



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Η λειτουργία των ουδετεροφίλων στις αντισωματικές ανεπάρκειες.**

**Γερασιμίνα Τσιντή**

Εξεταστική επιτροπή:

- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Ματθαίος Σπελέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
- Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος στις «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» με εξειδίκευση στη Ανοσολογία.

Λάρισα, Οκτώβριος 2014



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



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**  
**The function of neutrophils in antibody deficiencies**

**By**  
**Gerasimina Tsinti**

Examining Committee

- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology (Supervisor)
- Mathaios Speletas, Associate Professor of Laboratory Immunology
- Efthimia Peteinaki, Associate Professor of Microbiology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in “Clinical Applications of Molecular Medicine” with specialization in Immunology.

Larissa, October 2014

# Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ABSTRACT .....	7
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ .....	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	11
<b>I. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ .....</b>	<b>11</b>
I.1. Φαγοκυττάρωση.....	12
I.2. Τα ουδετερόφιλα ως κύτταρα ρυθμιστές του ανοσιακού συστήματος .....	14
<b>II. NETOSIS.....</b>	<b>16</b>
II.1. Δομή των NETs .....	18
II.2. NETosis: Ένας νέος τύπος κυτταρικού θανάτου .....	18
II.3. Μηχανισμός NETosis.....	19
II.4. Πρότυπα απελευθέρωσης των NETs .....	20
II.5. Τα NETs είναι αποτελεσματικά έναντι των μικροβίων .....	22
II.6. Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης των NETs .....	23
II.7. Τα NETs ως πηγή αυτοαντιγόνων.....	25
II.8. Αντιφλεγμονώδης δράση των NETs .....	26
II.9. Επιλογή επαγωγής ουδετεροφιλικών μηχανισμών .....	27
<b>III. ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ .....</b>	<b>28</b>
II.1. Κλινικές εκδηλώσεις της COVID.....	31
II.2. IVIG και θνητότητα/λοιμώξεις.....	32
II.3. ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗ.....	33
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	34
<b>IV. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ.....</b>	<b>34</b>
<b>V. ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>36</b>
<b>VI. ΥΛΙΚΟ .....</b>	<b>37</b>
VI.1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ.....	37
VI.1.1. Ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες χωρίς θεραπεία υποκατάστασης με IVIG .....	37
VI.1.2. Ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες σε θεραπεία υποκατάστασης με IVIG/SCIG. ....	38
VI.1.3. Ασθενείς με λοιμώξεις.....	38
VI.1.4. Υλικό μελέτης p-STAT5.....	40
VI.1.5. Υγιείς μάρτυρες.....	40
<b>VII. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>41</b>
VII.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	41
VII.2. ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ .....	41
VII.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ IN VITRO ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ NETS.....	41
VII.3.1. Απομόνωση ουδετεροφίλων από ολικό περιφερικό αίμα. ....	41
VII.3.2. Εκτίμηση καθαρότητας απομονωμένου κυτταρικού πληθυσμού και βιωσιμότητας κυττάρων .....	42
VII.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ.....	43
VII.4.1. Επίδραση με PMA .....	44
VII.4.2. Επίδραση IVIG.....	44

VII.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ .....	45
VII.5.1. Στερέωση .....	45
VII.5.2. Ανοσοφθορισμός .....	45
VII.5.3. Χρώση DNA.....	46
VII.5.4. Κάλυψη κυττάρων .....	47
VII.5.5. Φύλαξη παρασκευασμάτων .....	47
VII.6. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ.....	48
VII.7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ p-STAT5.....	48
VII.7.1. Μέτρηση επιπέδων p-STAT5, σε ουδετερόφιλα ολικού περιφερικού αίματος.....	48
VII.7.2. Μέτρηση επιπέδων p-STAT5 σε ουδετερόφιλα σε καλλιέργεια παρουσία ανθρώπινου φυσιολογικού ορού και ορού ασθενών με Β-ΧΛΛ .....	50
<b>VIII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>51</b>
VIII.1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ NETS.....	51
VIII.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ NETOSIS.....	57
VIII.2.1. Υγιείς μάρτυρες .....	57
VIII.2.2. Ασθενείς με υπογαμμασφαιριναιμία.....	57
VIII.2.3. Ασθενείς με λοιμώξεις .....	58
VIII.2.4. Ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες υπό θεραπεία υποκατάστασης .....	60
VIII.2.5. In vitro επίδραση της IVIG στη NETosis.....	63
VIII.3. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ STAT5 ΣΕ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ CVID.....	64
<b>IX. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>68</b>
IX.1. Η NETOSIS ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ .....	68
IX.1.1. Θέματα προς διερεύνηση .....	71
IX.2. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ STAT5 ΣΕ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ CVID .....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία αποτελεί την συγγραφική προσπάθεια περιγραφής και ανάλυσης μιας σειράς πειραμάτων που διεξήχθησαν κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014 στο Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Τώρα που το πόνημα αυτό φτάνει στο τέλος του, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους με στήριξαν στην προσπάθεια αυτή με οποιοδήποτε τρόπο.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο αυτής της διπλωματικής εργασίας και υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, τον Καθηγητή κ. Γερμενή Αναστάσιο που μου εμπιστεύτηκε την εκπόνησή της και έτσι κατόρθωσα να έρθω σε επαφή με ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο της επιστημονικής έρευνας. Οι γνώσεις που αποκόμισα σε πολλαπλά επίπεδα, μέσα από τη συνεργασία μου μαζί του, είναι ανεκτίμητες.

Ευχαριστώ ακόμη τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίο για τη στήριξή του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης. Σε κάθε βήμα διεξαγωγής της εργασίας ήταν έμπρακτα παρών και πρόθυμος να με διδάξει την επιστημονική μέθοδο.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή κ. Ρίτη Κωνσταντίνο, στον δρ. Καμπά Κωνσταντίνο, στην υποψήφια διδάκτορα Αποστολίδου Ειρήνη και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Αιματολογίας του τομέα Γενικής Παθολογίας του Ιατρικού Τμήματος του ΔΠΘ, για τη στήριξή τους, τη θεωρητική τους καθοδήγηση και την παροχή τεχνογνωσίας.

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την Τσαντούλα Φανή για την πολύτιμη βοήθειά της στα πρώτα βήματα εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ τη δρ. Ζαμανάκου Μαρία και την υποψήφια διδάκτορα Σεβδαλή Ειρήνη, για το αμέριστο ενδιαφέρον που έδειξαν για την παρούσα εργασία. Με το χρόνο που διέθεσαν σε μένα, με την καθοδήγησή τους και τις γνώσεις που μου παρείχαν, συνεισέφεραν ουσιαστικά στην πραγματοποίησή της.

Επίσης ευχαριστώ τους Γραμμουσιάνου Ευαγγελία, Καραμούτη Ευαγγελία, Μαμάρα Αντιγόνη, Φλώρου Ζωή, Μολυβδά Αδάμ, Μιχόπουλο Αλέξανδρο, Καραϊσκου Γεσθημανή και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, για τη βοήθειά τους, την εποικοδομητική συνύπαρξη στο χώρο του εργαστηρίου και την πολύτιμη ανταλλαγή απόψεων επί επιστημονικών και διαδικαστικών θεμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παραχώρηση δυνατότητας χρήσης του μικροσκοπίου φθορισμού.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ουδετερόφιλα συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και ρύθμιση των κυττάρων της φυσικής και προσαρμοστικής ανοσίας. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι τα ουδετερόφιλα στον σπλήνα αλληλεπιδρούν με Β-λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης, επάγοντας την ισοτυπική μεταστροφή, τις σωματικές υπερμεταλλάξεις και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών. Στις πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες, η κύρια βλάβη έγκειται στην ανικανότητα διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων και παραγωγής ανοσοσφαιρινών. Ο πιθανός ρόλος των ουδετεροφίλων στις πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (PADs) δεν έχει μελετηθεί.

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου των ουδετεροφίλων στις PADs, μέσω της μελέτης σχηματισμού εξωκυττάρων ουδετεροφιλικών δικτύων χρωματίνης (NETosis) και της ενεργοποίησης του STAT5.

Μελετήθηκαν η αυθόρμητη NETosis και η επαγωγή της με PMA σε ουδετερόφιλα ασθενών με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας με γ-σφαιρίνη, ανοσοεπαρκών ατόμων με λοιμώξεις και υγιών μαρτύρων. Στους υγιείς μάρτυρες μελετήθηκε η *in vitro* επίδραση της γ-σφαιρίνης στον σχηματισμό NETs από το PMA. Η ποσοτικοποίηση της NETosis πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία φθορισμού μετά από ανοσοεντόπιση του συμπλέγματος ελαστάσης-DNA (NETs), ενώ η ενεργοποίηση του STAT5 διερευνήθηκε με κυτταρομετρικό προσδιορισμό του p-STAT5.

Τα ουδετερόφιλα των ασθενών με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια και των ανοσοεπαρκών με λοιμώξεις παρουσίασαν αυξημένη NETosis. Τα ουδετερόφιλα ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες υπό θεραπεία, παρουσίασαν NETosis ανάλογη των υγιών μαρτύρων και μειωμένη επαγωγή NETosis από το PMA. Η *in vitro* επίδραση με γ-σφαιρίνη σε ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων ενίσχυσε τη NETosis από το PMA. Τα επίπεδα του p-STAT5, δεν παρουσίασαν διαφορά στα ουδετερόφιλα ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες συγκριτικά με αυτά των υγιών μαρτύρων.

Η εργασία αυτή παρέχει ενδείξεις ότι η NETosis τροποποιείται στις ανοσοανεπάρκειες και κατά την περίοδο των λοιμώξεων στους ανοσοεπαρκείς και επηρεάζεται από τη γ-σφαιρίνη. Διαπιστώθηκε ότι πράγματι υπάρχουν διαταραχές στη λειτουργία των ουδετεροφίλων, όπως αποδείχθηκε από τη NETosis, οι οποίες πιθανόν εμπλέκονται στην παθογένεια των επιπλοκών της νόσου.

# ABSTRACT

Neutrophils contribute to the activation, and regulation of innate and adaptive immune cells. There is evidence that splenic marginal zone B-cells undergo class switching, somatic hypermutation and production of immunoglobulins by interaction with neutrophils. In primary antibody deficiencies (PADs) B-lymphocytes fail to differentiate and produce immunoglobulins. The probable role of neutrophils in PADs has not been investigated.

