν ΧΑΠ γνωρίζοντας ότι οι περισσότεροι καπνιστές δεν εκδηλώνουν κλινικά σημαντική απόφραξη των αεραγωγών [65]; Γιατί τα συμπτώματα της νόσου επιμένουν ακόμα και μετά την διακοπή καπνίσματος; Ποιός είναι ο μηχανισμός των παροξύνσεων της ΧΑΠ δεδομένου ότι μόνο το 50-60% των περιπτώσεων αποδίδονται σε παθογόνα [66];

Ωστόσο, αν και υπάρχει εμφανής πρόκληση αναπνευστικών νόσων μέσω του καπνού, ολόένα και περισσότεροι μηχανισμοί αποκαλύπτονται που συνδέουν την ΧΑΠ με αυτοάνοσες διαταραχές, όπως η ΡΑ και ο ΣΕΛ [28]. Για παράδειγμα, το κάπνισμα είναι

προδιαθεσικός παράγοντας τόσο για την ΧΑΠ όσο για την ΡΑ [67]. Επίσης, από την στιγμή έναρξης της τελευταίας, η φλεγμονή «χρονίζει» [68], όπως αντίστοιχα συμβαίνει σε ορισμένο βαθμό με την φλεγμονή στους αεραγωγούς και μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Επιπρόσθετα, παροξύνσεις συμβαίνουν και στις δύο νόσους με την διαφορά ότι στην ΧΑΠ «εξηγούνται» από εξωτερικούς παράγοντες όπως οι λοιμώξεις και η ρύπανση, ενώ στη ΡΑ θεωρούνται αναπόσπαστο κομμάτι της νόσου όπου υπάρχει παρουσία Τ-κυττάρων έναντι ειδικών επιτόπων των χόνδρων [68] ή και έναντι βακτηρίων που τους μιμούνται [69]. Τέλος, η ομοιότητα όσον αφορά τα κύτταρα και τις κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΧΑΠ [70,71] και της ΡΑ [72,73] είναι αξιοσημείωτη.

Είναι πιθανό ότι η αυξημένη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων στους ασθενείς με ΧΑΠ δεν μπορεί να γίνει αποτελεσματικά από τα κυψελιδικά μακροφάγα, με αποτέλεσμα την αύξηση του «αντιγονικού» υλικού που δεν απομακρύνεται, φαινόμενο παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται σε πολλά αυτοάνοσα νοσήματα [74]. Το γεγονός αυτό ενισχύεται ακόμη περισσότερο με την ανακάλυψη IgG αυτοαντισωμάτων, με μεγάλη συγγένεια έναντι του πνευμονικού επιθηλίου, σε ασθενείς με ΧΑΠ. Συγκεκριμένα, οι Feghali-Bostwick και συν., διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση αντι-Her-2 επιθηλιακών αυτοαντισωμάτων είναι μεγαλύτερη σε καπνιστές και πρώην καπνιστές ασθενείς με ΧΑΠ συγκριτικά με φυσιολογικούς μάρτυρες (καπνιστές ή μη) [75]. Παρόμοια αποτελέσματα αφορούν τόσο αντι-ενδοθηλιακά αντισώματα [76], όσο και αντισώματα έναντι της ελαστίνης [77], ενώ με την χρήση συστοιχιών (arrays) ανιχνεύθηκε μια πλειάδα πεπτιδίων που μπορούν να αναγνωριστούν από αυτοαντισώματα στον ορό ασθενών με ΧΑΠ [78].

Πρόσφατα, οι Polverino και συν., λαμβάνοντας υπόψη ότι η ΧΑΠ είναι μια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική φλεγμονώδη απόκριση αλλά και αρκετές αυτοάνοσες εκδηλώσεις μελέτησαν την έκφραση του BAFF συνδέτη [26]. Ο BAFF έχει μελετηθεί κυρίως σε αυτοάνοσες νόσους όπως το σύνδρομο Sjogren [79], ο ΣΕΛ [80] και η ΡΑ [81]. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ότι αυξημένη έκφραση του BAFF σχετίζεται με την σοβαρότητα της νόσου [26].

Εντούτοις, οι Lamela & Vega, θεωρούν ότι οι ερευνητικές προσπάθειες που επικεντρώνονται στη μελέτη των μηχανισμών αυτοανοσίας δεν είναι ύψιστης σημασίας σε καπνιστές και σε ασθενείς με ΧΑΠ, τουλάχιστον από πρακτική άποψη. Κι αυτό γιατί ο καπνός μπορεί να επηρεάζει μεμονωμένα άτομα με διαφορετικό τρόπο, ακριβώς όπως το αλκοόλ επηρεάζει διαφορετικά τα άτομα που κάνουν κατάχρηση αλκοόλ και η σκόνη διοξειδίου του πυριτίου επηρεάζει διαφορετικά τους εργαζόμενους των λατομείων. Επίσης, είναι σαφές ότι οι γενετικοί παράγοντες καθώς και η ποσότητα του εισπνεόμενου καπνού μπορεί να έχει θεμελιώδη επίδραση τόσο στην παθογένεση της ΧΑΠ, όσο και στην εξέλιξη

της. Τέλος, πιστεύουν ότι ακόμη και αν ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν οι καπνιστές με τον υψηλότερο κίνδυνο της ΧΑΠ, άλλες σοβαρές συνέπειες του καπνίσματος, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα ή οι νεοπλασματικές παθήσεις, πρέπει να ληφθούν υπόψη. Οι τελευταίες παθήσεις, που επηρεάζουν την σοβαρότητα του κλινικού φαινοτύπου της ΧΑΠ, φαίνεται να εμπλέκονται σε ένα φαύλο κύκλο γενετικής προδιάθεσης και διαφορετικότητας του κάθε ασθενούς [82].

1.4. ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΑ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΧΑΠ

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα για την αντιμετώπιση της ΧΑΠ, είναι από του στόματος ή εισπνεόμενα βρογχοδιασταλτικά και κορτικοστεροειδή [83]. Ειδικότερα, η χρήση εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών ενδείκνυται σε συμπτωματικούς ασθενείς με ΧΑΠ, με FEV₁ <50% (στάδια 3 και 4) και επαναλαμβανόμενες παροξύνσεις [83]. Ωστόσο, πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με ΧΑΠ που λαμβάνουν από στόματος ή εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή παρουσιάζουν μείωση των λεμφοζιδίων στους αεραγωγούς [84,85]. Επιπρόσθετα, το εύρημα αυτό μπορεί να συνδυάζεται με αύξηση της πιθανότητας αναπνευστικής λοίμωξης και μπορεί να ευθύνεται για την αύξηση των πνευμονιών όπως παρατηρήθηκε σε πρόσφατες κλινικές δοκιμές, καθώς και σε μελέτες παρατήρησης [86,87,88]. Βέβαια, είναι ασαφές μέχρι σήμερα πώς είναι δυνατόν τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή να μειώνουν τις παροξύνσεις, 80% των οποίων είναι βακτηριακές, ενώ αντίστροφα προωθούν την ανάπτυξη πνευμονίας [89]. Στο πλαίσιο αυτό, οι Brusselle και συν., υπέθεσαν ότι ο αυξημένος κίνδυνος πνευμονίας σε ασθενείς που ελάμβαναν κορτικοστεροειδή προκαλείται εν μέρει λόγω καταστολής της ειδικής ανοσιακής απάντησης [60].

Ο ακριβής μηχανισμός και το αποτέλεσμα της δράσης των κορτικοστεροειδών (και δη των εισπνεόμενων) σε ασθενείς με ΧΑΠ, δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές για την επίδραση των κορτικοστεροειδών στην διαδικασία της ισοτυπικής μεταστροφής μέσω του CD40L συνδέτη [90,91].

2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ - TACI , BAFFR ΚΑΙ ICOS

Οι υποδοχείς TACI (Transmembrane Activator και CAML Interactor, TNFRSF13B, CD267) και BAFFR (BAFF receptor, TNFRSF13C, CD268) ανήκουν στην υπεροικογένεια των TNF. Οι τελευταίοι, είναι ένα σύνολο πρωτεϊνών που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην οργανογένεση των λεμφικών οργάνων και στην ομοιόσταση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος [92]. Τα μέλη της μπορεί να είναι είτε μόρια-συνδέτες (ligands) που συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη (membrane-bound) ή μόρια-συνδέτες που

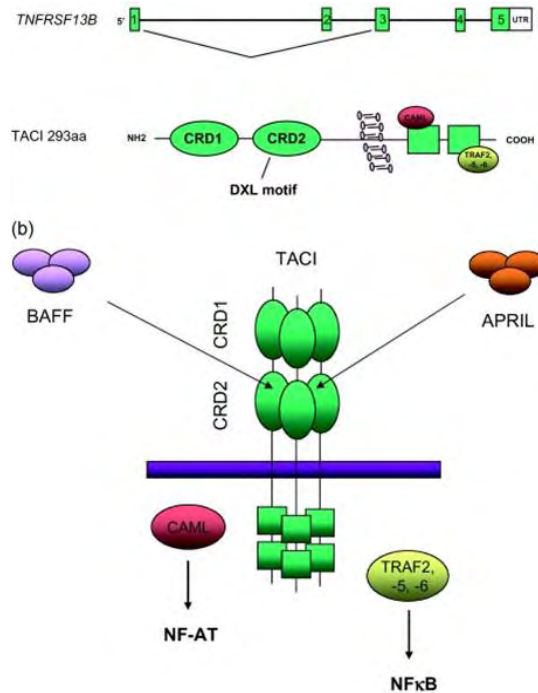
εκκρίνονται (secreted) από τα κύτταρα και συνδέονται με ένα ή περισσότερα μέλη της αντίστοιχης οικογένειας TNFR στην επιφάνεια των κυττάρων [92].

2.1. TACI ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

2.1.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ

Ο υποδοχέας TACI προστέθηκε στην υπεροικογένεια-TNF όταν διαπιστώθηκε ότι συνδέεται με την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη CAML [93]. Το γονίδιο *TNFRSF13B*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TACI (293 αμινοξέων), βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17p11.2), περιοχή που αποτελεί συχνό στόχο για μεταλλάξεις και ανασυνδυασμούς [94].

Ο υποδοχέας TACI είναι μια τύπου III διαμεμβρανική πρωτεΐνη, στην οποία το αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα είναι εξωκυττάριο και δεν υπάρχει αμινοτελική αλληλουχία σηματοδότησης. Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δύο τμημάτων πλούσιων σε κυστεΐνες (CRDs), χαρακτηριστικές της TNF-υπεροικογένειας υποδοχέων, οι οποίες είναι μεταξύ τους κατά 50% όμοιες [95]. Ειδικότερα, ο υποδοχέας αποτελείται από εξωκυττάριο τμήμα συνολικού μεγέθους 166 αμινοξέων (aa), διαμεμβρανικό μεγέθους 20 aa (166-186 aa) και ενδοκυττάριο τμήμα μεγέθους 107 aa (187-293 aa). Το πρώτο τμήμα επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD-1) εκτείνεται από το 32 aa έως το 67 aa, που λείπει από μια ισομορφή του TACI και είναι αυτό το οποίο συμμετέχει στον πολυμερισμό (τριμερισμό για την ακρίβεια) του υποδοχέα [95]. Το δεύτερο τμήμα επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD-2), εκτείνεται από το 68 aa έως το 106 aa και είναι αυτό στο οποίο προσδένονται οι συνδέτες του υποδοχέα με υψηλή συγγένεια [95]. Όλες οι επαναλήψεις κυστεΐνης του TACI υποδοχέα και των συνδετών του, περιέχουν το λεγόμενο DxL μοτίβο: (F/Y/W)-D-x-L-(V/T)-(R/G), μια διατηρημένη αλληλουχία που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των συνδετών στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, όπως έχουν δείξει μελέτες κρυσταλλογραφίας του τμήματος αυτού [96,97] (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Η γονιδιακή οργάνωση και η δομή της πρωτεΐνης TACI. Το γονίδιο *TNFRSF13B* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, αποτελείται από πέντε εξώνια (η απεικόνιση τους δεν είναι σε κλίμακα) και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 293 αμινοξέων. Ο υποδοχέας TACI περιέχει τις πλούσιες σε κυστεΐνη περιοχές 1 και 2 (CRD-1 και CRD-2) στο εξωκυττάριο τμήμα του. Στο ενδοκυττάριο τμήμα του περιέχει θέσεις δέσμευσης για τις πρωτεΐνες TRAF (TRAF -2, -5 και -6) και την πρωτεΐνη CAML. Ένα εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να συμβεί, δίνοντας αφορμή για μια σύντομη πρωτεΐνη TACI από την οποία λείπει το CRD1. (B) ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί την δημιουργία τριμερών. Τα BAFF και APRIL, είναι οι συνδέτες του TACI (από Bacchelli και συν. [98]).

Με εναλλακτικό μάτισμα προκύπτει μια μικρότερου μεγέθους TACI πρωτεΐνη (short TACI), η οποία περιέχει μόνο μια επανάληψη κυστεΐνης (CRD-2), αλλά οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κΒ. Το χαρακτηριστικό αυτό, κάνει τον TACI υποδοχέα να διαφέρει από τα άλλα μέλη των TNFR, στην περίπτωση των οποίων απαιτούνται αρκετές επαναλήψεις κυστεΐνης για την πρόσδεση με τους συνδέτες τους [99]. Εντούτοις, μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο η δεύτερη επανάληψη CRD-2 του υποδοχέα TACI απαιτείται για την υψηλής συγγένειας σύνδεση με τους συνδέτες του [99].

Τα μόρια BAFF και APRIL είναι οι κύριοι συνδέτες του υποδοχέα TACI, όπου μάλιστα προσδένονται σε αυτόν με μεγάλη συγγένεια και ειδικότητα [100]. Ο BAFF (γνωστός και ως BLyS, THANK, TALL-1 και zTNF4) ενισχύει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των Β-κυττάρων, ενώ αυξημένες συγκεντρώσεις του έχουν βρεθεί σε διάφορα νοσήματα, τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα [101,102]. Ο APRIL (γνωστός ως TNSF13A, Tall-2, και TRDL-1), επάγει την ισotuπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών [103]. Είναι

αξιοσημείωτο ότι η συγγένεια σύνδεσης των BAFF και APRIL στον υποδοχέα TAC1 είναι παρόμοιες [104], ενώ επιπρόσθετα, ετεροτριμερή των BAFF και APRIL μπορούν να ενεργοποιήσουν τον σηματοδοτικό καταρράκτη του υποδοχέα [105]. Τα BAFF/APRIL ετεροτριμερή μπορούν να προσδένονται στον TAC1, αλλά όχι στους άλλους δύο TNFR υποδοχείς BCMA (B Cell Maturation Antigen) ή BAFFR [105], στους οποίους οι συνδέτες APRIL και BAFF μπορούν να συνδεθούν αντίστοιχα [106].

Τέλος, η πρωτεογλυκάνη (heparan sulphate proteoglycans, HSPGs) syndecan-2 μπορεί, επίσης, να δρα ως συνδέτης του TAC1, βασιζόμενη αποκλειστικά στις πλευρικές αλυσίδες της. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι ο TAC1 υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιείται και από άλλες HSPG *in vivo* (π.χ. syndecan-4) [107]. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι ο συνδέτης APRIL μπορεί να συνδέεται ανεξάρτητα σε πρωτεογλυκάνες όπως η syndecan-1 (CD138), δημιουργώντας ένα βιολογικά ενεργό σύμπλοκο, στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων [108,109]. Αν και δεν είναι πλήρως γνωστή η χρησιμότητα της σύνδεσης αυτής, πιστεύεται όμως ότι είναι πολύ σημαντική για τον πολυμερισμό του APRIL κατά την σύνδεσή του στον TAC1 υποδοχέα και ίσως εξηγεί τα εναλλακτικά αποτελέσματα κατά την σηματοδότηση του στα B-κύτταρα.

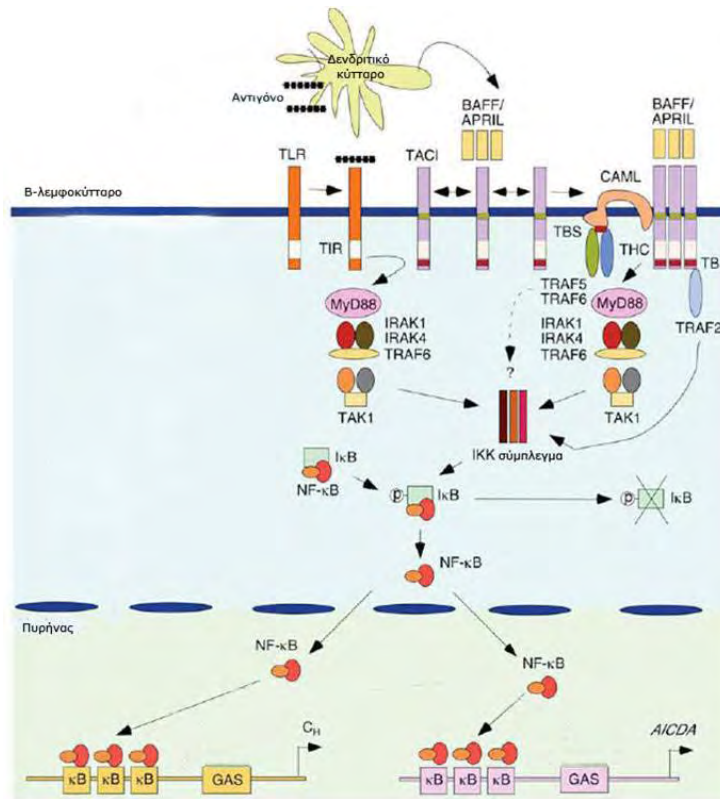
2.1.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Ο TAC1 υποδοχέας εκφράζεται κυρίως στα ώριμα B-κύτταρα. Αρχικά είναι ανιχνεύσιμος στα μεταβατικά T1 σταδίου (transitional) B-κύτταρα, αυξάνεται δεκαπλάσια στα B-κύτταρα στη ζώνη του μανδύα (marginal zone) [110], ενώ καταστέλλεται στο στάδιο των πλασματοκυττάρων [111]. Φαίνεται ότι η επαγωγή του TAC1 σε σπληνικά B-κύτταρα επιμύων, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο mRNA, είναι άμεση έπειτα από διέγερση με LPS μέσω του υποδοχέα TLR4 [112], αλλά και μετά από διέγερση με CpG ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια μέσω του υποδοχέα TLR9 [113]. Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του BcR υποδοχέα παρουσία των κυτταροκινών IL-2 και IL-10 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα TAC1 στην επιφάνεια των κυττάρων [103]. Εντούτοις, υπάρχουν αναφορές για χαμηλή έκφραση του υποδοχέα και σε άλλα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Συγκεκριμένα, έχει ανιχνευθεί χαμηλής έκφρασης TAC1 σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα επιμύων [54] ή σε κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί με τον συνδέτη BAFF [114]. Πρόσφατα παρατηρήθηκε, ότι ο TAC1 υποδοχέας μπορεί να ανιχνευθεί και σε μονοκύτταρα, στα οποία ο BAFF προάγει σήματα επιβίωσης και ενεργοποίησης, προκαλώντας τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα [115].

Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι ο TAC1 υποδοχέας προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση του NF-κB, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα άλλα μέλη της TNFR-

υπεροικογένειας [54]. Μάλιστα, διαμόλυνση με το *TNFRSF13B* γονίδιο σε κύτταρα Jurkat (T- οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας), τα οποία φυσιολογικά δεν εκφράζουν τον υποδοχέα, αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας TACI μπορεί να ενεργοποιήσει επίσης τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και NF-AT, καθώς και να επάγει σηματοδότηση μέσω της κινάσης JNK. Τα ευρήματα αυτά, προσδίδουν έναν κομβικό ρόλο στον TACI υποδοχέα, για ποικίλες ανοσιακές απαντήσεις [54]. Συγκεκριμένα, μετά την πρόσδεση του συνδέτη (BAFF ή APRIL), επάγεται τριμερισμός του TACI υποδοχέα, με τον οποίο ακολούθως προσδένονται TRAF μόρια στο ενδοκυττάριο τμήμα του. Ειδικότερα, προσδένονται τα TRAF-2, -5 και -6 σε ένα διαφορετικό σημείο πρόσδεσης από αυτό της CAML πρωτεΐνης [54,116]. Η τελευταία, εμπλέκεται τόσο στην εισροή ιόντων Ca^{2+} [93], όσο και στην διαδικασία διακίνησης υποδοχέων (receptor trafficking) [117], δηλαδή την μετακίνηση του υποδοχέα στο κύτταρο, με στόχο την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίησή του, ή ακόμα και την αποικοδόμηση του. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της CAML πρωτεΐνης στη TACI σηματοδότηση δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος.

Σε μια πρόσφατη μελέτη από τους Bossen και συν., διαπιστώθηκε ότι ο BAFF μπορεί να υιοθετήσει δύο σταθερές και υψηλής οργάνωσης δομές, με τις οποίες προσδένεται στον υποδοχέα TACI, μια τριμερή και μία πολυμερή (60-μερή), οργανωμένη σε ένα σύμπλεγμα τύπου ιού [118]. Αν και οι δύο δομές μπορούν να συνδεθούν στον TACI υποδοχέα, ωστόσο μόνο η 60-μερής ενεργοποιεί το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι του, χωρίς να μπορεί να εξηγηθεί ταυτόχρονα ποια γεγονότα καθορίζουν την σχετική αναλογία 3-μερούς/60-μερούς. Ωστόσο, το γεγονός ότι και οι δύο μορφές του BAFF έχουν βρεθεί στον ορό επίμυων και ανθρώπων, καταδεικνύει ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης στην σηματοδότηση του TACI υποδοχέα, εκείνο της πολυμερικής αλλαγής της δομής του συνδέτη του [118]. Τέλος, ενδιαφέρουσα είναι η ανακάλυψη ότι στο κυτταροπλασματικό τμήμα του TACI υποδοχέα, πλην των TRAF και CAML πρωτεϊνών, υπάρχει και ένα διατηρημένο μοτίβο πρόσδεσης της MyD88 πρωτεΐνης. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη προσαρμογής, η οποία μπορεί και ενεργοποιεί τον NF-κΒ μέσω ενός TIR πεδίου. Ο TACI υποδοχέας δεν έχει TIR πεδίο αλλά παρόλα αυτά μπορεί να ενεργοποιήσει την ισοτυπική μεταστροφή και να ελέγξει ένα εσωτερικό, TIR-ανεξάρτητο και TACI-εξαρτώμενο μονοπάτι, για την διαφοροποίηση των ανοσοσφαιρινών [119]. Η σηματοδότηση του TACI υποδοχέα, απεικονίζεται στην **Εικόνα 8**.



Εικόνα 8: Ο TAC1 υποδοχέας, εκτός από τις πρωτεΐνες TRAF και CAML, χαρακτηρίζεται από ένα τύπου TLR, TIR-ανεξάρτητο μονοπάτι, στο οποίο εμπλέκεται η MyD88 πρωτεΐνη. Η σύνδεση του BAFF ή του APRIL, που παράγονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (π.χ. δενδριτικά κύτταρα), στον TAC1, ενεργοποιεί τον ολιγομερισμό του υποδοχέα και την στρατολόγηση της MyD88 πρωτεΐνης στο THC πεδίο. Ακόλουθη στρατολόγηση των IRAK-1, IRAK-4 και TAK-1 προκαλεί ενεργοποίηση του IKK συμπλέγματος. Αυτή η διαδικασία ενισχύεται περαιτέρω με την πρόσδεση του TRAF2 στο TBS του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την τελική ενεργοποίηση του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα και εν τέλει την ισοτυπική μεταστροφή, παρουσία και άλλων σημάτων που παράγονται από κυτταροκίνες και συνδέτες των TLR (αντιγόνα). Οι TLR, χρησιμοποιούν ένα κανονικό TIR-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι, ενώ συνεργάζονται με τους αντίστοιχους συνδέτες του TAC1 για την επαγωγή της παραγωγής ανοσοσφαιρινών (από He και συν., με τροποποιήσεις [119]).

Μια πρόσφατη μελέτη, περιέγραψε έναν απροσδόκητο ρόλο για τον υποδοχέα TAC1, όσον αφορά την διέγερση των CTLs. Συγκεκριμένα, μετά από ανοσοποίηση επίμυων χωρίς B-κύτταρα, με πολλαπλά διαφορετικά πεπτίδια ή πρωτεΐνες (π.χ. OVA), αυτά δεν μπορούσαν να παράγουν CTLs. Ακόλουθη ανασύσταση των επίμυων αυτών, με φυσιολογικά B-κύτταρα ή B-κύτταρα από διαγονιδιακά ζώα με απουσία έκφρασης ποικίλων μορίων (π.χ. b2m, CD40, IL-2 ή IL-4) κατέστησε εφικτή την παραγωγή φυσιολογικών CTLs. Αντίθετα, όταν εγχύθηκαν B-κύτταρα από TAC1^{-/-} διαγονιδιακά ζώα, η ανασύσταση αυτή δεν ήταν εφικτή, προτείνοντας έτσι έναν σημαντικό ρόλο του TAC1 στην *in vivo*

διέγερση των CTLs. Είναι μάλιστα ενδιαφέρον, ότι η χορήγηση μικρών ποσοτήτων ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (εξωκυττάριο τμήμα του TACI συγχωνευμένο με ένα Fc πολυπεπίδιο), δεν στόχευε τα CTLs, όπως θα περίμενε κανείς, αλλά τα δένδριτικά κύτταρα [120]. Ως αποτέλεσμα έχει προταθεί, ότι η παρουσία του TACI είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των δένδριτικών κυττάρων (που φυσιολογικά εκφράζουν μεγάλες ποσότητες BAFF και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα *in vitro* παρουσία των B-κυττάρων), επάγοντας την έκπτυξη μεγάλου αριθμού ενεργοποιημένων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων κατά την CTL διέγερση [120]. Συμπερασματικά, αν και ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης δεν είναι ακόμη γνωστός, προκύπτει ξεκάθαρα ότι ο TACI υποδοχέας μπορεί να δρα και ως συνδέτης, διευκολύνοντας την T-κυτταροτοξικότητα. Επομένως, μπορεί να συμπεριληφθεί στα μέλη της TNFR-υπεροικογένειας που μπορούν να δρουν και προς τις δύο κατευθύνσεις [121].

2.1.3. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TACI ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο του BAFF στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των B-κυττάρων, θα περίμενε κανείς σε διαγονιδιακούς επίμυες που δεν εκφράζουν TACI (TACI^{-/-}), έναν φαινότυπο που θα επηρέαζε αρνητικά τα B-κύτταρα. Αντίθετα όμως, TACI^{-/-} διαγονιδιακά ζώα παρουσίασαν υπερπλασία των B-κυττάρων με διπλάσιο αριθμό τους στο περιφερικό αίμα και το σπλήνα, παραγωγή αυτοαντισωμάτων και ανάπτυξη λεμφοϋπερπλαστικού συνδρόμου [122]. Παράλληλα, η απουσία έκφρασης του TACI υποδοχέα οδήγησε σε διαταραχή της θυμο-ανεξάρτητης παραγωγής ανοσοσφαιρινών (σε απόκριση στην NP-φικόλη ή σε αντιγόνα της κάψας του πνευμονιοκόκκου), την στιγμή που οι T-εξαρτώμενες αποκρίσεις ήταν φυσιολογικές [122]. Επίσης, το γεγονός ότι ο υποδοχέας υπερεκφράζεται έπειτα από διέγερση των B-κυττάρων, οδήγησε τους Castigli και συν., στην διαπίστωση ότι η σηματοδότηση μέσω του TACI είναι κομβικής σημασίας για την ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών [123]. Η επιβεβαίωση ήρθε αργότερα, όταν αποδείχθηκε ότι η διέγερση του TACI με τον συνδέτη APRIL, παρουσία πρωτεογλυκανών, προκαλούσε παραγωγή IgA ανοσοσφαιρίνης [124]. Τα παραπάνω ευρήματα, συσχετίστηκαν με την ανίχνευση μεταλλάξεων του TACI γονιδίου σε ασθενείς με COVID, που ως γνωστόν παρουσιάζουν διαταραχή της ισοτυπικής μεταστροφής [125,126]. Ωστόσο, είναι γεγονός ότι υπάρχουν ασάφειες όσον αφορά τον ακριβή βιολογικό ρόλο του TACI, δεδομένου ότι έχει αναφερθεί τόσο θετική όσο και αρνητική επίδραση της διέγερσης του υποδοχέα [127]. Η σύνοψη των λειτουργιών του TACI υποδοχέα σε επίμυες και στον άνθρωπο παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Σύνοψη των λειτουργιών του υποδοχέα *TAC1* στον άνθρωπο και σε επίμους, *in vivo* και *in vitro*.

Δράση ενεργοποίησης του υποδοχέα <i>TAC1</i>	
<i>In vitro</i>	
Ανθρώπινα PBMC	Τα δενδριτικά κύτταρα προάγουν, μέσω των BAFF και APRIL, την CD40-ανεξάρτητη ισοτυπική μεταστροφή [103]
Παρθένα Β-κύτταρα επιμύων	T-ανεξάρτητη ισοτυπική μεταστροφή. Έκκριση IgG1 και IgA έπειτα από διέγερση με BAFF και APRIL [128]
<i>In vivo</i>	
APRIL ^{-/-} επίμους	Διαταραχή της IgA ισοτυπικής μεταστροφής [123]
TAC1 ^{-/-} επίμους	Διαταραχή της TI τύπου II απόκρισης έναντι πολυσακχαριδικών αντιγόνων βακτηρίων με κάψα (π.χ. <i>Streptococcus pneumoniae</i>) [122]
CVID ασθενείς	Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>TAC1</i> συσχετίστηκαν με CVID [125,126] και IgA ανεπάρκεια [125]. Επιπρόσθετα, η παραγωγή αντισωμάτων έπειτα από εμβολιασμό με πνευμονιόκοκκο ήταν επιλεκτικά μειωμένη [125]
Ανασταλτική δράση του υποδοχέα <i>TAC1</i>	
<i>In vitro</i>	
B-κύτταρα ανθρώπου	Αντι- <i>TAC1</i> αντισώματα παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό B-κυττάρων, προάγουν την απόπτωση [129] και εμποδίζουν την παραγωγή αντισωμάτων [124]
B-κύτταρα επιμύων	Αντι- <i>TAC1</i> αντισώματα παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό B-κυττάρων και προάγουν την απόπτωση [129]
<i>In vivo</i>	
TAC1 ^{-/-} επίμους	Υπερπλασία B-κυττάρων [122], αυτοανοσία, λεμφοϋπερπλασία και υπεργαμμασφαιριναιμία, αύξηση βλαστικών κέντρων στο σπλήνα και αυξημένη κυτταροβρίθεια λεμφοζιδίων [130]. Αυτοάνοση σπειραματονεφρίτιδα, λέμφωμα [129]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω και παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**, μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B*, διαπιστώθηκαν σε ασθενείς με CVID και συσχετίστηκαν (ακόμη και σε ετερόζυγη μορφή) με την ανάπτυξη της νόσου [125,126]. Η CVID είναι, μετά την εκλεκτική IgA ανοσοανεπάρκεια, η συχνότερη ανοσοανεπάρκεια στον άνθρωπο όπου οι πάσχοντες εμφανίζουν υπογαμμασφαιριναιμία, αδυναμία παραγωγής αντισωμάτων έπειτα από εμβολιασμό ή έκθεση σε παθογόνα και συνακόλουθα συχνές λοιμώξεις [131]. Είναι μάλιστα ενδιαφέρον, ότι αρχικά περιγράφηκαν αρκετές μεταλλάξεις του *TNFRSF13B* που συσχετίστηκαν με τη νόσο [125,126]. Ωστόσο, τα ίδια κέντρα που πρωτοπεριέγραψαν το 2005 μεταλλάξεις του γονιδίου ως παθογενετικές του νοσήματος [124,125], δύο χρόνια αργότερα αναθεώρησαν τη θέση αυτή, δεδομένου ότι όλες οι μεταλλάξεις έχουν βρεθεί και

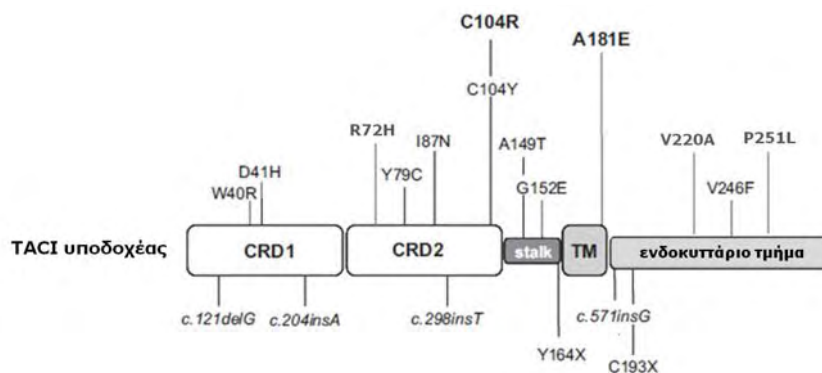
σε φυσιολογικά άτομα [132,133]. Μερικές από τις πιο συχνές μεταλλάξεις του *TNFRSF13B* παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2** και στην **Εικόνα 9**.

Πίνακας 2: Σύνοψη των μεταλλάξεων του γονιδίου *TAC1* που εμφανίζονται στην βιβλιογραφία.

Νουκλεοτίδιο	Μετάλλαξη (πρωτεΐνη)	Τμήμα υποδοχέα	Ασθενείς (%)	Υγιείς (%)	Μελέτη
61+1G>T	-	Ιντρόνιο 1	2,10	0	134
81G>A	T27T	CRD1, εξωκυττάριο	72,60	40,30	132,133
118T>C	W40R	CRD1, εξωκυττάριο	<0,40	0	137
121G>C	D41H	CRD1, εξωκυττάριο	0,94	0	137
124C>A	P42T	CRD1, εξωκυττάριο	2,10	0,40	134
204insA	L69fsX11	CRD1, εξωκυττάριο	0,47	0	133,137
215G>A	R72H	CRD2, εξωκυττάριο	0,94	0	132,133
236A>G	Y79C	CRD2, εξωκυττάριο	<0,40	0	137
260T>A	I87N	CRD2, εξωκυττάριο	<0,40	0,15	134,137
291T>G	P97P	CRD2, εξωκυττάριο	6,13	1,61	132-134
310T>C	C104R	CRD2, εξωκυττάριο	1,66-4,60	0-2,52	132,133,137
324G>A	C104Y	CRD2, εξωκυττάριο	<0,40	0	137
445G>A	A149T	Εξωκυττάριο	<0,40	0	137
455G>A	G152E	Εξωκυττάριο	<0,40	0	137
492C>A	Y164X	Εξωκυττάριο	<0,40	ΔΕ	137
512T>G	L171R	Διαμεμβρανικό	0,47	0	133
515G>A	C172Y	Διαμεμβρανικό	2,10	0	134
542C>A	A181E	Διαμεμβρανικό	0-2,60	0-1	132,133,137
563A>T	K188M	Ενδοκυττάριο	1,0	ΔΕ	135
579C>A	C193X	Ενδοκυττάριο	<0,40	<0,40	137
605G>A	R202H	Ενδοκυττάριο	0-3,54	0-2,31	132,133
659T>C	V220A	Ενδοκυττάριο	3,30	0,80	132
736G>T	V246F	Ενδοκυττάριο	<0,40	0	137
752C>T	P251L	Ενδοκυττάριο	7,07-17	10,48	132,133
831T>C	S277S	Ενδοκυττάριο	32,07	25,80	133

*ΔΕ: δεν εκτιμήθηκε

Ωστόσο, δύο από τις μεταλλάξεις του *TNFRSF13B*, οι A181E και C104R, φαίνεται να συνδέονται ισχυρά με την ανάπτυξη της COVID [137]. Αν και είναι πολύ πιθανόν οι μεταλλάξεις αυτές να μην είναι παθογενετικές, μπορούν ωστόσο να επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρεται σε πρόσφατη ανασκόπηση των Salzer και συν., η παρουσία μετάλλαξης στο ένα ή και στα δύο αλληλία του *TNFRSF13B* σχετίζεται ισχυρά με υπογαμμασφαιριναιμία (RR: 4.3, 95% CI:2.4-7.6), ενώ όσον αφορά τις κύριες μεταλλάξεις C104R και A181E, η συσχέτιση με την ετερόζυγη μετάλλαξη C104R είναι ισχυρή για την ανάπτυξη COVID, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο και για την A181E [137]. Επίσης, η παρουσία των μεταλλάξεων σχετίζεται με την αυξημένη συχνότητα σπληνομεγαλίας και αυτοανοσίας [136,137].