This work aims to investigate the involvement of neutrophils in PADs, through the study of Neutrophil Extracellular Traps formation (NETosis) and STAT5 activation.

Neutrophils were isolated from patients with PADs before and after initiation of intravenous-immunoglobulin (IVIG) treatment, from immunocompetent individuals during infections, and from healthy controls. Spontaneous NET-formation, NET-formation after stimulation with PMA and NET-formation after stimulation with PMA in the presence of IgG preparation were studied. NETs quantification was assessed by Elastase-DNA complex (NETs) detection by fluorescence microscopy. We measured phosphorylated STAT5 (p-STAT5) levels in the neutrophils of patients with primary-Ab deficiencies by Flow-Cytometry.

Enhanced NETosis was detected in patients with primary-Ab-deficiencies and in immunocompetent individuals with infections, compared to NETosis of healthy individuals. NETosis was found normal in the neutrophils of IVIG-treated patients with PADs. *In vitro* stimulation of the neutrophils of IVIG-treated patients by PMA did not induce further NET-formation. Treatment of PMA-stimulated neutrophils from healthy controls, with IgG-preparation, enhanced NET-formation. No difference was observed in the p-STAT5 levels of the neutrophils from patients with PADs compared to healthy-controls.

These data indicate that NETosis, is altered in PADs and during infections and is modulated by intravenous immunoglobulin treatment. We conclude that there are abnormalities in neutrophils' function, such as aberrant NETosis, that may be related to the pathogenesis of the complications of the disease.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Ab	(Antibody) αντίσωμα
aggNETs	(aggregated Neutrophil Extracellular Traps) σωρευμένα εξωκυττάρια ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης
ANA	(AntiNuclear Antibodies) αντιπυρηνικά ντισώματα
ANCA	(AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibody), αντιουδετεροφιλικά αντικυτταροπλασματικά αντισώματα
ATP	(Adenosine Tri-Phosphate) τριφωσφορική αδενοσίνη
BAFF/BLys	(B-cell Activating Factor/ B-lymphocyte stimulator) παράγοντας ενεργοποίησης των B-λεμφοκυττάρων
B-CLL/B-ΧΛΛ	(B-Chronic Lymphocytic Leukemia) χρόνια B-Λεμφοκυτταρική λευχαιμία
BPI	(Bactericidal Permeability Increasing Protein) πρωτεΐνη αύξησης της βακτηριακής διαπερατότητας
BSA	(Bovine Serum Albumin) αλβουμίνη ορού βοός
Btk	(Brutton kinase) κινάση του Μπρουτόν
CD	(Cluster of Differentiation) δείκτης επιφανείας ή αντιγόνο διαφοροποίησης
CGD	(Chronic Granulomatous Disease) χρόνια κοκκιωματώδης νόσος
CLL-S	(Chronic Lymphocytic Leukemia-Serum) ορός ασθενών με B-ΧΛΛ
CRP	(C-Reactive Protein) C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CSR	(Class Switch Recombination) γονιδιακός ανασυνδυασμός που επάγει τη μεταστροφή τάξης ανοσοσφαιρινών
CVID	(Common Variable Immunodeficiency) κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DCs	(Dendritic Cells) δενδριτικά κύτταρα
DNA	Deoxy- Ribonucleic Acid (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
dsDNA	(double stranded Deoxy- Ribonucleic Acid) δίκλωνο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EETs	(Eosinophil Extracellular Traps) εξωκυττάρια παγίδες ηωσινοφίλων
ESID	(European Society for Immunodeficiencies) Ευρωπαϊκή Εταιρεία για τις Ανοσοανεπάρκειες
G-CSF	(Granulocyte- Colony Stimulating Factor) αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων



ICOS	(Inducible T-cell COStimulator) αναγόμενος συνδιεγέρτης των T-λεμφοκυττάρων
IFN-γ	(Interferon-γ) Ιντερφερόνη-γ
IL	(Interleukin) Ιντερλευκίνη
IL-1RA	(Interleukin -1 Receptor Antagonist) ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1
IVIG	(IntraVenous Immunoglobulin G) υποδόρια γ-ανοσοσφαιρίνη
LDS	(Low Density Supernatant) υπερκείμενα χαμηλής πυκνότητας
LPS	(Lipopolysacharite) βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης
MAC1	(Membrane Attack Complex 1) σύμπλεγμα μεμβρανικής επίθεσης 1
MBL	(Mannose Binding Lectin) λεκτίνη συνδεόμενη με μαννόζη
MCETs	(Macrophage Extracellular Traps) εξωκυττάρια παγίδες μακροφάγων
MHC-II	(Major Histocompatibility Complex-II) μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας κλάσης II
MPO	(Myeloperoxidase) μυελοπεροξειδάση
MSU	(Monosodium Urate) κρύσταλλοι ουρικού οξέος
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NE	(Neutrophil Elastase) ουδετεροφιλική ελαστάση
NETs	(Neutrophil Extracellular Traps) εξωκυττάρια ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης
NHL	(Non-Hodgkin Lymphoma) Non- Hodgkin λέμφωμα
NHS	(Normal Human Serum) ανθρώπινος φυσιολογικός ορός
NK T	(Natural Killers T-lymphocytes) φυσικά φονικά T-λεμφοκύτταρα
NOX2	(NADPH Oxidase 2) οξειδάση τύπου 2 του NADPH
PAD4	(Peptidyl- Arginine Deiminase 4 ) απαμινάση 4 της πεπτιδυλαργινίνης
PAGID	(PanAmerican Group for Immunodeficiency) Παναμερικανική Ομάδα για την Ανοσοανεπάρκεια
PBS	(Phosphate Buffer Saline) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PKC	(Protein Kinase C) πρωτεϊνική κινάση C
PLA	(Phospholipase A) φωσφολιπάση A
PMA	(Phorbol Myristate Acetate) φορβόλη
PR-3	(Proteinase 3) πρωτεϊνάση 3
ROS	(Reactive Oxygen Species) δραστικές ρίζες οξυγόνου
SCIG	(Subcutaneous Immunoglobulin) υποδόρια ανοσοσφαιρίνη
SECs	(Splenic Sinusoidal Endothelial Cells) ενδοθηλιακά κύτταρα σπλήνα

sIgAD	(selective Immunoglobulin A Deficiency) εκλεκτική ανεπάρκεια Ανοσοσφαιρίνης A
STAT	(Signal Transducer and Activator of transcription) μόριο μεταγωγής σήματος και ενεργοποίησης μεταγραφής
TLR	(Toll-Like Receptor) υποδοχέας τύπου Toll
WB	(Whole Blood) ολικό Αίμα
WFI	(Water For Injections) ενέσιμο υδατικό διάλυμα
XLA	(X-Linked Agammaglobulinemia) φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## I. Μηχανισμοί δράσης των ουδετεροφίλων

Τα ουδετερόφιλα συνιστούν την πρώτη γραμμή άμυνας της φυσικής κυτταρικής ανοσίας. Μαζί με τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα συνιστούν τα πολυμορφοπύρρηνα (PMNs) όπου αποτελούν περίπου το 70% των κυττάρων στο περιφερικό αίμα,. Παράγονται μέσω της διαδικασίας της αιμοποίησης στον μυελό των οστών και εξέρχονται στην αιματική κυκλοφορία με ρυθμό  $5 \times 10^{10}$ - $10 \times 10^{10}$  κύτταρα ημερησίως, ως τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα, όπου μετά από έναν εξαιρετικά σύντομο χρόνο ζωής (χρόνος ημίσειας ζωής στην κυκλοφορία 6-8 ώρες), πεθαίνουν με τη διαδικασία της απόπτωσης. Μελέτες σε ποντικούς έδειξαν ότι περίπου 1-2% των ώριμων ουδετεροφίλων βρίσκονται στην αιματική κυκλοφορία. Άλλες παρακαταθήκες είναι ο μυελός των οστών, κάποιοι εντερικοί ιστοί, καθώς και ενδαγγειακές πηγές στο συκώτι, στο σπλήνα και στους πνεύμονες. Ο χρόνος ζωής μπορεί να επεκταθεί μετά από την έκθεσή τους σε διάφορες ουσίες όπως οι κυτταροκίνες. Σε περιπτώσεις διαφόρων μολύνσεων ο μυελός των οστών αποκρίνεται παράγοντας περισσότερα από τα συνηθισμένα ουδετερόφιλα τα οποία γενικά είναι τα πρώτα που καταφθάνουν στο σημείο της φλεγμονής. Σε φυσιολογικές συνθήκες η κύρια ρύθμιση της κοκκιοποίησης εξαρτάται από τον παράγοντα ενεργοποίησης της αποικίας των κοκκιοκυττάρων (G-CSF).

Τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν διαμέσου του ενδοθηλίου του μυελού των οστών μέσω στενά συνδεδεμένων πόρων, μέσω μια μοναδικής διαδικασίας η οποία αποκαλείται διακυτταρική μετανάστευση. Μετά την απελευθέρωσή τους από τον μυελό των οστών τα ώριμα ουδετερόφιλα κινούνται μέσω της αιματικής ροής. Ορισμένα από αυτά απομακρύνονται από την κυκλοφορία και συνιστούν την αποκαλούμενη δεξαμενή των μεταναστευτικών ουδετεροφίλων.

Τα εναπομένοντα ουδετερόφιλα στην περιφέρεια, διαδραματίζουν έναν ρόλο κλειδί στην πρώτης γραμμής άμυνα. Στρατολογούνται σχεδόν άμεσα στην περιοχή του τραυματισμού ή της φλεγμονής μέσω μιας διαδικασίας η οποία ενορχηστρώνεται από μια μεγάλη ποικιλία χημειοκινών όπως : IL-8, IFN- $\gamma$ , ο παράγοντας του συμπληρώματος C5a και το λευκοτριένιο B4. Τα ουδετερόφιλα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να συνδέονται με ορισμένους εξωκυττάριους συνδέτες και να επάγουν έναν αριθμό μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης εξαρτώμενων του δεδομένου ερεθίσματος στρατολόγησή στους. Ανάλογα με το μονοπάτι που

ενεργοποιείται, κατευθύνεται και η ρύθμιση των φυσιολογικών λειτουργιών και των μηχανισμών δράσης τους.