Εικόνα 9: Η κατανομή των πιο συχνών μεταλλάξεων του TNFRSF13B (από Salzer και συν., με τροποποιήσεις [137]).

Ειδικά για την C104R μετάλλαξη, διαπιστώθηκε ότι παρεμποδίζει την πρόσδεση του συνδέτη, ακόμη και σε ετερόζυγη μορφή [138]. Επιπρόσθετα η μετάλλαξη C104R διαταράσσει τον δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys93 και Cys104 και παρεμβαίνει στο σχηματισμό του h2 βρόχου στο CRD-2 του TACI υποδοχέα [95]. Η μετάλλαξη C76R στους επίμυες είναι το ισοδύναμο της μετάλλαξης C104R στον άνθρωπο. Οι GeHa και συν., προσπάθησαν να καθορίσουν το αποτέλεσμα της μετάλλαξης C76R, σε επίμυες που εκφράζουν τόσο το φυσιολογικό, όσο και το μεταλλαγμένο υποδοχέα (C76R⁺). Οι C76R/TACI (+/-) επίμυες είχαν σημαντικά μειωμένες θυμο-ανεξάρτητες απαντήσεις (παραγωγή αντισωμάτων στα αντιγόνα TNP-Φικόλη) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [B6/129 επίμυες (+/+)]. Επίσης, τα B-κύτταρά τους είχαν μειωμένη ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και να εκκρίνουν την IgG1 ανοσοσφαιρίνη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι σε αντιστοιχία, η μετάλλαξη C104R στον άνθρωπο θα μπορούσε να βλάψει τη λειτουργία του υποδοχέα TACI και σε ετεροζυγώτες, μέσω της ανεπάρκειας κατάλληλου απλοτύπου (haploinsufficiency¹) [139].

Στον Ελληνικό πληθυσμό, τόσο σε ασθενείς με COVID όσο και σε υγιείς μάρτυρες, φαίνεται να επικρατούν κυρίως οι παραλλαγές P251L και V220A [140], η βιολογική σημασία των οποίων δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Μάλιστα, η θέση τους, βάσει της βιβλιογραφίας, βρίσκεται στο σημείο πρόσδεσης των πρωτεϊνών TRAF [54,116,141]. Σύμφωνα με την μελέτη των Salzer και συν., η V220A θεωρείται «καλοήθης» εξαλλαγή αν και μπορεί να επηρεάσει το κέντρο σταθεροποίησης της πρωτεΐνης (stabilization center, SC), δηλαδή συσσωρευμένα κατάλοιπα, τα οποία επηρεάζουν την τρισδιάστατη δομή της. [137]. Αντίθετα, η παρουσία της P251L, θεωρείται επιβλαβής [137], ενώ είναι

¹ Ο όρος "haploinsufficiency" ισχύει όταν ένας διπλοειδής οργανισμός έχει μόνο ένα ενιαίο λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου (με το άλλο αντίγραφο να έχει αδρανοποιηθεί λόγω μετάλλαξης), το οποίο δεν παράγει επαρκή ποσότητα πρωτεΐνης, οδηγώντας έτσι σε μια ανώμαλη ή ασθενή ιδιότητα. Είναι υπεύθυνη για ορισμένες, αλλά όχι για όλες τις αυτοσωματικές κυρίαρχες διαταραχές (dominant-negative effect).

ενδιαφέρουσα η άποψη, ότι αποτελεί μια από τις αρχαιότερες παραλλαγές του *TNFRSF13B* γονιδίου [142]. Ο ρόλος του TACI στην παθογένεση ή και το φαινότυπο της ΧΑΠ είναι τελείως άγνωστος.

2.2. BAFFR ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

2.2.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ

Ο υποδοχέας BAFFR (επίσημα: BR3, TNFRSF13C, CD268), ανήκει στην TNF υπεροικογένεια έπειτα από την ανακάλυψη πως, παρόμοια με τους TACI και BCMA υποδοχείς, προσδένεται στο BAFF [55]. Το γονίδιο *TNFRSF13C/BAFFR* βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 22 (22q13.2) και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 184 αμινοξέων. Ο BAFFR υποδοχέας, παρόμοια με τους TACI [54] και BCMA [143] υποδοχείς, είναι μια τύπου III διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που περιέχει ένα πεδίο CRD, στο οποίο περιέχονται μόνο τέσσερις επαναλήψεις κυστεΐνης, αντίθετα με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας που χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον έξι [144]. Η δομή του υποδοχέα περιλαμβάνει εξωκυττάριο (1-101 αα), διαμεμβρανικό (102-122 αα) και ενδοκυττάριο τμήμα (123-184 αα) [55].

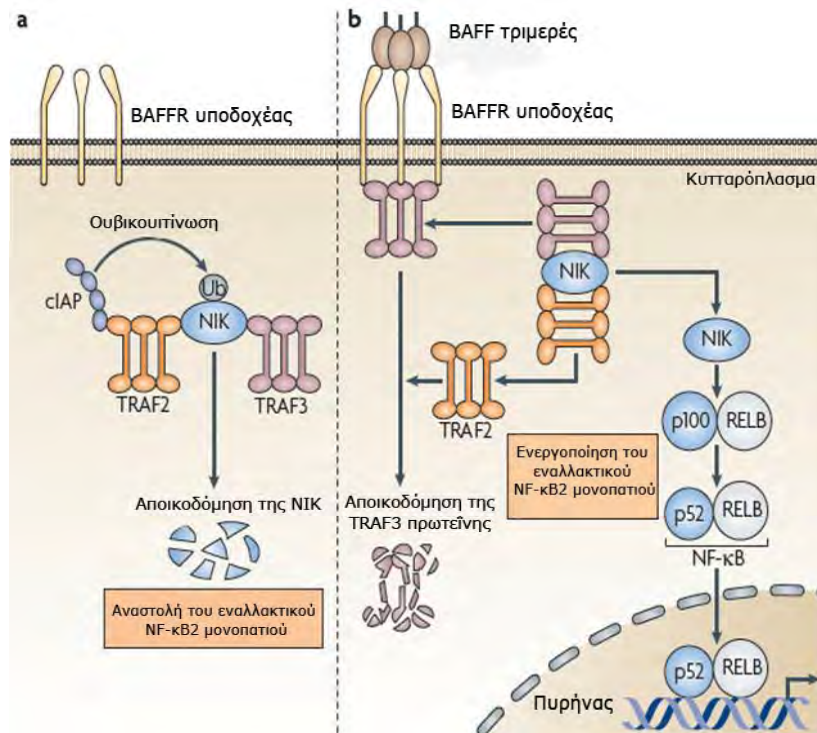
Ο μοναδικός συνδέτης του BAFFR υποδοχέα είναι ο BAFF, με τον οποίο ο υποδοχέας συνδέεται με υψηλή συγγένεια [106]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο BAFF είναι μέλος της TNF οικογένειας, που εκφράζεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα με σημαντικό ρόλο για την διατήρηση της ομοιόστασης και της διαφοροποίησης των B-κυττάρων [145,146]. Ο συνδέτης αυτός χαρακτηρίζεται από ένα καρβοξυτελικό πεδίο που ονομάζεται THD, το οποίο μοιράζεται 20-30% ομολογία με άλλα 16 μέλη της TNF υπεροικογένειας (π.χ. TNF, CD40L, FasL κτλ) [99]. Ο BAFF, όπως και ο APRIL, χαρακτηρίζεται από μια αλληλουχία-μοτίβο, που αναγνωρίζεται από το πρωτεολυτικό ένζυμο φουρίνη (furin). Αποτέλεσμα της αναγνώρισης αυτής είναι η δημιουργία μιας διαλυτής μορφής του BAFF, υποδηλώνοντας ότι ο συνδέτης υπάρχει και συνδεδεμένος με την κυτταρική μεμβράνη [147]. Η διαλυτή μορφή του BAFF είναι συνήθως τριμερής, αλλά μπορεί επίσης να οργανωθεί σε ανώτερη δομή 20 τριμερών (60-μερή), όπως αναφέρθηκε παραπάνω [118].

2.2.2. ΈΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Τα B-κύτταρα καθώς και μικρός αριθμός μη ενεργοποιημένων T-κυττάρων στην περιφέρεια, εκφράζουν τον BAFFR υποδοχέα [55,148]. Επίσης, ανιχνεύθηκε υψηλή

έκφραση του υποδοχέα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, στον σπλήνα και τους λεμφαδένες, ενώ ανιχνεύθηκε χαμηλή έκφραση του στον μυελό των οστών [55,149] και το εμβρυϊκό ήπαρ [55].

Μετά την έναρξη της σηματοδότησης, στο ενδοκυττάριο τμήμα του BAFFR υποδοχέα, συνδέονται οι πρωτεΐνες TRAFs. Πρόκειται για τριμερείς πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να συνδέονται και στους τρεις υποδοχείς TAC1, BAFF-R και BCMA [141,150,151]. Είναι ενδιαφέρον, ότι ενώ η συγγένεια της πρωτεΐνης TRAF για ένα μονομερές BAFFR υποδοχέα είναι χαμηλή, η σύνδεση TRAF-υποδοχέα σταθεροποιείται όταν υπάρχει σύνδεση τριμερούς TRAF-τριμερούς BAFFR υποδοχέα [152]. Ο BAFFR υποδοχέας, συνδέεται και φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TRAF3, η οποία επακόλουθα φωσφορυλιώνει την NIK κινάση. Η NIK κινάση συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κB2 εναλλακτικού μονοπατιού [153].



Εικόνα 10: Ο ρόλος των πρωτεϊνών TRAF στην σηματοδότηση του BAFFR. Α) Απουσία της BAFF/BAFFR πρόσδεσης η NIK κινάση συνδέεται με τις TRAF2 και TRAF3 πρωτεΐνες. Η TRAF2 «στρατολογεί» τον cIAP, ο οποίος έχει ως στόχο την NIK κινάση την οποία αποικοδομεί μέσω της ουβικουιτίνωσης, αναστέλλοντας έτσι τον NF-κB2. Β) Έπειτα από την BAFF/BAFFR σύνδεση, η TRAF3 πρωτεΐνη συνδέεται με τον BAFFR, ενώ με την σειρά της, η TRAF2 προάγει την αποικοδόμηση της TRAF3. Η NIK κινάση είναι πλέον ελεύθερη να συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κB2 εναλλακτικού μονοπατιού, το οποίο προάγει την επιβίωση των κυττάρων (από Mackay F & Schneider P, με τροποποιήσεις [154]).

Ωστόσο, αν και δεν υπάρχει άμεση σύνδεση του BAFFR υποδοχέα με την TRAF2, έχει διαπιστωθεί ότι η απαλοιφή της τελευταίας, προκαλεί συσσώρευση της πρωτεΐνης TRAF3. Οι παρατηρήσεις αυτές θέτουν την βάση για ένα μοντέλο που εξηγεί λογικά τα αρχικά βήματα της σηματοδότησης του υποδοχέα. Ειδικότερα, απουσία του BAFF, η TRAF3 συνδέεται με την NIK κινάση και στην συνέχεια αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα, με την βοήθεια της TRAF2. Επομένως, με αυτόν τον τρόπο, η TRAF3 δεν συμμετέχει στην ενεργοποίηση του εναλλακτικού NF-κΒ μονοπατιού. Αντίθετα, παρουσία του BAFF, η TRAF3 συνδέεται στον BAFFR, η NIK κινάση σταθεροποιείται με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ2, που με την σειρά της θα οδηγήσει στην επιβίωση των Β-κυττάρων [154]. Τα αρχικά στάδια σηματοδότησης του BAFFR υποδοχέα δεν είναι πλήρως κατανοητά, δεδομένου ότι μπορεί να ενεργοποιήσει το κλασσικό (classical) ή το εναλλακτικό (non-canonical) NF-κΒ μονοπάτι [150,155] ή άλλους αντι-αποπτωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. Bcl-2)[156]. Ο ρόλος των πρωτεϊνών TRAF στην σηματοδότηση του BAFFR παρουσιάζεται στην **Εικόνα 10**.

2.2.3. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ BAFFR ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Σημαντικός παράγοντας για την κατανόηση του ρόλου του υποδοχέα BAFFR, όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των Β-κυττάρων, είναι ο συνδέτης BAFF. Ο BAFFR κατέχει το προνόμιο της αποκλειστικής σύνδεσης με τον συγκεκριμένο συνδέτη [106], ο οποίος ρυθμίζει θετικά την ομοιόσταση των Β-κυττάρων μεταβιβάζοντας σήματα επιβίωσης [157]. Ωστόσο, η διαπίστωση ότι επίμυες με βλάβες στο γονίδιο *BAFFR*, είχαν τις ίδιες διαταραχές στα Β-κύτταρα με *BAFF*^{-/-} διαγονιδιακά ζώα, κατέδειξε τον BAFFR πολύ σημαντικό υποδοχέα για την διαφοροποίηση και την επιβίωση των Β-κυττάρων [106].

Επιπρόσθετα, ο BAFFR εκτός από τον σημαντικό του ρόλο στην ομοιόσταση των Β-κυττάρων, συμμετέχει στην ισοτυπική μεταστροφή, στην διατήρηση των βλαστικών κέντρων των λεμφοζιδίων και την επαγωγή της έκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών στα Β-κύτταρα [164]. Οι μελέτες που έχουν δημοσιευθεί και συνοψίζουν τον ρόλο του συστήματος BAFF/BAFFR συνοψίζονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Μελέτες που καταδεικνύουν τον ρόλο του συστήματος BAFF/BAFFR.

BAFF συνδέτης
<ul style="list-style-type: none">• <i>In vitro</i> διέγερση του πολλαπλασιασμού ανθρώπινων Β-κυττάρων και της παραγωγής ανοσοσφαιρινών [147]• Παράταση της επιβίωσης ανθρώπινων CD27⁺ μνημονικών και CD38⁺ Β-κυττάρων [158]• Αυξημένος αριθμός ώριμων Β-κυττάρων και δραστικών Τ-κυττάρων, αυτοάνοσες εκδηλώσεις και εναπόθεση ανοσοσφαιρινών στους νεφρούς σε BAFF^{+/+} διαγονιδιακά ζώα [159]• Υποπλασία Β-κυττάρων, μείωση των ανοσοσφαιρινών στην κυκλοφορία και μείωση της χυμικής ανοσιακής απόκρισης σε BAFF^{-/-} διαγονιδιακά ζώα [160]
BAFFR υποδοχέας
<ul style="list-style-type: none">• Εκδήλωση τύπου-ΣΕΛ συνδρόμου, παρουσία αντι-dsDNA αντισωμάτων, υπεργαμμασφαιριναιμία, ελαττωματική διαφοροποίηση Β-κυττάρων και σπειραματονεφρίτιδα σε επίμυες με μετάλλαξη στο <i>baffr</i> γονίδιο [161,162,163]• Απώλεια περιφερικών Β-κυττάρων και μείωση ανοσοσφαιρινών στην κυκλοφορία σε <i>baffr</i>^{-/-} διαγονιδιακά ζώα [164]• Μείωση των Β-κυττάρων στην περιφέρεια, τους λεμφαδένες και τον σπλήνα έπειτα από χορήγηση BAFFR αναστολέων [165]• Μείωση των Β-κυττάρων στην περιφέρεια, τους λεμφαδένες και το σπλήνα έπειτα από χορήγηση αντι-BAFFR αντισώματος, σε πρωτεύοντα (<i>Macaca fascicularis</i>) [102].

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο BAFF συνδέτης εμπλέκεται στην εκδήλωση αυτοανοσίας και ΣΕΛ, οι Ju και συν., θέλησαν να διερευνήσουν περαιτέρω τον ρόλο του BAFFR υποδοχέα στα παραπάνω φαινόμενα. Για το λόγο αυτό, διασταύρωσαν πειραματόζωα με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, ώστε να προκύψει ένα BAFFR μεταλλαγμένο διαγονιδιακό ζώο (A/WySnJ/MRL-*lpr* έπιμυς). Ως αποτέλεσμα, προέκυψαν επίμυες με μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης των Β-κυττάρων *in vitro* (άνωριμων, ώριμων και ζώνης μανδύα) στον σπλήνα, αλλά με μεγαλύτερο αριθμό και Β-κυττάρων και πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών [163].

Από τις παραπάνω αναφορές προκύπτει πως μεταλλάξεις στο BAFFR γονίδιο συνδέονται με ένα τροποποιημένο φαινότυπο όσον αφορά τον αριθμό των Β-κυττάρων, προτείνοντας ότι η παρουσία τους συμβάλλει στην έλλειψη της χυμικής ανοσίας. Οι Losi και συν., έπειτα από την ανάλυση αλληλουχίας σε όλο το γονίδιο *TNFRSF13C/BAFFR* σε ασθενείς με CVID και υγιή άτομα, περιέγραψαν τις μεταλλάξεις, που συνοψίζονται στον **Πίνακα 4**. Παρά το γεγονός ότι στο σύνολο των ασθενών οι μεταλλάξεις που

ανιχνεύθηκαν ήταν σε ετερόζυγη κατάσταση, η παρουσία τους ωστόσο δεν προκάλεσε κάποια διαταραχή στην έκφραση του BAFFR υποδοχέα [166].

Οι Warnatz και συν., περιέγραψαν πρόσφατα για πρώτη CVID που προκαλείται από BAFFR ανεπάρκεια [167]. Η ανεπάρκεια αυτή οφείλεται σε ομόζυγη έλλειψη 8 αμινοξέων στο διαμεμβρανικό του τμήμα της πρωτεΐνης, οδηγεί σε CVID, που χαρακτηρίζεται από χαμηλό αριθμό των Β-κυττάρων στην περιφέρεια και μείωση στον ορό των IgG και IgM ανοσοσφαιρινών, χωρίς όμως αντίστοιχη μείωση της IgA [167]. Παράλληλα, πρόσφατα ανακοινώθηκε από τους Σπελέτα και συν., πως η παρουσία της P21R σε ομόζυγη κατάσταση επηρεάζει την σύνθεση του υποδοχέα με το συνδέτη και πως η συχνότητα του P21R αλληλίου είναι υψηλότερη σε άτομα με ανεπάρκεια παραγωγής αντισωμάτων συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες [168].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σύμφωνα με τη μελέτη των Polverino και συν, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του BAFFR στον πνεύμονα ασθενών με ΧΑΠ και ιδιαίτερα στα λεμφοζήδια [26]. Ωστόσο, ο ρόλος των μεταλλάξεων-παραλλαγών του *TNFRSF13C* και της σηματοδότησης του BAFFR σε ασθενείς με ΧΑΠ δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα.

Πίνακας 4: Οι μεταλλάξεις του BAFFR γονιδίου.

Θέση	Νουκλεοτιδίο	Πρωτεΐνη	Τμήμα υποδοχέα	Ασθενείς (%)	Υγιείς (%)	Μελέτη
Εξώνιο 1	62C>G	Pro21Arg (P21R)	Εξωκυττάριο	10,4	3,5	[166]
Ιντρόνιο 2	IVS2-33T>C	-	-	10,4	5,2	[166]
Εξώνιο 2	191G>T	Gly64Val (G64V)	Εξωκυττάριο	0	3,5	[166]
Εξώνιο 2	192C>T	Gly64Val (G64V)	Εξωκυττάριο	0	3,5	[166]
Εξώνιο 3	475C>T	His159Tyr(H159Y)	Ενδοκυττάριο	2,08	1,75	[166]

2.3. ICOS ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

2.3.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ ΤΟΥ ICOS

Η αποτελεσματική ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων μέσω του αντιγονοειδικού υποδοχέα τους, απαιτεί πρόσθετα σήματα διέγερσης που παρέχονται από συνδिएεργετικά μόρια στην επιφάνεια του κυττάρου [169]. Ένα τέτοιο συνδिएεργετικό μόριο είναι και ο υποδοχέας ICOS υποδοχέας, ο οποίος είναι δομικά και λειτουργικά συνδεδεμένος με το CD28 [170]. Το γονίδιο *ICOS* έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 2q33 και γειτνιάζει με τα γονίδια CD28 και CTLA4 [171]. Συνολικά, περιέχει 5 εξόνια και 4 ιντρόνια, μεγέθους ~20 kb [172]. Ο υποδοχέας ICOS (CD154) είναι ένα ομοδιμερές των 55-60 kDa, τα οποία

συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα με πεδία τύπου ανοσοσφαιρινών (IgV) και μία ενδοκυττάρια ουρά με κατάλοιπα τυροσίνης εντός SH2 μοτίβων [174,173]. Μετά τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης ICOS στα ανθρώπινα T-κύτταρα [170], έγινε ανίχνευση της ομόλογής της στους επίμυες [174,175].

Ο υποδοχέας ICOS αλληλεπιδρά με το συνδέτη ICOS-L (αναφέρεται επίσης ως B7h, B7RP-1, GL50, B7-H2 ή LICOS) [176], με τον οποίο συνιστά ένα μονομερές ζεύγος υποδοχέα-συνδέτη [174,173]. Ο συνδέτης ICOS-L εκφράζεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά, μονοκύτταρα/μακροφάγα), ινοβλάστες στους οποίους έχει χορηγηθεί TNF-α [177] καθώς και σε ενδοθηλιακά, επιθηλιακά [178], B-κύτταρα [174] και T-κύτταρα [179]. Η ευρεία έκφραση του συνδέτη ICOS-L υποδηλώνει την συμμετοχή του σε ποικίλες βιολογικές λειτουργίες μέσω του ICOS υποδοχέα [176,178].

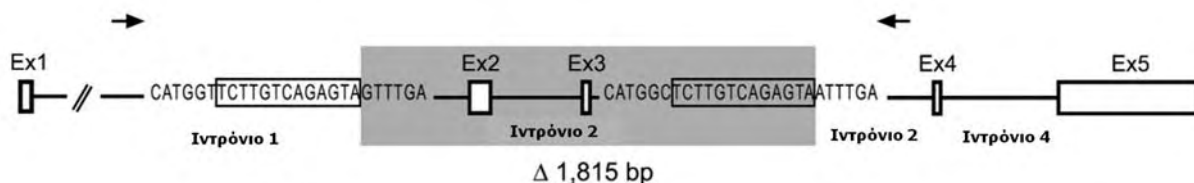
2.3.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ICOS

Σε αντίθεση με το CD28, το οποίο εκφράζεται σε T-κύτταρα που βρίσκονται σε ανάπαυση, ο ICOS υποδοχέας εκφράζεται μόνο σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα [170]. Ειδικότερα, στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, ο ICOS εκφράζεται σε T-ζώνες (παραφλοιώδεις περιοχές λεμφαδένων) και ιδιαίτερα σε βλαστικά κέντρα, δηλαδή περιοχές πολλαπλασιασμού και τελικής διαφοροποίησης των B-κυττάρων [170,180]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του ICOS υποδοχέα, αλληλοεπικαλύπτεται σε μεγάλο βαθμό με αυτό της CD28 πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, ο ICOS υποδοχέας συνδέεται με την PI3K στο SH2 πεδίο της, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των MAP κινασών (JNK, p38 και ERK)[181]. Εντούτοις, ο ICOS υποδοχέας χαρακτηρίζεται από μια αλληλουχία (YMFMSH2), που του προσδίδει την ικανότητα να συνδέεται επίσης με μια παραλλαγή της PI3K. Η συγκεκριμένη παραλλαγή αποτελείται από την κανονική p85 καταλυτική και μια, περισσότερο ενεργή, p50a ρυθμιστική υπομονάδα [182]. Αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μορφής PI3K, είναι η αυξημένη δράση της ως «λιπιδικής κινάσης», με αποτέλεσμα να προκαλείται μεγαλύτερη παραγωγή των προϊόντων της [(3,4,5) P_3] και ταυτόχρονη αύξηση της Akt σηματοδότησης [181,182]. Η ισχυρή ενεργοποίηση της Akt σηματοδότησης, υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη ICOS διαδραματίζει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των T-κυττάρων [183].

2.3.3. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ICOS ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Είναι ενδιαφέρον πως οι ανοσιακές βλάβες σε CD28^{-/-} διαγονιδιακά ζώα, μπορούν να διορθωθούν με την παράλληλη συνεχή έκφραση του ICOS υποδοχέα. Επομένως η έκφραση του ICOS μπορεί είτε να υποκαταστήσει είτε να παρακάμψει τις απαιτήσεις του κυττάρου για το CD28, υποδηλώνοντας έτσι την αλληλοσυμπλήρωση των δύο μορίων [184]. Έπειτα από *in vitro* μελέτες, διαπιστώθηκε ότι ο ICOS υποδοχέας έχει την ικανότητα να συνδιεγείρει αποτελεσματικά τη διάδοση σήματος στα T-κύτταρα, τη σύνθεση κυτταροκινών και την T-εξαρτώμενη διέγερση των B-κυττάρων [170,174].

Γενικότερα, παρά το γεγονός ότι τα CD28 και ICOS συνδιεγείρουν την απελευθέρωση ενός μεγάλου φάσματος κυτταροκινών των T-κυττάρων, μόνο το CD28 προκαλεί την απελευθέρωση άφθονης IL-2 [185]. Αντίθετα, ο υποδοχέας ICOS είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην απελευθέρωση της IL-10 [170,186], η οποία εμπλέκεται στην παραγωγή B-κυττάρων μνήμης και πλασματοκυττάρων [187,188,189]. Ωστόσο, η έκφραση του ICOS κυρίως σε βλαστικά κέντρα του λεμφικού ιστού, υποδηλώνει την ουσιαστική συμμετοχή του υποδοχέα στην θυμοεξαρτώμενη ανοσιακή απάντηση. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε όταν διαπιστώθηκε πως σε *Icos*^{-/-} διαγονιδιακά ζώα, παρατηρείται διαταραχή της χυμικής ανοσιακής απόκρισης [170,190,191].



Εικόνα 11: Απαλοιφή 1815 bp στο γονίδιο ICOS. Αλληλούχηση (*sequencing*) του ελλιπούς προϊόντος PCR 1,2 kb αποκάλυψε απαλοιφή των 1.815 bp στο γονίδιο ICOS (μέρος intrónιο 1, εξόνιο 2, intrónιο 2, εξόνιο 3 και μέρος του intrónιο 3). Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 13 βάσεων που προκύπτει φαίνεται περιγεγραμμένη. Η σκιασμένη περιοχή χαρακτηρίζει τα τμήματα του γονιδίου ICOS που έχουν απαλειφθεί. Ex: εξόνιο (από Grimbacher και συν., με τροποποιήσεις [192]).

Πρόσφατα, οι Grimbacher και συν., σε αναζήτηση πρωτεϊνών που πιθανόν εμπλέκονται στην COVID, αναγνώρισαν ασθενείς με απουσία έκφρασης του ICOS υποδοχέα σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα [192]. Διαπιστώθηκε ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης οφειλόταν σε ομόζυγη έλλειψη τμήματος του γονιδίου ICOS (**Εικόνα 11**). Αξιοσημείωτο είναι ότι στα άτομα αυτά, ενώ τα T-κύτταρα τους ήταν φυσιολογικά ως προς την κατανομή των υποπληθυσμών, την ενεργοποίηση, την παραγωγή κυτταροκινών και τον πολλαπλασιασμό

τους, ο αριθμός των Β-κυττάρων που είχαν υποστεί ισοτυπική μεταστροφή είχε μειωθεί σημαντικά [192]. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε πως ICOS^{-/-} και ICOS-L^{-/-} διαγονιδιακά ζώα, είχαν παρόμοιο φαινότυπο (ελλατωματική δημιουργία βλαστικών κέντρων, μειωμένη χυμική απόκριση) [193], επιβεβαιώνοντας τον σημαντικό ρόλο του ICOS στην Τ-εξαρτώμενη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων, την ισοτυπική μεταστροφή και την δημιουργία Β-κυττάρων μνήμης [192].

Και στην περίπτωση του ICOS γονιδίου, ο ρόλος των μεταλλάξεων του στην παθογένεση ή το φαινότυπο της ΧΑΠ δεν έχει επίσης μέχρι σήμερα μελετηθεί.

3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ - TLR2 ΚΑΙ TLR4 ΣΤΗ ΧΑΠ

Όπως αναφέρθηκε, η μη ειδική ανοσία κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την ενίσχυση των μηχανισμών άμυνας του ξενιστή [10]. Σύμφωνα με πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας, διαπιστώθηκε πως η παρουσία γενετικών βλαβών του TLR4 γονιδίου (T399I) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της ΧΑΠ σε καπνιστές [194]. Παράλληλα, έχει γίνει εκτενής αναφορά όσον αφορά την συμμετοχή των TLR2 και TLR4 υποδοχέων, στην αιτιολογία πολλών νόσων του πνεύμονα [21].

Πίνακας 5: Οι μελέτες συσχέτισης των πολυμορφισμών TLR4-D299G, TLR4-T399I και TLR2-R753Q με την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

SNP	Συμμετέχοντες		Επίδραση	Μελέτη
	Ασθενείς	Υγιείς		
TLR4-D299G TLR4-T399I TLR2-R753Q	134	106	Ο TLR4-T399I συσχετίστηκε με 2.4 φορές υψηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη ΧΑΠ, αλλά όχι με το στάδιο της νόσου ή την συχνότητα των παροξύνσεων.	[194]
TLR2-R753Q	149	150	Ο TLR2-R753Q δεν σχετίζεται με την έναρξη ή την πορεία της ΧΑΠ.	[195]
TLR4-D299G TLR4-T399I	138	135	Οι TLR4 πολυμορφισμοί δεν έχουν καμία επίπτωση στην έναρξη ή την πορεία της νόσου	[196]
TLR4-D299G TLR4-T399I	152	444	Η συχνότητα του TLR4-D299G μειώνεται σε ασθενείς με ΧΑΠ υποδηλώνοντας ότι η LPS μεταγωγή σήματος μπορεί να είναι σημαντική για την ανάπτυξη της νόσου	[197]
TLR4-D299G		289 ^a	Ο πολυμορφισμός δεν έχει επίπτωση στην σοβαρότητα της ΧΑΠ σε επίπεδο πληθυσμού.	[198]

^a Οι συγγραφείς απέφυγαν να χαρακτηρίσουν τους συμμετέχοντες ως ασθενείς με ΧΑΠ και ονόμασαν τους συμμετέχοντες κάπνιστές.

Οι TLR2 και TLR4 υποδοχείς, εκφράζονται σε πλήθος κυττάρων (μονοκύτταρα, μακροφάγα και κυψελιδικά μακροφάγα, ουδετερόφιλα, σιτευτικά κύτταρα, βασεόφιλα, T-κύτταρα και B-κύτταρα) και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ένα μεγάλο εύρος αντιγονικών συνδετών, μολυσματικής προέλευσης (Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια) [199] ή μη (π.χ.υαλουρονάνη) [21]. Ωστόσο, υπάρχει μικρός αριθμός μελετών σχετικά με τις γενετικές βλάβες των TLR2 και TLR4 γονιδίων σε ασθενείς με ΧΑΠ, τα οποία συνοψίζονται στον **Πίνακα 5**.

Στην παρούσα μελέτη αναζητήθηκε επιπρόσθετα σε ασθενείς με ΧΑΠ η συμμετοχή παραλλαγών των *TLRs* σε συνδυασμό με βλάβες των γονιδίων της ειδικής ανοσίας *TACI* και *ICOS*.

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο ποσοτικός (μελέτη της έκφρασης) και ποιοτικός (παρουσία γενετικών βλαβών-παραλλαγών) χαρακτηρισμός των TAC1, BAFFR και ICOS υποδοχέων της ειδικής ανοσίας σε ασθενείς με ΧΑΠ, συγκριτικά με υγιή πληθυσμό. Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη ότι η ΧΑΠ μπορεί να είναι μια συστηματική νόσος, όπου η συμμετοχή ανοσιακών κυττάρων σχετίζεται με την σοβαρότητα της, θελήσαμε να μελετήσουμε τον φαινότυπο των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος στο περιφερικό αίμα των ασθενών σε διάφορα στάδια της νόσου (πάντα συγκριτικά με ομάδα υγιών μαρτύρων). Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη προηγούμενων αποτελεσμάτων του εργαστηρίου, όσον αφορά το ρόλο των *TLRs* στην εμφάνιση της ΧΑΠ, η μελέτη συμπεριέλαβε και την ανίχνευση μονήρων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των *TLR2* και *TLR4*, που μελετήθηκαν σε συνδυασμό με πολυμορφισμούς των γονιδίων *TNFRSF13B* και *ICOS*, για να διαπιστωθεί αν συρρέοντες παραλλαγές ανοσογονιδίων συμμετέχουν στην παθογένεση ή επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Τα άτομα που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης, ήταν εκατόν είκοσι τρεις (123) ασθενείς με ΧΑΠ, που προέρχονταν από τα Εξωτερικά Ιατρεία του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και τα Προγράμματα Σπιρομετρήσεων που διοργανώνει η Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στον ευρύτερο χώρο της Θεσσαλίας. Η συλλογή των δειγμάτων των ασθενών, έγινε κατά το χρονικό διάστημα: Ιανουάριος 2008 – Μάιος 2010. Όλα τα άτομα που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη υποβλήθηκαν σε έλεγχο από ειδικό πνευμονολόγο για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της διάγνωσης της ΧΑΠ, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της GOLD 2007 [4]. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκε ξηρό σπιρόμετρο (Koko Legend, Ferraris Louisville, CO, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες της American Thoracic Society (ATS) [200] και καταγράφηκαν τα σπιρομετρικά στοιχεία FEV₁, FVC, PEF και FEF_{25-75%}. Ως ασθενείς με ΧΑΠ θεωρήθηκαν τα άτομα με σπιρομέτρηση αποφρακτικού τύπου (FEV₁/FVC < 70%). Ο έλεγχος περιελάμβανε, επίσης, την εξέταση για παρουσία δύσπνοιας, βήχα και απόχρεμψης, καθώς και τη μέτρηση του εκατοστιαίου κορεσμού αιμοσφαιρίνης με οξυγόνο σε αρτηριακό αίμα (SatO₂). Η εκτίμηση της βαρύτητας της δύσπνοιας έγινε με βάση την MRC βαθμολόγηση. Στους πάσχοντες, καθορίστηκε το στάδιο της νόσου με βάση τον FEV₁. Επίσης, για όλους τους ασθενείς, έγινε καταγραφή του αριθμού των παροξύνσεων κατά την διάρκεια του τελευταίου έτους.