Είναι αρκετά γνωστοί τρεις κύριοι διαφορετικοί μηχανισμοί της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των ουδετεροφίλων: η φαγοκυττάρωση, η παραγωγή των δραστικών ριζών οξυγόνου και η αποκοκκίωση ειδικών αντιμικροβιακών πρωτεϊνών. Όλοι έχουν σχεδιαστεί για την αναγνώριση και εξόντωση των εχθρικών μικροβίων.

## **I.1. Φαγοκυττάρωση**

Τα ουδετερόφιλα μπορούν και εξοντώνουν μικροοργανισμούς μέσω μηχανισμών οι οποίοι είναι εξαρτώμενοι ή ανεξάρτητοι του οξυγόνου. Η φαγοκυττάρωση αποτελεί έναν μη ειδικό, μηχανισμό της φυσικής ανοσίας, αντιμετώπισης των παθογόνων και απομάκρυνσης των κυτταρικών υπολειμμάτων. Όπως τα μακροφάγα, έτσι και τα ουδετερόφιλα μπορούν και εσωτερικεύουν οψωνισμένα και μη σωματίδια μέσω της εγκόλπωσής τους σε ένα κενοτόπιο προερχόμενο από μεμβράνη, το οποίο καλείται φαγόσωμα. Μετά την φαγοκυττάρωση τα ουδετερόφιλα εισέρχονται σε διαδικασία απόπτωσης και τα αποπτωτικά ουδετερόφιλα απομακρύνονται από τα μακροφάγα, αποτρέποντας την απελευθέρωση ουδετεροφιλικών συστατικών τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ιστική βλάβη.

Οι κύριοι υποδοχείς οψωνινών των ουδετεροφίλων είναι οι Fc-υποδοχείς (FcRs). Οι κύριοι Fc υποδοχείς των ανθρώπινων μη-ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων είναι οι FcRIIA (CD32) και FcRIIIb (CD16). Μετά την ενεργοποίησή τους και την παραγωγή ιντερφερόνης, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ένας άλλος υποδοχέας υψηλής συγγένειας, ο FcRI (CD64)<sup>1</sup>. Κύριο ενδοκυττάριο γεγονός για τους FcRs αποτελεί η φωσφορυλίωσή τους από ανοσοσφαιρίνες ή από σωματίδια καλυμμένα με στοιχεία του συμπληρώματος.<sup>1,2</sup> Ένας άλλος γνωστός υποδοχέας σχετιζόμενος με τη φαγοκύτωση είναι η β2 ιντεγκρίνη του MAC1 συμπλέγματος (CD11b/CD18). Με την ενεργοποίησή αναγνωρίζει το θραύσμα του συμπληρώματος C3bi.

### ***I.1.a. Δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS)***

Με την ενεργοποίησή τους τα ουδετερόφιλα της περιφέρειας παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου μέσω μιας διαδικασίας η οποία αποκαλείται αναπνευστική έκρηξη. Η διαδικασία αυτή αρχίζει να λαμβάνει χώρα εντός των πρώτων λεπτών από την εφαρμογή του ερεθίσματος και συμπεριλαμβάνει χημικούς παράγοντες, όπως είναι τα υπεροξειδικά ανιόντα ( $O_2^-$ ), οι υδροξυλικές ρίζες ( $OH^-$ ) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )<sup>3</sup>. Η παραγωγή των ROS

σχετίζεται κυρίως με τα πολυμορφοπύρηνα (PMNs) και με τα μονοκύτταρα (MNCs), αλλά παρόλο που αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό, ρυθμίζεται από διαφορετικούς μηχανισμούς σε αυτούς τους κυτταρικούς τύπους.

Αν και η παραγωγή των ROS μπορεί να προκύπτει μέσω διαφορετικών βιοχημικών μονοπατιών, το τελικό αποτέλεσμα είναι το ίδιο. Μετά από ενεργοποίησή τους τα κύτταρα παράγουν από το οξυγόνο υπεροξειδικά ανιόντα και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου παράγονται από το σύστημα της οξειδάσης του NADPH των φαγοκυττάρων, το οποίο αποτελεί ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα εντός του κυττάρου<sup>4,5</sup>. Το εν λόγω σύμπλεγμα αποτελείται από ένα μεμβρανοσυνδεδεμένο στοιχείο (κυτόχρωμα b), καθώς και τέσσερα κυτοσολικά (p40, p47, p67, και rac2). Το σήμα ενεργοποίησης επάγει την μετατόπιση των κυτοσολικών πρωτεϊνών στο κυτόχρωμα-b. Έτσι δημιουργείται ένα λειτουργικό πολυσυστατικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων το οποίο καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου με κατανάλωση NADPH. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω του κυτοχρώματος-b από το NADPH στο κυτοσόλιο, διαμέσου της μεμβράνης και αποδίδονται είτε σε ενδοκυττάριο διαμέρισμα όπως το φαγόσωμα, είτε αποδίδονται στον εξωκυττάριο χώρο. Τα αρχικά προϊόντα, δηλαδή τα υπεροξειδικά ανιόντα και υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν είναι επαρκώς δραστικά προκειμένου να καταστρέψουν τα παθογόνα, αλλά δίνουν μετέπειτα προϊόντα, άλλες δραστικές ρίζες οξυγόνου οι οποίες έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση<sup>5</sup>. Απορρύθμιση των οδών σχηματισμού δραστικών ριζών οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε μία εμμένουσα φλεγμονώδη κατάσταση, η οποία με τη σειρά της να οδηγήσει σε κυτταρική και ιστική βλάβη<sup>3</sup>.

### ***1.1.β. Αντιμικροβιακά συστατικά ουδετερόφιλων***

Εκτός από την παραγωγή των μικροβιοκτόνων ROS, τα ουδετερόφιλα διαθέτουν μια ποικιλία μη-οξειδωτικών παραγόντων για την καταπολέμηση των εισβαλλόντων παθογόνων. Αυτοί οι παράγοντες διαταράσσουν το μικροβιακό κυτταρικό τοίχωμα και τις μεμβράνες ή αναστέλλουν την αύξηση. Περιλαμβάνουν υψηλά φορτισμένα πεπτιδικά και πρωτεΐνες όπως οι ντεφενσίνες, οι καθελιδίνες (LL-37), η μυελοπεροξειδάση (MPO), η πρωτεΐνη αύξησης της βακτηριακής διαπερατότητας (BPI) και οι κατιονικές πρωτεάσες σερίνης γνωστές ως σεροσιδίνες, όπως είναι η ουδετεροφιλική ελαστάση (NE), η καθεψίνη G, η πρωτεΐνη-3 και η αζουροσιδίνη (ένα μη ενεργό ομόλογο σεροσιδίνης)<sup>6</sup>.

Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεάσες σερίνης διαδραματίζουν έναν διπλό ρόλο: είναι ικανές να συνδέονται με τους βακτηριακούς λοιμογόνους παράγοντες και ενώ δεν μπορούν να εξοντώσουν τα βακτήρια μπορούν να αντισταθμίσουν κάποιες από τις βλαβερές τους συνέπειες. Αυτό το συμπέρασμα έχει προκύψει από την παρατήρηση της ικανότητας της ουδετεροφιλικής ελαστάσης να συνδέεται με ένα αριθμό λοιμογόνων παραγόντων εντεροβακτηρίων, με

αποτέλεσμα την αποτροπή της διαφυγής των βακτηρίων από το φαγολυσσόσωμα<sup>7</sup>. Επιπλέον αυτές οι πρωτεΐνες (πρωτεάσες σερίνης), σε υψηλές συγκεντρώσεις, αποτελούν ισχυρά αντιμικροβιακά συστατικά ανεξάρτητα από τη δραστικότητα πρωτεάσης που διαθέτουν, καθώς φαίνεται ότι διεισδύουν και διαταράσσουν τις βακτηριακές μεμβράνες μέσω του κατιονικού τους φορτίου<sup>8</sup>. Επιπλέον το ουδετερόφιλο είναι οπλισμένο με κατιονικές φωσφολιπάσες (PLA) όπως η GrPA-PLA2, οι οποίες διεισδύουν στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram-θετικών βακτηρίων, διασπών και απελευθερώνουν βακτηριακά φωσφολιπίδια, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν βακτηριακές αυτολυσίνες<sup>9</sup>.

Επιπρόσθετα τα ουδετερόφιλα διαθέτουν παράγοντες οι οποίοι περιορίζουν την παροχή σημαντικών θρεπτικών συστατικών στα μικρόβια. Δύο τέτοιες πρωτεΐνες, η λακτοφερρίνη και η λιποκαλίνη 2, χηλιώνουν τον σίδηρο επηρεάζοντας έτσι την πρόσληψή του από τα μικρόβια. Τέλος τα ουδετερόφιλα διαθέτουν στο κυτταρόπλασμα τους συμπλέγματα S100 πρωτεϊνών όπως η καλπροτεκτίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες εκκρίνονται μέσω ενός μη-κλασσικού μονοπατιού και χηλιώνουν ιόντα  $Zn^{2+}$  στις φλεγμαίνουσες περιοχές με συνέπεια να αποτρέπουν τη διαθεσιμότητα αυτών των σημαντικών ιόντων για τα βακτήρια.

## **I.2. Τα ουδετερόφιλα ως κύτταρα ρυθμιστές του ανοσιακού συστήματος**

Τα ουδετερόφιλα αποτελούν πηγή κυτταροκινών και γι'αυτό μπορούν και δρουν μέσω αυτορρυθμιστικών μονοπατιών. Η έρευνα έχει δείξει ότι τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα μπορούν να συνθέτουν και να απελευθερώνουν ένα μεγάλο εύρος κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και άλλων κυτταροκινών οι οποίες είναι ιδιοσυστατικά ενεργές ή η έκφρασή τους επάγεται μετά από κάποιο ερέθισμα<sup>10</sup>. Συγκριτικά με άλλα φαγοκύτταρα η εκκριτική ικανότητα των ουδετεροφίλων είναι μάλλον φτωχή. Αυτή η αδυναμία μπορεί να εξηγηθεί από δύο γεγονότα. Πρώτον, ο αριθμός των ουδετεροφίλων είναι περίπου 20 φορές υψηλότερος από αυτόν τον μονοκυττάρων. Δεύτερον αυτός ο κυτταρικός τύπος στρατολογείται πολύ πιο γρήγορα στην περιοχή της φλεγμονής/λοίμωξης συγκριτικά με άλλα κύτταρα. Το πρότυπο παραγωγής κυτταροκινών των ουδετεροφίλων της περιφέρειας διαφοροποιείται σε μεγάλο βαθμό και εξαρτάται από συνδιεγερτικούς παράγοντες και συνδέτες που είναι παρόντες στο μικροπεριβάλλον.