Στη μελέτη συμμετείχαν νυν ή πρώην καπνιστές ηλικίας άνω των 40 ετών, με κατώτερο όριο έκθεσης στο κάπνισμα, ένα πακέτο ημερησίως για 20 έτη (20 pack-years, yrs). Ως πρώην καπνιστές, ορίστηκαν όσοι είχαν διακόψει το κάπνισμα για διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους. Κριτήριο αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν το ιστορικό άσθματος ή ατοπίας, αυτοάνοσων νοσημάτων και καρκίνου. Σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη έγινε σχετική ενημέρωση από γιατρό της Πνευμονολογικής Κλινικής, ενώ παραλήφθηκε ενυπόγραφη συγκατάθεση, σύμφωνα με τη Συνθήκη του Ελσίνκι.

Ως ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκε υλικό εξήντα έξι (66) υγιών, μη-συγγενικών ατόμων του ευρύτερου πληθυσμού της Θεσσαλίας, τα οποία προέρχονταν από Κέντρα Ανοικτής Προστασίας Ηλικιωμένων (Κ.Α.Π.Η) Αργυροπουλίου και Δαμασίου, του Νομού Λάρισας. Τα άτομα αυτά, ήταν αντίστοιχης ηλικίας και φύλου (age- και sex-matched) και δεν εμφάνιζαν συμπτώματα της νόσου. Κριτήρια ένταξης υγιών ατόμων στην μελέτη, ήταν η απουσία λοίμωξης, νεοπλασίας, ατοπίας ή αυτοάνοσης εκδήλωσης. Παρόμοια με τους ασθενείς, σε όλα τα άτομα που συμπεριλήφθηκαν πραγματοποιήθηκε σχετική ενημέρωση

και ακόλουθη ενυπόγραφη συγκατάθεση. Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και των υγιών μαρτύρων συνοψίζονται στον **Πίνακα 6**.

Από τους ασθενείς με ΧΑΠ και τους υγιείς μάρτυρες συλλέχθηκε περιφερικό αίμα κατά την ένταξή τους στην μελέτη (V_0). Επιπρόσθετα, στην ομάδα των ασθενών η αιμοληψία επαναλήφθηκε 6 (V_1 - 56 ασθενείς) και 12 μήνες μετά (V_2 - 44 ασθενείς).

Πίνακας 6: Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και μαρτύρων.

Μεταβλητή	Ασθενείς	Μάρτυρες
No.	123	66
Ηλικία	68,4±9,5 (41-86)	69,5±10,7 (41-82)
Φύλο		
Άρρεν (n, %)	118 (95,9)	61 (92,4)
Θήλυ (n, %)	5 (4,1)	5 (7,6)
Πακέτα-έτη καπνίσματος (pys)	71,4±42,2	-
Καπνισματική συνήθεια ^β		
Ναι, n (%)	59 (49,6)	-
Όχι, n (%)	60 (50,4)	-
Στάδιο νόσου		
GOLD 1, n (%)	18 (14,6)	-
GOLD 2, n (%)	64 (51,2)	-
GOLD 3, n (%)	26 (21,1)	-
GOLD 4, n (%)	14 (12,1)	-
Αριθμός παροξύνσεων	1,02 (1-10)	-
Δείκτης μάζας σώματος, BMI (kg/m ²)	27,1±5,2	-
Εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή ^γ		
Ναι, n (%)	72 (62,1)	0 (0)
Όχι, n (%)	44 (37,9)	66 (100,0)

^α n (number), αριθμός ατόμων, ^β Η πληροφορία της καπνισματικής συνήθειας ήταν διαθέσιμη για 119 ασθενείς, ^γ Η πληροφορία της χρήσης των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών ήταν διαθέσιμη για 116 ασθενείς

2. ΥΛΙΚΑ

2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

α) Μονοκλωνικά αντισώματα

Στις κυτταρομετρικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε πληθώρα μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα χαρακτηριστικά τους αναγράφονται στους **Πίνακες 7-8**.

β) Λοιπά αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά

Στο σύνολο των διεργασιών που συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους **Πίνακες 9 και 10**, αντίστοιχα.

Πίνακας 7: Τα ιστοτυπικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό ασθενών και μαρτύρων.

mab	Φθορ ^α	Προέλευση	Αριθμός καταλόγου	Ισοτυπικό αντίσωμα για την ανίχνευση:
IgG _{2a} -K	PE	eBioscience, USA	12-4321-42	του TACI υποδοχέα
Fab-τμήματα ανοσοσφαιρινών	FITC	Dako, Denmark	X092901	του μορίου IgD
IgG ₁	PE	Beckman Coulter, USA	A07796	του BAFFR υποδοχέα
IgG ₁	PC5	Beckman Coulter, USA	A07798	του μορίου CD27
IgG ₁ /IgG ₁	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07794	αντιγόνων σημασμένων με διπλά FITC/PE αντισώματα

^αΦθοριόχρωμα

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη των επιφανειακών αντιγόνων.

Αντιγόνο	Κλώνος	Φθορ ^α	Προέλευση	Cat.No.	Περιγραφή	Κυτταρική κατανομή	B ^γ
CD45	J33	PC5	Beckman Coulter, USA	A07785	Ευοδώνει τη μεταβίβαση του μηνύματος του BcR και του TcR	Λευκοκύτταρα	[201,202]
CD3	UCHT1	PC5	Beckman Coulter, USA	A07749	Τμήμα του συμπλέγματος του TcR	Θυμοκύτταρα, T-κύτταρα	[203]
CD19	J3-119	FITC PE	Beckman Coulter, USA	A07768 A07769	Σχηματίζει σύμπλεγμα με τα CD21 και CD81, συνυποδοχέας στα B-κύτταρα	B-κύτταρα	[204]
CD5	BL1a	FITC	Beckman Coulter, USA	A08932	Συνδέτης του CD72	Θυμοκύτταρα, T-κύτταρα, υποπληθυσμοί των B-κυττάρων	[205]
CD27	1A4CD27	PC5	Beckman Coulter, USA	6607107	Προσδένεται στο CD70, συνδιεγέρτης των T- και B-κυττάρων	T-κύτταρα, μυελικά θυμοκύτταρα, υποπληθυσμό των B-κυττάρων	[206]
IgD	ΜΔ ^β	FITC	Dako, Denmark	F0059	Στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης μαζί με την IgM σε διαφοροποιημένα B-κύτταρα	B-κύτταρα	[207]
BAFFR	11C1	PE	BioLegend, USA	316906	Παίζει κομβικό ρόλο στην επιβίωση, την ομοιόσταση των B-κυττάρων	B-κύτταρα, ενεργοποιημένα T-κύτταρα	[106]
TACI	1A1	PE	BioLegend, USA	133403	Συμμετέχει στις T-ανεξάρτητες αποκρίσεις και την ισotypική μεταστροφή	B-κύτταρα, ενεργοποιημένα T-κύτταρα	[122]
CD3/CD4	UCHT1/ 13B8.2	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07733	CD4: Συνυποδοχέας των τάξης II MHC μορίων Υποδοχέας της gp120 του HIV-1	Υποπληθυσμοί θυμοκυττάρων, T – βοηθητικά, μονοκύτταρα-μακροφάγα	[208]
CD3/CD8	UCHT1/ B9.11	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07734	CD8: Συνυποδοχέας των τάξης I MHC μορίων	Υποπληθυσμοί θυμοκυττάρων, κυτταρολυτικά T-κύτταρα	[209,210]
CD45/CD14	Immu19.2/ RMO52	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07738	CD14: Υποδοχέας του συμπλέγματος LPS-LBP	Μυελομονοκύτταρα	[211]
CD3/CD19	UCHT1/ J3- 119	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07736	Βλέπε CD3, CD19	Βλέπε CD3, CD19	-
CD3/CD16.56	UCHT1/ 3G8, N901 (NKH1)	FITC/PE	Beckman Coulter, USA	A07735	Το CD16 είναι χαμηλής συγγένειας υποδοχέας της IgG, το CD56 είναι μόριο προσκόλλησης	CD16: ουδετερόφιλα, NK-κύτταρα, μακροφάγα, CD56: NK-κύτταρα, CD3/CD16.56: NK T-κύτταρα	[212,213]

^αΦθοριόχρωμα, ^βΜΔ: μη διαθέσιμο, ^γβιβλιογραφική αναφορά

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Αλβουμίνη βοδινού ορού	10x BSA	B9001S	New England Biolabs, USA
Νεφελομετρικός αντιορός	N Latex CardioPhase hsCRP Reagent	OQIY21	Siemens, Germany
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	E/0650DF/C17	Fischer Scientific, Eu
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A, Greece
Αραιωτικό διάλυμα	N Diluent D	OUMT65	Siemens, Germany
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, UK
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad, USA
Διάλυμα PBS	PBS	508002	INOVA Diagnostics, USA
Διάλυμα TBE	TBE 10x buffer	15581-028	Invitrogen,UK
Διάλυμα πλύσης	Buffer AW1	19081	Qiagen, Germany
Διάλυμα πλύσης	Buffer AW2	19072	Qiagen, Germany
Διάλυμα εκχύλισης	Elution Buffer AE	19077	Qiagen, Germany
Διάλυμα λύσης	Lysis Buffer AL	19075	Qiagen, Germany
Διάλυμα ελέγχου	N/T Protein Control SL/M	OQIO135	Siemens, Germany
Διάλυμα Novex TBE	Novex® TBE Running Buffer (5X)	LC6675	Invitrogen, UK
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	Rnase ZAP	AM9780	Ambion, USA
Διάλυμα λύσης	VersaLyse™ Lysing Solution	A09777	Beckman Coulter, USA
Διάλυμα Supplementary	N Supplementary Reagent/Precipitation	OUMU15	Siemens, Germany
Διάλυμα Diluent	N Diluent	OUMT 65	Siemens, Germany
Διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης	N Protein Standard SL	OQIM13	Siemens, Germany
Διάλυμα Tango	10x Buffer Tango	BY5	Fermentas, Germany
Διάλυμα παρεμπόδισης μη ειδικής σύνδεσης	Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction	X0903	Dako, Denmark
Διάλυμα NEB 2	10xNEBuffer 2 Restriction Endonuclease Buffer	B7002S	New England Biolabs, USA
Διάλυμα NEB 3	10x NEB Buffer 3 Restriction Endonuclease Buffer	B7003S	New England Biolabs, USA
Διάλυμα NEB 4	10x NEB Buffer 4 Restriction Endonuclease Buffer	B7004S	New England BioLabs, USA
Διάλυμα REACT 2	RE _{ACT} ® 2	16302-010	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	10bp DNA Ladder	10821-015	Invitrogen, UK

Πίνακας 9: (συνέχεια)

Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15622805	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder	12373-031	Invitrogen, UK
Νερό ελεύθερο Ρηασών	Ultra Pure Water	10977-015	Gibco, USA
Νεφελομετρικός αντιορός	N Latex IgG4	OPAU003	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	N Latex IgG3	OPAV03	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	N AS IgG2	OQXK09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	N AS IgG1	OQXI09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	IgM	OSAR09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	IgG	OSAS09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	IgA	OSAT09	Siemens, Germany
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dNTP set	10297-018	Invitrogen, UK
Περιοστική ενδονουκλεάση Btg I	Btg I Restriction Enzyme	R0608L	New England Biolabs, USA
Περιοστική ενδονουκλεάση Bve I	Bve I (BspMI) Restriction Enzyme	ER1741	Fermentas, Germany
Περιοστική ενδονουκλεάση Hinf I	Hinf I Restriction Enzyme	15223-019	Invitrogen, UK
Περιοστική ενδονουκλεάση Sfc I	Sfc I Restriction Enzyme	R0561L	New England BioLabs, USA
Περιοστική ενδονουκλεάση Nco I	Nco I Restriction Enzyme	ER0571	Fermentas, Germany
Περιοστική ενδονουκλεάση Mnl I	Mnl I Restriction Enzyme	R0163L	New England Biolabs, USA
Πολυακρυμίδη	20% TBE Gels 1.0 mm, 15 well	EC63155BOX	Invitrogen, UK
Πολυμεράση Taq	Taq DNA polymerase	18038-042	Invitrogen, UK
Πρωτεΐνάση	Qiagen Protease	19131	Qiagen, Germany
Φορμαλδεΰδη	Formaldehyde, solution 37%	FO0011	Scharlau, Spain
Φυσιολογικός ορός αρουραίου	Normal Rat Serum	24-5555	eBioscience, USA
Χρωστική	10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer	10816-015	Invitrogen, UK
DNA kit	QiAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Germany
PCR kit	Taq PCR Master Mix Kit	201445	Qiagen, Germany

Πίνακας 10: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Βαθμονομημένη πιπέτα 10 mL	10 mL pipette, sterile	161010	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 2 mL	2 mL pipette, sterile	160210	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 25 mL	25 mL pipette, sterile	162510	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 5 mL	5 mL pipette, sterile	160510	Bioline, Israel
Κυβέτες φωτομέτρου	Uvette 220-1600 nm	9520010051	Eppendorf, UK
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518	Corning, USA
Μπουκάλι 125 mL	Sterile squared Media Bottle 125 mL	2019-0125	Nalgene, Denmark
Μπουκάλι 250 mL	250 mL Storage bottles	430281	Corning, USA
Μπουκάλι 500 mL	500 mL Storage bottles	430282	Corning, USA
Ρύγχη πιπέτας 10 µL	10 µL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100 µL, με φίλτρο	100 µL sterilised filter tips	DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 µL	1000 µL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 µL	200 µL sterilised tips	D200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 µL, με φίλτρο	200 µL sterilised filter tips	DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 30 µL, με φίλτρο	30 µL sterilised filter tips	DF30ST	Gilson Inc, USA
Σωληνάρια πολυστυρενίου 5 mL	FACS tube, EasySep	3520105	Stem Cell Techn, Canada
Σωληνάρια γενικής αίματος	VACUETTE® EDTA tubes	454087	Vacurette, USA
Σωληνάριο ορού	Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST)	367954	BD Vacutainer, USA
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	6571	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

3.1. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην μέτρηση του πρόσθιου (Forward scatter, FS) και του πλάγιου σκεδασμού (Side scatter, SS) των κυττάρων, ώστε να χαρακτηριστεί το μέγεθος και η κοκκίωσή τους, αντίστοιχα. Επίσης, η χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (σημασμένα με φθοριοχρώματα) που προσδένονται σε συγκεκριμένους αντιγονικούς καθοριστές στην επιφάνεια των κυττάρων, κατέστησε δυνατό το χαρακτηρισμό συγκεκριμένων πληθυσμών. Στην διαδικασία αυτή, ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων με επικείμενη λύση τους, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός των λευκοκυττάρων στο κυτταρόμετρο.

3.1.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ TNFRSF13B/TAC1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Ο κυτταρομετρικός προσδιορισμός του TAC1/TNFRSF13B υποδοχέα έγινε με την χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων έπειτα από προεργασία κάθε δείγματος. Συγκεκριμένα, σε ειδικά σωληνάρια πολυστυρενίου εναποτέθηκαν έως 10^6 κύτταρα περιφερικού αίματος και 1mL διαλύματος λύσης VersaLyse. Με την χρήση του VersaLyse εφαρμόστηκε μια γρήγορη και ήπια λύση των ερυθρών, που δεν επηρεάζει την λειτουργία των λεμφοκυττάρων και διατηρεί την ακεραιότητα της κυτταρικής επιφάνειας (απαραίτητη προϋπόθεση για την μελέτη των κυττάρων σε κυτταρομετρητή ροής). Ο λόγος που η λύση των ερυθρών καθίσταται απαραίτητη σε όλες τις διαδικασίες της κυτταρομετρίας είναι διότι ο σίδηρος (Fe) της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών φθορίζει δίνοντας μη ειδικό σήμα. Μετά από ανάδευση (vortex) του παρασκευάσματος, ακολούθησε επώαση σε RT για τουλάχιστον 10min μετά το πέρας των οποίων το άνω μίγμα, φυγοκεντρήθηκε στις 1600rpm για 5min με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύματος λύσης. Ακολούθησε μια πλύση με διάλυμα 1xPBS στις 1600rpm για 5min και στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο ορός αρουραίου 3%, στους 4-6°C για 15min, ώστε να παρεμποδιστούν μη ειδικές συνδέσεις των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Έπειτα, προστέθηκαν τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (eBioscience, BioLegend, Beckman Coulter). Συγκεκριμένα, στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκε το ισουπικό αντίσωμα Rat IgG_{2a}-PE, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας το αντίσωμα Rat anti-human TAC1/CD267-PE. Και στα δύο σωληνάρια, χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD19-FITC και CD45-PC5. Ακολούθησε επώαση 15min σε RT στο σκοτάδι και μια τελευταία έκπλυση με 1xPBS στις 1600rpm για 5min, όπως παραπάνω. Μετά την τελική φυγοκέντρηση, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1mL 1%FA-PBS, ώστε να γίνει μονιμοποίηση της σύνδεσης των

αντισωμάτων. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) με το πρόγραμμα CXP software version 2.0.

3.1.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ BAFF ΥΠΟΔΟΧΕΑ (BAFFR)

Για την ανίχνευση του BAFFR υποδοχέα, χρησιμοποιήθηκε ένα σωληνάριο ελέγχου και ένα σωληνάριο δοκιμασίας και τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα. Συγκεκριμένα, στο σωληνάριο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το ισοτυπικό αντίσωμα Rat IgG1-PE, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Rat BAFFR-PE/CD268. Και στα δύο σωληνάρια προστέθηκε το αντίσωμα CD19-FITC και το CD3-PC5. Στη συνέχεια σε κάθε σωληνάριο, προστέθηκαν έως 10^6 κύτταρα περιφερικού αίματος, ακολούθησε ανάδευση και επώασή τους για 15min σε RT στο σκοτάδι. Τέλος, έγινε λύση των ερυθροκυττάρων στο COULTER® TQ-Prep™ Workstation (Beckman Coulter) και ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο.

3.1.3. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Οι παραπάνω αναλύσεις έγιναν σε συνδυασμό με πλήρη ανοσοφαινοτυπική μελέτη των κυττάρων του περιφερικού αίματος. Αρχικά, προσδιορίστηκε ο αριθμός τους, με αδρή διάκριση των υποπληθυσμών τους στον αιματολογικό αναλυτή MD-II Hematology Analyzer (Beckman/Coulter) και στην συνέχεια, προστέθηκαν τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα στα αντίστοιχα σωληνάρια. Συγκεκριμένα, για τον χαρακτηρισμό των βοηθητικών ($CD4^+$) και των κυτταροτοξικών ($CD8^+$) T-κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα, τα αντισώματα CD3-FITC/CD4-PE και CD3-FITC/CD8-PE. Για τον χαρακτηρισμό των μονοκυττάρων και των B-κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα, τα αντισώματα CD45-FITC/CD14-PE και CD3-FITC/CD19-PE. Τέλος, με την χρήση των CD3-FITC/CD16.56-PE αντισωμάτων έγινε χαρακτηρισμός των NK-κυττάρων. Στη συνέχεια σε κάθε σωληνάριο, προστέθηκαν έως 10^6 κύτταρα περιφερικού αίματος, ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15min σε RT στο σκοτάδι και λύση των ερυθροκυττάρων. Τα δείγματα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο όπως παραπάνω.

3.1.4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την ανίχνευση παρθένων (naïve), μη μετεστραμένων (non-switched) και B-κυττάρων μνήμης (memory), χρησιμοποιήθηκαν τα IgD και CD27 μονοκλωνικά αντισώματα. Τους IgD^+CD27^- πληθυσμούς χαρακτηρίζουν τα παρθένα B-κύτταρα, τους IgD^+CD27^+ χαρακτηρίζουν τα μη μετεστραμένα (memory-non-switched) B-κύτταρα μνήμης, ενώ τους IgD^-CD27^+ χαρακτηρίζουν τα B-κύτταρα μνήμης, που έχουν υποστεί ισοτυπική μεταστροφή [214]. Αρχικά, σε 2 σωληνάρια RIA εναποτέθηκαν έως 10^6 κύτταρα

περιφερικού αίματος, τα οποία εναιωρήθηκαν σε 1mL διαλύματος λύσης VersaLyse για 10min σε RT. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1600rpm για 5min, ενώ μετά το πέρας αυτής τα δείγματα επαναιωρήθηκαν σε 4mL 1xPBS. Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 1600rpm για 5min και απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Negative control Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal) για 20min στους 37°C, ώστε να αποφευχθούν μη ειδικές συνδέσεις. Έπειτα, αφού προστέθηκε και στα δύο σωληνάρια το CD19-PE, στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκαν τα αντισώματα Fab-FITC και το ισotyπικό IgG1-PC5, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας, τα αντισώματα Rabbit anti-Human IgD-FITC και CD27-PC5. Ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15min στους 4°C και μια τελευταία έκπλυση με 1xPBS στις 1600rpm για 5min, όπως παραπάνω. Μετά την τελική έκπλυση, το ίζημα επαναιώρηθηκε σε 1mL διαλύματος 1%FA-PBS.

Παράλληλα, για την ανίχνευση του CD5⁺ υποπληθυσμού των B-κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν 2 δοκιμαστικά σωληνάρια, όπου στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκε το αντίσωμα IgG1-FITC/IgG1-PE, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας τα αντισώματα CD5-FITC και CD19-PE. Παρόμοια με τις παραπάνω εξωκυττάρειες χρώσεις, ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15min σε RT και λύση των ερυθροκυττάρων με 1mL VersaLyse.

3.2. ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM και υποτάξεων της IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) καθώς και προσδιορισμός της CRP. Η νεφελομετρία, είναι μια εξαιρετικά ακριβής μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραπάνω, και πραγματοποιήθηκε με την χρήση κατάλληλων αντιορών, αφού πρώτα στα δείγματα έγινε αυτόματα αρχική αραιώση με ειδικό διάλυμα (N Diluent D).

Ο νεφελομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα διάφορα βιολογικά υγρά, στηρίζεται στη σχέση της τελευταίας με την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός από τα συμπλέγματα που σχηματίζονται μεταξύ της πρωτεΐνης (αντιγόνου) και του προστιθέμενου αντίστοιχου αντισώματος. Συγκεκριμένα, τα συμπλέγματα αυτά, «διασκορπίζουν» μια δέσμη φωτός που διαπερνά το δείγμα προς ανάλυση, όπου η ένταση του είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα αξιολογείται έπειτα από σύγκριση με μια γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνη [215].

Η διαδικασία απομόνωσης ορού, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα τεχνική περιλάμβανε λήψη περιφερικού αίματος σε ειδικά σωληνάρια και φυγοκέντρηση στις 3500rpm για 5min, ενώ τα δείγματα ορού που ελήφθησαν, αποθηκεύτηκαν άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Τα δείγματα ορού έπειτα από την απόψυξή τους και πριν την χρήση τους, παρέμειναν στους 4°C για 2-4h και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ειδικά διάφανα σωληνάρια RIA.

Η καμπύλη αναφοράς (reference curve), βάσει της οποίας γίνεται ο νεφελομετρικός προσδιορισμός, σχηματίζεται ως συνάρτηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός (Is) και της γνωστής συγκέντρωσης της υπό εξέταση πρωτεΐνης (c) στα πρότυπα διαλύματα (standards). Συγκεκριμένα, η καμπύλη αναφοράς προκύπτει με βαθμονόμηση πολλαπλού-σημείου έπειτα από διαδοχικές αραιώσεις μιας πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης (N Protein Standard SL). Μετά την δημιουργία καμπύλης αναφοράς, γίνεται εσωτερικός έλεγχος ποιότητας με την χρήση των N/T Protein Controls SL/M, τα οποία αναλύονται και εκτιμώνται όπως αναλύονται και τα δείγματα των ασθενών.

3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από άμεσα ληφθέν περιφερικό αίμα, σε σωληνάρια γενικής αίματος με αντιπηκτικό K₃EDTA, με την χρήση του QiAamp DNA Blood Mini Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen). Αρχικά, σε ειδικό σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1,5mL, εναποτέθηκαν 20μL Qiagen πρωτεάσης. Σκοπός του ενζύμου αυτού, είναι η απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών προσδεμένων στο DNA, μέσω της πέψης πεπτιδικών δεσμών σε αλειφατικά, αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα. Στο ίδιο σωληνάριο, προστέθηκαν 200μL δείγματος (περιφερικό αίμα) και 200μL διαλύματος λύσης (Buffer AL), το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Qiagen). Μετά από ανάδευση (vortex) του παρασκευάσματος, ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 20min και στη συνέχεια προστέθηκαν 200μL απόλυτης αιθανόλης 96-100%. Το άνω μίγμα, εναποτέθηκε σε ειδική στήλη (QiAamp Spin Column) και φυγοκεντρήθηκε στις 8000rpm για 1min. Ακολούθησαν 2 πλύσεις της στήλης με τα διαλύματα AW1 και AW2 στις 8000rpm για 1min και 14000rpm για 3min, αντίστοιχα. Τα διαλύματα αυτά μέσω των αλάτων τους, προκαλούν αλλαγή του pH ώστε να διασφαλίσουν την απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων υλικών που πιθανόν να παρεμποδίσουν την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η βελτίωση της ποιότητας του DNA. Έπειτα, αφού προστέθηκαν σε κάθε στήλη 100μL διαλύματος εκχύλισης AE (Elution Buffer), ακολούθησε επώαση 1min και τελική φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 1min. Η

συγκέντρωση του DNA ήταν περίπου 50-200ng/μL. Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν μέχρι την χρήση τους σε βαθιά κατάψυξη (-80°C)

3.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

3.4.1. *TNFRSF13B/TACI*

3.4.1.1. PCR ΓΙΑ ΤΙΣ V220A, P251L ΚΑΙ C104R ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ

Η ανίχνευση των P251L, V220A και C104R παραλλαγών, οι οποίες είναι και οι συχνότερες γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *TACI* στον Ελληνικό χώρο, έγινε με AS-PCR ακολουθούμενη από RFLP. Με τη συγκεκριμένη τεχνική έγινε αρχικά ενίσχυση τμήματος DNA του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*, στο οποίο εμπεριέχονται οι παραπάνω γενετικές παραλλαγές. Ωστόσο, η αλληλουχία του DNA στη θέση όπου ανιχνεύονται οι V220A και C104R παραλλαγές, δεν περιελάμβανε θέσεις πέψης για κανένα ένζυμο περιορισμού. Κατά συνέπεια, χρειάστηκε ειδικός σχεδιασμός και τροποποίηση του πρόσθιου ή του οπίσθιου εκκινητή στο 3' άκρο του, κατά περίπτωση, με στόχο τη δημιουργία αλληλουχίας πέψης από κατάλληλο ένζυμο περιορισμού παρουσία της παραλλαγής. Η συγκεκριμένη τροποποίηση δεν εμπόδιζε τη σύνδεση του εκκινητή στην αλληλουχία του DNA, δεδομένου ότι δεν αφορά την τελευταία βάση του. Στον **Πίνακα 11**, παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών του *TACI*.

Πίνακας 11: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών του *TACI*. Υπογραμμισμένες φαίνονται οι βάσεις που αντικαταστάθηκαν ενώ σε παρένθεση οι βάσεις που τοποθετήθηκαν στην θέση τους ώστε να δημιουργηθεί η αλληλουχία πέψης παρουσία της παραλλαγής.

Γενετική παραλλαγή	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μήκος (bp)	
C104R	Πρόσθιος	TACI-3S	ATCAAAATgCAATgCAgCTAAA	22
	Οπίσθιος	ExC104R	gCTCCTgAgCTTgTTC(C)ICAC	20
V220A & P251L	Πρόσθιος	TACI-33544	ACgCgATggAAgCCggCAgC(A)CCTg	24
	Οπίσθιος	TACI-33772	CATTTATgCACCTgggCCCCCCTC	24

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μίγματος ήταν 30μL και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη), 1,5mM

MgCl₂, 62.5μM από κάθε dNTP, 20 pmoles από κάθε εκκινητή (Thermo Fisher Scientific), 0,8u Taq-πολυμεράση, 100-200ng DNA και αποστειρωμένο H₂O. Οι συνθήκες των αντιδράσεων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης φαίνονται στον **Πίνακα 12**.

Πίνακας 12: Οι συνθήκες της PCR για την ανίχνευση των V220A, P251L και C104R.

Στάδιο	Γενετική παραλλαγή			
	V220A & P251L		C104R	
	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	2min	94°C	30sec
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	30sec	94°C	30sec
Υβριδισμός (Annealing)	68°C	30sec	55°C	30sec
Επέκταση (Extension)			72°C	45sec
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5min	72°C	5min
Κύκλοι	30		32	

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβανόταν ένα σωληνάριο μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank), έτσι ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων.

3.4.1.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ V220A, P251L ΚΑΙ C104R ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Για την ανίχνευση της V220A παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *Bve* I (BspMI), το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E.coli* που φέρει το *bve*I γονίδιο, που προέρχεται από το πρωτεοβακτήριο *Brevundimonas vesicularis*. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου *Bve* I παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 10xBuffer Tango, το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Fermentas).

Αντίστοιχα, για την ανίχνευση της P251L παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *Mnl* I, το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το *Mnl*I γονίδιο που προέρχεται από το μικροοργανισμό *Moraxella nonliquefaciens*. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου *Mnl* I παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 2 και 10xBSA. Η χρησιμότητα της BSA πρωτεΐνης

έγκειται αφενός στην παρεμπόδιση της προσκόλλησης του ενζύμου στα σωληνάρια ή άλλες επιφάνειες (π.χ ρύγχη πιπετών), αφετέρου στην σταθεροποίηση των πρωτεϊνών της αντίδρασης.

Για την ανίχνευση της C104R παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *Btg I*, το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το *BtgI* γονίδιο που προέρχεται από το μικροοργανισμό *Bacillus thermoglucosidasius*. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου *Btg I*, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 3. Τα παραπάνω ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, οι οποίες φαίνονται στον **Πίνακα 13**.

Πίνακας 13: Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των V220A, P251L και C104R παραλλαγών και η αλληλουχία που αυτά αναγνωρίζουν. Όπου R: A ή G, Y: C ή T, N: A, G, C ή T.

Γενετική παραλλαγή	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης
C104R	BtgI	5'...C [▼] CRYGG...3' 3'...GGYRC [▲] C...5'
V220A	BveI (BspMI)	5'...ACCTGC(N) ₄ [▼] ...3' 3'...TGGACG(N) ₆ [▲] ...5'
P251L	MnII	5'...CCTC(N) ₇ [▼] ...3' 3'...GGAG(N) ₆ [▲] ...5'

Συγκεκριμένα, σε ένα φυσιολογικό δείγμα, ως προς την V220A παραλλαγή, το ένζυμο *Bve I* αναγνώρισε μια φορά την αλληλουχία, η οποία υπήρχε φυσιολογικά στο τμήμα που ενισχύεται, με αποτέλεσμα να προκύψουν τα προϊόντα πέψης μήκους 192bp και 60bp. Σε ένα ετερόζυγο δείγμα, το ένζυμο εκτός από την καθορισμένη αλληλουχία αναγνώρισε και αυτή που δημιουργήθηκε στην θέση του πρόσθιου εκκινήτη παρουσία του V220A με αποτέλεσμα να προκύψουν τα προϊόντα πέψης μήκους 192bp, 60bp, 31bp και 29bp. Τέλος, σε ένα ομόζυγο δείγμα προέκυψαν τα προϊόντα πέψης 192bp, 31bp και 29bp. Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 12-24h σε υδατόλουτρο. Τα αποτελέσματα έγιναν ορατά έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε προπαρασκευασμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης 20% TBE χρησιμοποιώντας κάθετη συσκευή XCell *SureLock* Mini-Cell. Οι συνθήκες, στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι ηλεκτροφορήσεις των δειγμάτων ήταν 200V και 10-18mA για 2h. Τέλος, η σήμανση των δεσμών στην πηκτή έγινε έπειτα από ανάδευση της για 30min σε διάλυμα Novex TBE που περιείχε βρωμιούχο αιθύδιο σε

συγκέντρωση 0,5μg/mL. Η φωτογράφιση της πηκτής έγινε υπό υπεριώδες φως, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μοριακών βαρών τον 10bp DNA Ladder.

Αναφορικά με την P251L, σε ένα φυσιολογικό άτομο, δεν υπήρχε η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο *Mnl* I, με αποτέλεσμα να προκύψει ένα μοναδικό προϊόν μήκους 252bp. Σε ένα ετερόζυγο, προκύπτει το προϊόν μήκους 252bp και δύο επιπρόσθετων τμημάτων 134bp και 118bp. Τέλος, σε ένα ομόζυγο, προκύπτουν τα προϊόντα πέψης 134bp και 118bp. Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε στους 37°C για περίπου 2h, ενώ τα αποτελέσματα έγιναν ορατά σε πηκτή αгарόζης 2% TBE. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση ήταν 120V και 400mA, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μοριακών βαρών τον E-Gel Low Range Ladder (100-2000bp).

Τέλος, στο φυσιολογικό για την C104R δείγμα, προέκυψε μια δέσμη μήκους 337bp, που αντιστοιχεί στο τμήμα ενίσχυσης της PCR. Σε ένα ετερόζυγο, προέκυψε το προϊόν 337bp και δύο επιπρόσθετα προϊόντα πέψης μήκους 316bp και 22bp, ενώ σε ένα ομόζυγο μόνο τα προϊόντα 316bp και 22bp. Για την ανίχνευση της C104R πραγματοποιήθηκε πέψη στους 37°C για περίπου 4h, ενώ σε πηκτή αгарόζης ήταν ορατή μόνο η δέσμη των 316bp. Η ανάλυση των προϊόντων πέψης έγινε σε πηκτή αгарόζης 3% TBE, όπως παραπάνω, ενώ οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση και ο μάρτυρας μοριακών βαρών ήταν παρόμοια με αυτά της P251L παραλλαγής.

3.4.2. TLR2 ΚΑΙ TLR4

3.4.2.1. PCR ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ D299G, T399I ΤΟΥ TLR4

Η ανίχνευση των πολυμορφισμών *TLR4*-D299G και *TLR4*-T399I, έγινε με AS-PCR ακολουθούμενη από RFLP ανάλυση, όπως περιγράφεται από τους Lorenz και συν. [216]. Με τη συγκεκριμένη τεχνική έγινε αρχικά ενίσχυση PCR τμήματος DNA που περιέχει τον κάθε πολυμορφισμό και ακολούθησε πέψη του προϊόντος με ειδικό ένζυμο περιορισμού. Ωστόσο, παρόμοια με τις παραλλαγές του *TAC1/TNFRSF13B*, στην θέση όπου εμφανίζονται οι πολυμορφισμοί του *TLR4* που μελετήθηκαν, δεν προκύπτουν θέσεις πέψης για κανένα ένζυμο περιορισμού. Κατά συνέπεια, όπως παραπάνω, έγινε ειδικός σχεδιασμός και τροποποίηση των πρόσθιων εκκινητών στο 3' άκρο τους, με στόχο τη δημιουργία αλληλουχίας πέψης από το αντίστοιχο, για κάθε πολυμορφισμό, ένζυμο περιορισμού. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των D299G και T399I πολυμορφισμών φαίνονται στον **Πίνακα 14**.

Πίνακας 14: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των D299G και T399I πολυμορφισμών του TLR4. Υπογραμμισμένες φαίνονται οι βάσεις που αντικαταστάθηκαν, ενώ σε παρένθεση οι βάσεις που τοποθετήθηκαν στην θέση τους ώστε να δημιουργηθεί η αλληλουχία πέψης παρουσία της παραλλαγής.

Πολυμορφισμός	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μήκος (bp)	
D299G	Πρόσθιος	299S	gATTAgCATACTTAgACTACTACCTg(C)ATg	30
	Οπίσθιος	299AS	gATCAACTTCTgAAAAAAgCATTCCCAC	27
T399I	Πρόσθιος	399F	ggTTgCTgTTCTCAAAGTgATTTTgggA <u>C</u> (g)AA	31
	Οπίσθιος	399R	ACCTgAAgACTggAgAgTgAgTTAAATgCT	30

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μίγματος ήταν 30μL και περιείχε το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα, 1,5mM MgCl₂, 62,5μM από κάθε dNTP, 20 pmoles από κάθε εκκινητή, 0,8u Taq-πολυμεράση και 100-200ng DNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR, οι οποίες ήταν όμοιες για τους πολυμορφισμούς του TLR4 που εξετάστηκαν, φαίνονται στον **Πίνακα 15**.

Πίνακας 15: Οι συνθήκες της PCR για την ανίχνευση των D299G και T399I πολυμορφισμών του TLR4.

Στάδιο	Πολυμορφισμός D299G & T399I	
	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	2min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	30sec
Υβριδισμός (Annealing)	57°C	30sec
Επέκταση (Extension)	72°C	45sec
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5min
Κύκλοι	32	

3.4.2.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ D299G ΚΑΙ T399I ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Για την ανίχνευση του D299G πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού Nco I, το οποίο απομονώνεται το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το NcoI γονίδιο από τον μικροοργανισμό *Nocardia coralline*. Για την πέψη 6μL προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 2,5u του ενζύμου Nco I παρουσία του ρυθμιστικού

διαλύματος 10xBuffer Tango, το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Fermentas). Η αντίδραση πέψης έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2h.

Αντίστοιχα, για την ανίχνευση του T399I πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *Hinf* I, το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το *Hinfl* γονίδιο από το μικροοργανισμό *Haemophilus influenzae*. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 2,5u του ενζύμου *Hinf* I, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, RE_{ACT}[®] 2. Παρόμοια με τον D299G, η αντίδραση πέψης έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2h. Στον **Πίνακα 16** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα παραπάνω ένζυμα.

Αναλυτικά, σε φυσιολογικό δείγμα, ως προς τον D299G πολυμορφισμό, δεν παρατηρήθηκε πέψη των προϊόντων PCR, οπότε ανιχνεύθηκε μόνο ένα τμήμα προϊόντος στα 249bp. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού προκύπτουν τρία τμήματα, ένα στα 249bp και άλλα δύο, στα 218bp και 26bp. Το τελευταίο τμήμα, λόγω μικρού μεγέθους, δεν ήταν ορατό σε συνήθεις πηκτές αγαρόζης, αλλά μόνο σε πηκτές ακρυλαμίδης. Τέλος, σε ομοζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού προέκυψαν μόνο οι δέσμες των 218bp και 26bp, ενώ σε πηκτική αγαρόζης ήταν ορατή μόνο η δέσμη των 218bp. Η ανάλυση των προϊόντων πέψης έγινε σε πηκτική αγαρόζης 2% TBE, όπως παραπάνω.

Πίνακας 16: Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των D299G και T399I πολυμορφισμών του TLR4 και η αλληλουχία που αυτά αναγνωρίζουν. Όπου N: A, G, C ή T.

Γενετική παραλλαγή	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης
D299G	Nco I	5'...CCATGG...3' 3'...GGTACC...5'
T399I	Hinf I	5'...GANTC...3' 3'...CTNAG...5'

Όσον αφορά τον T399I πολυμορφισμό, σε φυσιολογικό δείγμα δεν έγινε πέψη των προϊόντων PCR, οπότε προέκυψε μόνο ένα τμήμα προϊόντος στα 407bp. Σε ετερόζυγο δείγμα προκύπτουν τρία τμήματα, ένα στα 407bp και άλλα δύο, που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης του πολυμορφικού αλληλίου, στα 375bp και στα 29bp. Τέλος, σε ομόζυγο, προκύπτουν τα τμήματα των 375bp και 29bp, ενώ σε πηκτική αγαρόζης είναι ορατή μόνο η δέσμη των 375bp. Παρόμοια με τον πολυμορφισμό D299G, η τελευταία δέσμη δεν ήταν ορατή σε συνήθεις πηκτές αγαρόζης, αλλά μόνο σε πηκτές ακρυλαμίδης. Η αντίδραση

πέψης έγινε σε υδατόλουτρο, στους 37°C για 2h και η ανάλυση των προϊόντων πέψης σε πηκτική αгарόζης 2% TBE.

3.4.2.3. PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ R753Q ΤΟΥ *TLR2*

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού R753Q πραγματοποιήθηκε με πρωτόκολλο PCR-RFLP. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά σχεδιάστηκαν από τους Schröder και συν., [217] και φαίνονται στον **Πίνακα 17**.

Πίνακας 17: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με σκοπό την ανίχνευση του R753Q πολυμορφισμού του *TLR2*.

Εκκινητής	Αλληλουχία των εκκινητών (5'-3')	Μήκος (bp)
Πρόσθιος	TLR2F TATggTCCAggAGCTggAgA	20
Οπίσθιος	TLR2R TgACATAAAgATCCCAACTAgACAA	25

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μείγματος ήταν 30μL και περιείχε το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR buffer, 1,5mM MgCl₂, 62.5μM από κάθε dNTP, 20 pmoles από κάθε εκκινητή, 0,8u Taq-πολυμεράση και 100-200ng DNA. Η αντίδραση PCR διεξαγόταν σε 34 κύκλους, μετά από αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 2 min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec, υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 64°C για 30 sec και σύνθεση-επέκταση νέων αλύσων DNA με τη δράση της Taq-πολυμεράσης στους 72°C για 45sec. Η τελική φάση επέκτασης, μετά την ολοκλήρωση των 38 κύκλων, διαρκούσε 5 min στους 72 °C.

3.4.2.4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ R753Q ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Για την ανίχνευση του R753Q πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *Sfc I*, το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το *SfcI* γονίδιο από τον *Streptococcus faecium*. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 0,15u του ενζύμου *Sfc I*, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 4 και 10xBSA στους 37°C για 12-24h. Στην **Εικόνα 12** παρουσιάζεται η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο.



Εικόνα 12: Η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο *SfcI* και η θέση πέψης (βέλη). Όπου R: A ή G, Y: C ή T, N: A, G, C ή T.

Αναλυτικά, σε φυσιολογικό δείγμα ανιχνεύθηκε μόνο ένα τμήμα προϊόντος PCR μήκους 430bp. Σε ετεροζυγώτες φορείς του R753Q, ανιχνεύθηκε ένα τμήμα 430bp και επιπρόσθετα τμήματα μήκους 307bp και 123bp ενώ, σε ομοζυγώτες ανιχνεύθηκαν μόνο τα τμήματα των 307bp και 123bp. Τα αποτελέσματα της PCR-RFLP έγιναν ορατά έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% TBE, όπως παραπάνω.

3.4.3. ICOS

3.4.3.1. PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΛΛΕΙΨΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ICOS

Για την ανίχνευση των ελλείψεων του γονιδίου *ICOS* ενισχύθηκε συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους 2,914 bp, στην οποία περιλαμβάνονταν μέρος του ιντρονίου 1, το εξώνιο 2, το ιντρόνιο 2, το εξώνιο 3 και μέρος του ιντρονίου 3. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση έχουν προηγουμένα δημοσιευθεί από τους Grimbacher και συν., [192] και φαίνονται στον **Πίνακα 18**.

Πίνακας 18: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση ανίχνευσης ελλείψεων του γονιδίου *ICOS*.

	Εκκινητής	Αλληλουχία των εκκινητών (5'-3')	Μήκος (bp)
Πρόσθιος	ICOS-LS	TggggCTTTATCTTTATTATCAgg	24
Οπίσθιος	ICOS-LAS	TggggCgCTATCTCATTCTCT	20

Η αντίδραση έγινε με την βοήθεια ενός προπαρασκευασμένου διαλύματος που περιέχει Taq DNA πολυμεράση, PCR Buffer και dNTPs σε βελτιστοποιημένες συγκεντρώσεις. Το Taq PCR Master Mix Kit παρέχει μια τελική συγκέντρωση 1,5 mM MgCl₂ και 200μM κάθε dNTP Και συμβάλει στην ενίσχυση προϊόντων PCR μεγάλου μεγέθους το οποίο μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 7.3kb. Για κάθε αντίδραση ο όγκος του μίγματος ήταν 30μL και περιείχε 15μL του προπαρασκευασμένου Taq PCR Master Mix διαλύματος, 10pmoles από κάθε εκκινητή, 100-200ng DNA και H₂O. Η αντίδραση διεξαγόταν σε 36 κύκλους, μετά από αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη (denaturation) στους 94°C για 45sec, σύζευξη (annealing) των εκκινητών

στους 55°C για 40sec και δράση της Taq στους 68°C για 3:30min. Στο τέλος των 36 κύκλων έγινε τελική επέκταση στους 68°C για 5min.

Αναλυτικά, σε ένα φυσιολογικό δείγμα, κατά την αντίδραση PCR ενισχύθηκε όλη η αλληλουχία του τμήματος του γονιδίου *ICOS* συνολικού μήκους 2,914 bp. Σε δείγμα με ετερόζυγη έλλειψη των τμημάτων του γονιδίου (ιντρονίο 1, εξώνιο 2, ιντρόνιο 2, εξώνιο 3, μέρος ιντρονίου 3), αναμενόταν το φυσιολογικό τμήμα των 2,914bp και μια μικρότερου μήκους καθορισμένη αλληλουχία 1,099bp. Τέλος, σε ομόζυγο δείγμα αναμενόταν μόνο το τμήμα των 1,099bp. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης έγιναν ορατά έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% TBE, όπως παραπάνω.

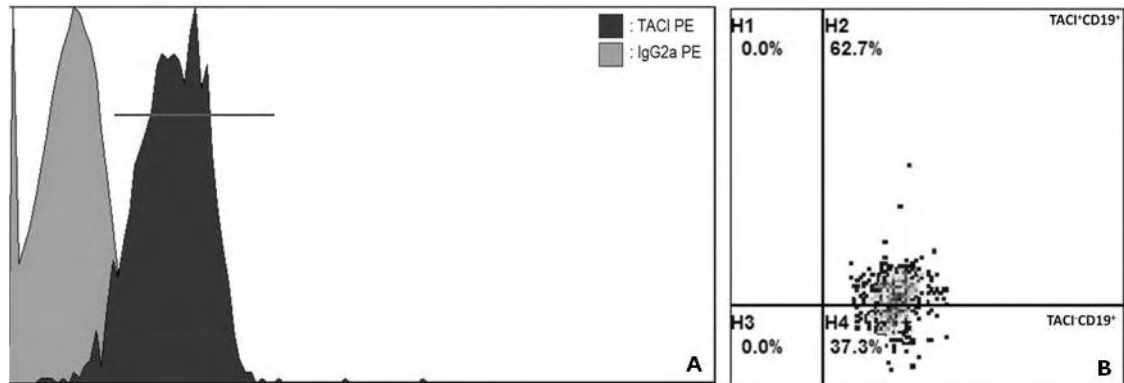
3.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η χ^2 (*chi-square*) ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκριθούν οι συχνότητες των αλληλίων μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Όπου χρειάστηκε, χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος Fisher. Η αναζήτηση συσχέτισης ανάμεσα στη ΧΑΠ και την παρουσία των παραλλαγών που εξετάστηκαν έγινε με τη χρήση της μονοπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης (*univariate logistic regression*). Κατά τον ίδιο τρόπο διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχετίσεων της παρουσίας των παραλλαγών και με άλλες μεταβλητές. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος αναλογιών (*odds ratio, OR*) με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (*confidence interval, CI*). Σημαντική θεωρήθηκε μια απόκλιση όταν $p < 0,05$. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία *U* των Mann–Whitney, προκειμένου να συγκριθούν οι συνεχείς μεταβλητές. Τέλος, αναζητήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης (*correlation coefficient r*) κατά Spearman. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της 13^{ης} έκδοσης του Στατιστικού Πακέτου για τις Κοινωνικές Επιστήμες (*Statistical Package for the Social Sciences 13, SPSS 13, Chicago, IL, USA*).

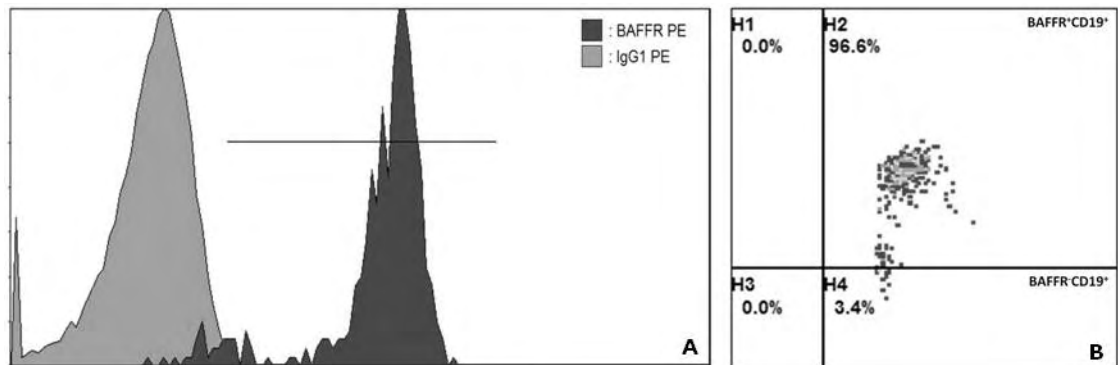
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ - ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΑCΙ ΚΑΙ ΒΑFFR

Ένα από τα ερωτήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν η έκφραση των υποδοχέων ΤΑCΙ και ΒΑffR σε ασθενείς με ΧΑΠ και υγιείς μάρτυρες. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα πειραμάτων κατά την κυτταρομετρική ανάλυση των υποδοχέων ΤΑCΙ και ΒΑffR (**Εικόνες 13 και 14**).



Εικόνα 13: Α. Ιστόγραμμα του ΤΑCΙ υποδοχέα (ΤΑCΙ-PE) συγκριτικά με το ιστοτυπικό αντίσωμα (IgG2a- PE) και Β. στικτόγραμμα του ΤΑCΙ υποδοχέα στα Β-κύτταρα (CD19⁺).



Εικόνα 14: Α. Ιστόγραμμα του του ΒΑff-R (ΒΑffR-PE) συγκριτικά με το ιστοτυπικό αντίσωμα (IgG1-PE) και Β. Στικτόγραμμα του ΒΑffR υποδοχέα στα Β-κύτταρα (CD19⁺).

Με τον έλεγχο *U* των Mann-Whitney, διαπιστώθηκε διαφορά στην έκφραση του ΤΑCΙ υποδοχέα ανάμεσα στους ασθενείς με ΧΑΠ και υγιείς μάρτυρες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση του υποδοχέα στην επιφάνεια των Β-κυττάρων των ασθενών, συγκριτικά με τους υγιείς ($p=0,019$). Η διαφορά αυτή επαληθεύτηκε για την μέση ένταση φθορισμού ($p=0,001$), μια στατιστική παράμετρο που χαρακτηρίζει πιο αντιπροσωπευτικά την ένταση της κατανομής φθορισμού. Επίσης, συνυπολογίζοντας την μέση ένταση φθορισμού και το ποσοστό έκφρασης (ποσοστό έκφρασης (%) x μέση ένταση

φθορισμού), προέκυψε η έκφραση του TAC1 κάθε δείγματος, η οποία επίσης διαφέρει σημαντικά στις δύο ομάδες ($p=0,001$). Όσον αφορά τον BAFFR υποδοχέα, οι ασθενείς με ΧΑΠ είχαν χαμηλότερη έκφραση του υποδοχέα συγκριτικά με τους υγιείς, χωρίς ωστόσο να υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (**Πίνακας 19**).

Πίνακας 19: Η έκφραση των υποδοχέων TAC1 και BAFFR, στους ασθενείς με ΧΑΠ και τους υγιείς μάρτυρες.

	Ασθενείς ΧΑΠ	Μάρτυρες	P
TAC1 (%)	34,65±20,20	26,77±12,60	0,019
TAC1 (MFI)	1,32±0,60	1,01±0,53	0,001
TAC1 expression	0,51±0,45	0,29±0,24	0,001
BAFFR	98,49±7,12	99,25±3,18	0,495
BAFFR (MFI)	7,76±4,71	9,18±5,61	0,086
BAFFR expression	7,68±4,63	9,15±5,60	0,077

Παρόμοια, κατά την ανάλυση της έκφρασης των υποδοχέων TAC1 και BAFFR στους ασθενείς που επανεξετάστηκαν 6 (V_1) και 12 (V_2) μήνες μετά την ένταξή τους στην μελέτη (V_0), διαπιστώθηκε πως η έκφραση του TAC1 υποδοχέα είναι υψηλότερη στους ασθενείς συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Για την διερεύνηση τυχόν διαφοράς μεταξύ των τριών επισκέψεων των ασθενών χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis, τα αποτελέσματα του οποίου συνοψίζονται στον **Πίνακα 20**, όπου δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά 6 και 12 μήνες μετά πλην της συνολικής έκφρασης του BAFFR.

Πίνακας 20: Η έκφραση των υποδοχέων TAC1 και BAFFR, στους 6 μήνες (V_1) και 12 μήνες (V_2) μετά την πρώτη επίσκεψη των ασθενών (V_0).

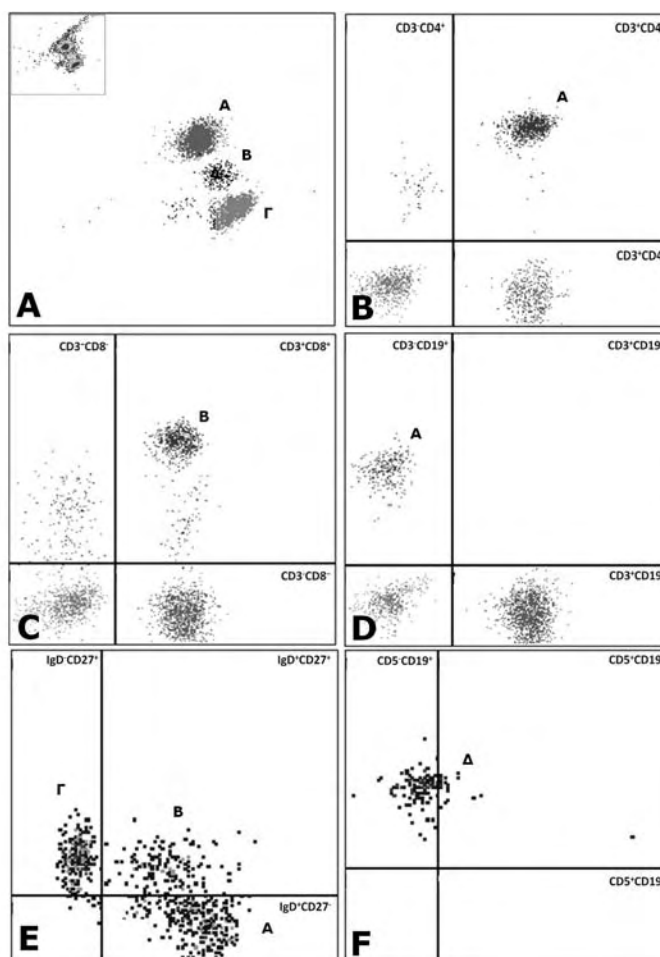
	Ασθενείς ΧΑΠ			P^β
	V₀ (n=123)	V₁ (n=56)	V₂ (n=44)	
TAC1 (%)	34,65±20,2 ^α	35,98±18,57 ^α	34,54±18,83 ^α	0,374
TAC1 (MFI)	1,32±0,60 ^α	1,41±0,70 ^α	1,77±1,12 ^α	0,976
TAC1 expression	0,51±0,45 ^α	0,54±0,44 ^α	0,67±0,64 ^α	0,877
BAFFR	98,49±7,12	99,22±1,62	99,04±1,99	0,269
BAFFR (MFI)	7,76±4,71	7,77±4,51	10,06±6,75	0,053
BAFFR expression	7,68±4,63	7,72±4,46	9,95±6,69	0,039

^αστατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες ($P<0,05$) ^βσύγκριση της έκφρασης των υποδοχέων μεταξύ των τριών επισκέψεων των ασθενών με ανάλυση Kruskal-Wallis.

Τέλος, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην έκφραση των υποδοχέων TAC1 και BAFFR σε καπνιστές και μη καπνιστές ($p>0,05$).

4.2. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα πειραμάτων κατά την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των κυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών και μαρτύρων (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: (A). Στικτογράμμα στο οποίο διακρίνονται οι τρεις πληθυσμοί των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, A. πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, B. μονοκύτταρα και Γ. λεμφοκύτταρα. (B, C). Στικτογράμματα στα οποία διακρίνονται υποπληθυσμοί των T-κυττάρων A. βοηθητικά, B. κυτταροτοξικά T-κύτταρα. (D). Στικτογράμμα στο οποίο διακρίνονται τα A. B-κύτταρα ($CD19^+$). (E, F). Στικτογράμματα στα οποία απεικονίζονται υποπληθυσμοί των B-κυττάρων. A. Παρθένα B-κύτταρα ($IgD^+ CD27^-$), B. Μη μετεστραμμένα B-κύτταρα μνήμης ($IgD^+ CD27^+$), Γ. B-κύτταρα μνήμης ($IgD^- CD27^+$), Δ. B-1 κύτταρα ($CD5^+ CD19^+$).

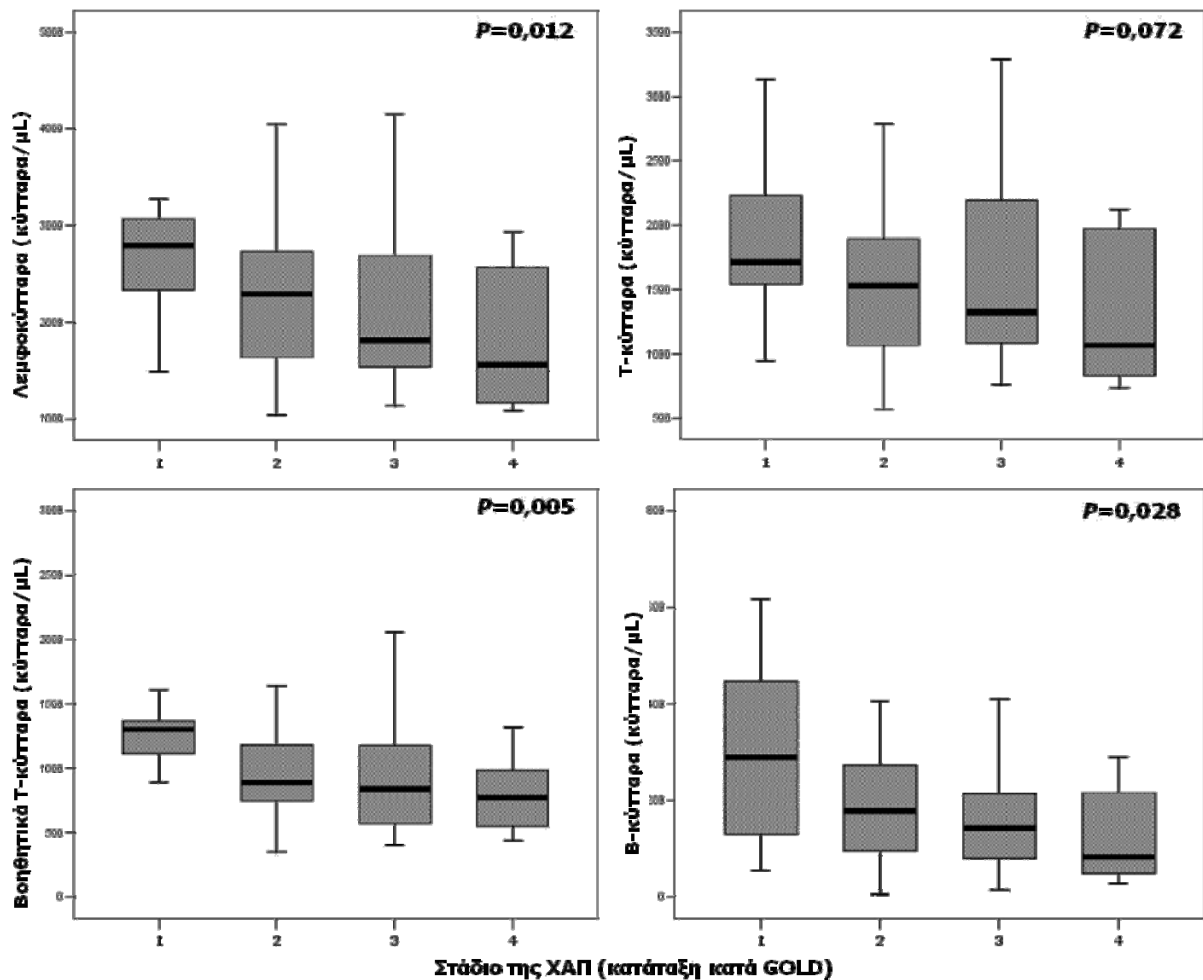
Με τον έλεγχο U των Mann-Whitney, έγινε σύγκριση του αριθμού των κυττάρων του περιφερικού αίματος ανάμεσα στους ασθενείς με ΧΑΠ και τους υγιείς μάρτυρες, κατά την οποία προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Γενικότερα, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των κυττάρων στην περιφέρεια των ασθενών συγκριτικά με τους υγιείς. Σε ορισμένες περιπτώσεις η μείωση των πληθυσμών αυτών ήταν σημαντική, όπως στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων ($p=0,021$), των NK-κυττάρων ($p<0,001$), των Β- ($p=0,01$) και των Β-1-κυττάρων ($CD5^+CD19^+$) ($p=0,012$). Από την άλλη, στους ασθενείς, ο αριθμός των μονοκυττάρων ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ($p<0.001$). Τα αποτελέσματα του ανοσοφαινοτυπικού χαρακτηρισμού συνοψίζονται στον **Πίνακα 21**.

Πίνακας 21: Τα αποτελέσματα του ανοσοφαινοτυπικού χαρακτηρισμού κυττάρων του περιφερικού αίματος και υποπληθυσμών των Β-κυττάρων στους ασθενείς με ΧΑΠ και τους υγιείς μάρτυρες.

	Ασθενείς ΧΑΠ (n=123)	Μάρτυρες (n=66)	P
Λευκοκύτταρα (κύτταρα/μL)	7730±2053	7157±1837	0,100
Λεμφοκύτταρα (κύτταρα/μL)	2223±767	2493±730	0,021
T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	1543±595	1705±589	0,086
Βοηθητικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	973±422	1033±408	0,317
Κυτταροτοξικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	523±281	597±303	0,099
Λόγος CD4/CD8	2,30±1,40	2,10±1,14	0,446
B-κύτταρα (κύτταρα/μL)	195±144	238±145	0,010
Υποπληθυσμοί των Β-κυττάρων			
IgD ⁺ CD27 ⁻ (%)	61,18±18,34	58,55±16,90	0,306
IgD ⁺ CD27 ⁻ (απόλυτος αριθμός)	139±116	137±98	0,423
IgD ⁺ CD27 ⁺ (%)	12,2±10,41	13,03±10,36	0,759
IgD ⁺ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	23±27	29±24	0,072
IgD ⁻ CD27 ⁺ (%)	22,70±13,22	22,64±11,52	0,762
IgD ⁻ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	43±34	58±56	0,118
CD5 ⁺ CD19 ⁺ (%)	9,08±8,38	10,87±6,52	0,012
NK-κύτταρα (κύτταρα/μL)	345±216	540±300	<0,001
Μονοκύτταρα (κύτταρα/μL)	601±282	398±147	<0,001
Ουδετερόφιλα (κύτταρα/μL)	4257±1725	4033±1416	0,375

Επιπρόσθετα, έπειτα από ανάλυση Kruskal-Wallis των κυτταρικών πληθυσμών ανά στάδιο της νόσου (σύμφωνα με την κατάταξη κατά GOLD), διαπιστώθηκε πως στους

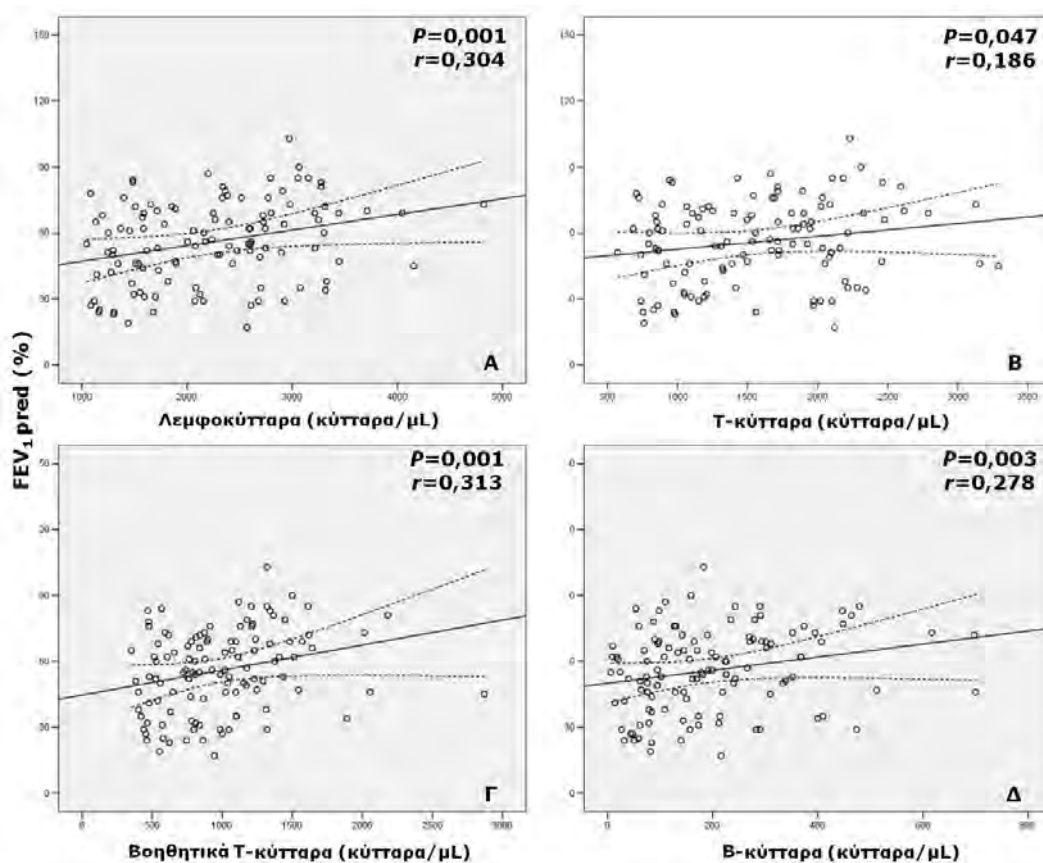
ασθενείς με ΧΑΠ, ανά στάδιο, διαφέρει σημαντικά ο αριθμός των λεμφοκυττάρων ($p=0,012$), των βοηθητικών Τ-κυττάρων ($p=0,005$) και των Β-κυττάρων ($p=0,028$). Μάλιστα, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των παραπάνω κυτταρικών πληθυσμών με την πρόοδο της νόσου (**Εικόνα 16**). Η πτωτική αυτή τάση επαληθεύτηκε επίσης, για τα Τ- και τα ΝΚ-κύτταρα, χωρίς ωστόσο να προκύψει στατιστικά σημαντική διαφορά για τα διαφορετικά στάδια της νόσου ($p>0,05$).



Εικόνα 16: Απεικόνιση του απόλυτου αριθμού των Α. λεμφοκυττάρων, Β. Τ-κυττάρων, Γ. βοηθητικών Τ-κυττάρων και Δ. Β-κυττάρων, ανά στάδιο της νόσου (κατάταξη κατά GOLD). Το στάδιο της νόσου κατά GOLD 1=ήπια, GOLD 2=μέτρια, GOLD 3=σοβαρή και GOLD 4=πολύ σοβαρή νόσος.

Λαμβάνοντας υπόψη την μείωση των λεμφοκυττάρων και των υποπληθυσμών αυτών με την πρόοδο της ΧΑΠ διερευνήθηκε επίσης, η συσχέτισή τους με κλινικά χαρακτηριστικά

της νόσου, όπως τον δείκτη FEV₁, τα πακέτα-έτη καπνίσματος (pys), τον αριθμό παροξύνσεων τον τελευταίο χρόνο και την κλίμακα δύσπνοιας. Ο έλεγχος έγινε με τον συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman, κατά τον οποίο διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση του FEV₁ με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων ($p=0,001$, $r=0,304$, $N=114$), των Τ-κυττάρων ($p=0,047$, $r=0,186$, $N=114$), των βοηθητικών Τ-κυττάρων ($p=0,001$, $r=0,313$, $N=114$) και των Β-κυττάρων ($p=0,003$, $r=0,278$, $N=114$). Η απεικόνιση της συσχέτισης του FEV₁ σε συνάρτηση με τον απόλυτο αριθμό των παραπάνω πληθυσμών παρουσιάζεται παρακάτω στα διαγράμματα διασποράς (**Εικόνα 17**). Επίσης, διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση του FEV₁ με τον αριθμό των παρθένων ($p=0,005$, $r=0,329$, $N=70$) και των μη μετεστραμμένων Β-κυττάρων μνήμης ($p=0,033$, $r=0,255$, $N=70$).



Εικόνα 17: Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) του δείκτη FEV₁, pred (%) σε συνάρτηση με τον αριθμό Α. λεμφοκυττάρων, Β. Τ-κυττάρων, Γ. βοηθητικών Τ-κυττάρων και Δ. Β-κυττάρων.

Περαιτέρω, η ανάλυση Spearman έδειξε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα πακέτα έτη καπνίσματος και τον αριθμό των βοηθητικών Τ-κυττάρων ($p=0,027$, $r=0,204$, $N=117$). Επίσης, έδειξε αρνητική συσχέτιση της δύσπνοιας με τον αριθμό των βοηθητικών Τ-κυττάρων ($p=0,003$, $r=-0,281$, $N=109$) και των Β-κυττάρων ($p=0,027$, $r=-0,212$,

N=109), ενώ δεν υπήρξε συσχέτιση του αριθμού των κυττάρων του περιφερικού αίματος με τον αριθμό των παροξύνσεων ($p>0,05$).