### ***I.2.a. Παραγωγή κυτταροκινών από τα ουδετερόφιλα***

Η παραγωγή κυτταροκινών από τα ουδετερόφιλα ελέγχεται από ρυθμιστικούς μηχανισμούς που δρουν σε διαφορετικά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένου τη μεταγραφή mRNA, τη σταθερότητα ή

τη μετάφραση (για παράδειγμα μέσω της στόχευσης μεσολαβούμενης από micro-RNA, όπως στην περίπτωση της IFN- $\gamma$  ποντικών), καθώς και στο επίπεδο της έκκρισης πρωτεϊνών. Όσον αφορά στο επίπεδο της πρωτεϊνικής έκκρισης σημαντικές ποσότητες του παράγοντα ενεργοποίησης των B-λεμφοκυττάρων (BAFF ή BLyS), ο TNF-σχετιζόμενος συνδέτης επαγωγής της απόπτωσης (TRAIL), η CXCL8, ο CCL20, και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (IL-1RA), δεν απελευθερώνονται άμεσα μετά τη σύνθεση αλλά αποθηκεύονται σε ενδοκυτταρικές δεξαμενές. Αυτές οι κυτταροκίνες εκκρίνονται ταχέως μόνο μετά από τη διέγερση των ουδετεροφίλων με τα κατάλληλα ερεθίσματα<sup>11</sup>.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα αποτελούν πηγή κυτταροκινών οι οποίες είναι σημαντικές για την επιβίωση, την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων. Σε αυτά τα μόρια περιλαμβάνονται ο BAFF<sup>12</sup> και συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό (APRIL), που είναι το πιο στενά σχετιζόμενο με τον BAFF μόριο. Τα ουδετερόφιλα σε φλεγμαίνοντα αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, και σε λεμφικό ιστό των βλεννογόνων που φλεγμαίνει (MALT) ή σε διάφορες B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες καθώς και σε στερεούς όγκους εκφράζουν και εκκρίνουν υψηλά επίπεδα APRIL<sup>13</sup>. Ο APRIL προωθεί την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών και κακοηθών B-λεμφοκυττάρων. Γι'αυτό ο APRIL που προέρχεται από τα ουδετερόφιλα θα μπορούσε να συντηρεί την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα ή την κακοήθη αύξηση και εξέλιξη όπως στο B-λεμφοκυτταρικό λέμφωμα.

### ***1.2.β. Τα ουδετερόφιλα ως ρυθμιστές της προσαρμοστικής ανοσίας***

Τα ουδετερόφιλα για πολύ καιρό αντιμετωπίζονταν ως δραστικά κύτταρα τα οποία έχουν μικρή επιρροή στη διαμόρφωση της προσαρμοστικής ανοσίας. Η θέση αυτή φαίνεται να ανατρέπεται τα τελευταία χρόνια μετά από διάφορες αναφορές που υποστηρίζουν το αντίθετο.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα (αλλά όχι τα μη-ενεργοποιημένα) εκφράζουν την κυτταροκίνη ενεργοποίησης των B-κυττάρων BAFF -γνωστή και ως BLyS<sup>12</sup> και ότι τα ουδετερόφιλα αποτελούν κύρια πηγή της BAFF- σχετιζόμενης κυτταροκίνης διέγερσης των B-λεμφοκυττάρων, APRIL, στα B-κυτταρικά λεμφώματα και στις αποθήκες των πλασματοκυττάρων των βλεννογόνων<sup>13</sup>. Μια πρόσφατη εργασία από τους Puga και συν.<sup>13</sup> αποκάλυψε μια συσχέτιση μεταξύ των ουδετεροφίλων και των B κυττάρων της οριακής ζώνης και πρότεινε ότι αυτή η αλληλεπίδραση μεσολαβεί τις T-λεμφοκυτταρικές ανεξάρτητες κυτταρικές αποκρίσεις μέσω του BAFF και APRIL. Οι συγγραφείς παρατήρησαν έναν μεγάλο αριθμό ουδετεροφίλων γύρω από την οριακή ζώνη στο σπλήνα ανθρώπων, μακάκων και ποντικών. Στα ποντίκια τα ουδετερόφιλα του σπλήνα, αλλά όχι τα κυκλοφορούντα

ουδετερόφιλα ήταν ικανά να ενεργοποιήσουν ισχυρά τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης, ενώ έδρασαν παρεμποδιστικά για τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα στο σπλήνα φάνηκαν να υποβοηθούν την επιβίωση των Β-λεμφοκυττάρων, να προωθούν την παραγωγή αντισωμάτων, την μεταστροφή τάξης σε IgG και σε IgA, καθώς και τις σωματικές υπερμεταλλάξεις, υποδεικνύοντας ότι διαθέτουν τις προδιαγραφές για να αποτελούν βοηθητικά κύτταρα των Β-λεμφοκυττάρων (B helper cells). Τα ουδετερόφιλα του σπλήνα, εκφράζουν μεγάλα ποσά από BAFF, APRIL, και IL-21, και όλες αυτές οι κυτταροκίνες αποτελούσαν προαπαιτούμενο για την διεγερτική δράση στα Β-λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης.

Τα ουδετερόφιλα εκτός από κύρια κύτταρα της φυσικής ανοσίας διαδραματίζουν και ρόλο στην προσαρμοστική ανοσία, αλληλεπιδρώντας με τα DCs. Τα DCs, τα οποία επίσης αποτελούν κύτταρα της φυσικής ανοσιακής απόκρισης, παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα Τ-λεμφοκύτταρα αφού έχουν προβεί σε περαιτέρω διαδικασία ωρίμανσης ως απόκριση στις προερχόμενες από τα ουδετερόφιλα κυτταροκίνες, όπως είναι ο TNF.

Τα ουδετερόφιλα εκκρίνουν επίσης ιντερλευκίνη-12 (IL-12), η οποία επάγει την διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων σε φλεγμονώδη Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 1 τα οποία με τη σειρά τους παράγουν IFN- $\gamma$ . Παρουσίας της IFN- $\gamma$  και άλλων φλεγμονωδών κυτταροκινών τα ουδετερόφιλα αυξάνουν την έκφραση μορίων MHC-II τα οποία φέρουν αντιγόνα, αποκτώντας αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργία όμοια με αυτή των DCs<sup>14</sup>.

Τα ουδετερόφιλα αλληλεπιδρούν περαιτέρω με το προσαρμοστικό ανοσιακό σύστημα συνδεόμενα με την IgG και με την IgA κατά τον οψωνισμό των βακτηρίων, οι οποίες παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα. Η επακόλουθη ενεργοποίηση των Fc $\gamma$  και Fc $\alpha$  υποδοχέων των ουδετεροφίλων διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στις δραστικές λειτουργίες των ουδετεροφίλων.

## II. NETosis

Πρόσφατα αποκαλύφθηκε μια τρίτη στρατηγική αντιμικροβιακής δράσης των ουδετεροφίλων, η απελευθέρωση των εξωκυττάρων ουδετεροφιλικών παγίδων ή αλλιώς ουδετεροφιλικών δικτύων χρωματίνης (NETs). Τα NETs προκύπτουν μέσω της απελευθέρωσης από τα ουδετερόφιλα πυρηνικών συστατικών στον εξωκυττάριο χώρο. Συνίστανται από αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη, η οποία διακοσμείται με κοκκιάδες καθώς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες<sup>15</sup>. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα NETs έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα είδη σπονδυλοζώων συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, των ποντικών, της κότας και του zebra fish<sup>16</sup>.



Ο πρωταρχικός ρόλος της φυσικής ανοσίας είναι ο περιορισμός των μικροβίων στα σημεία της φλεγμονής και η αποτροπή της συστηματικής τους επέκτασης. Σε αυτή τη διαδικασία τα ουδετερόφιλα διαδραματίζουν ένα ρόλο κλειδί, τα οποία φέρουν ένα φορτίο αντιμικροβιακών μορίων τα οποία είναι υψηλά δραστικά, αλλά επιδεικνύουν χαμηλή ειδικότητα στόχου. Αυτά τα χαρακτηριστικά τα καθιστούν όχι μόνο δυνατά αντιμικροβιακά αλλά και εν δυνάμει υψηλά τοξικά συστατικά για τον ξενιστή. Προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφική δράση αυτών των μορίων εναντίον του εαυτού, φυλάσσονται σε ειδικά διαμερίσματα των ουδετερόφιλων γνωστά ως κοκκία και λειτουργούν μόνο εντός εξειδικευμένων φαγολυσσοσωμάτων. Παρόλ'αυτά κάποια από τα συστατικά των κοκκίων μπορούν να απελευθερωθούν όπου και διαχέονται τοπικά εντός ενός στενού φάσματος δράσης. Αντίθετα τα αντισώματα, ένα σημαντικό εργαλείο του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, είναι υψηλά ειδικές, εξαιρετικά σταθερές πρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως συστηματικά, με παρατεταμένη δράση όπλα. Φαίνεται ότι τα NETs ταιριάζουν με την αποστολή και τα χαρακτηριστικά του ουδετερόφιλου, λειτουργώντας για τον περιορισμό της μικροβιακής επέκτασης και της παράπλευρης δράσης από τα περιεχόμενα των κοκκίων. Επιπλέον φαίνεται ότι αποτελούν μια σημαντική προσθήκη στο οπλοστάσιο των αντιμικροβιακών στοιχείων καθώς τα NETs συγκρατώντας τα μαζί αυξάνουν την δραστική τους συγκέντρωση και προωθούν τη συνέργια μεταξύ των διάφορων συστατικών<sup>17</sup>.