4.3. ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ- ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Αρχικά, κατά την ανάλυση δειγμάτων ορού με την χρήση της ανοσονεφελομετρίας, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της CRP ώστε να αποκλειστεί η ύπαρξη λοίμωξης. Σε όλα τα δείγματα των ασθενών με ΧΑΠ και των υγιών μαρτύρων που ελέγχθησαν, η CRP βρέθηκε φυσιολογική (<10 mg/dL), ενώ έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών IgG, IgM και IgA και των υποτάξεων της IgG (IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4) και στις δύο ομάδες. Ειδικότερα, δύο μονοζυγωτικοί δίδυμοι με ΧΑΠ (σταδίου 4), εμφάνισαν IgA ανεπάρκεια ($<22,5$ mg/μL). Επίσης, δύο ασθενείς εμφάνισαν IgG4 ανεπάρκεια με τιμές 0 mg/μL και 0,5 mg/μL αντίστοιχα, ενώ έντεκα ασθενείς και ένας υγιής εμφάνισαν υψηλή συγκέντρωση όλων των ανοσοσφαιρινών (πολυκλωνική αύξηση) ή μόνο της IgG. Στους τελευταίους, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού, ώστε να ελεγχθεί η ανίχνευση μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών.

Όπως προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση, με τον έλεγχο U των Mann-Whitney, έγινε σύγκριση της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς κατά την οποία διαπιστώθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση της IgM ανοσοσφαιρίνης στους πρώτους ($p=0,002$). Η συγκέντρωση των IgG και IgA ανοσοσφαιρινών καθώς και των υποτάξεων της IgG, ήταν κατά μέσο όρο όμοια στις δύο ομάδες με εξαίρεση την IgG4, η οποία αγγίζει τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($p=0,058$) και παρατηρείται ελαφρώς υψηλότερη στους ασθενείς (**Πίνακας 22**).

Περαιτέρω, η ανάλυση Spearman στους ασθενείς, όσον αφορά την IgM, δεν έδειξε κάποια συσχέτιση της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών με τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως τον FEV₁ ($p=0,496$, $r=0,064$, $N=114$), τον αριθμό των παροξύνσεων ($p=0,774$, $r=-0,027$, $N=117$) ή την κλίμακα δύσπνοιας ($p=0,363$, $r=-0,088$, $N=108$). Επίσης, δεν υπήρξε διαφοροποίηση της συγκέντρωσης της IgM ή των άλλων τάξεων και των υποτάξεων της IgG ανά στάδιο της νόσου ($p>0,05$).

Πίνακας 22: Η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών σε ασθενείς και μάρτυρες.

Ανοσοσφαιρίνη (mg/dL)	Ασθενείς ΧΑΠ	Μάρτυρες	P
IgG	1158±341	1138±250	0.888
IgM	102±99	71±40	0.002
IgA	270±151	247±86	0.544
IgG1	687±183	666±195	0.433
IgG2	360±142	365±116	0.494
IgG3	58±28	52±23	0.232
IgG4	100±136	71±65	0.058

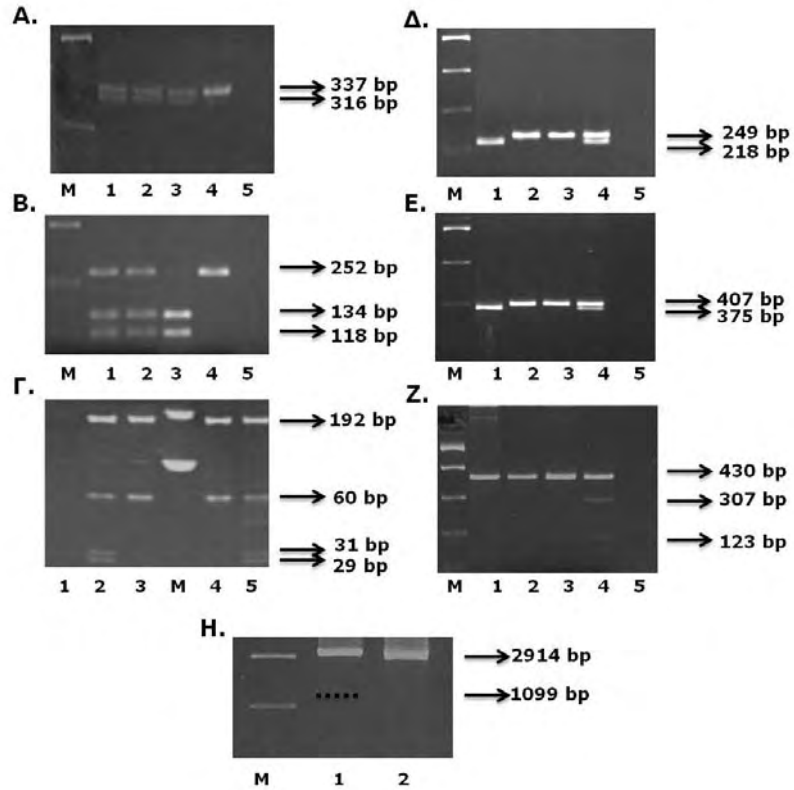
4.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Στην **Εικόνα 18** παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά από PCR-RFLP για την ανίχνευση των παραλλαγών που μελετήθηκαν.

4.4.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *TAC1*, *TLR2* ΚΑΙ *TLR4*, ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ICOS*

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συχνότητα γενετικών βλαβών-παραλλαγών των γονιδίων *TAC1* και *ICOS*, ενώ επιπρόσθετα μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί των *TLR2* και *TLR4* γονιδίων. Στον **Πίνακα 23**, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά η γονοτυπική συχνότητα και η συχνότητα αλληλίου κάθε παραλλαγής που ελέγχθηκε, καθώς επίσης το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (*P* value) και ο λόγος πιθανοτήτων (odds ratio, OR). Να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις όπου υπήρχε αμφιβολία ως προς το αποτέλεσμα, η αντίδραση επαναλήφθηκε. Επίσης, επανεξετάστηκε τυφλά περίπου το 10% των δειγμάτων της μελέτης, ούτως ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μας.

Συγκεκριμένα, τέσσερις ασθενείς με ΧΑΠ (3,25%) ήταν ταυτόχρονα ετεροζυγώτες φορείς των V220A και P251L παραλλαγών, ενώ μόνο ένας είχε την C104R μετάλλαξη (0,81%). Αντίστοιχα, στην ομάδα των υγιών δεν υπήρχε κανένας διπλός ετεροζυγώτης για τους παραπάνω πολυμορφισμούς, ενώ όλοι ήταν αρνητικοί για την μετάλλαξη C104R. Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς του *TLR4* (D299G, T399I), 12 ασθενείς με ΧΑΠ (9,75%) και 7 μάρτυρες (10,60%) ήταν διπλοί ετεροζυγώτες φορείς των *TLR4*-D299G και *TLR4*-T399I πολυμορφισμών, ενώ μόνο ένας ασθενής με ΧΑΠ ήταν διπλός ομοζυγώτης για τους πολυμορφισμούς αυτούς (0,81%).



Εικόνα 18: **A.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης για την *TACI-C104R*. *M*: μάρτυρας. Δείγματα 1-3: ετερόζυγα για την *C104R*. Δείγμα 4: χωρίς την παραλλαγή *C104R* (φυσιολογικό). Δείγμα 5: *blank*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 3%. **B.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης για την παραλλαγή *TACI-P251L*. *M*: μάρτυρας. Δείγματα 1-2: ετερόζυγα για την παραλλαγή *P251L*. Δείγμα 3: ομόζυγο για την παραλλαγή *P251L*. Δείγμα 4: χωρίς την παραλλαγή *P251L* (φυσιολογικό). Δείγμα 5: *blank*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 2%. **Γ.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης για την *TACI-V220A*. *M*: μάρτυρας. Δείγμα 1: *blank*. Δείγματα 2 και 4: ετερόζυγα για την *V220A*. Δείγμα 3-4: χωρίς την παραλλαγή *V220A* (φυσιολογικό). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 20%. **Δ.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης για την *TLR4-D299G*. *M*: μάρτυρας. Δείγμα 1: ομόζυγο για την *D299G*. Δείγματα 2-3: χωρίς την *D299G* (φυσιολογικά). Δείγμα 4: ετερόζυγο για την *D299G*. Δείγμα 5: *blank*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 2%. **E.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης για την *TLR4-T399I*. *M*: μάρτυρας. Δείγμα 1: ομόζυγο για την *T399I*. Δείγματα 2-3: χωρίς την *T399I* (φυσιολογικά). Δείγμα 4: ετερόζυγο για την *T399I*. Δείγμα 5: *blank*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 2%. **Z.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης για την *TLR2-R753Q*. *M*: μάρτυρας. Δείγμα 1-3: χωρίς την *R753Q* (φυσιολογικά). Δείγμα 4: ετερόζυγο για την *R753Q*. Δείγμα 5: *blank*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 2%. **H.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα *PCR* κατά την ανίχνευση ελλείψεων του γονιδίου *ICOS*. *M*: μάρτυρας. Δείγμα 1: ετερόζυγο για την έλλειψη (με διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται το μοριακό βάρος της αναμενόμενης δέσμης). Δείγματα 2: χωρίς την έλλειψη στο *ICOS* (φυσιολογικό). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αгарόζης 1,5%.

Επίσης, σε δύο ασθενείς με ΧΑΠ και έναν υγιή μάρτυρα ανιχνεύθηκε μόνο ο πολυμορφισμός *TLR4*-T399I (1,62% και 1,51%, αντίστοιχα). Τέλος, σε επτά ασθενείς με ΧΑΠ (5,69%), ενώ μόνο σε έναν υγιή (1,51%) ανιχνεύθηκε ο πολυμορφισμός *TLR2*-R753Q. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας ασθενής με ΧΑΠ (0,81%) ήταν ταυτόχρονα ετερόζυγος ως προς τις 4 από τις παραλλαγές μελετήθηκαν, δηλαδή τους πολυμορφισμούς D299G και T399I *TLR4*, καθώς και τις V220A και P251L του γονιδίου *TAC1*.

Κατά την μοριακή μελέτη του γονιδίου *ICOS*, ελέγχθησαν συνολικά 64 δείγματα ασθενών με ΧΑΠ. Όλα τα δείγματα που ελέγχθησαν ήταν αρνητικά ως προς την ύπαρξη κάποιας ομόζυγης ή ετερόζυγης έλλειψης. Δεδομένης λοιπόν, της εξαιρετικά σπάνιας συχνότητας της συγκεκριμένης βλάβης, αλλά και της έλλειψης, γενικότερα, θετικών δειγμάτων στον ευρύτερο θεσσαλικό πληθυσμό, η μελέτη ανίχνευσης των ελλείψεων *ICOS*, δεν συνεχίστηκε περαιτέρω. Όλες οι παραλλαγές που εξετάστηκαν, ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), όπως φαίνεται στον **Πίνακα 23**, πλην της V220A του γονιδίου *TAC1* ($p = 0,002$). Η τιμή *P* value $< 0,05$ υποδηλώνει σημαντική απόκλιση από τις παρατηρούμενες γενοτυπικές συχνότητες της ισορροπίας Hardy-Weinberg.

Πίνακας 23: Τα αποτελέσματα κατά την ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Παραλλαγή	Γονίδιο	Θέση	Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου		Ισορροπία Hardy-Weinberg	
			Μάρτυρες	Ασθενείς	Μάρτυρες	Ασθενείς
C104R	<i>TAC1</i>	Εξώνιο 3	ΔΕ	0,00	ΔΕ	0,963
V220A	<i>TAC1</i>	Εξώνιο 5	0,04	0,04	0,002	0,603
P251L	<i>TAC1</i>	Εξώνιο 5	0,17	0,14	0,882	0,717
D299G	<i>TLR4</i>	Εξώνιο 3	0,05	0,06	0,649	0,312
T399I	<i>TLR4</i>	Εξώνιο 3	0,06	0,07	0,600	0,476
R753Q	<i>TLR2</i>	Εξώνιο 1	0,01	0,03	0,950	0,745

Με την χ^2 ανάλυση, έγινε σύγκριση της συχνότητας των παραλλαγών μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ και μαρτύρων, τα αποτελέσματα της οποίας συνοψίζονται στον **Πίνακα 24**.

Πίνακας 24: Η συχνότητα παραλλαγών των γονιδίων *TACI*, *TLR4* και *TLR2* σε ασθενείς και υγιείς.

Γενετική Παραλλαγή	Ασθενείς ΧΑΠ (n=123)	Μάρτυρες (n=66)	P	OR (95% CI)
Ηλικία, mean±SD (range)	68,4±9,5	69,5±10,7	0,113	
Φύλο (Α/Θ)	118/5	61/5	0,323	1,93 (0,53-6,94)
<i>TACI-V220A</i>				
Γονότυπος, n (%)				
A/A Wt	112 (91,1)	62 (93,9)	0,485	0,65 (0,20-2,15)
A/G Het	11 (8,9)	3 (4,5)		
G/G Hom	0 (0,0)	1 (1,5)		
Αλληλία, n (%)				
A	235	127	0,753	0,84 (0,28-2,47)
G	11	5		
<i>TACI-P251L</i>				
Γονότυπος, n (%)				
G/G Wt	90 (73,2)	46 (69,7)	0,612	1,18 (0,61-2,29)
G/A Het	31 (25,2)	18 (27,3)		
A/A Hom	2 (1,6)	2 (3,0)		
Αλληλία, n (%)				
G	211	110	0,528	1,20 (0,67-2,15)
A	35	22		
<i>TACI-C104R</i>				
Γονότυπος, n (%)				
A/A Wt	122 (99,2)	66 (100)	0,651 ^a	0,99 (0,97-1,01)
A/G Het	1 (0,8)	0 (0,0)		
G/G Hom	0 (0,0)	0 (0,0)		
Αλληλία, n (%)				
A	245	132	0,651 ^a	0,99 (0,98-1,01)
G	1	0		
<i>TLR4-D299G</i>				
Γονότυπος, n (%)				
A/A Wt	110 (89,4)	59 (89,4)	0,994	1,00 (0,38-2,65)
A/G Het	12 (9,8)	7 (10,6)		
G/G Hom	1 (0,8)	0 (0,0)		
Αλληλία, n (%)				
A	232	125	0,875	0,92 (0,36-2,35)
G	14	7		
<i>TLR4-T399I</i>				
Γονότυπος, n (%)				
C/C Wt	108 (87,8)	58 (87,9)	0,988	0,99 (0,39-2,48)
C/T Het	14 (11,4)	8 (12,1)		
T/T Hom	1 (0,8)	0 (0,0)		
Αλληλία, n (%)				
C	230	124	0,866	0,92 (0,38-2,22)
T	16	8		
<i>TLR2-R753Q</i>				
Γονότυπος, n (%)				
G/G Wt	116 (94,3)	65 (98,5)	0,265	0,25 (0,03-2,11)
G/A Het	7 (5,7)	1 (1,5)		
A/A Hom	0 (0,0)	0 (0,0)		
Αλληλία, n (%)				
G	239	131	0,270	0,26 (0,03-2,14)
A	7	1		

^aμονοπλευρη σημαντικότητα (one-tailed significance)

Αν και δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα των παραλλαγών ανάμεσα στις δύο ομάδες, εντούτοις, όταν έγινε ανάλυση Kruskal-Wallis στους ασθενείς με ΧΑΠ, διαπιστώθηκε ότι η συσσώρευση των παραλλαγών μειώνεται όσο προχωρά το στάδιο της νόσου ($p=0,038$). Συγκεκριμένα, εμφανίζεται μεγαλύτερη η συχνότητα των παραλλαγών στα στάδια 1,2 και 3 συγκριτικά με τα άτομα σταδίου 4 (**Πίνακας 25**).

Πίνακας 25: Η συχνότητα των παραλλαγών ανά στάδιο της νόσου.

Αριθμός παραλλαγών	Στάδιο της νόσου (n, %)			
	Στάδιο 1 (n=17)	Στάδιο 2 (n=63)	Στάδιο 3 (n=25)	Στάδιο 4 (n=14)
0	8 (47,1)	35 (55,6)	9 (36,0)	11 (78,6)
1	3 (17,6)	20 (31,7)	9 (36,0)	2 (14,3)
2	5 (29,4)	7 (11,1)	6 (24,0)	1 (7,1)
3	1 (5,9)	-	-	-
4	-	1 (1,6)	1 (4,0)	-
Ύπαρξη παραλλαγής				
Όχι	8 (47,1)	35 (55,6)	9 (36,0)	11 (78,6)
Ναι	9 (52,9)	28 (44,4)	16 (64,0)	3 (21,4)

5. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Λαμβάνοντας υπόψη, πως στους ασθενείς με ΧΑΠ υπήρξε μείωση στον αριθμό των κυττάρων του περιφερικού αίματος, διερευνήθηκε περαιτέρω η παρουσία λεμφοπενίας καθώς και η διαφορά συγκέντρωσης ανοσοσφαιρινών στους ασθενείς με ΧΑΠ και τους μάρτυρες. Επίσης, μελετήθηκε και η ενδεχομένη συμβολή της θεραπείας με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή και της καπνισματικής συνήθειας, στα παραπάνω φαινόμενα.

5.1. ΛΕΜΦΟΠΕΝΙΑ

Έπειτα από την παρατήρηση της μείωσης λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΧΑΠ, μελετήθηκε περαιτέρω η παρουσία λεμφοπενίας τόσο στους ασθενείς όσο στους υγιείς. Συνοπτικά, παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό της λεμφοπενίας ήταν μεγαλύτερο στους ασθενείς με ΧΑΠ συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής φαίνονται στον **Πίνακα 26**.

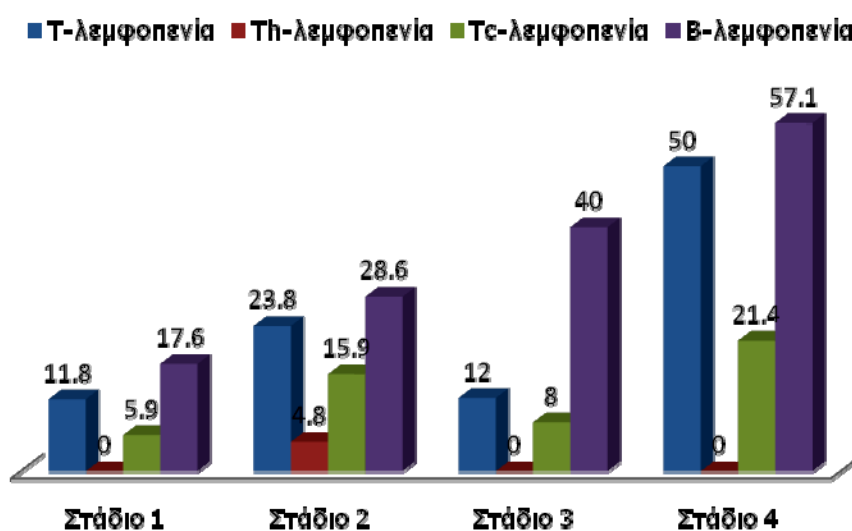
Πίνακας 26: Η λεμφοπενία στους ασθενείς με ΧΑΠ και τους υγιείς μάρτυρες.

	Ασθενείς ΧΑΠ (n=123)	Υγιείς (n=66)	P	OR (95% CI)
T-λεμφοπενία (<1000 κύτταρα/μL)				
OXI, n (%)	94 (76,4)	60 (90,9)	0,015	0,32 (0,12-0,82)
ΝΑΙ, n (%)	29 (23,6)	6 (9,1)		
T_h^a-λεμφοπενία (<500 κύτταρα/μL)				
OXI, n (%)	119 (96,7)	65 (98,5)	0,659	0,45 (0,05-4,18)
ΝΑΙ, n (%)	4 (3,3)	1 (1,5)		
Tc^β-λεμφοπενία (<300 κύτταρα/μL)				
OXI, n (%)	106 (86,2)	61 (92,4)	0,241	0,51 (0,18-1,45)
ΝΑΙ, n (%)	17 (13,8)	5 (7,6)		
B-λεμφοπενία (<100 κύτταρα/μL)				
OXI, n (%)	82 (66,7)	62 (93,9)	<0,001	0,12 (0,04-0,379)
ΝΑΙ, n (%)	41 (33,3)	4 (6,1)		

^a Th: T-helper, βοηθητικά T-κύτταρα, ^β Tc: cytotoxic T-cell, κυτταροτοξικό T-κύτταρο

Περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου αυτού στους ασθενείς σύμφωνα με τα στάδια της νόσου, κατέδειξε ενδιαφέροντα ευρήματα. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των ασθενών με λεμφοπενία όσο προχωρά το στάδιο της νόσου. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς με σοβαρή νόσο, χαρακτηρίζονταν από το μεγαλύτερο ποσοστό λεμφοπενίας, ειδικότερα T- και B- λεμφοπενίας, το οποίο αφορούσε περίπου το 50% των ασθενών σταδίου 4. Τα αποτελέσματα της λεμφοπενίας ανά στάδιο της νόσου φαίνονται στην

Εικόνα 19.



Εικόνα 19: Η επί τοις % απεικόνιση της λεμφοπενίας στους ασθενείς με ΧΑΠ, ανά στάδιο της νόσου (κατάταξη κατά GOLD). (Th: βοηθητικά T-κύτταρα, Tc: κυτταροτοξικά T-κύτταρα).

Η παρουσία λεμφοπενίας και συγκεκριμένα της μείωσης των T- και B-κυττάρων κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια, παρατηρήθηκε ότι είναι ένα σταθερό εύρημα σε συγκριμένους ασθενείς. Μάλιστα, σε 15/40 από τους ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν με B-λεμφοπενία κατά την ένταξη τους στη μελέτη, παρατηρήθηκε το ίδιο φαινόμενο κατά την επανεξέτασή τους 6 και 12 μήνες μετά.

5.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

Από τους συνολικά 123 ασθενείς με ΧΑΠ που συμμετείχαν στην μελέτη, πληροφορίες ως προς τη θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή συλλέχθηκαν αναδρομικά για τους 116. Ειδικότερα, εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή λάμβανε ποσοστό 62,1%, ενώ αντίστοιχα 37,9% των ασθενών είτε δεν χρησιμοποιούσε κάποιο κορτικοστεροειδές είτε χρησιμοποιούσε κάποια άλλη εισπνεόμενη μη ανοσοτροποποιητική ουσία (π.χ. φορμοτερόλη, σαλμετερόλη, τιοτρόπιο, σαλβουταμόλη). Με τον έλεγχο *U* των Mann-Whitney, διερευνήθηκαν οι κυτταρικοί πληθυσμοί στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΧΑΠ που λάμβαναν εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή συγκριτικά με τους μη χρήστες. Κατά τη σύγκριση αυτή, προέκυψαν τα αποτελέσματα, που συνοψίζονται παρακάτω (**Πίνακας 27**).

Αναλυτικά, παρατηρήθηκε σημαντική πτώση των λεμφοκυττάρων ($p=0,026$) και των βοηθητικών T-κυττάρων ($p=0,005$) στους ασθενείς που χρησιμοποίησαν εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή συγκριτικά με τους μη χρήστες. Περαιτέρω διερεύνηση της διαφοροποίησης χρηστών κορτικοστεροειδών και μη, όσον αφορά την συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών, κατέδειξε αύξηση της IgG ($p=0,006$) και της IgG4 ($p=0,009$), παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των B-κυττάρων δε διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0,193$).

Λαμβάνοντας υπόψη, ότι τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή που χρησιμοποιούν οι ασθενείς, διέφεραν ως προς την εισπνεόμενη φαρμακευτική ουσία, έγινε περαιτέρω διαχωρισμός τους σε ομάδες ανάλογα με την φαρμακευτική ουσία. Συγκεκριμένα, θεραπεία με φλουτικαζόνη λάμβανε το 29,3% (34 ασθενείς), βουδεσονίδη το 32,8 % (38 ασθενείς), μπεκλομεθαζόνη το 0,86% (1 ασθενής) και σικλεσονίδη το 1,72% (2 ασθενείς). Με τον έλεγχο *U* των Mann-Whitney έγινε διακριτά σύγκριση των κυτταρικών πληθυσμών ανάμεσα σε ασθενείς που εισέπνεαν ή όχι φλουτικαζόνη (**Πίνακας 28**), καθώς και ανάμεσα σε ασθενείς που εισέπνεαν ή όχι βουδεσονίδη. Όσον αφορά την μπεκλομεθαζόνη και την σικλεσονίδη, δεν πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος λόγω του εξαιρετικά μικρού αριθμού των ασθενών που τις χρησιμοποιούσαν.

Συνοπτικά, στους ασθενείς που λάμβαναν φλουτικαζόνη, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του αριθμού των B-κυττάρων ($p=0,033$), των βοηθητικών T-κυττάρων ($p=0,025$)

και των Β-κυττάρων μνήμης ($p=0,049$) σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν λάμβαναν το συγκεκριμένο κορτικοστεροειδές. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε διαφορά στις δύο ομάδες όσον αφορά τη συγκέντρωση ανοσοσφαιρινών, δεδομένου ότι στους χρήστες φλουτικαζόνης διαπιστώθηκε αύξηση στην συγκέντρωση της IgG ανοσοσφαιρίνης ($p=0,001$) καθώς και των υποτάξεων IgG1 ($p=0,022$), IgG2 ($p=0,035$) και IgG3 ($p=0,017$). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στους πληθυσμούς των κυττάρων του περιφερικού αίματος ή στη συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών στους ασθενείς που χρησιμοποιούσαν βουδεσονίδη ($p>0.05$). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής παρουσιάζονται στον **Πίνακα 29**.

Πίνακας 27: Οι κυτταρικοί πληθυσμοί στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΧΑΠ, όσον αφορά την χρήση εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ			
	Χρήση Εισπνεόμενου Κορτικοστεροειδούς^a		
	ΝΑΙ	ΟΧΙ	P
Ασθενείς (%)	72 (62,1)	44 (37,9)	
Λευκοκύτταρα (κύτταρα/μL)	7676±1941	7777±2315	0,918
Λεμφοκύτταρα (κύτταρα/μL)	2084±706	2452±847	0,026
T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	1475±593	1687±604	0,063
Βοηθητικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	911±405	1079±445	0,021
Κυτταροτοξικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	520±302	549±259	0,256
Λόγος CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,23±1,42	2,37±1,46	0,422
B-κύτταρα (κύτταρα/μL)	184±140	219±156	0,193
Υποπληθυσμοί των B-κυττάρων			
IgD ⁺ CD27 ⁻ (%)	61,51±19,85	61,72±16,89	0,890
IgD ⁺ CD27 ⁻ (απόλυτος αριθμός)	131±105	156±130	0,381
IgD ⁺ CD27 ⁺ (%)	12,79±12,84	11,52±7,76	0,778
IgD ⁺ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	22±28	25±23	0,137
IgD ⁻ CD27 ⁺ (%)	20,22±12,37	24,17±13,55	0,471
IgD ⁻ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	35±28	51±38	0,163
CD5 ⁺ CD19 ⁺ (%)	9,49±8,90	9,30±8,05	0,591
NK-κύτταρα (κύτταρα/μL)	354±240	308±159	0,613
Μονοκύτταρα (κύτταρα/μL)	609±307	571±249	0,575
Ουδετερόφιλα (κύτταρα/μL)	4432±1650	3993±1873	0,110

^a Η πληροφορία ήταν διαθέσιμη για 116 ασθενείς.

Πίνακας 28: Ο αριθμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος στους ασθενείς με ΧΑΠ, ως προς την χρήση της εισπνεόμενης φλουטיκαζόνης.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ			
	Χρήση Εισπνεόμενης Φλουטיκαζόνης^d		
	ΝΑΙ	ΟΧΙ	P
Ασθενείς (%)	34 (29,3)	82 (70,7)	
Λευκοκύτταρα (κύτταρα/μL)	7670±1867	7732 ±2175	0,940
Λεμφοκύτταρα (κύτταρα/μL)	2010±681	2312±805	0,077
T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	1416±566	1613±613	0,116
Βοηθητικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	844±364	1029±441	0,025
Κυτταροτοξικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	523±309	534 ±277	0,621
Λόγος CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,15±1,51	2,33±1,40	0,257
B-κύτταρα (κύτταρα/μL)	157±127	214±151	0,033
Υποπληθυσμοί των B-κυττάρων			
IgD ⁺ CD27 ⁻ (%)	60,70±22,08	61,85±17,44	0,812
IgD ⁺ CD27 ⁻ (απόλυτος αριθμός)	108±112	152±119	0,115
IgD ⁺ CD27 ⁺ (%)	14,06±18,58	11,68±7,55	0,988
IgD ⁺ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	21±37	24±22,14	0,066
IgD ⁻ CD27 ⁺ (%)	18,33±10,49	23,18±13,50	0,206
IgD ⁻ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	26±16	47±36	0,049
CD5 ⁺ CD19 ⁺ (%)	9,01±6,79	9,46±8,72	0,665
NK-κύτταρα (κύτταρα/μL)	334±186	338±225	0,891
Μονοκύτταρα (κύτταρα/μL)	557±161	611±324	0,472
Ουδετερόφιλα (κύτταρα/μL)	4641±1566	4110±1798	0,167

^dΗ πληροφορία ήταν διαθέσιμη για 116 ασθενείς.

Να σημειωθεί ότι 3 ασθενείς με ΧΑΠ χρησιμοποιούσαν και τα δύο κορτικοστεροειδή (φλουτικαζόνη και βουδεσονίδη). Στον έναν παρουσιάστηκε βαριά Β-λεμφοπενία (44 κύτταρα/μL), η οποία επιδεινώθηκε 6 μήνες (18 κύτταρα/μL) και 12 μήνες (19 κύτταρα/μL) μετά, ενώ οι άλλοι δύο ασθενείς είχαν φυσιολογικό αριθμό Β-κυττάρων στην περιφέρεια (270 και 157 κύτταρα/μL). Ωστόσο, ο τελευταίος είχε εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (<22,5 mg/dL), ενώ μετά από 12 μήνες ήταν οριακά φυσιολογικός για τα Β-κύτταρα (106 κύτταρα/μL, φυσιολογικές τιμές >100 κύτταρα/μL).

Επομένως, έγινε περαιτέρω διερεύνηση για την ύπαρξη δόσοεξαρτώμενης επίδρασης των κορτικοστεροειδών στα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Στους ασθενείς που

χρησιμοποιούσαν κορτικοστεροειδή η δόση της φλουτικαζόνης κυμαίνονταν από 500-1000μg, ενώ η δόση βουδεσονίδης από 400-1040μg. Η ανάλυση έγινε με τον μη παραμετρικό έλεγχο Spearman. Ωστόσο, περαιτέρω ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$) γεγονός που δηλώνει ότι το φαινόμενο δεν είναι δοσοεξαρτώμενο.

Πίνακας 29: Ο αριθμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος στους ασθενείς με ΧΑΠ, ως προς την χρήση της εισπνεόμενης βουδεσονίδης.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ			
	Χρήση Εισπνεόμενης Βουδεσονίδης^a		
	ΝΑΙ	ΟΧΙ	P
Ασθενείς (%)	38 (32,8)	78 (67,2)	
Λευκοκύτταρα (κύτταρα/μL)	7815±1966	7665±2146	0,370
Λεμφοκύτταρα (κύτταρα/μL)	2187±716	2242±813	0,846
T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	1512±566	1577±624	0,707
Βοηθητικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	949±395	987±443	0,735
Κυτταροτοξικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	507±286	543±286	0,407
Λόγος CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,30±1,35	2,27±1,48	0,769
B-κύτταρα (κύτταρα/μL)	197±125	197±157	0,646
Υποπληθυσμοί των B-κυττάρων			
IgD ⁺ CD27 ⁻ (%)	61,35±19,58	61,72±17,98	0,959
IgD ⁺ CD27 ⁻ (απόλυτος αριθμός)	155±101	140±124	0,324
IgD ⁺ CD27 ⁺ (%)	12,20±7,70	12,13±11,44	0,590
IgD ⁺ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	25,22±21,37	23,99±27,33	0,568
IgD ⁻ CD27 ⁺ (%)	21,69±14,00	22,42±12,81	0,706
IgD ⁻ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	42,97±34,65	43,57±35,18	0,928
CD5 ⁺ CD19 ⁺ (%)	8,93±9,55	9,57±8,01	0,332
NK-κύτταρα (κύτταρα/μL)	340±195	335±223	0,897
Μονοκύτταρα (κύτταρα/μL)	662±390	562±214	0,103
Ουδετερόφιλα (κύτταρα/μL)	4339±1696	4230±1775	0,379

^aΗ πληροφορία ήταν διαθέσιμη για 116 ασθενείς.

Επιπρόσθετα, περαιτέρω ανάλυση κατέδειξε ότι ασθενείς που λάμβαναν φλουτικαζόνη παρουσίαζαν αυξημένη συχνότητα παροξύνσεων της νόσου, διαφορά που ήταν στατιστικά σημαντική (μέση τιμή±SD: 1,79±2,40 vs. 0,73±1,25, $p=0,006$).

5.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΝΗΘΕΙΑΣ

Τέλος, έπειτα από καταγραφή της καπνισματικής συνήθειας κάθε ασθενούς στη μελέτη, βρέθηκε ότι 50,4% ήταν καπνιστές και 49,6% πρώην καπνιστές. Με τον έλεγχο *U* των Mann-Whitney, διερευνήθηκαν οι κυτταρικοί πληθυσμοί στο περιφερικό αίμα των καπνιστών ή μη ασθενών με ΧΑΠ κατά την οποία προέκυψαν τα αποτελέσματα, που συνοψίζονται παρακάτω (**Πίνακας 30**).

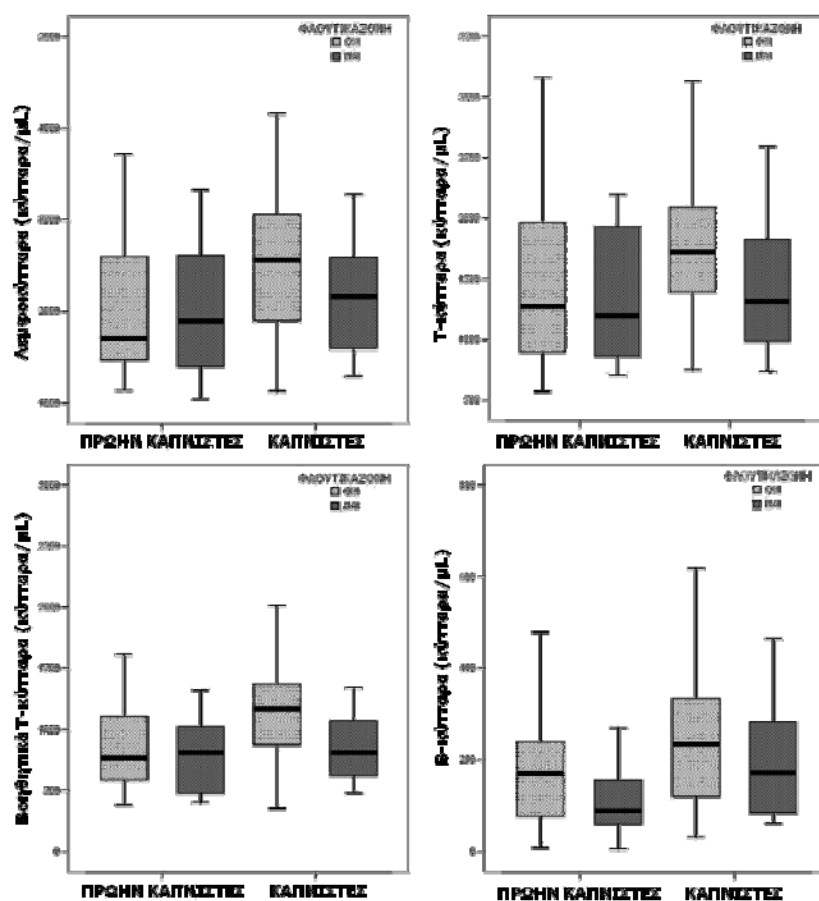
Πίνακας 30: Οι διαφορές που παρατηρούνται στα κύτταρα του περιφερικού αίματος ως προς την καπνισματική συνήθεια των ασθενών.

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ		
	Κάπνισμα ^a		P
	ΝΑΙ	ΟΧΙ	
Ασθενείς (%)	60 (50,4)	59 (49,6)	
Λευκοκύτταρα (κύτταρα/μL)	7735±1914	7668±2213	0,493
Λεμφοκύτταρα (κύτταρα/μL)	2429±753	1997±696	0,002
T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	1686±574	1409±582	0,010
Βοηθητικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	1094±439	865±376	0,001
Κυτταροτοξικά T-κύτταρα (κύτταρα/μL)	546±251	500±306	0,099
Λόγος CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,3±1,27	2,32±1,57	0,505
B-κύτταρα (κύτταρα/μL)	236±146	160±136	0,001
Υποπληθυσμοί των B-κυττάρων			
IgD ⁺ CD27 ⁻ (%)	60,30±18,35	64,68±18,87	0,347
IgD ⁺ CD27 ⁻ (απόλυτος αριθμός)	158±121	112±104	0,106
IgD ⁺ CD27 ⁺ (%)	10,76±6,26	14,63±16,3	0,666
IgD ⁺ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	23±21	25±34	0,236
IgD ⁻ CD27 ⁺ (%)	24,97±14,63	17,04±7,61	0,043
IgD ⁻ CD27 ⁺ (απόλυτος αριθμός)	52±37	24±17	0,001
CD5 ⁺ CD19 ⁺ (%)	8,74±7,80	10,10±9,41	0,628
Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (κύτταρα/μL)	318±167	352±248	0,704
Μονοκύτταρα (κύτταρα/μL)	574±214	604±317	0,977
Ουδετερόφιλα (κύτταρα/μL)	4039±1622	4503±1765	0,271

^aΗ πληροφορία της καπνισματικής συνήθειας ήταν διαθέσιμη για 119 ασθενείς.

Συγκεκριμένα, στους καπνιστές παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των λεμφοκυττάρων ($p=0,002$), των T-κυττάρων ($p=0,010$), των βοηθητικών T-κυττάρων

($p=0,001$), των Β-κυττάρων ($p=0,001$) και των Β-κυττάρων μνήμης ($p=0,001$). Περαιτέρω διερεύνηση όσον αφορά την επίδραση της καπνισματικής συνήθειας στους ασθενείς με ΧΑΠ, δεν κατέδειξε κάποια διαφορά στην συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων της IgG ($p>0,05$). Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να αιτιολογούν από το γεγονός ότι η ομάδα των μη καπνιστών της παρούσας μελέτης (που είχαν ιστορικό βαριάς καπνισματικής συνήθειας) παρουσίαζε μεγαλύτερη συχνότητα και αριθμό παροξύνσεων της νόσου ($p=0,001$), γεγονός που οφείλεται αφενός στη μεγαλύτερη ηλικία των ασθενών ($p=0,001$) και αφετέρου στο πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου τους ($p=0,001$). Ωστόσο, περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι σε κάθε περίπτωση η δράση της φλουτικαζόνης εμφανίζεται κατασταλτική, ανεξάρτητα από την παρούσα καπνισματική συνήθεια των ασθενών, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα που περιγράφονται παραπάνω (**Εικόνα 20**). Ειδικά δε για την ομάδα των καπνιστών, η χρήση της φλουτικαζόνης φάνηκε να είναι ιδιαίτερα κατασταλτική στην περίπτωση των βοηθητικών Τ-κυττάρων ($p=0,024$).



Εικόνα 20: Οι πληθυσμοί των λεμφοκυττάρων (□ απουσία φλουτικαζόνης, ■ παρουσία φλουτικαζόνης) σε καπνιστές και πρώην καπνιστές.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΧΑΠ αποτελεί αντικείμενο έντονου ενδιαφέροντος, δεδομένου ότι η επίπτωση και το συνολικό κοινωνικοοικονομικό της κόστος αυξάνονται τα τελευταία χρόνια, χωρίς όμως παράλληλα να έχει πλήρως αποσαφηνιστεί το παθογενετικό υπόβαθρο της νόσου. Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, διαπιστώθηκε η συμμετοχή κυττάρων καθώς και γονιδίων της μη ειδικής και της ειδικής ανοσίας στην παθογένεση, αλλά και τη σοβαρότητα της νόσου [64]. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η έκφραση των υποδοχέων της ειδικής ανοσίας TAC1 και BAFFR και η παρουσία γενετικών βλαβών-παραλλαγών στα γονίδια *TAC1* και *ICOS* σε ασθενείς με ΧΑΠ, συγκριτικά με υγιή πληθυσμό, ενώ παράλληλα, στα άτομα της μελέτης έγινε ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος. Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη, την σημασία των TLRs στη ΧΑΠ, ανιχνεύθηκαν οι πολυμορφισμοί των *TLR2* και *TLR4*, ώστε να εξακριβωθεί αν σε συνδυασμό με παραλλαγές των γονιδίων *TNFRSF13B* και *ICOS* μπορούν να συμμετέχουν στην παθογένεση ή να επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου.

Αρχικά μελετήθηκε η έκφραση των υποδοχέων TAC1 και BAFFR στην επιφάνεια των B-κυττάρων και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα σε δύο πληθυσμιακές ομάδες, ασθενείς με ΧΑΠ και υγιείς μάρτυρες. Όπως προέκυψε, η μέση έκφραση του TAC1 υποδοχέα ήταν 34,6% στους ασθενείς και 26,7% στους υγιείς μάρτυρες. Το εύρος της έκφρασης του TAC1, που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη, είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα όσον αφορά στην έκφραση του στα B-κύτταρα του περιφερικού αίματος [167]. Ωστόσο διαπιστώθηκε ότι στα B-κύτταρα των ασθενών η έκφραση του TAC1 ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη έκφραση στους υγιείς μάρτυρες και η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Δεδομένου ότι σε καταστάσεις υποξίας αυξάνεται η έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων, η συγκεκριμένη διαφορά ενδεχομένως οφείλεται στην επίδραση της στους ασθενείς [218]. Είναι προφανές ότι απαιτούνται *in vitro* μελέτες που θα αναδείξουν πιθανή συσχέτιση της έκφρασης του TAC1 και της υποξίας και θα επιβεβαιώσουν παθογενετικά το παραπάνω εύρημα.

Ωστόσο, το πιο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν οι διαφορές που προέκυψαν στους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Ειδικότερα, στους ασθενείς διαπιστώθηκε χαμηλότερος απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων, των NK-κυττάρων και των B-κυττάρων, αλλά και του CD5⁺ υποπληθυσμού των τελευταίων, στο περιφερικό αίμα. Η μείωση αυτή, μάλιστα, είναι προοδευτική και ανάλογη με την σοβαρότητα της νόσου, ενώ παράλληλα, ο αριθμός των κυττάρων αυτών φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται ο δείκτης FEV₁. Στο πλαίσιο αυτό, περαιτέρω διερεύνηση της λεμφοπενίας σε ασθενείς και μάρτυρες ανέδειξε ενδιαφέροντα ευρήματα. Ειδικότερα, το ποσοστό λεμφοπενίας (T-, Th-, Tc- και B-λεμφοπενία) στους

ασθενείς με ΧΑΠ διαπιστώθηκε ιδιαίτερα αυξημένο (3,3-33,3%) συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες (1,5-9,1%), διαφορά που ήταν στατιστικά σημαντική. Παράλληλα όμως, στους ασθενείς διαπιστώθηκε σημαντικά υψηλότερος αριθμός μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Ως προς την αιτιολόγηση του φαινομένου της κυτταροπενίας στους ασθενείς, δεν μπορούν παρά μόνο να πιθανολογηθούν μηχανισμοί. Έτσι, καταρχήν, είναι πιθανό η διαφορά αυτή μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, να οφείλεται σε μη φυσιολογική παραγωγή κυττάρων από το μυελό των οστών των πρώτων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα (CD34⁺) εμπλέκονται στην παθογένεση χρόνιων παθολογικών καταστάσεων όπως καρδιαγγειακές, ενδοκρινολογικές, αιματολογικές και νοσήματα του συνδετικού ιστού [219]. Στη ΧΑΠ μάλιστα, διαπιστώθηκε ελάττωση του αριθμού των CD34⁺ κυττάρων σε ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή νόσο. Η μείωση αυτή, μάλιστα, συσχετίζεται με την υποξία, τη σοβαρότητα της απόφραξης των αεραγωγών και την πρόσληψη οξυγόνου [220]. Παρόμοιες μεταβολές στον πληθυσμό των CD34⁺ κυττάρων έχουν αναφερθεί σε σχέση με το κάπνισμα [221] και την ρύπανση του αέρα [222]. Όλα αυτά προτείνουν πιθανώς μια συσχέτιση μεταξύ μη επαρκούς αιμοποίησης και ΧΑΠ.

Ένας δεύτερος μηχανισμός που θα μπορούσε να συμβάλει στην εκδήλωση της κυτταροπενίας στους ασθενείς είναι η αυξημένη απόπτωση των κυττάρων στην περιφέρεια. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα ενεργοποιημένα περιφερικά T-κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ χαρακτηρίζονται από αυξημένη «ροπή» προς απόπτωση [223], ενώ έχει αναφερθεί και αυξημένη απόπτωση ενδοεπιθηλιακών T-κυττάρων στους αεραγωγούς [224]. Οι Hodge και συν. διαπίστωσαν επίσης ότι τα T-κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ (CD4⁺ και CD8⁺) χαρακτηρίζονται από μειωμένη έκφραση της αντι-αποπτωτικής Bcl-2 πρωτεΐνης, καθώς και του υποδοχέα της IL-7, ο οποίος συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης [225]. Ως εκ τούτου, πιθανολογείται αυξημένη απόπτωση των κυττάρων του περιφερικού αίματος στη ΧΑΠ, η οποία μπορεί να οφείλεται σε τοπικά αποπτωτικά σήματα των αεραγωγών [35]. Στο πλαίσιο αυτό, μειωμένη επιβίωση των λεμφοκυττάρων θα μπορούσε να αιτιολογηθεί και από το φαινόμενο της ανοσογήρανσης, που φαίνεται να είναι εντονότερη σε ασθενείς με ΧΑΠ. Συγκεκριμένα, οι Morla και συν. διαπίστωσαν μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην ένταση του καπνίσματος και το μήκος των τελομερών σε καπνιστές και μη [226,227,228]. Μάλιστα, υπολόγισαν ότι 10 τσιγάρα την ημέρα για 40 έτη προκαλούσαν γήρανση των λεμφοκυττάρων κατά 7,4 έτη [227]. Συνεπώς, η αυξημένη γήρανση και απόπτωση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος που παρατηρείται σε ασθενείς με

ΧΑΠ, θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάδειξη των ανοσοφαινοτυπικών ευρημάτων της παρούσας μελέτης.

Επιπρόσθετα, η κυτταροπενία που παρατηρείται στους ασθενείς είναι πιθανό να οφείλεται σε αυξημένη «κατανάλωση» των κυττάρων στον πάσχοντα πνευμονικό ιστό. Είναι γνωστό σήμερα ότι στο πλαίσιο της ανοσοεπιτήρησης (που είναι μια βασική λειτουργία του ανοσιακού συστήματος), τα περισσότερα ώριμα λεμφοκύτταρα «επανακυκλοφορούν» συνεχώς, από το αίμα στους ιστούς και αντίστροφα, πολλές φορές την ημέρα. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυξημένη έκφραση των υποδοχέων CCR5, CXCR3 και CXCR6 σε πνευμονικά CD8⁺ T-κύτταρα συσχετίστηκε θετικά με τη σοβαρότητα της ΧΑΠ [39], ενώ διαπιστώθηκε και αυξημένη έκφραση των αντίστοιχων συνδετών τους CCL3, CXCL9, CXCL16 στον πνευμονικό ιστό [39]. Αντίστοιχα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η δημιουργία των λεμφοζιδίων στον πνεύμονα ασθενών με ΧΑΠ πραγματοποιείται έπειτα από την πρόσληψη ή τη διατήρηση T- και B-κυττάρων που εκφράζουν τον CXCR3 υποδοχέα, σε βαθμό ανάλογο με τη σοβαρότητα της νόσου [229]. Τα κύτταρα αυτά προσελκύονται στην περιοχή μέσω των IP-10/CXCL10 και Mig/CXCL9 συνδετών του CXCR3, που εκφράζονται από κύτταρα του πνεύμονα και των λεμφοζιδίων [229]. Συνεπώς, ο αυξημένος αριθμός των κυττάρων της ειδικής ανοσίας στους αεραγωγούς και το πνευμονικό παρέγχυμα φαίνεται να είναι ανάλογος με την σοβαρότητα της νόσου [45,58,230,231], υποδηλώνοντας παράλληλα την αυξημένη «κατανάλωσή» των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος τοπικά στον πάσχοντα ιστό. Μάλιστα, οι De Jong και συν. διαπίστωσαν ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση του FEV₁ με τον αριθμό των B-κυττάρων [232], όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματά μας. Βέβαια, πρέπει να αναφερθεί ότι, σε αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, οι Urbanowicz και συν., αναφέρουν αύξηση των B-κυττάρων στην περιφέρεια [233]. Οι συγγραφείς όμως συμπεριέλαβαν μόνο 11 ασθενείς με ΧΑΠ στη μελέτη και αντίστοιχα 17 υγιείς καπνιστές και 18 υγιείς μη-καπνιστές δηλαδή, πολύ μικρό αριθμό εξεταζομένων συγκριτικά με την παρούσα μελέτη. Επιπλέον, δεν υπήρξε διάκριση των ασθενών με βάση τη θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή, δεδομένου ότι ενώ αναφέρεται πως 6 στους 10 ασθενείς είχαν λάβει θεραπεία τις τελευταίες 6 εβδομάδες, δεν προσδιορίζονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών [233].

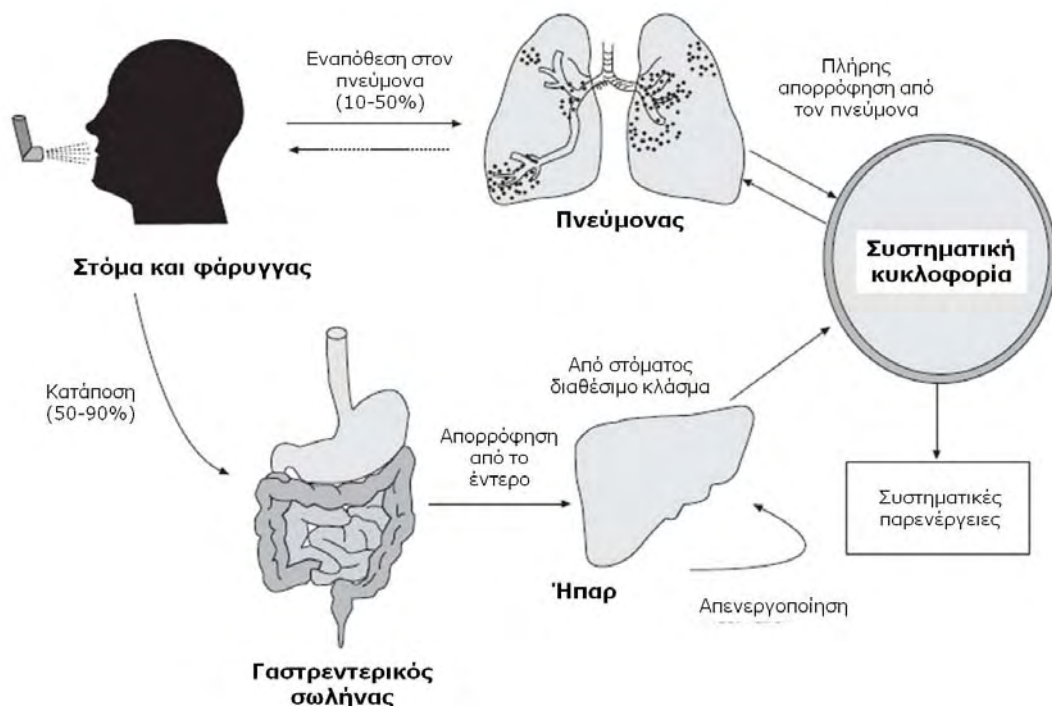
Τέλος, η παρατηρούμενη κυτταροπενία των ασθενών ενδέχεται να προκαλείται υπό την επίδραση της θεραπείας με ανοσοτροποποιητικές ουσίες, όπως είναι τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή. Στις αρχές της δεκαετίας του '80 τα εισπνεόμενα σκευάσματα κορτικοστεροειδών βρέθηκε ότι ήταν άκρως αποτελεσματικά για τη θεραπεία του άσθματος και σύντομα «υιοθετήθηκαν» στην ΧΑΠ χωρίς, ωστόσο να υπάρχει αρχικά καμία

επιστημονική ένδειξη για το όφελός τους. Μάλιστα, ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με ΧΑΠ άρχισε να χρησιμοποιεί τα σκευάσματα άμεσα [234], χωρίς να υπάρχει ούτε μια τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή που να αξιολογεί την αποτελεσματικότητά τους. Οι Suissa S και Barnes PJ αναφέρουν πως η χρήση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών στη θεραπεία της ΧΑΠ έχει προωθηθεί μάλλον «επιθετικά» γύρω από έναν καταρράκτη επιστημονικών ανακρίβειών όσον αφορά στην αποτελεσματικότητά τους [235]. Ωστόσο, σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες θεραπευτικές οδηγίες της ΧΑΠ [83], συνιστάται η θεραπεία ασθενών με σοβαρή έως πολύ σοβαρή ΧΑΠ με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή [83]. Κι αυτό γιατί η τακτική αγωγή εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών φαίνεται να οδηγεί σε κλινικά οφέλη όσον αφορά τα συμπτώματα, τα ποσοστά παροξύνσεων, και τη βελτίωση του FEV₁ δείκτη όπως προέκυψε από αρκετές κλινικές δοκιμές [236,237,238,239].

Στην παρούσα μελέτη, η χρήση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών συσχετίστηκε με πτώση των λεμφοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους στο περιφερικό αίμα, φαινόμενο ιδιαίτερα έντονο στην περίπτωση της εισπνεόμενης φλουτικαζόνης. Μάλιστα, ως αποτέλεσμα, η χορήγηση φλουτικαζόνης συσχετίστηκε και με αυξημένη συχνότητα παροξύνσεων της νόσου. Επομένως, διαφαίνεται μια αρνητική επίδραση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών, σε αντίθεση με αυτό που είναι μέχρι σήμερα ευρέως αποδεκτό. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση στους ασθενείς αυτούς της IgG και των υποτάξεών της, IgG1, IgG2 και IgG3, αντισταθμίζοντας πιθανώς το αρνητικό αποτέλεσμα που αρχικά διαφαίνεται από την χρήση τους. Αντίθετα, δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για τους πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων αυτών όσον αφορά στους χρήστες της βουδεσονίδης. Τα αποτελέσματά μας, όσον αφορά στην αρνητική δράση των κορτικοστεροειδών, συμφωνούν με αυτά των Hodge και συν., που αναφέρουν πως είναι πιθανό η θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή να συμβάλει σε αυξημένη απόπτωση των T-κυττάρων, με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης της Bcl-2 πρωτεΐνης [225]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή (δεξαμεθαζόνη, κυκλοξεμιμίδη) αυξάνουν την έκφραση του TGF-β mRNA στα φυσιολογικά T-κύτταρα [240], ασκώντας και έμμεσα ανοσοκατασταλτική δράση. Παράλληλα, η χρήση τους συσχετίστηκε και με αυξημένο κίνδυνο πνευμονίας [84] γεγονός που δεν μελετήθηκε εκτενώς παθογενετικά. Συγκεκριμένα, οι Carveley και συν. διαπίστωσαν ότι τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή, και μάλιστα η φλουτικαζόνη, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πνευμονίας σε ασθενείς με ΧΑΠ, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης δραστηριότητάς της [84], σε αντίθεση με τη βουδεσονίδη, η οποία στη μελέτη των Sin και συν. σχετικά [88], φαίνεται να είναι ασφαλέστερη. Τα ευρήματα αυτά πιθανώς σχετίζονται και εξηγούνται από τα αποτελέσματα της παρούσας

μελέτης, που παράλληλα παρέχει και ένα σαφή παθογενετικό μηχανισμό για την ερμηνεία τους.

Ωστόσο, το ερώτημα που εγείρεται είναι με ποιο τρόπο τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή, τα οποία διατρέχουν το τραχειοβρογχικό δένδρο και στοχεύουν σε αυτό, μπορούν να επηρεάσουν τα λεμφοκύτταρα της περιφέρειας. Κατά την εισπνοή τους, ένα σημαντικό μέρος της δόσης αποτίθεται στο στόμα και στο φάρυγγα, όπου έχει τη δυνατότητα να ασκήσει τοπικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Αυτή η μερίδα της δόσης, αν δεν ξεπλυθεί από το στόμα, μπορεί να καταποθεί και στη συνέχεια να απορροφηθεί από το γαστρεντερικό σωλήνα [241]. Το φάρμακο, καθώς και ό,τι «δραπετεύει» της πρώτης απενεργοποίησης στο ήπαρ, εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία προκαλώντας ενδεχομένως εξωπνευμονικές ανεπιθύμητες ενέργειες [242]. Επιπρόσθετα και μεγάλο μέρος της δόσης των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών που φτάνει τους αεραγωγούς μπορεί να απορροφηθεί μέσω της πνευμονικής στη γενική κυκλοφορία, όπου έχει τη δυνατότητα να ασκήσει επίσης συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες [241]. Η σχηματική απεικόνιση της «κυκλοφορίας» του εισπνεόμενου κορτικοστεροειδούς βρίσκεται παρακάτω (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση της μοίρας ενός εισπνεόμενου κορτικοστεροειδούς (από Derendorf H, με τροποποιήσεις [242]).

Τελευταία δε, γίνεται εκτενής αναφορά στην επίδραση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών στα Τ-κύτταρα, είτε άμεσα, είτε μέσω έμμεσης επίδρασής τους στα δενδριτικά κύτταρα, τα Β-κύτταρα, τα ΝΚ-κύτταρα και τα ΝΚΤ-κύτταρα [243]. Μάλιστα, επειδή τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή μπορούν να έχουν κατασταλτική δράση σε κυτταροκίνες των Β-κυττάρων (π.χ. IL-4) ενδέχεται να επιδρούν τελικά στα ίδια τα Β-κύτταρα [244].

Θα μπορούσε κανείς να αναρωτηθεί γιατί η φλουטיκαζόνη και η βουδεσονίδη δεν έχουν το ίδιο αρνητικό αποτέλεσμα. Η μόνη φαρμακοδυναμική παράμετρος που ποικίλλει μεταξύ των δύο κορτικοστεροειδών είναι η συγγένεια πρόσδεσης του υποδοχέα, η οποία αποτελεί ένδειξη της κλινικής ασφάλειας του εισπνεόμενου κορτικοστεροειδούς, δεδομένου ότι τόσο οι θετικές επιπτώσεις του στον πνεύμονα, όσο και οι ανεπιθύμητες ενέργειές του (τοπικές και συστηματικές), μεσολαβούνται από τους ίδιους, ευρείας έκφρασης υποδοχείς [242]. Όμως, τα κύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών της μελέτης μας επηρεάζονται αποκλειστικά από τη φλουטיκαζόνη, ενώ η βουδεσονίδη δεν έχει καμία επίδραση. Σύμφωνα με την ανασκόπηση του Derendorf και συν., ως τιμή αναφοράς της σχετικής συγγένειας πρόσδεσης (relative receptor affinity, RRA) των κορτικοστεροειδών στους υποδοχείς χρησιμοποιείται αυτή της δεξαμεθαζόνης, η οποία ισούται με 100 μονάδες. Τη στιγμή που η RRA της βουδεσονίδης ισούται με 935 μονάδες, η αντίστοιχη RRA της φλουטיκαζόνης είναι διπλάσια αγγίζοντας τις 1800 μονάδες [245]. Επιπρόσθετα, η φλουטיκαζόνη είναι ένα ισχυρά λιπόφιλο κορτικοστεροειδές, άρα με μεγάλο εύρος κατανομής, μεγάλη εναπόθεση σε σταθερή κατάσταση στους λιπώδεις ιστούς και εξισορρόπηση με το αίμα [246]. Σύμφωνα με τη μετα-ανάλυση του Lipworth και συν., η φλουטיκαζόνη εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη δοσοεξαρτώμενη καταστολή των επινεφριδίων σε σχέση με άλλα εισπνεόμενα στεροειδή, για παράδειγμα 4,3 φορές μεγαλύτερη από την βουδεσονίδη [247]. Επομένως, ακόμα και με την ίδια δόση εισπνεόμενης βουδεσονίδης και φλουטיκαζόνης, οι παρενέργειες της φλουטיκαζόνης μπορούν να είναι πιο έντονες.

Είναι ωστόσο αδιευκρίνιστο πως συνάδει η κατασταλτική δράση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών με την αύξηση της IgG και των υποτάξεων IgG1, IgG2 και IgG3 στους χρήστες της φλουטיκαζόνης στην παρούσα μελέτη. Έχει διαπιστωθεί ότι τα κορτικοστεροειδή μπορούν να ενισχύσουν την ισοτυπική μεταστροφή και τη σύνθεση της IgE από τα Β-κύτταρα μέσω της υπερέκφρασης του CD40L [90]. Εάν υπάρχει παρόμοιος μηχανισμός και για την IgG και τις υποτάξεις της δεν είναι γνωστό σήμερα και χρήζει περαιτέρω μελέτης. Η κλινική σημασία της υπερέκφρασης των ανοσοσφαιρινών στη ΧΑΠ είναι μεγάλη, δεδομένου ότι οι επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις και οι παροξύνσεις

ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση φλουτικαζόνης συσχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα παροξύνσεων της νόσου, παρά την αύξηση των IgG ανοσοσφαιρινών στο αίμα. Είναι προφανές ότι προοπτικές μελέτες, με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, μπορούν να οδηγήσουν σε πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της έλλειψης εργασιών αναφορικά με τις γενετικές βλάβες των γονιδίων *TNFRSF13B/TAC1* και *ICOS* σε ασθενείς με ΧΑΠ. Για το λόγο αυτό, υπολογίστηκε η επίπτωση γενετικών βλαβών, που προηγούμενα είχαν ανιχνευθεί στον Ελληνικό πληθυσμό, στα γονίδια ειδικής ανοσίας *TNFRSF13B/TAC1* (V220A, P251L, C104R) και *ICOS* (έλλειψη), καθώς και γενετικών βλαβών των *TLR2* (R753Q) και *TLR4* (D299G, T399I) γονιδίων της μη ειδικής ανοσίας. Επειδή ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν μεγάλος χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος συνδυασμού αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και χρήσης περιοριστικών ενζύμων (PCR-RFLP). Για να είναι δυνατή η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε παράλληλα ανάλυση της παρουσίας των γενετικών βλαβών σε υγιείς μάρτυρες.

Έπειτα από δοκιμασία χ^2 διαπιστώθηκε ότι στο δείγμα των μαρτύρων υπήρχε παραβίαση της ισορροπίας Hardy-Weinberg, όσον αφορά στην παραλλαγή *TNFRSF13B/TAC1-V220A*. Σύμφωνα με την ισορροπία H-W η γενοτυπική συχνότητα δύο αλληλίων ενός γονιδιακού τόπου παραμένει σταθερή από γενιά σε γενιά [11], εκτός αν υπάρξουν κάποιες επιρροές που μπορούν να την διαταράξουν. Συνοπτικά, οι προϋποθέσεις εξασφάλισης της ισορροπίας αυτής είναι α) το πλήθος των ατόμων στον πληθυσμό να είναι, πρακτικά, άπειρο, β) οι δυνατές συζεύξεις να είναι ελεύθερες και τυχαίες, γ) όλα τα αλληλόμορφα να έχουν την ίδια πιθανότητα να μεταβιβαστούν στους γαμέτες, συνεισφέροντας έτσι στον ίδιο βαθμό στη συγκρότηση της γονιδιακής δεξαμενής και δ) κανένα αλληλόμορφο να μην προστίθεται και να μην απομακρύνεται από την γονιδιακή δεξαμενή (π.χ. μετανάστευση ατόμων), ή να μην δημιουργείται κάποιο νέο αλληλόμορφο (μέσω μεταλλαξιγένεσης) [248]. Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε ότι εκτός εργαστηρίου μια ή περισσότερες από αυτές τις προϋποθέσεις παραβιάζονται [248]. Επομένως, το μικρό μέγεθος δείγματος των υγιών μαρτύρων (n=66) θα μπορούσε να αιτιολογήσει την αύξηση του ποσοστού ομοζυγωτίας και επακολούθως την απόκλιση από την ισορροπία H-W, τη στιγμή που σε ένα θεωρητικά άπειρο δείγμα οι συχνότητες αλληλίου θα παρέμεναν σχετικά σταθερές από γενιά σε γενιά [249]. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι η πλειοψηφία των υγιών μαρτύρων ήταν κάτοικοι δύο μικρών χωριών θα μπορούσε να υποστηρίξει την υπόθεση

ⁱⁱ Σύμφωνα με την εξίσωση $p^2+2pq+q^2=1$.

περί μη τυχαίας σύζευξης. Να σημειωθεί ότι η ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης δεν είναι ένα σπάνιο φαινόμενο στις μελέτες συσχέτισης ασθενών-μαρτύρων στην ΧΑΠ [250,251].

Μέχρι σήμερα, δεν είχε μελετηθεί η παρουσία γενετικών βλαβών στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με ΧΑΠ. Επομένως, η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας έγινε βάσει μελετών που αφορούν σε ασθενείς με CVID και στους αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες [132,133,252]. Διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των V220A και P251L στον Ελληνικό πληθυσμό, σε ασθενείς με ΧΑΠ και υγιείς μάρτυρες, είναι υψηλότερο συγκριτικά με ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα [132,133,252]. Εντούτοις, τα αποτελέσματά μας για τους V220A και P251L συμφωνούν με τα ευρήματα των μελετών αυτών περί απουσίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ ασθενών και μαρτύρων [132,133,252]. Παρόμοια, η συχνότητα της μετάλλαξης *TACI-C104R*, όπως προκύπτει από την εμφάνισή της σε έναν μόνο ασθενή με ΧΑΠ (0,81%) και κανένα υγιή μάρτυρα (0,0%), συνάδει με τα ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα [132,133,134]. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο ετερόζυγος ασθενής με ΧΑΠ δεν εμφάνισε διαταραχές στην έκφραση του TACI υποδοχέα ή στη συγκέντρωση των IgG και IgA ανοσοσφαιρινών, που θα αναμένονταν σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, όπου η παρουσία της C104R μετάλλαξης, ακόμη και σε ετερόζυγο μορφή, συσχετίζεται ισχυρά με εμφάνιση CVID [125,126]. Μέχρι πρόσφατα, δεν ήταν γνωστό αν η επίδραση αυτή της C104R οφείλεται σε διαταραχή της σηματοδότησης ή σε ανεπαρκή απλότυπο [137]. Φαίνεται, όμως, ότι η παρουσία της προκαλεί διαταραχή της λειτουργίας του TACI υποδοχέα όπως διαπίστωσαν οι Geha και συν. με τη χρήση διαγονιδιακών ζώων [139]. Παρ' όλα αυτά, η παρουσία της μετάλλαξης σε άτομο μεγάλης ηλικίας χωρίς ανοσοανεπάρκεια ενισχύει την άποψη [253] ότι μόνη της η βλάβη δεν οδηγεί σε κλινικό σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας και ότι απαιτούνται επιπρόσθετοι παράγοντες (γενετικοί ή επίκτητοι) για την πλήρη εκδήλωση της νόσου (CVID).

Οι μελέτες των τελευταίων ετών στην ΧΑΠ υποστηρίζουν τη συμμετοχή της μη ειδικής ανοσίας, και ιδιαίτερα των παραλλαγών των TLR υποδοχέων, στην έναρξη ή το φαινότυπο της νόσου. Με το σκεπτικό αυτό λοιπόν, μελετήθηκε και η παρουσία πολυμορφισμών των *TLR4* και *TLR2* σε ασθενείς με ΧΑΠ και υγιείς μάρτυρες. Από την παρούσα μελέτη δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την παρουσία κοινών πολυμορφισμών του *TLR4* (D299G, T399I) και του πολυμορφισμού *TLR2-R753Q* μεταξύ των δύο ομάδων. Αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται αρχικά να είναι αντίθετο με προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου μας, όπου η παρουσία του *TLR4-T399I* πολυμορφισμού συσχετίστηκε με 2,4 φορές υψηλότερο κίνδυνο για την εκδήλωση της νόσου σε καπνιστές [194]. Ωστόσο, η συγκεκριμένη διαφορά, είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού μεγέθους των δειγμάτων των δύο μελετών και των διαφορετικών κριτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν

κατά την επιλογή των συμμετεχόντων σε αυτές δεδομένου ότι στην πρώτη μελέτη η ομάδα ελέγχου ήταν μόνο καπνιστές.

Γενικότερα, είναι αμφίβολο οι γενετικές βλάβες που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη να ευθύνονται αποκλειστικά για την εμφάνιση ή τη σοβαρότητα εκδήλωσης της ΧΑΠ. Εξάλλου, μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί αρκετά γονίδια (*SERPINA1*, *GSTM1*, *TGFB1*, *TNF*, *SOD3* κτλ) και έχουν συσχετιστεί με αυξημένη ευαισθησία έναντι της νόσου [254]. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό ότι όλες οι γενετικές βλάβες που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι κληρονομήσιμες [255]. Και αυτό δεδομένου ότι έχει διαπιστωθεί πως η ΧΑΠ χαρακτηρίζεται από κληρονομική επιβάρυνση [256]. Έτσι, έχει υπολογιστεί ότι ο κίνδυνος εκδήλωσης της νόσου είναι μεγαλύτερος σε μονοζυγωτικούς από ότι σε διζυγωτικούς διδύμους, ενώ 60% της προδιάθεσης των ασθενών με ΧΑΠ εκτιμάται ότι μπορεί να εξηγηθεί από γενετικούς παράγοντες [256]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το γεγονός πως στην παρούσα μελέτη συμπεριλαμβάνονται δύο μονοζυγωτικοί δίδυμοι με πολύ σοβαρή ΧΑΠ (σταδίου 4) και IgA ανεπάρκεια έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [255,256].