Ο σχηματισμός των εξωκυττάρων δικτύων χρωματίνης έχει χαρακτηριστεί ως ένας αποτελεσματικός αμυντικός μηχανισμός έναντι παθογόνων. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε ουδετερόφιλα (NETs), ηωσινόφιλα (EETs)<sup>18</sup>, σιτευτικά κύτταρα (MCETs)<sup>19</sup> και μονοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση των λοιμώξεων ιδιαίτερα στις περιοχές φραγμών όπου ο οργανισμός έρχεται σε επαφή με το περιβάλλον.

Έχει παρατηρηθεί ότι τα εξωκυττάρια ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης συνδέονται και εξοντώνουν βακτήρια καθώς και μύκητες στον εξωκυττάριο χώρο, αλλά πιθανά συμμετέχουν και σε φαινόμενα ανοσοπαθολογίας, ενώ έχει διατυπωθεί και η υπόθεση ότι συμμετέχουν σε αυτοάνοσα φαινόμενα<sup>20</sup>.

Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτές οι εξωκυττάρια δομές που περιέχουν DNA έχουν περιγραφεί ακόμα και στα φυτά και συγκεκριμένα στην περιοχή του ακρορρίζου όπου το προστατεύουν από την εισβολή παθογόνων<sup>21</sup>.

Η παρατήρηση αυτή στα φυτά υποστηρίζει την υπόθεση ότι το DNA εκτός της βασικής λειτουργίας που του έχει αποδοθεί, δηλαδή της διατήρησης και παροχής γενετικής πληροφορίας, διαδραματίζει πιθανά έναν επιπρόσθετο ρόλο στη φυσική ανοσία ο οποίος έχει

διατηρηθεί στην πορεία της εξέλιξης από τα φυτά μέσω των εντόμων στα διάφορα σπονδυλωτά μέχρι τον άνθρωπο.

## II.1. Δομή των NETs

Τα NETs όταν παρατηρηθούν με ηλεκτρονική μικροσκοπία παρουσιάζονται ως γραμμικά στοιχεία περίπου 15-17 nm τα οποία είναι διακοσμημένα με σφαιρίδια διαμέτρου 25 nm, ορισμένα από τα οποία σχηματίζουν ευρύτερες δομές διαμέτρου 50 nm, με διάφορες ουσίες να περιστοιχίζουν αυτό το ικρίωμα, οι οποίες είναι κυρίως πρωτεΐνες των ουδετεροφιλικών κοκκίων<sup>22</sup>. Όπως διαπιστώθηκε μετά από παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού, ο σκελετός των NETs αποτελείται από δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από την ανθεκτικότητά τους στην αποδιάταξη από πρωτεάσες αλλά και από την καταστροφή τους μετά από τη χρήση ενζύμων αποδιάταξης του DNA<sup>23</sup>. Αποδείχθηκε ότι τα NETs είναι ευαίσθητες δομές που απαιτούν προσεχτικό χειρισμό κατά τη διάρκεια των διάφορων σταδίων της απομόνωσης, ενεργοποίησης και οπτικοποίησής τους, η οποία πραγματοποιείται με ηλεκτρονική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού.

## II.2. NETosis: Ένας νέος τύπος κυτταρικού θανάτου

Στην αρχική περιγραφή της παραγωγής των NETs οι συγγραφείς θεώρησαν ότι η NETosis αποτελεί μια ενεργή διαδικασία η οποία δεν σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο, βασιζόμενοι σε μια σειρά παρατηρήσεων<sup>15</sup>:

(1) Ερεθίσματα επαγωγής των NETs δεν προωθούν την απελευθέρωση κυτταροπλασματικών δεικτών όπως η λακτασική αφυδρογονάση, ενώ τα ενεργοποιημένα κύτταρα επιδείκνυαν ζωτικές χρωστικές για τουλάχιστον δύο ώρες μετά το ερέθισμα, αποκλείοντας την νέκρωση ως ένα σχετιζόμενο φαινόμενο.

(2) Η IL-8 και το LPS τα οποία συνήθως επιμηκύνουν το χρόνο ζωής των ουδετερόφιλων επάγουν το σχηματισμό των NETs.

(3) Τα NETs σχηματίστηκαν από κινητά κύτταρα όπως αποδείχθηκε από βιντεομικροσκοπία.

(4) Τα NETs σχηματίστηκαν μόλις 10 λεπτά μετά από την ενεργοποίηση- ένα χρονικό διάστημα το οποίο δεν είναι συμβατό με την απόπτωση.

Αυτή η υπόθεση αντιμετωπίστηκε με δυσπιστία και θεωρήθηκε ότι μία διαδικασία που οδηγεί σε αποδιάταξη του πυρήνα και έξοδο του DNA στον εξωκυτταρικό χώρο αναπόφευκτα σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο. Το 2007 περεταίρω διερεύνηση από την ομάδα του Dr. Brinkmann

κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η NETosis αποτελεί ένα μονοπάτι κυτταρικού θανάτου. Αυτή διαδικασία περιγράφηκε και αργότερα σε κοκκιοκύτταρα άλλου τύπου, όπως στα ηωσινόφιλα όπου παρατηρείται ταχεία «εκτίναξη» μιτοχονδριακού DNA<sup>18</sup>. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα ευρήματα εισήχθη ο όρος ETosis<sup>22</sup>, ο οποίος περιγράφει τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου που οδηγεί στο σχηματισμό των εξωκυττάρων παγίδων, χρησιμοποιώντας τον όρο NETosis ειδικά όταν αυτές οι εξωκυττάρια παγίδες προέρχονται από τα ουδετερόφιλα.

### II.3. Μηχανισμός NETosis

Ο σχηματισμός των NETs προϋποθέτει δύο γεγονότα: την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)<sup>23</sup> και την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης.

Η παραγωγή των ROS πραγματοποιείται από το ένζυμο NOX2 και είναι υπεύθυνη για την οξειδωτική έκρηξη που τελικά θα εξοντώσει τον φαγοκυτταρωμένο οργανισμό στα φαγολυσοσώματα. Τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν τις ROS στην παραγωγή των NETs δεν είναι εντελώς κατανοητά, παρόλ'αυτά είναι γνωστό ότι το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) είναι σημαντικό, δεδομένου του γεγονότος ότι ο ενεργοποιητής της, PMA είναι ένας από τους πιο γνωστούς μέχρι σήμερα επαγωγείς σχηματισμού των NETs.

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PKC οδηγεί στη συγκρότηση του συμπλέγματος της NOX2 στη μεμβράνη του φαγοςώματος και με την μεταφορά ηλεκτρονίων μέσα σε αυτό παράγει υπεροξειδικά ανιόντα ( $O_2^{2-}$ ). Την ίδια στιγμή η αύξηση στο αρνητικό φορτίο που παράγεται κατά τη διαδικασία δημιουργεί μια ευνοϊκή κλίση για την είσοδο των ιόντων υδρογόνου ( $H^+$ ) στο φαγόσωμα και την ανάμιξή τους με τα υπεροξειδικά ανιόντα με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Αυτό το συστατικό σε αντίθεση με άλλες ROS είναι ηλεκτρικά ουδέτερο και μπορεί να διαχυθεί πίσω στο κυτόπλασμα όπου στρέφει την κυτταρική ισορροπία προς την κατεύθυνση της γενικευμένης ενεργοποίησης μέσω της οξείδωσης της υπεροικογένειας των φωσφατασών τυροσίνης σε ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο κυστεΐνης το οποίο είναι υψηλά συντηρημένο σε αυτή την υπεροικογένεια πρωτεϊνών αφήνοντας τέτοια ένζυμα ανενεργά με έναν αντιστρεπτό ή μη αντιστρεπτό τρόπο βασιζόμενο στο βαθμό της οξείδωσης.

Άλλα ένζυμα τα οποία αποτελούν στόχο υπεροξειδωσις μέσω των καταλοίπων κυστεΐνης είναι οι κασπάσες οι οποίες για αυτό το λόγο αναστέλλουν την απόπτωση. Η απόδειξη για τη σημασία των ROS στην πραγματοποίηση της NETosis βασίζεται στις ακόλουθες ενδείξεις.

- (1) Το  $H_2O_2$  σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις αποτελεί κύριο επαγωγέα της παραγωγής των NETs.

(2) Η αναστολή των NOX2 αναστέλλει την παραγωγή των NETs.

(3) Προσθήκη καταλάσης σε καλλιέργειες ουδετερόφιλων όπου το  $H_2O_2$  μετατρέπεται σε νερό, οδηγεί σε αναστολή του σχηματισμού των NETs.

(4) Σε ασθενείς με χρόνια κοκκιοματώδη νόσο (CGD), ασθένεια που προκαλείται από την ανεπάρκεια συστατικών της NOX2, υπάρχει ένα σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας που οδηγεί σε λοιμώξεις που απειλούν τη ζωή και στην απουσία σχηματισμού NETs όπως διαπιστώθηκε μετά από παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Επιπρόσθετα κατά την επανάκτηση της δραστηριότητας της NOX2 με γονιδιακή θεραπεία διαπιστώθηκε αποτελεσματικός σχηματισμός των NETs και αντιμετώπιση της λοίμωξης<sup>24</sup>.

Η δεύτερη διαδικασία είναι η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, μια διαδικασία η οποία είναι μόνο εν μέρει κατανοητή<sup>25</sup>. Μελέτες που χρησιμοποίησαν ακυτταρικό μέσο που περιείχε χαμηλής πυκνότητας υπερκείμενο (LDS) ουδετερόφιλων (κυτταρόπλασμα και κοκκία) προκάλεσαν πυρηνική αποσυμπύκνωση σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Περαιτέρω διαχωρισμός του LDS αποκάλυψε ότι η ουδετεροφιλική ελαστάση που είναι αποθηκευμένη στα αζουροφιλικά κοκκία ήταν ο αιτιολογικός παράγοντας υπεύθυνος για αυτό το φαινόμενο. Αυτό το ένζυμο μετατοπίζεται στον πυρήνα μετά την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, διασπά τις ιστόνες και κυρίως την H4, όπου οι πυρηνικές αλλαγές και η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης είναι άμεσα ανάλογες με την διάσπαση της H4. Η μυελοπεροξειδάση (MPO) ένα άλλο ένζυμο που αποθηκεύεται σε αυτά τα κοκκία δεν προκαλεί αποδιάταξη των ιστονών αυτή καθεαυτή αν και υποβοηθά την διάσπασή τους από την ελαστάση (NE) και είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των NETs.