Σύμφωνα με τους Tabor και συν. υπάρχουν πολλά επιδημιολογικά κριτήρια τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη στις μελέτες γονιδιακής συσχέτισης, όπως π.χ. η ύπαρξη «δοσοεξαρτώμενης» σχέσης μιας γενετικής βλάβης, δηλαδή άτομα με δύο αντίγραφα ίσως βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο από αυτά με ένα αντίγραφο. Επίσης, θεωρείται απαραίτητη η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Ωστόσο, η απουσία επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων συσχέτισης δεν σημαίνει απαραίτητα και αναιρέσή τους. Αντιθέτως, υπογραμμίζει την ανάγκη για περισσότερες μελέτες σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ή για τη λεπτομερή μελέτη της λειτουργίας ενός γονιδίου [257]. Επομένως, πολυπαραγοντικά νοσήματα, όπως είναι η ΧΑΠ, είναι περισσότερο πιθανό να προκαλούνται από διάφορα, και ίσως αναρίθμητα, γονίδια, καθένα από τα οποία συνεισφέρει σε διαφορετικό βαθμό στο σχετικό κίνδυνο και στην εκδήλωση της νόσου [257]. Είναι απαραίτητο να τονιστεί ότι η παρουσία των παραλλαγών αθροιστικά μειώθηκε με την πρόοδο των σταδίων της νόσου υποδηλώνοντας ότι, η συνδυασμένη παρουσία των πολυμορφικών αλληλίων δρα προστατευτικά. Ανάλογα αποτελέσματα στην ΧΑΠ έχουν διαπιστωθεί από τους Budulac και συν., οι οποίοι διαπίστωσαν πως η παρουσία πολλαπλών πολυμορφισμών στο *MRP1* γονίδιο μπορεί να σχετίζεται σημαντικά με υψηλότερο δείκτη FEV₁ στους ασθενείς [258]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί θετική επίδραση πολλαπλών SNPs του μιτοχονδριακού DNA στην επιβίωση ασθενών με καρκίνο του νεφρού. Δηλαδή, οι ασθενείς με 0-2 γενετικές «βλάβες» είχαν μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με φορείς 3-6 τέτοιων «βλαβών» [259]. Τέλος, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η παρουσία πολυμορφισμών

μπορεί μιν να καθιστά τους φορείς περισσότερο ανθεκτικούς σε εντοπισμένη φλεγμονή, αλλά ταυτόχρονα πιο επιρρεπείς σε συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση [260,261].

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε έτσι ώστε να εξετάσει τις γενετικές βλάβες στα γονίδια *TAC1* και *ICOS* και την έκφραση των υποδοχέων της ειδικής ανοσίας *TAC1* και *BAFFR* στα Β-κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ και υγιών μαρτύρων. Επίσης, στόχος ήταν να προβεί στον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων του περιφερικού αίματος των δύο ομάδων που αναφέρθηκαν. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η παρουσία των παραλλαγών στα γονίδια *TAC1*, *TLR4* και *TLR2* παρατηρείται τόσο σε ασθενείς με ΧΑΠ όσο και σε υγιείς μάρτυρες με παρόμοια συχνότητα. Εντούτοις, αποκαλύφθηκε πως οι ασθενείς με ήπια και μέτρια μορφή της νόσου παρουσιάζουν μεγαλύτερη συσσώρευση γενετικών βλαβών συγκριτικά με τους ασθενείς με σοβαρή και πολύ σοβαρή νόσο, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της προστατευτικής επίδρασης της «συρροής» γενετικών παραλλαγών στους πρώτους.

Επίσης, διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση του *TAC1* υποδοχέα στα Β-κύτταρα μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, χωρίς όμως παράλληλα να παρατηρείται διαφορά στην έκφραση του *BAFFR* υποδοχέα. Επιπρόσθετα, η διαπίστωση πως στο περιφερικό αίμα των ασθενών διάφοροι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί εμφανίζονται ελαττωμένοι (Β-κύτταρα, ΝΚ-κύτταρα), και μάλιστα προοδευτικά μειώνονται με την πρόοδο των σταδίων της νόσου, έστρεψε το ενδιαφέρον μας σε δευτερογενή μεν αλλά σημαντικά αποτελέσματα. Με βάση τα ευρήματα αυτά φαίνεται ότι η χρήση της εισπνεόμενης φλουτικαζόνης στους ασθενείς με ΧΑΠ προκαλεί μείωση των κυττάρων του περιφερικού αίματος ενώ παράλληλα αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων ανοσοσφαιρινών πιθανόν αντισταθμίζοντας το φαινόμενο αυτό. Το εύρημα αυτό συνδυάστηκε και με αυξημένη συχνότητα παροξύνσεων της νόσου.

Η χρήση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών θεωρείται ενδεδειγμένη θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση των ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, με βάση συγκεκριμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Ωστόσο, το ενδεχόμενο να σχετίζεται με πτώση του αριθμού των λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, τα οποία είναι σημαντικά για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων, θέτει τελικά σε αμφισβήτηση την ορθότητα της χρήσης τους σε ορισμένους τουλάχιστον ασθενείς. Στην παρούσα εργασία τονίσαμε τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών, καθώς και τις διαφορές του αριθμού των Β-κυττάρων και των υποπληθυσμών τους ανάμεσα στους ασθενείς, παραμέτρων δηλαδή που μπορούν να επηρεάσουν τον κλινικό τους φαινότυπο. Η διέξοδος φαίνεται να βρίσκεται αφενός στον προσδιορισμό του ανοσοφαινοτύπου των ασθενών πριν τη χορήγηση ενός εισπνεόμενου κορτικοστεροειδούς, αφετέρου στην αναζήτηση άλλων,

κατά περίπτωση, θεραπευτικών εφαρμογών όπως η χορήγηση ανοσοσφαιρινών [262] ή η χρήση βλαστικών κυττάρων [263]. Προς αυτήν την κατεύθυνση η αντιμετώπιση της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας ως μια ανοσοανεπαρκούς κατάστασης δημιουργεί νέες προοπτικές και ανοίγει νέους ορίζοντες που πρέπει να διερευνηθούν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μεταλλάξεις *TAC1* και *ICOS*: Επιδημιολογία και κλινικές συσχετίσεις σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική νόσο

Κυριακή Λιαδάκη

Εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας

Τμήμα Ιατρικής – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

(Διευθυντής: Καθ. Α.Ε. Γερμενής)

ΣΚΟΠΟΣ Σύμφωνα με πρόσφατες βιβλιογραφικές εργασίες, η ΧΑΠ είναι μια συστηματική νόσος στην οποία η συμμετοχή κυττάρων του ανοσιακού συστήματος σχετίζεται με την σοβαρότητά της. Εντούτοις, η μελέτη του φαινομένου σε επίπεδο έκφρασης υποδοχέων της ειδικής ανοσίας και γονιδίων που τα εκφράζουν, καθώς και ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος συγκριτικά με αντίστοιχα φυσιολογικά άτομα, ίδιας ηλικίας και φύλου, δεν είχε μελετηθεί συστηματικά. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί η έκφραση των υποδοχέων *TAC1* και *BAFFR* στα Β-κύτταρα και η παρουσία γενετικών βλαβών-παραλλαγών στα γονίδια *TAC1* και *ICOS* σε ασθενείς με ΧΑΠ και αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες. Επίσης σκοπός ήταν να προσδιοριστεί ο φαινότυπος των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος στο περιφερικό αίμα των ασθενών σε διάφορα στάδια της νόσου καθώς και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών (πάντα συγκριτικά με ομάδα υγιών μαρτύρων). Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη προηγούμενων αποτελεσμάτων του εργαστηρίου, όσον αφορά το ρόλο των *TLRs* στην εμφάνιση της ΧΑΠ, η μελέτη συμπεριέλαβε και την ανίχνευση μονήρων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των *TLR2* και *TLR4*, που μελετήθηκαν σε συνδυασμό με παραλλαγές των γονιδίων *TNFRSF13B* και *ICOS*, για να διαπιστωθεί αν συρρέοντες παραλλαγές ανοσογονιδίων συμμετέχουν στην παθογένεση ή επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου.

ΥΛΙΚΟ Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 123 ασθενείς με ΧΑΠ και 66 υγιείς μάρτυρες κατά την ένταξή τους στη μελέτη. Για τους ασθενείς η αιμοληψία επαναλήφθηκε 6 και 12 μήνες μετά (56 και 44 ασθενείς, αντίστοιχα). Από όλα τα άτομα της μελέτης απομονώθηκε γενετικό υλικό και ορός.

ΜΕΘΟΔΟΙ Η έκφραση των υποδοχέων TAC1 και BAFFR, μέσω των μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-CD267 (κλώνος: 1a1, BioLegend) και αντι-CD268 (κλώνος: 11C1, BioLegend), καθώς και ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Η ανίχνευση των παραλλαγών V220A, P251L, C104R του γονιδίου *TNFRSF13B/TAC1*, των πολυμορφισμών D299G και T399I του γονιδίου *TLR4*, και του R753Q του γονιδίου *TLR2* έγινε με πρωτόκολλο PCR-RFLP. Η ανίχνευση ελλείψεων του γονιδίου *ICOS* έγινε με πρωτόκολλο PCR. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών έγινε με ανοσονεφελομετρία. Η αναζήτηση συσχετίσεων έγινε με τη χρήση μονοπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης. Η σύγκριση των συνεχών μεταβλητών έγινε με μη παραμετρική δοκιμασία U των Mann-Whitney και τον συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος SPSS (v13.0).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Στο περιφερικό αίμα των ασθενών, κατά τη διάγνωση, διαπιστώθηκε υψηλότερη έκφραση του υποδοχέα TAC1 στα B-κύτταρα συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες (μέση τιμή \pm SD: 34,6 \pm 20,2% και 26,7 \pm 12,6%, αντίστοιχα, $p=0,019$). Παράλληλα, διαπιστώθηκε πως στο περιφερικό αίμα των ασθενών διάφοροι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί εμφανίζονται ελαττωμένοι (λεμφοκύτταρα, B-κύτταρα, NK-κύτταρα) και μάλιστα, η μείωση των κυττάρων ήταν ανάλογη με την πρόοδο της νόσου ($p<0,05$). Με βάση δευτερογενή ευρήματα της μελέτης φαίνεται ότι η χρήση της εισπνεόμενης φλουטיκαζόνης οδηγεί σε μείωση των βοηθητικών T-κυττάρων και των B-κυττάρων, καθώς και σε αύξηση της συγκέντρωσης της IgG ($p=0,001$) και των υποτάξεων IgG1 ($p=0,022$), IgG2 ($p=0,035$) και IgG3 ($p=0,017$). Παράλληλα, τα ευρήματα αυτά συνδυάστηκαν με αυξημένη συχνότητα παροξύνσεων της νόσου ($p=0,006$). Τέλος, παραλλαγές των *TAC1*, *TLR2* και *TLR4* παρατηρούνται τόσο σε ασθενείς με ΧΑΠ όσο και σε υγιείς μάρτυρες με παρόμοια συχνότητα. Ωστόσο, αποκαλύφθηκε πως οι ασθενείς με ήπια και μέτρια μορφή της νόσου παρουσιάζουν μεγαλύτερη συσσώρευση γενετικών βλαβών συγκριτικά με τους ασθενείς με σοβαρή και πολύ σοβαρή νόσο ($p=0,038$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Παρατηρήθηκε ότι, οι ασθενείς με ΧΑΠ, παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του TAC1 υποδοχέα στα B-κύτταρα και παράλληλα σημαντικές διαφορές στον απόλυτο αριθμό, κυρίως των B-κυττάρων, με τα αντίστοιχα φυσιολογικά άτομα. Σε μια προσπάθεια διερεύνησης των ευρημάτων μας, διαπιστώθηκε ότι το φαινόμενο αυτό συνδέεται με την χρήση εισπνεόμενης φλουטיκαζόνης. Παράλληλα, σε ασθενείς με σοβαρή έως πολύ σοβαρή νόσο παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός των παραλλαγών στα γονίδια που μελετήθηκαν. Η συσχέτιση αυτή δείχνει να συνηγορεί υπέρ της προστατευτικής επίδρασης της συρροής γενετικών παραλλαγών σε ασθενείς με ήπια και μέτρια νόσο. Τα χαρακτηριστικά αυτά

(αριθμός κυττάρων και παρουσία παραλλαγών), θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν καθοριστικούς παράγοντες για την έκβαση της νόσου ασθενών με ΧΑΠ.

ABSTRACT

Mutations *TACI* and *ICOS*: epidemiology and clinical associations in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Kyriaki Liadaki

Department of Immunology - Histocompatibility

School of Medicine – University of Thessaly

(Director: Prof. A.E. Germenis)

OBJECTIVE COPD is a systemic disease whereas the participation of immune cells has been associated with the severity of the disease. The purpose of this study was to investigate in COPD patients the expression of the TACI and BAFFR receptors on B-cells, the presence of *TNFRSF13B/TACI* and *ICOS* variations, the phenotype of immune cells (and their subpopulations) in the peripheral blood at different stages of the disease, along with the levels of immunoglobulins. Additionally, regarding our previous results, concerning the role of TLRs in the onset of COPD, the study also included the detection of single nucleotide polymorphisms of *TLR2* and *TLR4*, in conjunction with *TNFRSF13B/TACI* and *ICOS* variants, in order to determine whether co-segregating variations are involved in the pathogenesis or affect the phenotype of the disease.

SAMPLES Peripheral blood was collected from 123 patients with COPD and 66 healthy controls (age- and sex-matched). For patients, blood sampling was repeated 6 and 12 months later (56 and 44 patients, respectively). For all the subjects immunophenotyping was performed directly after sampling, while genetic material and serum was also isolated.

METHODS The expression levels of the TACI and BAFFR receptors, through monoclonal antibodies anti-CD267 (clone: 1a1, BioLegend) and anti-CD268 (clone: 11C1, BioLegend) respectively, and the immunophenotyping of peripheral blood cells were estimated by flow cytometry. The detection of V220A, P251L, C104R variants of *TNFRSF13B/TACI*, the D299G and T399I polymorphisms of *TLR4*, and R753Q of *TLR2* was performed by PCR-RFLP protocol, while the detection of *ICOS* deletions by long-range PCR. The concentration of immunoglobins was determined by immunonephelometry. Statistical

analyses were performed by the non-parametric Mann-Whitney and the Spearman correlation tests, using the SPSS (v13.0) software.

RESULTS TAC1 receptor expression was found higher in COPD patients compared to healthy controls (mean±SD: 34.6 ± 20.2% and 26.7 ± 12.6%, respectively, p=0.019). Peripheral blood lymphocyte populations, including total lymphocytes, B-cells, and NK cells, were significantly decreased in COPD patients, while these reductions were proportional to the progression of the disease (p <0.05). Interestingly, the use of inhaled fluticasone resulted in a reduction of T-helper and B cells and simultaneously to an increase of the levels of IgG (p=0.001) and its subclasses IgG1 (p=0.022), IgG2 (p=0.035) and IgG3 (p=0.017) in the peripheral blood. Furthermore, the above findings, due to the usage of fluticasone, were also associated with an increased incidence of disease exacerbations (p=0.006). Finally, variants of *TAC1*, *TLR2* and *TLR4* were observed both in COPD patients and healthy controls with a rather similar frequency (p>0.05). However, patients with mild and moderate form of the disease exhibited a greater segregation of genetic variants compared to patients with severe and very severe disease (p=0.038).

CONCLUSION Patients with COPD displayed a significant increase of TAC1 expression on B-cells and also, significant decreases in the absolute numbers of subpopulations of immune cells, compared to healthy individuals. However, the reduction of T-helper and B cells, along with an increase of COPD exacerbations, was mainly attributed to the usage of inhaled fluticasone. Furthermore, in COPD the segregation of immune gene variants seems to favor a protective effect in patients with mild and moderate disease. These findings could represent determinants of disease outcome in patients with COPD.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. MURRAY JL, LOPEZ AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study *Lancet* 1997, 349:1498-1504
2. LUNDBÄCK B, LINDBERG A, LINDSTRÖM M, RÖNMARK E, JONSSON AC, JÖNSSON E, LARSSON LG, ANDERSSON S, SANDSTRÖM T, LARSSON K. Not 15 but 50% of smokers develop COPD?--Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies *Respir Med* 2003, 97:115-122
3. BRUCE N, PEREZ-PADILLA R, ALBALAK R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge *Bull World Health Organ* 2000, 78:1078-1092
4. RABE KF, HURD S, ANZUETO A, BARNES PJ, BUIST SA, CALVERLEY P, FUKUCHI Y, JENKINS C, RODRIGUEZ-ROISIN R, VAN WEEL C, ZIELINSKI J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:532-555
5. DAVIS RM, NOVOTNY TE. Changes in risk factors: the epidemiology of cigarette smoking and its impact on chronic obstructive pulmonary disease *Am Rev Respir Dis* 1989, 140:S82–84
6. COSIO M, GHEZZO H, HOGG JC, CORBIN R, LOVELAND M, DOSMAN J, MACKLEM PT. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests *N Engl J Med* 1978, 298:1277-1281
7. COSIO MG, SAETTA M, AGUSTI A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease *N Engl J Med* 2009, 360:2445-2454
8. RENNARD SI, VESTBO J. COPD: the dangerous underestimate of 15% *Lancet* 2006, 367:1216-9
9. LØKKE A, LANGE P, SCHARLING H, FABRICIUS P, VESTBO J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population *Thorax* 2006, 61:935-939
10. MILLS PR, DAVIES RJ, DEVALIA JL. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160:S38-43
11. JANEWAY C, TRAVELS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M. *Immunobiology*, Churchill Livingstone 2001, 7-10
12. KURTZ J. Specific memory within innate immune systems *Trends Immunol* 2005, 26:186-192
13. IMLER JL, ZHENG L. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals *J Leukoc Biol* 2004, 75:18-26
14. RAO T, RICHARDSON B. Environmentally induced autoimmune diseases: potential mechanisms *Environ Health Perspect* 1999, 107:737-742
15. MATZINGER P. The danger model: a renewed sense of self *Science* 2002, 296:301-305
16. WICKENDEN JA, CLARKE MC, ROSSI AG, RAHMAN I, FAUX SP, DONALDSON K, MACNEE W. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 29:562-570
17. SUN W, WU R, LAST JA. Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line *Toxicology* 1995, 100:163-174
18. STONE PJ, GOTTLIEB DJ, O'CONNOR GT, CICCOLELLA DE, BREUER R, BRYAN-RHADFI J, SHAW HA, FRANZBLAU C, SNIDER GL. Elastin and collagen degradation products in urine of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:952-959
19. CHURG A, ZAY K, SHAY S, XIE C, SHAPIRO SD, HENDRICKS R, WRIGHT JL. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 27:368-374
20. MORTAZ E, ADCOCK IM, ITO K, KRANEVELD AD, NIJKAMP FP, FOLKERTS G. Cigarette smoke induces cxcl8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor *Eur Respir J* 2010, 36:1143-1154
21. JIANG D, LIANG J, LI Y, NOBLE PW. The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury *Cell Res* 2006, 16:693-701

-
22. DI STEFANO A, CARAMORI G, OATES T, CAPELLI A, LUSUARDI M, GNEMMI I, IOLI F, CHUNG KF, DONNER CF, BARNES PJ, ADCOCK IM. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD *Eur Respir J* 2002, 20:556-563
 23. COX LA JR. A Causal Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Risk *Risk Anal* 2011, 31:38-62
 24. RETAMALES I, ELLIOTT WM, MESH I B, COXSON HO, PARE PD, SCIURBA FC, ROGERS RM, HAYASHI S, HOGG JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:469-473
 25. TURATO G, ZUIN R, MINIATI M, BARALDO S, REA F, BEGHÉ B, MONTI S, FORMICHI B, BOSCHETTO P, HARARI S, PAPI A, MAESTRELLI P, FABBRI LM, SAETTA M. Airway inflammation in severe chronic obstructive pulmonary disease: relationship with lung function and radiologic emphysema *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166:105-110
 26. POLVERINO F, BARALDO S, BAZZAN E, AGOSTINI S, TURATO G, LUNARDI F, BALESTRO E, DAMIN M, PAPI A, MAESTRELLI P, CALABRESE F, SAETTA M. A novel insight into adaptive immunity in chronic obstructive pulmonary disease: B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 182:1011-1019
 27. SAPKOTA AR, BERGER S, VOGEL TM. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes *Environ Health Perspect* 2010, 118:351-356
 28. GETTS MT, MILLER SD. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: triggering of autoimmune diseases by infections *Clin Exp Immunol* 2010, 160:15-21
 29. ARNISON Y, SHOENFELD Y, AMITAL H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity *J Autoimmun* 2010, 34:J258-265
 30. MCWILLIAM AS, NAPOLI S, MARSH AM, PEMPER FL, NELSON DJ, PIMM CL, STUMBLES PA, WELLS TN, HOLT PG. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli *J Exp Med* 1996, 184:2429-2432
 31. BRATKE K, KLUG M, BIER A, JULIUS P, KUEPPER M, VIRCHOW JC, LOMMATZSCH M. Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, 38:655-660
 32. D'HULST AI, VERMAELEN KY, BRUSSELLE GG, JOOS GF, PAUWELS RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice *Eur Respir J* 2005, 26:204-213
 33. ROOS-ENGSTRAND E, POURAZAR J, BEHNDIG AF, BLOMBERG A, BUCHT A. Cytotoxic T cells expressing the co-stimulatory receptor NKG2D are increased in cigarette smoking and COPD *Respir Res* 2010, 11:128
 34. KASAHARA Y, TUDER RM, COOL CD, LYNCH DA, FLORES SC, VOELKEL NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163:737-744
 35. HODGE S, HODGE G, SCICCHITANO R, REYNOLDS PN, HOLMES M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells *Immunol Cell Biol* 2003, 81:289-296
 36. MAJO J, GHEZZO H, COSIO MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema *Eur Respir J* 2001, 17:946-953
 37. DEMEDTS IK, DEMOOR T, BRACKE KR, JOOS GF, BRUSSELLE GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema *Respir Res* 2006, 7:53
 38. BUTCHER EC, PICKER LJ. Lymphocyte homing and homeostasis *Science* 1996, 272:60-66
 39. FREEMAN CM, CURTIS JL, CHENSUE SW. CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8+ cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity *Am J Pathol* 2007, 171:767-776

-
40. O'SHAUGHNESSY TC, ANSARI TW, BARNES NC, JEFFERY PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV₁ *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 155:852-857
 41. SAETTA M, DI STEFANO A, TURATO G, FACCHINI FM, CORBINO L, MAPP CE, MAESTRELLI P, CIACCIA A, FABBRI LM. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157:822-826
 42. SAETTA M, BARALDO S, CORBINO L, TURATO G, BRACCIONI F, REA F, CAVALLESKO G, TROPEANO G, MAPP CE, MAESTRELLI P, CIACCIA A, FABBRI LM. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160:711-717
 43. VERNOOY JH, MÖLLER GM, VAN SUYLEN RJ, VAN SPIJK MP, CLOOTS RH, HOET PH, PENNINGHS HJ, WOUTERS EF. Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175:464-472
 44. CHRYSOFAKIS G, TZANAKIS N, KYRIAKOY D, TSOUMAKIDOU M, TSILIGIANNI I, KLIMATHIANAKI M, SIAFAKAS NM. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD *Chest* 2004, 125:71-76
 45. HOGG JC, CHU F, UTOKAPARCH S, WOODS R, ELLIOTT WM, BUZATU L, CHERNIACK RM, ROGERS RM, SCURBA FC, COXSON HO, PARÉ PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease *N Engl J Med* 2004, 350:2645-2653
 46. SULLIVAN AK, SIMONIAN PL, FALTA MT, MITCHELL JD, COSGROVE GP, BROWN KK, KOTZIN BL, VOELKEL NF, FONTENOT AP. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 172:590-596
 47. DI STEFANO A, CARAMORI G, CAPELLI A, GNEMMI I, RICCIARDOLO FL, OATES T, DONNER CF, CHUNG KF, BARNES PJ, ADCOCK IM. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease *Eur Respir J* 2004, 24:78-85
 48. BOPP T, RADSACK M, SCHMITT E, SCHILD H. New strategies for the manipulation of adaptive immune responses *Cancer Immunol Immunother* 2010, 59:1443-1448
 49. ISAJEV S, TAIVANS I, STRAZDA G, KOPEIKA U, BUKOVSKIS M, GORDJUSINA V, KRATOVSKA A. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD *Eur Respir J* 2009, 33:61-67
 50. PLUMB J, SMYTH LJ, ADAMS HR, VESTBO J, BENTLEY A, SINGH SD. Increased T-regulatory cells within lymphocyte follicles in moderate COPD *Eur Respir J* 2009, 34:89-94
 51. SMYTH LJ, STARKEY C, VESTBO J, SINGH D. CD4-regulatory cells in COPD patients *Chest* 2007, 132:156-163
 52. CRAXTON A, MAGALETTI D, RYAN EJ, CLARK EA. Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF *Blood* 2003, 101:4464-4471
 53. MACKAY F, LEUNG H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function *Semin Immunol* 2006, 18:284-289
 54. VON BÜLOW GU, BRAM RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily *Science* 1997, 278:138-141
 55. THOMPSON JS, BIXLER SA, QIAN F, VORA K, SCOTT ML, CACHERO TG, HESSION C, SCHNEIDER P, SIZING ID, MULLEN C, STRAUCH K, ZAFARI M, BENJAMIN CD, TSCHOPP J, BROWNING JL, AMBROSE C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF *Science* 2001, 293:2108-2111
 56. JANEWAY C, TRAVELS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M. *Immunobiology*, Churchill Livingstone 2001, 341-360
 57. IYER PARAMESWARAN G, MURPHY TF. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bacteria and updated guide to antibacterial selection in the older patient *Drugs Aging* 2009, 26:985-995
 58. BOSKEN CH, HARDS J, GATTER K, HOGG JC. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry *Am Rev Respir Dis* 1992, 145:911-917
 59. VAN DER STRATE BW, POSTMA DS, BRANDSMA CA, MELGERT BN, LUNGE MA, GEERLINGS M, HYLKEMA MN, VAN DEN BERG A, TIMENS W, KERSTJENS HA. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 173:751-758

-
60. BRUSSELLE GG, DEMOOR T, BRACKE KR, BRANDSMA CA, TIMENS W. Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? *Eur Respir J* 2009, 34:219-230
 61. RAFI A, NAGARKATTI M, NAGARKATTI PS. Hyaluronate-CD44 interactions can induce murine B-cell activation *Blood* 1997, 89:2901-2908
 62. D'HULST AI, MAES T, BRACKE KR, DEMEDTS IK, TOURNOY KG, JOOS GF, BRUSSELLE GG. Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in scid-mice. Is the acquired immune system required? *Respir Res* 2005, 6:147
 63. FLETCHER C, PETO R. The natural history of chronic airflow obstruction *Br Med J* 1977, 1:1645-1648
 64. CURTIS JL, FREEMAN CM, HOGG JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research *Proc Am Thorac Soc* 2007, 4:512-521
 65. SHAPIRO SD. End-stage chronic obstructive pulmonary disease: the cigarette is burned out but inflammation rages on *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:339-40
 66. GOMPERTZ S, O'BRIEN C, BAYLEY DL, HILL SL, STOCKLEY RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis *Eur Respir J* 2001, 17:1112-1119
 67. HUTCHINSON D, SHEPSTONE L, MOOTS R, LEAR JT, LYNCH MP. Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA *Ann Rheum Dis* 2001, 60:223-227
 68. TOIVANEN P. From reactive arthritis to rheumatoid arthritis *J Autoimmun* 2001, 16:369-371
 69. GUERASSIMOV A, ZHANG Y, BANERJEE S, CARTMAN A, WEBBER C, ESDAILE J, FITZCHARLES MA, POOLE AR. Autoimmunity to cartilage link protein in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis *J Rheumatol* 1998, 25:1480-1484
 70. COSIO MG, GUERASSIMOV A. Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160:S21-25
 71. SAETTA M, TURATO G, MAESTRELLI P, MAPP CE, FABBRI LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163:1304-1309
 72. AREND WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2001, 45:101-106
 73. KOETZ K, BRYL E, SPICKSCHEN K, O'FALLON WM, GORONZY JJ, WEYAND CM. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:9203-9208
 74. GAJPL US, KUHN A, SHERIFF A, MUNOZ LE, FRANZ S, VOLL RE, KALDEN JR, HERRMANN M. Clearance of apoptotic cells in human SLE *Curr Dir Autoimmun* 2006, 9:173-187
 75. FEGHALI-BOSTWICK CA, GADGIL AS, OTTERBEIN LE, PILEWSKI JM, STONER MW, CSIZMADIA E, ZHANG Y, SCIURBA FC, DUNCAN SR. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 177:156-163
 76. KARAYAMA M, INUI N, SUDA T, NAKAMURA Y, NAKAMURA H, CHIDA K. Antiendothelial Cell Antibodies in Patients with COPD *Chest* 2010, 138:1303-1308
 77. LEE SH, GOSWAMI S, GRUDO A, SONG LZ, BANDI V, GOODNIGHT-WHITE S, GREEN L, HACKEN-BITAR J, HUH J, BAKAEEN F, COXSON HO, COGSWELL S, STORNESS-BLISS C, CORRY DB, KHERADMAND F. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema *Nat Med* 2007, 13:567-569
 78. LEIDINGER P, KELLER A, HEISEL S, LUDWIG N, RHEINHEIMER S, KLEIN V, ANDRES C, HAMACHER J, HUWER H, STEPHAN B, STEHLE I, LENHOF HP, MEESE E. Novel autoantigens immunogenic in COPD patients *Respir Res* 2009, 10:20
 79. JONSSON MV, SZODORAY P, JELLESTAD S, JONSSON R, SKARSTEIN K. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome *J Clin Immunol* 2005, 25:189-201
 80. ZHANG J, ROSCHKE V, BAKER KP, WANG Z, ALARCON GS, FESSLER BJ, BASTIAN H, KIMBERLY RP, ZHOU T. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus *J Immunol* 2001, 166:6-10

-
81. BOSELLO S, YOUINOU P, DARIDON C, TOLUSSO B, BENDAOU B, PIETRAPERTOSA D, MORELLI A, FERRACCIOLI G. Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 2008, 35:1256–1264
 82. LAMELA J, VEGA F. Comment in: Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease *N Engl J Med* 2009, 360:2445-2454
 83. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, NHLBI/WHO workshop report 2008 (<http://www.goldcopd.org>)
 84. CALVERLEY PM, ANDERSON JA, CELLI B, FERGUSON GT, JENKINS C, JONES PW, YATES JC, VESTBO J. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease *N Engl J Med* 2007, 356:775-789
 85. WEDZICHA JA, CALVERLEY PM, SEEMUNGAL TA, HAGAN G, ANSARI Z, STOCKLEY RA. The prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations by salmeterol/fluticasone propionate or tiotropium bromide *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 177:19-26
 86. ERNST P, GONZALEZ AV, BRASSARD P, SUISSA S. Inhaled corticosteroid use in chronic obstructive pulmonary disease and the risk of hospitalization for pneumonia *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:162-6
 87. O'BYRNE PM, PEDERSEN S, CARLSSON LG, RADNER F, THORÉN A, PETERSON S, ERNST P, SUISSA S. Risks of Pneumonia in Asthmatic Patients Taking Inhaled Corticosteroids *Am J Respir Crit Care Med* 2010, [Epub ahead of print]
 88. SIN DD, TASHKIN D, ZHANG X, RADNER F, SJÖBRING U, THORÉN A, CALVERLEY PM, RENNARD SI. Budesonide and the risk of pneumonia: a meta-analysis of individual patient data *Lancet* 2009, 374:712–719
 89. SINGANAYAGAM A, CHALMERS JD. Comment in: Budesonide and risk of pneumonia *Lancet* 2009, 374:2051-2052
 90. JABARA HH, AHERN DJ, VERCELLI D, GEHA RS. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells *J Immunol* 1991, 147:1557-1560
 91. JABARA HH, BRODEUR SR, GEHA RS. Glucocorticoids upregulate CD40 ligand expression and induce CD40L-dependent immunoglobulin isotype switching *J Clin Invest* 2001, 107:371-378
 92. LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LENARDO MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology *Cell* 2001, 104:487-501
 93. BRAM RJ, CRABTREE GR. Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein *Nature* 1994, 371:355-358
 94. SHAW CJ, LUPSKI JR. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms *Hum Genet* 2005, 116:1-7
 95. HYMOWITZ S, PATEL D, WALLWEBER H, RUNYON S, YAN M, YIN J, SHRIVER S, GORDON N, PAN B, SKELTON N, KELLEY R, STAROVASNIK M. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding *J Biol Chem* 2005, 280:7218–7227
 96. GORDON NC, PAN B, HYMOWITZ SG, YIN J, KELLEY RF, COCHRAN AG, YAN M, DIXIT VM, FAIRBROTHER WJ, STAROVASNIK MA. BAFF/BLyS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site *Biochemistry* 2003, 42:5977-5983
 97. PATEL DR, WALLWEBER HJ, YIN J, SHRIVER SK, MARSTERS SA, GORDON NC, STAROVASNIK MA, KELLEY RF. Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen *J Biol Chem* 2004, 279:16727-16735
 98. BACCHELLI C, BUCKRIDGE S, THRASHER AJ, GASPARD HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency *Clin Exp Immunol* 2007, 149:401-409
 99. BODMER JL, SCHNEIDER P, TSCHOPP J. The molecular architecture of the TNF superfamily *Trends Biochem Sci* 2002, 27:19-26
 100. WU Y, BRESSETTE D, CARRELL JA, KAUFMAN T, FENG P, TAYLOR K, GAN Y, CHO YH, GARCIA AD, GOLLATZ E, DIMKE D, LAFLEUR D, MIGONE TS, NARDELLI B, WEI P, RUBEN SM, ULLRICH SJ, OLSEN HS, KANAKARAJ P,