Ένα άλλο σημαντικό βήμα της διαδικασίας σχηματισμού των NETs είναι η κιτρουλλινοποίηση των ιστονών μέσω της απαμινάσης 4 της πεπτιδυλ-αργινίνης (PAD4), ένα ασβεστιοεξαρτώμενο ένζυμο το οποίο είναι παρόν στα ουδετερόφιλα και το μόνο μέλος αυτής της οικογένειας που διαθέτει υποπεριοχή με πυρηνική τοπολογία, που του επιτρέπει να λειτουργήσει και σε αυτό το επίπεδο. Η κιτρουλλινοποίηση των ιστονών προλαμβάνει τη μεθυλίωσή τους και την μετέπειτα μεταγραφή επιτρέποντας έτσι την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με έλλειψη της PAD4, μετά τη διέγερση, τα NETs απουσιάζουν καθώς και οι πυρηνικές αλλαγές που εμπλέκονται στη διαδικασία σχηματισμού τους<sup>23</sup>.

#### **II.4. Πρότυπα απελευθέρωσης των NETs**

Παρά τις προόδους στο πεδίο μελέτης του κυτταρικού θανάτου που έλαβαν χώρα από την ανακάλυψη της απόπτωσης το 1972, ο καθορισμός του κυτταρικού θανάτου και των διακριτών

μονοπατιών που οδηγούν σε αυτόν αποτελεί θέμα διαφωνίας. Το 2005 η επιτροπή ονοματολογίας για τον κυτταρικό θάνατο δημοσίευσε ένα κείμενο συμφωνίας πάνω στο ζήτημα της κατηγοριοποίησης. Το κείμενο αυτό επικαιροποιήθηκε το 2009 και το 2012. «Ένα κύτταρο μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως νεκρό όταν χάνει την ατομικότητά του ή όταν έχει φτάσει σε «ένα σημείο χωρίς επιστροφή», στο οποίο αυτό χάνει τη λειτουργία του μόνιμα. Η επιτροπή αποφάσισε να αλλάξει το σύστημα κατάταξης από την κλασική μορφολογική του κατηγοριοποίηση σε βιοχημική, καταλήγοντας στην ταυτοποίηση δεκατεσσάρων μοντέλων θανάτου. Κάποια από αυτά τα μοντέλα παρόλ'αυτά αποτελούν κυτταρικές διαδικασίες και μόνο υπό ορισμένες συνθήκες λαμβάνουν τη μορφή μονοπατιού κυτταρικού θανάτου, όπως είναι για παράδειγμα η αυτοφαγία. Πράγματι η αυτοφαγία αποτελεί μηχανισμό που αποτρέπει την κυτταρική γήρανση και παρέχει ενέργεια σε συνθήκες στέρησης θρεπτικών και ενέργειας. Επιπρόσθετα η αυτοφαγία δύναται να αποτελέσει τμήμα διαδικασίας άλλων υποτύπων κυτταρικού θανάτου, με στόχο να επιτρέψει τη ορθή εκτέλεσή του (απόπτωση, NETosis)<sup>26</sup>.

Στην κατάταξη του 2012 η NETosis έγινε για πρώτη φορά δεκτή ως ειδικός υπότυπος κυτταρικού θανάτου των κοκκιοκυττάρων ο οποίος διαφέρει από την απόπτωση και τη νέκρωση, με βάση την παρατήρηση της απουσίας ευαισθησίας στην παρεμπόδιση κασπασών και νεκροστατίνης αντίστοιχα<sup>27</sup>.

Έχουν προταθεί δύο μοντέλα απελευθέρωσης των NETs: ένας νέος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου και ένας μηχανισμός εξαγωγής DNA από άθικτα κύτταρα.

Οι Fuchs και συν. προσέγγισαν το θέμα του σχηματισμού των NETs παρατηρώντας μεμονωμένα κύτταρα με βιντεομικροσκοπία. Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι *ex vivo*, τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα εισέρχονται σε ένα πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου, όπου οι μεμβράνες του πυρήνα και των κοκκίων διαλύονται και τα πυρηνικά περιεχόμενα αποσυμπυκνώνονται στο κυτταρόπλασμα. Τελικά η πλασματική μεμβράνη διαρρηγνύεται και η χρωματίνη διακοσμημένη με κοκκιώδεις πρωτεΐνες απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Με φορβόλη (Phorbol Myristate Acetate-PMA), *Staphylococcus aureus* ή *Candida albicans* ως ερεθίσματα η όλη διαδικασία χρειάζεται 2-3 ώρες για να πραγματοποιηθεί. Αυτός ο μηχανισμός αντανάκλα πιθανά το σχηματισμό των NETs που πραγματοποιείται με άμεσο ερέθισμα από παθογόνα.

Αντίθετα μια άλλη μελέτη έδειξε ότι με την παρουσία λιποπολυσακχαριδίου (LPS) και αιμοπεταλίων, τα ουδετερόφιλα μπορούν να παράγουν NETs εντός λίγων λεπτών. Αυτή η διαδικασία απαιτεί τα κύτταρα να βρίσκονται υπό συνθήκες ροής και έχει συσχετιστεί με την αγγειακή απόφραξη κατά τη σήψη<sup>28</sup>. Αυτή η μελέτη αποκάλυψε έναν μηχανισμό έμμεσης διέγερσης των ουδετερόφιλων η οποία μεσολαβείται από ρυθμιστικά κύτταρα τελεστές όπως είναι τα αιμοπετάλια. Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορεί να είναι ιδανικός σε συνθήκες ροής οι οποίες υφίστανται στην αιματική κυκλοφορία, όπου ταχεία ανάπτυξη των NETs μπορεί να είναι

αναγκαία για τη δράση των ουδετερόφιλων προκειμένου να ανταπεξέλθουν στους μικρότερους χρόνους αντίδρασης. Αυτός ο μηχανισμός έχει χαρακτηριστεί ως βιώσιμη NETosis.

## II.5. Τα NETs είναι αποτελεσματικά έναντι των μικροβίων

Τα NETs φαίνονται αποτελεσματικά εναντίον των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, των μυκήτων και των παρασίτων. Έχει δειχθεί ότι τα NETs μπορούν να προσδεθούν και να εξοντώσουν τα βακτήρια *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes* και *Bacillus anthracis*, το μύκητα *C. albicans* και το πρωτόζωο *Leishmania amazonensis*. Τα NETs μπορούν να διαδραματίζουν έναν ζωτικό ρόλο στην αντιμετώπιση παθογόνων τα οποία είναι πολύ μεγάλα προς φαγοκυττάρωση όπως είναι οι μυκητικές υφές και πιθανά και οι έλμινθες<sup>29</sup>.

Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί το γεγονός, ότι τα NETs διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην άμυνα εναντίον μικροβίων όπως είναι ο *S. pneumoniae*, οι στρεπτόκοκκοι κλάσης A (GAS) και το *Mycobacterium tuberculosis* αν και με απουσία μικροβιοκτόνου δραστηριότητας. Αυτά τα μικρόβια παγιδεύονται αλλά δεν εξοντώνονται από τα NETs, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η NET- μεσολαβούμενη παγίδευση μικροβίων από μόνη της, διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο κατά την ανοσιακή άμυνα<sup>29</sup>.

Έχει παρατηρηθεί ότι Gram<sup>+</sup> και Gram<sup>-</sup> βακτήρια παγιδεύονται στις εξωκυττάρια δομές DNA που παράγονται από τα ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα, και μονοκύτταρα καθώς και από φυτικά κύτταρα στην περιοχή του ακρορρίζου.

Η αποδιάταξη των δομών μέσω της δράσης DNAsών και η παρεμπόδιση της δράσης των αντιμικροβιακών πρωτεϊνών που φαίρονται στις δομές, οδηγεί σε ανάσχεση της αντιμικροβιακής δράσης των δομών, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για την αντιμετώπιση των μικροβίων είναι απαραίτητα και τα δύο στοιχεία (DNA και πρωτεΐνες)<sup>24</sup>.

Η πρώτη ένδειξη ότι οι DNA παγίδες διαδραματίζουν ρόλο *in vivo* προήλθε από την παρατήρηση NETs σε λαγούς, με λοίμωξη από *Shigella* καθώς και στην ανθρώπινη σκωληκοειδίτιδα.

Επιπρόσθετα ηωσινοφιλικές εξωκυττάρια παγίδες παρατηρήθηκαν σε έντερο ασθενών με λοίμωξη από *Schistosoma* ή *Spirocheta*. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι εξωκυττάρια παγίδες επιτρέπουν τη στοχευμένη απόδοση αντιμικροβιακών συστατικών στα εισβάλλοντα παθογόνα, ενώ μπορούν και περιορίζουν την τοπική ανοσοπαθολογία.

Εκτός των περιγραφικών παρατηρήσεων έχουν πραγματοποιηθεί και λειτουργικές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα οι οποίες αποδεικνύουν *in vivo* την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των εξωκυττάρια παγίδων DNA. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το πειραματικό μοντέλο σήψης όπου

έχει δειχθεί ότι τα TLR-4 ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με τα ουδετερόφιλα, επάγοντας το φαινόμενο της NETosis σε αιμοφόρα αγγεία ήπατος καθώς και σε πνευμονικά αγγεία. Αυτά τα NETs είχαν την ικανότητα παγίδευσης Gram<sup>-</sup> βακτηρίων<sup>28</sup>. Από την άλλη πλευρά στο ίδιο μοντέλο σήψης παρατηρήθηκε ότι τα NETs, συσχετίστηκαν με ενδοθηλιακή ιστική βλάβη οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι μπορεί να σχετίζονται με την πολυοργανική δυσλειτουργία σε ασθενείς με σήψη.

Ο αντιβακτηριακός ρόλος των ηωσινοφίλων σε συσχέτιση με τις παγίδες DNA που προέρχονται από αυτά έχει καταδειχθεί σε IL-5 διαγονιδιακά ποντίκια.

Ο σχηματισμός των εξοκυττάρων παγίδων DNA φαίνεται να είναι πολύ σημαντικός για την άμυνα έναντι παθογόνων τα οποία είναι πολύ μεγάλα προς φαγοκυττάρωση, όπως οι μύκητες (για παράδειγμα *Candida albicans* ή *Nectria haematococa*)<sup>30</sup>. Επιπρόσθετα σε μοντέλο ποντικού με λοίμωξη από το πρωτόζωο *Toxoplasma gondii*, έχει δειχθεί ότι τα NETs περιορίζουν την παρασιτική λοίμωξη.

## II.6. Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης των NETs

Ως μια νέα στρατηγική τα NETs προσφέρουν ορισμένα πλεονεκτήματα: 1) Προωθούν τη φυσική ανασχεση των βακτηρίων, 2) επιτρέπουν τη συνέργια μεταξύ των αντιμικροβιακών παραγόντων και αυξάνουν την δραστική συγκέντρωσή τους ελαχιστοποιώντας τη διάχυση τους, 3) ελαχιστοποιούν τις βλάβες από τις αντιμικροβιακές ουσίες στους περιβάλλοντες ιστούς και 4) ρυθμίζουν τη φλεγμονώδη απόκριση. Για κάθε μία από αυτές τις δράσεις πρέπει πραγματοποιηθεί περαιτέρω διερεύνηση<sup>29</sup>.

Η φυσική ανασχεση των βακτηρίων αποτελεί και ένα από τα χαρακτηριστικά της φαγοκυττάρωσης. Παρόλ'αυτά η φαγοκυττάρωση απαιτεί συνεχή χημειοταξία και πρόσληψη των βακτηρίων γεγονός το οποίο έχει υψηλό ενεργειακό κόστος για το κύτταρο. Αντίθετα στην περίπτωση των NETs με το που αποπληρώσει το κύτταρο το κόστος σχηματισμού τους, τα μικρόβια παγιδεύονται χωρίς να απαιτείται περαιτέρω δαπάνη ενέργειας. Επιπροσθέτως, τα NETs, συγκριτικά με τα κύτταρα, μπορούν και εμμένουν περισσότερο όσον αφορά στην ικανότητά τους να συλλαμβάνουν μικρόβια μέσω της φαγοκυττάρωσης. Επιπλέον τα NETs μπορούν και επεκτείνονται σε μεγάλο βαθμό γεγονός που τους επιτρέπει να δρουν ως φυσικός φραγμός αποτρέποντας τη βακτηριακή διασπορά και καθιστώντας δυνατή τη σύλληψη μεγάλου αριθμού βακτηρίων.

Τα ουδετεροφιλικά αντιμικροβιακά συστατικά είναι όμως τοξικά και για κύτταρα του ξενιστή. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ιστόνες και η MPO προκαλούν τη λύση ευκαρυωτικών κυττάρων *in*

*vitro*<sup>25</sup>. Η δραστηριότητα των πρωτεασών σερίνης μπορεί επίσης να προκαλέσει βλάβη στους περιβάλλοντες ιστούς, όπως για παράδειγμα η ουδετεροφιλική ελαστάση (NE) η οποία μπορεί και συνδέεται με ορισμένες πρωτεΐνες του ξενιστή σε φλεγμαίνουσες περιοχές<sup>20</sup>. Επιπλέον το οπλοστάσιο των πρωτεασών των ουδετερόφιλων έχει μια ρυθμιστική λειτουργία με πιθανά δυσμενή αποτελέσματα στην εκκαθάριση των μικροβίων. Για παράδειγμα η NE συνδέεται με ορισμένες κυτταροκίνες οι οποίες ρυθμίζουν τη φλεγμονή και με τον C3bι CR1 υποδοχέα του συμπλέγματος του συμπληρώματος, παρεμποδίζοντας τη φαγοκυττάρωση των οψωνισμένων μικροβίων από τα ουδετερόφιλα. Η παρεμπόδιση του συστήματος του συμπληρώματος έχει συνδεθεί με τη χρόνια φλεγμονή στους πνεύμονες ασθενών που πάσχουν από κυστική ίνωση, όπου η NE είναι παρούσα σε υψηλά επίπεδα. Για τη μείωση της δραστηριότητας της πρωτεάσης σερίνης ο ξενιστής διαθέτει πρωτεΐνες σερίνης όπως η α1-αντιθρυψίνη και ο εκκρινόμενος αναστολέας λευκοκυτταρικών πρωτεασών (SLPI), που αναστέλλει άμεσα τη δραστηριότητα των πρωτεασών αλλά επιπλέον αλληλεπιδρά με αντιφλεγμονώδεις παράγοντες αποτρέποντας την αλληλεπίδρασή τους με την ουδετεροφιλική ελαστάση. Παρόλ'αυτά η οξειδωτική φλεγμονή αναστέλλει τη συσχέτισή τους με τις πρωτεάσες. Για αυτό και σε περιοχές όπου τα ουδετερόφιλα υπόκεινται σε οξειδωτική έκρηξη, οι σερίνες μπορεί να έχουν μειωμένη αποτελεσματικότητα παρόλο που τα επίπεδά τους αυξάνονται<sup>6</sup>.

Σε τέτοιες συνθήκες τα NETs μπορούν να προστατεύσουν τα παρακείμενα κύτταρα με δύο τρόπους: 1) περιορίζοντας τη διασπορά των τοξικών αντιμικροβιακών συστατικών οδηγώντας τα σε σύνδεση με το ικρίωμα του αποσυμπυκνωμένου DNA και 2) μειώνοντας τα επίπεδα της τοξικής τους δραστηριότητας. Έχει δειχθεί ότι η NE αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη και το DNA γεγονός που οδηγεί σε δραματική μείωση της πρωτεολυτικής της δραστηριότητας. Συνεπώς είναι πιθανό ότι όταν η NE συνδέεται με τα NETs, μειώνεται η πρωτεολυτική της δραστηριότητα και λειτουργεί πιθανά μέσω της ανεξάρτητης της πρωτεόλυσης αντιμικροβιακής δραστηριότητας.

Η συντοποθέτηση με ορισμένα αντιμικροβιακά συστατικά πιθανά βελτιώνει τη δραστηρική συγκέντρωση κάθε αντιμικροβιακού συστατικού μεμονωμένα, ενώ την ίδια στιγμή τους επιτρέπει να λειτουργήσουν συνεργικά. Η συνέργεια παίζει πιθανά έναν σημαντικό ρόλο κατά τη δέσμευση των μικροβίων. Θεωρητικά η δέσμευση του DNA θα έπρεπε να αυξάνει δραματικά τη συγγένεια των NETs για τις μικροβιακές επιφάνειες, δεδομένου ότι τα μικρόβια βρίσκονται αρκετά κοντά στο ικρίωμα του DNA. Επιπλέον η συνέργεια ορισμένων αντιμικροβιακών συστατικών είναι ένα φαινόμενο το οποίο έχει διαπιστωθεί σε διάλυμα και είναι πιθανό να ευνοείται επίσης όταν είναι συνδεδεμένα στο ικρίωμα. Μελέτες με διαλυτή MPO και NE έχουν δείξει ότι η NE διεγείρει την αντιμικροβιακή δράση της MPO ανεξάρτητα της πρωτεολυτικής



της δραστηριότητας. Τέτοιου τύπου ενδογενής συνέργεια μπορεί να ευνοείται περαιτέρω και στα NETs και το φαινόμενο αυτό να εκτείνεται και σε άλλα αντιμικροβιακά συστατικά.

Τέλος ο σχηματισμός των NETs από τα ουδετερόφιλα βοηθά στον έλεγχο της φλεγμονής, μέσω της απελευθέρωσης αντιφλεγμονωδών λιποξινών και μείωσης του φορτίου του παθογόνου. Επιπρόσθετα η πρόσληψη αποπτωτικού ουδετεροφιλικού υλικού (δηλαδή των NETs) από τα μακροφάγα, οδηγεί σε έκλυση ρεσολβινών και προτεκτινών, οι οποίες παρεμποδίζουν την περαιτέρω επιστράτευση των ουδετερόφιλων <sup>29</sup>.

## II.7. Τα NETs ως πηγή αυτοαντιγόνων

Το παράδειγμα των NETs προσφέρει μια βάσιμη εξήγηση για την ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων ενάντια σε νουκλεϊκά οξέα και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες του ξενιστή, εξαιτίας της έκθεσης του ουδετεροφιλικού DNA στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η παροδική ή χρόνια παρουσία των NETs μπορεί να οδηγήσει στη διέγερση της παραγωγής αντιουδετεροφιλικών κυτταροπλασματικών αυτοαντισωμάτων (ANCA)<sup>31</sup> ή αντιτυρηνικών αντισωμάτων (ANA), αλλά και τα αυτοαντισώματα αυτά μπορεί να επάγουν το σχηματισμό των NETs. Πρόσφατα οι Kessenbrock και συν. έδειξαν ότι τα NETs απελευθερώνονται από ουδετερόφιλα τα οποία έχουν διεγερθεί από ANCA, ενώ τα NETs με τη σειρά τους φέρουν τα στοχευμένα αυτοαντιγόνα πρωτεΐνωση-3 και μυελοπεροξειδάση (MPO). Οι συγγραφείς προτείνουν ότι ο σχηματισμός των NETs σχετίζεται με την πρόκληση αγγειίτιδας και προκαλεί αυτοάνοση απόκριση ενάντια σε συστατικά των ουδετερόφιλων σε άτομα που πάσχουν από αγγειίτιδα των μικρών αγγείων<sup>32</sup>.

Η συσσώρευση αιμοπεταλίων και ουδετερόφιλων τα οποία είχαν προσελκυθεί από χημειοκίνες κατά την παρουσία παθογόνων, μπορεί να αποτελεί τη βάση για δευτερογενείς ανοσολογικές αποκρίσεις στο διαταραγμένο ενδοθήλιο. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια διεγείρουν τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα μέσω μορίων υποδοχέων τύπου Toll-like, όπως ο TLR4 προκειμένου να εκθέσουν στον εξωκυττάριο χώρο τα NETs, γεγονός το οποίο έχει ως συνέπεια την παγίδευση και συσσώρευση λεμφοκυττάρων και πιθανά αντιγονοπαρουσιατικών κυττάρων. Η έκθεση του ουδετεροφιλικού DNA σε σύνδεση με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και η παρουσία παθογόνων αντιγόνων, μπορεί να προκαλούν τη διέγερση των B κυττάρων (π.χ. ενεργοποιημένα ενάντια στην μυελοπεροξειδάση, MPO). Τα ANA και ANCA αυτοαντισώματα, τα οποία προκύπτουν από αυτό το σενάριο μπορεί με τη σειρά τους να διεγείρουν τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα για να προσδεθούν στο ενδοθήλιο, να διαπεράσουν τον ενδοθηλιακό φραγμό και τελικά να επάγουν κυτταρικό θάνατο στο ενδοθήλιο.