-
- MOORE PA, BAKER KP. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TAC1 is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLYS *J Biol Chem* 2000, 275:35478-35485
101. GROSS JA, JOHNSTON J, MUDRI S, ENSELMAN R, DILLON SR, MADDEN K, XU W, PARRISH-NOVAK J, FOSTER D, LOFTON-DAY C, MOORE M, LITTAU A, GROSSMAN A, HAUGEN H, FOLEY K, BLUMBERG H, HARRISON K, KINDSVOGEL W, CLEGG CH. TAC1 and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease *Nature* 2000, 404:995-999
 102. VUGMEYSTER Y, SESHASAYEE D, CHANG W, STORN A, HOWELL K, SA S, NELSON T, MARTIN F, GREWAL I, GILKERSON E, WU B, THOMPSON J, EHRENFELS BN, REN S, SONG A, GELZLEICHTER TR, DANILENKO DM. A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys *Am J Pathol* 2006, 168:476-489
 103. LITINSKIY MB, NARDELLI B, HILBERT DM, HE B, SCHAFFER A, CASALI P, CERUTTI A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL *Nat Immunol* 2002, 3:822-829
 104. DILLON SR, GROSS JA, ANSELL SM, NOVAK AJ. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:235-246
 105. DILLON SR, HARDER B, LEWIS KB, MOORE MD, LIU H, BUKOWSKI TR, HAMACHER NB, LANTRY MM, MAURER M, KREJSA CM, ELLSWORTH JL, PEDERSON S, ELKON KB, WENER MH, DALL'ERA M, GROSS JA. B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by ataccept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin *Arthritis Res Ther* 2010, 12:R48
 106. THOMPSON JS, BIXLER SA, QIAN F, VORA K, SCOTT ML, CACHERO TG, HESSION C, SCHNEIDER P, SIZING ID, MULLEN C, STRAUCH K, ZAFARI M, BENJAMIN CD, TSCHOPP J, BROWNING JL, AMBROSE C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF *Science* 2001, 293:2108-2111
 107. BISCHOF D, ELSAWA SF, MANTCHEV G, YOON J, MICHELS GE, NILSON A, SUTOR SL, PLATT JL, ANSELL SM, VON BULOW G, BRAM RJ. Selective activation of TAC1 by syndecan-2 *Blood* 2006, 107:3235-3242
 108. KIMBERLEY FC, VAN BOSTELEN L, CAMERON K, HARDENBERG G, MARQUART JA, HAHNE M, MEDEMA JP. The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking *FASEB J* 2009, 23:1584-1595
 109. MOREAUX J, SPRYNSKI AC, DILLON SR, MAHTOUK K, JOURDAN M, YTHIER A, MOINE P, ROBERT N, JOURDAN E, ROSSI JF, KLEIN B. APRIL and TAC1 interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop *Eur J Haematol* 2009, 83:119-129
 110. HSU BL, HARLESS SM, LINDSLEY RC, HILBERT DM, CANCRO MP. Cutting edge: BLYS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators *J Immunol* 2002, 168:5993-5996
 111. O'CONNOR BP, RAMAN VS, ERICKSON LD, COOK WJ, WEAVER LK, AHONEN C, LIN LL, MANTCHEV GT, BRAM RJ, NOELLE RJ. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells *J Exp Med* 2004, 199:91-98
 112. OZCAN E, GARIBYAN L, LEE JJ, BRAM RJ, LAM KP, GEHA RS. Transmembrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand interactor drives plasma cell differentiation in LPS-activated B cells *J Allergy Clin Immunol* 2009, 123:1277-1286
 113. KATSENELSON N, KANSWAL S, PUIG M, MOSTOWSKI H, VERTHELYI D, AKKOYUNLU M. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion *Eur J Immunol* 2007, 37:1785-1795
 114. HUARD B, SCHNEIDER P, MAURI D, TSCHOPP J, FRENCH LE. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF *J Immunol* 2001, 167:6225-6231
 115. CHANG SK, ARENDT BK, DARCE JR, WU X, JELINEK DF. A role for BLYS in the activation of innate immune cells *Blood* 2006, 108:2687-2694
 116. VON BÜLOW GU, RUSSELL H, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, BRAM RJ. Molecular cloning and functional characterization of murine transmembrane activator and CAML interactor (TAC1) with chromosomal localization in human and mouse *Mamm Genome* 2000, 11:628-632

-
117. TRAN DD, RUSSELL HR, SUTOR SL, VAN DEURSEN J, BRAM RJ. CAML is required for efficient EGF receptor recycling *Dev Cell* 2003, 5:245-256
 118. BOSSEN C, CACHERO TG, TARDIVEL A, INGOLD K, WILLEN L, DOBLES M, SCOTT ML, MAQUELIN A, BELNOUE E, SIEGRIST CA, CHEVRIER S, ACHA-ORBEA H, LEUNG H, MACKAY F, TSCHOPP J, SCHNEIDER P. TAC1, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts *Blood* 2008, 111:1004-1012
 119. HE B, SANTAMARIA R, XU W, COLS M, CHEN K, PUGA I, SHAN M, XIONG H, BUSSEL JB, CHIU A, PUEL A, REICHENBACH J, MARODI L, DÖFFINGER R, VASCONCELOS J, ISSEKUTZ A, KRAUSE J, DAVIES G, LI X, GRIMBACHER B, PLEBANI A, MEFFRE E, PICARD C, CUNNINGHAM-RUNDLES C, CASANOVA JL, CERUTTI A. The transmembrane activator TAC1 triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88 *Nat Immunol* 2010, 11:836-845
 120. DIAZ-DE-DURANA Y, MANTCHEV GT, BRAM RJ, FRANCO A. TAC1-BLyS signaling via B-cell-dendritic cell cooperation is required for naive CD8+ T-cell priming in vivo *Blood* 2006, 107:594-601
 121. SUN M, FINK PJ. A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family *J Immunol* 2007, 179:4307-4312
 122. VON BÜLOW GU, VAN DEURSEN JM, BRAM RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TAC1 *Immunity* 2001, 14:573-582
 123. CASTIGLI E, SCOTT S, DEDEOGLU F, BRYCE P, JABARA H, BHAN AK, MIZOGUCHI E, GEHA RS. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:3903-3908
 124. SAKURAI D, HASE H, KANNO Y, KOJIMA H, OKUMURA K, KOBATA T. TAC1 regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG *Blood* 2007, 109:2961-2967
 125. CASTIGLI E, WILSON SA, GARIBYAN L, RACHID R, BONILLA F, SCHNEIDER L, GEHA RS. TAC1 is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency *Nat Genet* 2005, 37:829-834
 126. SALZER U, CHAPEL HM, WEBSTER AD, PAN-HAMMARSTRÖM Q, SCHMITT-GRAEFF A, SCHLESIER M, PETER HH, ROCKSTROH JK, SCHNEIDER P, SCHÄFFER AA, HAMMARSTRÖM L, GRIMBACHER B. Mutations in TNFRSF13B encoding TAC1 are associated with common variable immunodeficiency in humans *Nat Genet* 2005, 37:820-828
 127. SALZER U, JENNINGS S, GRIMBACHER B. To switch or not to switch--the opposing roles of TAC1 in terminal B cell differentiation *Eur J Immunol* 2007, 37:17-20
 128. CASTIGLI E, WILSON SA, SCOTT S, DEDEOGLU F, XU S, LAM KP, BRAM RJ, JABARA H, GEHA RS. TAC1 and BAFF-R mediate isotype switching in B cells *J Exp Med* 2005, 201:35-39
 129. SESHASAYEE D, VALDEZ P, YAN M, DIXIT VM, TUMAS D, GREWAL IS. Loss of TAC1 causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TAC1 as an inhibitory BLyS receptor *Immunity* 2003, 18:279-288
 130. YAN M, WANG H, CHAN B, ROOSE-GIRMA M, ERICKSON S, BAKER T, TUMAS D, GREWAL IS, DIXIT VM. Activation and accumulation of B cells in TAC1-deficient mice *Nat Immunol* 2001, 2:638-643
 131. CUNNINGHAM-RUNDLES C, BODIAN C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients *Clin Immunol* 1999, 92:34-48
 132. PAN-HAMMARSTRÖM Q, SALZER U, DU L, BJÖRKANDER J, CUNNINGHAM-RUNDLES C, NELSON DL, BACCHELLI C, GASPAS HB, OFFER S, BEHRENS TW, GRIMBACHER B, HAMMARSTRÖM L. Reexamining the role of TAC1 coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency *Nat Genet* 2007, 39:429-430
 133. CASTIGLI E, WILSON S, GARIBYAN L, RACHID R, BONILLA F, SCHNEIDER L, MORRA M, CURRAN J, GEHA R. Reexamining the role of TAC1 coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency *Nat Genet* 2007, 39:430-431
 134. MOHAMMADI J, LIU C, AGHAMOHAMMADI A, BERGBREITER A, DU L, LU J, REZAEI N, AMIRZARGAR AA, MOIN M, SALZER U, PAN-HAMMARSTRÖM Q, HAMMARSTRÖM L. Novel mutations in TAC1 (TNFRSF13B) causing common variable immunodeficiency *J Clin Immunol* 2009, 29:777-785
 135. GRIMBACHER B, SALZER U, FRANCO JL, WARNATZ K. The genetics of hypogammaglobulinemia. VII Meeting Of The Spanish Group For Primary Immunodeficiencies, Abstract Book 384-386
 136. ZHANG L, RADIGAN L, SALZER U, BEHRENS TW, GRIMBACHER B, DIAZ G, BUSSEL J, CUNNINGHAM-RUNDLES C. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in

-
- common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes *J Allergy Clin Immunol* 2007, 120:1178-1185
137. SALZER U, BACCHELLI C, BUCKRIDGE S, PAN-HAMMARSTRÖM Q, JENNINGS S, LOUGARIS V, BERGBREITER A, HAGENA T, BIRMELIN J, PLEBANI A, WEBSTER AD, PETER HH, SUEZ D, CHAPEL H, MCLEAN-TOOKE A, SPICKETT GP, ANOVER-SOMBKE S, OCHS HD, URSCHEL S, BELOHRADSKY BH, UGRINOVIC S, KUMARARATNE DS, LAWRENCE TC, HOLM AM, FRANCO JL, SCHULZE I, SCHNEIDER P, GERTZ EM, SCHÄFFER AA, HAMMARSTRÖM L, THRASHER AJ, GASPAR HB, GRIMBACHER B. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes *Blood* 2009, 113:1967-1976
 138. GARIBYAN L, LOBITO AA, SIEGEL RM, CALL ME, WUCHERPFENNIG KW, GEHA RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID) *J Clin Invest* 2007, 117:1550-1557
 139. LEE JJ, JABARA HH, GARIBYAN L, RAUTER I, SANNIKOVA T, DILLON SR, BRAM R, GEHA RS. The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency *J Allergy Clin Immunol* 2010, 126:1234-1241
 140. SPELETAS M, MAMARA A, IORDANAKIS G, PAPADOPOULOU-ALATAKI E, TSITSAMI E, GERMENIS AE. TACI expression and mutational status in Greek patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009, European Journal of Immunology* 2009, 39:S457
 141. XIA XZ, TREANOR J, SENALDI G, KHARE SD, BOONE T, KELLEY M, THEILL LE, COLOMBERO A, SOLOVYEV I, LEE F, MCCABE S, ELLIOTT R, MINER K, HAWKINS N, GUO J, STOLINA M, YU G, WANG J, DELANEY J, MENG SY, BOYLE WJ, HSU H. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation *J Exp Med* 2000, 192:137-143
 142. SAZZINI M, ZUNTINI R, FARJADIAN S, QUINTI I, RICCI G, ROMEO G, FERRARI S, CALAFELL F, LUISELLI D. An evolutionary approach to the medical implications of the tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B (TNFRSF13B) gene *Genes Immun* 2009, 10:566-578
 143. MADRY C, LAABI Y, CALLEBAUT I, ROUSSEL J, HATZOGLOU A, LE CONIAT M, MORNON JP, BERGER R, TSAPIS A. The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily *Int Immunol* 1998, 10:1693-1702
 144. SMITH CA, FARRAH T, GOODWIN RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death *Cell* 1994, 76:959-962
 145. MOREAUX J, CREMER FW, REME T, RAAB M, MAHTOUK K, KAUKEL P, PANTESCO V, DE VOS J, JOURDAN E, JAUCH A, LEGOUFFE E, MOOS M, FIOL G, GOLDSCHMIDT H, ROSSI JF, HOSE D, KLEIN B. The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature *Blood* 2005, 106:1021-1030
 146. ROWLAND S, LEAHY K, HALVERSON R, TORRES R, PELANDA R. BAFF Receptor Signaling Aids the Differentiation of Immature B Cells into Transitional B Cells following Tonic BCR Signaling *J Immunol* 2010, 185:4570-4581
 147. SCHNEIDER P, MACKAY F, STEINER V, HOFMANN K, BODMER JL, HOLLER N, AMBROSE C, LAWTON P, BIXLER S, ACHA-ORBEA H, VALMORI D, ROMERO P, WERNER-FAVRE C, ZUBLER RH, BROWNING JL, TSCHOPP J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth *J Exp Med* 1999, 189:1747-1756
 148. NG LG, SUTHERLAND AP, NEWTON R, QIAN F, CACHERO TG, SCOTT ML, THOMPSON JS, WHEWAY J, CHTANOVA T, GROOM J, SUTTON IJ, XIN C, TANGYE SG, KALLED SL, MACKAY F, MACKAY CR. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells *J Immunol* 2004, 173:807-817
 149. GORELIK L, CUTLER AH, THILL G, MIKLASZ SD, SHEA DE, AMBROSE C, BIXLER SA, SU L, SCOTT ML, KALLED SL. Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function *J Immunol* 2004, 172:762-766

-
150. MORRISON MD, REILEY W, ZHANG M, SUN SC. An atypical tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-binding motif of B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) receptor mediates induction of the noncanonical NF-kappaB signaling pathway *J Biol Chem* 2005, 280:10018-10024
 151. HATZOGLOU A, ROUSSEL J, BOURGEADE MF, ROGIER E, MADRY C, INOUE J, DEVERGNE O, TSAPIS A. TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase *J Immunol* 2000, 165:1322-1330
 152. YE H, WU H. Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:8961-8966
 153. CLAUDIO E, BROWN K, PARK S, WANG H, SIEBENLIST U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells *Nat Immunol* 2002, 3:958-965
 154. MACKAY F, SCHNEIDER P. Cracking the BAFF code *Nat Rev Immunol* 2009, 9:491-502
 155. ENZLER T, BONIZZI G, SILVERMAN GJ, OTERO DC, WIDHOPF GF, ANZELON-MILLS A, RICKERT RC, KARIN M. Alternative and classical NF-kappa B signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease *Immunity* 2006, 25:403-415
 156. DO RK, HATADA E, LEE H, TOURIGNY MR, HILBERT D, CHEN-KIANG S. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response *J Exp Med* 2000, 192:953-964
 157. ZHANG X, PARK CS, YOON SO, LI L, HSU YM, AMBROSE C, CHOI YS. BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors *Int Immunol* 2005, 17:779-788
 158. AVERY DT, KALLED SL, ELLYARD JI, AMBROSE C, BIXLER SA, THIEN M, BRINK R, MACKAY F, HODGKIN PD, TANGYE SG. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells *J Clin Invest* 2003, 112:286-297
 159. MACKAY F, WOODCOCK SA, LAWTON P, AMBROSE C, BAETSCHER M, SCHNEIDER P, TSCHOPP J, BROWNING JL. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations *J Exp Med* 1999, 190:1697-1710
 160. SCHIEMANN B, GOMMERMAN JL, VORA K, CACHERO TG, SHULGA-MORSKAYA S, DOBLES M, FREW E, SCOTT ML. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway *Science* 2001, 293:2111-2114
 161. MAYNE CG, AMANNA IJ, NASHOLD FE, HAYES CE. Systemic autoimmunity in BAFF-R-mutant A/WySnJ strain mice *Eur J Immunol* 2008, 38:587-598
 162. MAYNE CG, NASHOLD FE, SASAKI Y, HAYES CE. Altered BAFF-receptor signaling and additional modifier loci contribute to systemic autoimmunity in A/WySnJ mice *Eur J Immunol* 2009, 39:589-599
 163. JU ZL, SHI GY, ZUO JX, ZHANG JW, JIAN SUN. Unexpected development of autoimmunity in BAFF-R-mutant MRL-lpr mice *Immunology* 2007, 120:281-289
 164. SHULGA-MORSKAYA S, DOBLES M, WALSH ME, NG LG, MACKAY F, RAO SP, KALLED SL, SCOTT ML. B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation *J Immunol* 2004, 173:2331-2341
 165. PELLETIER M, THOMPSON JS, QIAN F, BIXLER SA, GONG D, CACHERO T, GILBRIDE K, DAY E, ZAFARI M, BENJAMIN C, GORELIK L, WHITTY A, KALLED SL, AMBROSE C, HSU YM. Comparison of soluble decoy IgG fusion proteins of BAFF-R and BCMA as antagonists for BAFF *J Biol Chem* 2003, 278:33127-33133
 166. LOSI CG, SILINI A, FIORINI C, SORESINA A, MEINI A, FERRARI S, NOTARANGELO LD, LOUGARIS V, PLEBANI A. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency *J Clin Immunol* 2005, 25:496-502

-
167. WARNATZ K, SALZER U, RIZZI M, FISCHER B, GUTENBERGER S, BÖHM J, KIENZLER AK, PAN-HAMMARSTRÖM Q, HAMMARSTRÖM L, RAKHMANOV M, SCHLESIER M, GRIMBACHER B, PETER HH, EIBEL H. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:13945-13950
 168. SPELETAS M, MAMARA A, BARDAKA F, LIADAKI K, ARGENTOU N, TSITSAMI E, GOURGOULIANIS K, GERMENIS AE. BAFF-R deficiency due to *TNFRSF13C*-P21R homozygosity resulting in mild immunodeficiency phenotype, *European Society for Immunodeficiencies Conference*, Instabul 2010
 169. CHAMBERS CA, ALLISON JP. Costimulatory regulation of T cell function *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11:203–210
 170. HUTLOFF A, DITTRICH AM, BEIER KC, ELJASCHWITSCH B, KRAFT R, ANAGNOSTOPOULOS I, KROCZEK RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 *Nature* 1999, 397:263-266
 171. COYLE AJ, LEHAR S, LLOYD C, TIAN J, DELANEY T, MANNING S, NGUYEN T, BURWELL T, SCHNEIDER H, GONZALO JA, GOSSELIN M, OWEN LR, RUDD CE, GUTIERREZ-RAMOS J-C. The CD28- related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses *Immunity* 2000, 13:95–105
 172. IHARA K, AHMED S, NAKAO F, KINUKAWA N, KUROMARU R, MATSUURA N, IWATA I, NAGAFUCHI S, KOHNO H, MIYAKO K, HARA T. Association studies of *CTLA-4*, *CD28*, and *ICOS* gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population *Immunogenetics* 2001, 53:447–454
 173. NURIEVA RI, MAI XM, FORBUSH K, BEVAN MJ, DONG C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:14163-14168
 174. YOSHINAGA SK, WHORISKEY JS, KHARE SD, SARMIENTO U, GUO J, HORAN T, SHIH G, ZHANG M, COCCIA MA, KOHNO T, TAFURI-BLADT A, BRANKOW D, CAMPBELL P, CHANG D, CHIU L, DAI T, DUNCAN G, ELLIOTT GS, HUI A, MCCABE SM, SCULLY S, SHAHINIAN A, SHAKLEE CL, VAN G, MAK TW, SENALDI G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS *Nature* 1999, 402:827-832
 175. MAGES HW, HUTLOFF A, HEUCK C, BÜCHNER K, HIMMELBAUER H, OLIVERI F, KROCZEK RA. Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand *Eur J Immunol* 2000, 30:1040-1047
 176. CARRENO BM, COLLINS M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses *Annu Rev Immunol* 2002, 20:29–53
 177. SWALLOW MM, WALLIN JJ, SHA WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha *Immunity* 1999, 11:423-432
 178. KHAYYAMIAN S, HUTLOFF A, BÜCHNER K, GRÄFE M, HENN V, KROCZEK RA, MAGES HW. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:6198-6203
 179. WANG F, ZHU W, LIU T, SUN Z, JU S, JU S, YU G, XIE W, DENG Z, LU B, ZHANG X. The expression analysis of ICOS-L on activated T cells and immature dendritic cells as well as malignant B cells and Grave's-disease-derived thyroid tissues by two novel mAbs against human ICOS-L *Tissue Antigens* 2007, 69:62-72
 180. BEIER KC, HUTLOFF A, DITTRICH AM, HEUCK C, RAUCH A, BÜCHNER K, LUDEWIG B, OCHS HD, MAGES HW, KROCZEK RA. Induction, binding specificity and function of human ICOS *Eur J Immunol* 2000, 30:3707-3717
 181. ARIMURA Y, KATO H, DIANZANI U, OKAMOTO T, KAMEKURA S, BUONFIGLIO D, MIYOSHI-AKIYAMA T, UCHIYAMA T, YAGI J. A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses *Int Immunol* 2002, 14:555-566
 182. FOS C, SALLES A, LANG V, CARRETTE F, AUDEBERT S, PASTOR S, GHIOTTO M, OLIVE D, BISMUTH G, NUNES JA. ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse *J Immunol* 2008, 181:1969-1977
 183. FRUMAN DA. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling *Curr Opin Immunol* 2004, 16:314-320

-
184. LINTERMAN MA, RIGBY RJ, WONG R, SILVA D, WITHERS D, ANDERSON G, VERMA NK, BRINK R, HUTLOFF A, GOODNOW CC, VINUESA CG. Roquin differentiates the specialized functions of duplicated T cell costimulatory receptor genes CD28 and ICOS *Immunity* 2009, 30:228-241
 185. GONZALO JA, DELANEY T, CORCORAN J, GOODEARL A, GUTIERREZ-RAMOS JC, COYLE AJ. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation *J Immunol* 2001, 166:1-5
 186. WITSCH EJ, PEISER M, HUTLOFF A, BÜCHNER K, DORNER BG, JONULEIT H, MAGES HW, KROCZEK RA. ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells *Eur J Immunol* 2002, 32:2680-2686
 187. CHOE J, CHOI YS. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells *Eur J Immunol* 1998, 28:508-515
 188. KINDLER V, ZUBLER RH. Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3 *J Immunol* 1997, 159:2085-2090
 189. ROUSSET F, GARCIA E, DEFRANCE T, PÉRONNE C, VEZZIO N, HSU DH, KASTELEIN R, MOORE KW, BANCHEREAU J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:1890-1893
 190. DONG C, JUEDES AE, TEMANN UA, SHRESTA S, ALLISON JP, RUDDLE NH, FLAVELL RA. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function *Nature* 2001, 409:97-101
 191. McADAM AJ, GREENWALD RJ, LEVIN MA, CHERNOVA T, MALENKOVICH N, LING V, FREEMAN GJ, SHARPE AH. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching *Nature* 2001, 409:102-105
 192. GRIMBACHER B, HUTLOFF A, SCHLESIER M, GLOCKER E, WARNATZ K, DRÄGER R, EIBEL H, FISCHER B, SCHÄFFER AA, MAGES HW, KROCZEK RA, PETER HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency *Nat Immunol* 2003, 4:261-268
 193. WONG S, OH E, NG C, LAM N. Impaired germinal center formation and recall T-cell-dependent immune responses in mice lacking the costimulatory ligand B7-H2 *Blood* 2003, 102:1381-1388
 194. SPELETAS M, MERENTITI V, KOSTIKAS K, LIADAKI K, MINAS M, GOURGOULIANIS K, GERMENIS AE. Association of TLR4-T399I polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease in smokers *Clin Dev Immunol* 2009, 2009:260286
 195. PABST S, YENICE V, LENNARZ M, TULETA I, NICKENIG G, GILLISSEN A, GROHÉ C. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms Arg677Trp and Arg753Gln in chronic obstructive pulmonary disease *Lung* 2009, 187:173-178
 196. PABST S, YENICE V, LENNARZ M, BAUMGARTEN G, KNUEFERMANN P, HECHT B, GILLISSENA, VETTER H, GROHE C. A stop codon polymorphism of toll-like receptor 5 is associated with a stable course of chronic obstructive lung disease *ERS Annual Congress* 2006, S582
 197. ROHDE G, KLEIN W, ARINIR U, HAGEDORN M, DUERIG N, T BAUER T, GILLISSEN A, SCHULTZE-WERNINGHAUS G, T EPPLER J. Association of the ASP299GLY TLR4 polymorphism with COPD *Respir Med* 2006, 100:892-896
 198. SABROE I, WHYTE MK, WILSON AG, DOWER SK, HUBBARD R, HALL I. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms and COPD *Thorax* 2004, 59:81
 199. TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors *Annu Rev Immunol* 2003, 21:335-376
 200. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Standardization of Spirometry, 1994 Update *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152:1107-1136
 201. HOLMES N. CD45: all is not yet crystal clear *Immunology* 2006, 117:145-155
 202. HERMISTON ML, XU Z, WEISS A. CD45: a critical regulator of signaling threshold in immune cells *Annu Rev Immunol* 2003, 21:107-137
 203. KUHNS MS, DAVIS MM, GARCIA KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex *Immunity* 2006, 24:133-139

-
204. DOODY GM, DEMPSEY PW, FEARON DT. Activation of B lymphocytes: integrating signals from CD19, CD22 and FcγRIIb1 *Cur Opin Immunol* 1996, 8:378-382
 205. REITER C. Cluster report: CD5 in Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. KNAPP W et al, Eds., Oxford University Press 1989, 331-332
 206. MORIMOTO C. Cluster report: CD27 in Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens. SCHLOSSMAN SF et al, Eds., Oxford University Press 1995, 356-357
 207. WHITE MB, SHEN AL, WORD CJ, TUCKER PW, BLATTNER FR. Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain *Science* 1985, 228:733-737
 208. KONIG R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR *Curr Opin Immunol* 2002, 14:75-83
 209. RUDOLPH MG, STANFIELD RL, WILSON IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors *Annu Rev Immunol* 2006, 24:419-466
 210. COLE DK, GAO GF. CD8: adhesion molecule, co-receptor and immunomodulator *Cell Mol Immunol* 2004, 1:81-88
 211. GOYERT SM, COHEN L, GANGLOFF SC, ASHMUN R, HAEFFNER-CAVAILLON N. Cluster report: CD14 in Leucocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens. KISHIMOTO T et al, Eds., Garland Publishing Inc. 1997, 963-965
 212. SCHMIDT RE, PERUSSIA B. Cluster report: CD16 in Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. Knapp W et al, Eds., Oxford University Press 1989, 574-578
 213. SCHUBERT J, LANIER LL, SCHMIDT RE. Cluster report: CD56 in Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. Knapp W et al, Eds., Oxford University Press 1989, 699-702
 214. KLEIN U, RAJEWSKY K, KÜPPERS R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells *J Exp Med* 1998, 188:1679-1689
 215. Γερμενής ΑΕ. Διαγνωστική Ανοσολογία. Εκδόσεις Παπαζήση 2000, σελ 16-18
 216. LORENZ E, FREES KL, SCHWARTZ DA. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR *Biotechniques* 2001, 31:22-4
 217. SCHRÖDER NW, HERMANN C, HAMANN L, GÖBEL UB, HARTUNG T, SCHUMANN RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific pcr *J Mol Med* 2003, 81:368-372
 218. OHNISHI S, YASUDA T, KITAMURA S, NAGAYA N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells *Stem Cells* 2007 25:1166-1177
 219. BLANN AD, PRETORIUS A. Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: two sides of the same coin, or two different coins? *Atherosclerosis* 2006, 188:12-18
 220. PALANGE P, FORTE S, ONORATI P, PARAVATI V, MANFREDI F, SERRA P, CARLONE S. Effect of reduced body weight on muscle aerobic capacity in patients with COPD *Chest* 1998, 114:12-18
 221. VAN EEDEN SF, HOGG JG. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking *Eur Respir J* 2000, 15:915-921
 222. MUKAE H, VINCENT, R, QUINLAN, K, ENGLISH D, HARDS J, HOGG JC, VAN EEDEN, SF. The effect of repeated exposure to particulate air pollution (PM10) on the bone marrow *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163:201-209
 223. HODGE SJ, HODGE GL, REYNOLDS PN, SCICCHITANO R, HOLMES M. Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 285:L492-99
 224. KASAHARA Y, TUDER RM, COOL CD, LYNCH DA, FLORES SC, VOELKEL NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163:737-744

-
225. HODGE S, HODGE G, HOLMES M, REYNOLDS PN. Increased peripheral blood T-cell apoptosis and decreased Bcl-2 in chronic obstructive pulmonary disease *Immunol Cell Biol* 2005, 83:160-166
226. MORLA M, BUSQUETS X, PONS J, SAULEDA J, MACNEE W, AGUSTI AG. Telomere shortening in smokers with and without COPD *Eur Respir J* 2006, 27:525-528
227. VALDES AM, ANDREW T, GARDNER JP, KIMURA M, OELSNER E, CHERKAS LF, AVIV A, SPECTOR TD. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women *Lancet* 2005, 366:662-664
228. SAVALE L, CHAOUAT A, BASTUJI-GARIN S, MARCOS E, BOYER L, MAITRE B, SARNI M, HOUSSET B, WEITZENBLUM E, MATRAT M, LE CORVOISIER P, RIDEAU D, BOCZKOWSKI J, DUBOIS-RANDÉ JL, CHOUAID C, ADNOT S. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 179:566-571
229. KELSEN SG, AKSOY MO, GEORGY M, HERSHMAN R, JI R, LI X, HURFORD M, SOLOMIDES C, CHATILA W, KIM V. Lymphoid follicle cells in chronic obstructive pulmonary disease overexpress the chemokine receptor CXCR3 *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 179:799-805
230. LAPPERRE TS, SNOECK-STROBAND JB, GOSMAN MM, STOLK J, SONT JK, JANSEN DF, KERSTJENS HA, POSTMA DS, STERK PJ. Dissociation of lung function and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170:499-504
231. LAPPERRE TS, POSTMA DS, GOSMAN MM, SNOECK-STROBAND JB, TEN HACKEN NH, HIEMSTRA PS, TIMENS W, STERK PJ, MAUAD T. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD *Thorax* 2006, 61:115-121
232. DE JONG JW, VAN DER BELT-GRITTER B, KOËTER GH, POSTMA DS. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function *Respir Med* 1997, 91:67-76
233. URBANOWICZ RA, LAMB JR, TODD I, CORNE JM, FAIRCLOUGH LC. Altered effector function of peripheral cytotoxic cells in COPD *Respir Res* 2009, 10:53
234. JACKEVICIUS CA, CHAPMAN KR. Prevalence of inhaled corticosteroid use among patients with chronic obstructive pulmonary disease: a survey *Ann Pharmacother* 1997, 31:160-64
235. SUISSA S, BARNES PJ. Inhaled corticosteroids in COPD: the case against *Eur Respir J* 2009, 34:13-16
236. PAUWELS RA, LÖFDAHL CG, LAITINEN LA, SCHOUTEN JP, POSTMA DS, PRIDE NB, OHLSSON SV. Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking *N Engl J Med* 1999, 340:1948-1953
237. BURGE PS, CALVERLEY PM, JONES PW, SPENCER S, ANDERSON JA, MASLEN TK. Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial *BMJ* 2000, 320:1297-1303
238. VESTBO J, SØRENSEN T, LANGE P, BRIX A, TORRE P, VISKUM K. Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial *Lancet* 1999, 353:1819-1823
239. LUNG HEALTH STUDY RESEARCH GROUP. Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease *N Engl J Med* 2000, 343:1902-1909
240. AYANLARBATUMAN O, FERRERO AP, DIAZ A, JIMENEZ SA. Regulation of transforming growth factor-beta 1 gene expression by glucocorticoids in normal human T lymphocytes *J Clin Invest* 1991, 88:1574-1580
241. PEDERSEN S, O'BYRNE P. A comparison of the efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma *Allergy* 1997, 52:1-34
242. DERENDORF H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled corticosteroids in relation to efficacy and safety *Respir Med* 1997, 91:A22-28
243. GEORAS SN. Inhaled glucocorticoids, lymphocytes, and dendritic cells in asthma and obstructive lung diseases *Proc Am Thorac Soc* 2004, 1:215-221
244. CAMERON LA, DURHAM SR, JACOBSON MR, MASUYAMA K, JULIUSSON S, GOULD HJ, LOWHAGEN O, MINSHALL EM, HAMID QA. Expression of IL-4, Cepsilon RNA, and IepsilonRNA in the nasal mucosa of

-
- patients with seasonal rhinitis: effect of topical corticosteroids *J Allergy Clin Immunol* 1998, 101:330–336
245. DERENDORF H, NAVE R, DROLLMANN A, CERASOLI F, WURST W. Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma *Eur Respir J* 2006, 28:1042-1050
246. THORSSON L, DAHLSTRÖM K, EDSBÄCKER S, KÄLLÉN A, PAULSON J, WIRÉN JE. Pharmacokinetics and systemic effects of inhaled fluticasone propionate in healthy subjects *Br J Clin Pharmacol* 1997, 43:155-161
247. LIPWORTH BJ. Systemic adverse effects of inhaled corticosteroid therapy: A systematic review and meta-analysis *Arch Intern Med* 1999, 159:941-955
248. MAYO O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium *Twin Res Hum Genet* 2008, 11:249-256
249. RYCKMAN K, WILLIAMS SM. Calculation and use of the Hardy-Weinberg model in association studies *Curr Protoc Hum Genet* 2008, 1:Unit 1.18
250. SMITH CA, HARRISON DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema *Lancet* 1997, 350:630-633
251. YIM JJ, PARK GY, LEE CT, KIM YW, HAN SK, SHIM YS, YOO CG. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1 *Thorax* 2000, 55:121-125
252. SALZER U, BIRMEIN J, BACCHELLI C, WITTE T, BUCHEGGER-PODBIELSKI U, BUCKRIDGE S, RZEPKA R, GASPAR HB, THRASHER AJ, SCHMIDT RE, MELCHERS I, GRIMBACHER B. Sequence analysis of TNFRSF13b, encoding TACI, in patients with systemic lupus erythematosus *J Clin Immunol* 2007, 27:372-377
253. Conley ME. Genetics of hypogammaglobulinemia: what do we really know? *Curr Opin Immunol* 2009, 21:1-6
254. CASTALDI PJ, CHO MH, COHN M, LANGERMAN F, MORAN S, TARRAGONA N, MOUKHACHEN H, VENUGOPAL R, HASIMJA D, KAO E, WALLACE B, HERSH CP, BAGADE S, BERTRAM L, SILVERMAN EK, TRIKALINOS TA. The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations *Hum Mol Genet* 2010, 19:526-534
255. HEMMINKI K, FÖRSTI A, LORENZO BERMEJO J. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are inherited from parents and they measure heritable events *J Carcinog* 2005, 4:2
256. INGEBRIGTSEN T, THOMSEN SF, VESTBO J, VAN DER SLUIS S, KYVIK KO, SILVERMAN EK, SVARTENGREN M, BACKER V. Genetic influences on Chronic Obstructive Pulmonary Disease - a twin study *Respir Med* 2010, 104:1890-1895
257. TABOR HK, RISCH NJ, MYERS RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations *Nat Rev Genet* 2002, 3:391-397
258. BUDULAC SE, POSTMA DS, HIEMSTRA PS, KUNZ LI, SIEDLINSKI M, SMIT HA, VONK JM, RUTGERS B, TIMENS W, BOEZEN HM. Multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) genetic variants, MRP1 protein levels and severity of COPD *Respir Res* 2010, 11:60
259. LIN J, HORIKAWA Y, TAMBOLI P, CLAGUE J, WOOD CG, WU X. Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma *Carcinogenesis* 2010, 31:1805-1812
260. ARBOUR NC, LORENZ E, SCHUTTE BC, ZABNER J, KLINE JN, JONES M, FREES K, WATT JL, SCHWARTZ DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans *Nat Genet* 2000, 25:187-191
261. LIADAKI K, PETINAKI E, SKOULAKIS C, TSIREVELOU P, KLAPSA D, GERMENIS AE, SPELETAS M. TLR4, but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* *Clin Vaccine Immunol* 2010, 8:217-222

-
262. PETER J. BARNES. Asthma and COPD: basic mechanisms and clinical management. Typeset by J&L Composition Ltd, Filey, North Yorkshire, UK 2002, 600
263. SUEBLINVONG V, WEISS DJ. Cell therapy approaches for lung diseases: current status *Curr Opin Pharmacol* 2009, 9:268-273