Επιπρόσθετα, τα μονοκύτταρα τα οποία επίσης εκφράζουν MPO και PR-3 αποτελούν στόχο των ANCA, με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις και χημειοτακτικές κυτταροκίνες όπως είναι η IL-8.

Θεωρώντας ότι τα NETs επάγουν σε μεγάλο βαθμό αυτόν τον φαύλο κύκλο, θα πρέπει να παρατηρείται μια αιτιακή σχέση ανάμεσα στην έλλειψη DNAsών και αυτοάνοσων νοσημάτων. Πράγματι, οι Manderson και συν. ανέφεραν ότι η DNάση I ανέστειλε την ανάπτυξη αντι-ssDNA και αντι-ιστονικών αυτοαντισωμάτων σε μοντέλο ποντικών με Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο. Επιπλέον οι Parseghian και Luhrs, παρείχαν ενδείξεις για την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ ιστονών, NETs και αυτοάνοσων νοσημάτων. Πρόσφατα οι Baker και συν. ανέφεραν ευρήματα, προτείνοντας την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του σχηματισμού NETs που σχετίζεται με μαλάρια και αντιπυρηνικών IgG αντισωμάτων ενάντια σε dsDNA και στην παθολογία παιδιών που έχουν λοίμωξη από *P.falciparum*<sup>33</sup>.

## II.8. Αντιφλεγμονώδης δράση των NETs

Η απομάκρυνση των ουδετεροφίλων από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα είναι σημαντική για την επίλυση της φλεγμονής σε ιστούς με μεγάλο αριθμό διηθούντων λευκοκυττάρων. Έχει δειχθεί όμως ότι συναθροίσεις δομών NETs οι οποίες σχηματίζονται σε συνθήκες υψηλής πυκνότητας ουδετεροφίλων μπορούν να περιορίσουν τη φλεγμονή<sup>34</sup>. Αυτές οι συναθροίσεις των NETs (από εδώ και στο εξής θα αναφέρονται ως aggNETs, από το aggregated NETs), των οποίων ο σχηματισμός μελετήθηκε στην ουρική αρθρίτιδα και προκλήθηκε από κρυστάλλους ουρικού οξέως (MSU κρύσταλλοι), διαπιστώθηκε ότι παγιδεύουν και διασπών πρωτεολυτικά κυτταροκίνες και χημειοκίνες προερχόμενες από ουδετερόφιλα, μειώνοντας τη φλεγμονή. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να αποτελεί μια εξήγηση για την ανεξήγητη αυθόρμητη επίλυση των κρίσεων φλεγμονής που προκαλούνται από τους κρυστάλλους του ουρικού οξέως σε ασθενείς με ουρική αρθρίτιδα ενώ μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο και σε άλλες μορφές ουδετεροφιλικής φλεγμονής.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η MSU-επαγόμενη NETosis προηγείται της παραγωγής ROS και καταλήγει στην απελευθέρωση προφλεγμονοδών μεσολαβητών από ουδετερόφιλα τα οποία καλλιεργούνται σε πυκνότητες συγκρίσιμες με αυτές της πρώιμης φάσης της στρατολόγησης των ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα. Αντίθετα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ουδετεροφίλων όπως συμβαίνει στο αρθρικό υγρό της ουρικής αρθρίτιδας ή σε υψηλά διηθούντες ουδετεροφίλων φλεγμαίνοντες ιστούς παρατηρήθηκαν aggNETs *in vitro* και *in vivo*. Αυτά τα aggNETs αποτελούν εκτεταμένες δομές εξοκυττάρου DNA διακοσμημένου με υλικό

των κοκκίων των ουδετεροφίλων οι οποίες είναι διεσπαρμένες μεταξύ των κρυστάλλων ουρικού οξέως.

Ο σχηματισμός των aggNETs αυξήθηκε με το ATP και την λακτοφερρίνη έναν ειδικό αναστολέα της μετανάστευσης των ουδετεροφίλων<sup>35</sup>. Η απελευθέρωση του ATP κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των NETs είναι γεγονός με σημασία καθώς η παρουσία εξωκυττάρων νουκλεοτιδίων προκαλεί την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα<sup>36</sup>. Όπως διαπιστώθηκε και το ATP και η λακτοφερρίνη έχουν την επιπρόσθετη δράση της συσσώρευσης των NETs. Σε καλλιέργειες χαμηλής πυκνότητας οι τοπικές συγκεντρώσεις των δύο αυτών συστατικών που χαρακτηρίζονται από σύντομο χρόνο ζωής, είναι σε συγκέντρωση κάτω της κρίσιμης που απαιτείται για τη συσσώρευση των NETs. Πράγματι μετά από προσθήκη και των δύο αυτών μεσολαβητών στις καλλιέργειες χαμηλής πυκνότητας διαπιστώθηκε επαγωγή σχηματισμού των aggNETs.

Η συσσώρευση των NETs προκάλεσε την αποδιάταξη φλεγμονοδών μεσολαβητών οι οποίοι απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και τερμάτισε την φλεγμονώδη απόκριση. Η προσθήκη ειδικών αναστολέων πρωτεασών απέτρεψε την αποδιάταξη κυτταροκινών.

Διατυπώθηκε λοιπόν η υπόθεση ότι μετά από την επαγόμενη από MSU-κρυστάλλους NETosis η στρατολόγηση των ουδετεροφίλων μπορεί να προχωρήσει μέχρι τα ουδετερόφιλα στην περιοχή της φλεγμονής προσεγγίσουν μια κρίσιμη συγκέντρωση και σχηματισθούν τα aggNETs. Εν συνεχεία τα aggNETs διακόπτουν τον κύκλο της φλεγμονής μέσω της αποδιάταξης των χημειοκινών και των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1β, οδηγώντας κατ'αυτό τον τρόπο τη διαδικασία της NETosis σε τέλμα και επιλύοντας τη φλεγμονή. Θεραπευτικές παρεμβάσεις εκμεταλλευόμενες τους μηχανισμούς που περιγράφηκαν μπορούν να περιλαμβάνουν τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την επίλυση της φλεγμονής προωθώντας τη συσσώρευση των NETs<sup>34</sup>.

## **II.9. Επιλογή επαγωγής ουδετεροφιλικών μηχανισμών**

Ένα σημαντικό ερώτημα αποτελεί το πως αποφασίζει το ουδετερόφιλο ποια από τις τρεις στρατηγικές θα ακολουθήσει για την εξουδετέρωση των μικροβίων. Σε αντίθεση με τη φαγοκυττάρωση, ο σχηματισμός των NETs μέσω του κυτταρικού θανάτου είναι οριστικός γι'αυτό και η διαδικασία επιλογής της συγκεκριμένης στρατηγικής πρέπει να πραγματοποιείται με αυστηρή ρύθμιση.

Μια ελκυστική υπόθεση μπορεί να διατυπωθεί από τη χρονικότητα των γεγονότων. *Ex vivo* τα ουδετερόφιλα προσλαμβάνουν τα μικρόβια μέσω της φαγοκυττάρωσης εντός λίγων λεπτών από τη στιγμή της έκθεσης. Ο ρυθμός αποκοκκίωσης ποικίλει με βάση το περιεχόμενο των κοκκίων, με τα εκκριτικά κυστίδια να εκκρίνονται πρωταρχικά (εντός 10 λεπτών από την έναρξη δράσης του ερεθίσματος). Στη συνέχεια ακολουθούν τα κοκκία ζελατινάσης, τα ειδικά κοκκία και τα αζουροφιλικά κοκκία. Αντίθετα ο σχηματισμός των NETs αποτελεί μια πιο καθυστερημένη διαδικασία, γεγονός που οδηγεί στη θέση ότι το ουδετερόφιλο μπορεί να επιτελέσει και τις τρεις διαδικασίες εφόσον αυτές συμβούν με τη σωστή ακολουθία: φαγοκυττάρωση, η οποία ακολουθείται από την αποκοκκίωση και τελικά ο σχηματισμός των NETs<sup>29</sup>. Σε συμφωνία με αυτό το μοντέλο, *in vitro* πειράματα υποδεικνύουν ότι αρχικά τα ουδετερόφιλα εξοντώνουν τον *S. aureus* κυρίως μέσω της φαγοκυττάρωσης, ενώ σε μετέπειτα χρονικά σημεία γίνεται κυρίαρχη, η εξόντωσή του μέσω των NETs<sup>23</sup>.

Εναλλακτικά, μεμονωμένα ουδετερόφιλα μπορούν και επιδεικνύουν διαφορετική απόκριση εντός ενός πληθυσμού κυττάρων. Αυτή η υπόθεση στηρίζεται και από την παρατήρηση ότι η NETosis αποτελεί μια διαδικασία η οποία μπορεί να επαχθεί στο 30% των ουδετερόφιλων το μέγιστο. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι πρέπει να διερευνηθεί το αν υφίσταται κάποια διαδικασία λήψης αποφάσεων που ρυθμίζει τις στρατηγικές θανάτωσης<sup>29</sup>.

### III. Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID), αποτελεί μια ετερογενή συλλογή καταστάσεων οι οποίες χαρακτηρίζονται από πρωτοπαθή αντισωματική ανεπάρκεια (υποαγαμμασφαιριναιμία), δύο τουλάχιστον ιστοτύπων ανοσοσφαιρινών. Εξαιτίας αυτού πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν επίσης τον όρο CVIDs. Αποτελεί την πιο κοινή πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια κλινικής σημασίας<sup>37</sup> (με συχνότητα 1:50.000- 1:200.000) και θεωρείται ότι έχει γενετική βάση η οποία είναι ως επί το πλείστον μη χαρακτηρισμένη, παρά τις μεγάλες προόδους οι οποίες έχουν λάβει χώρα τα τελευταία χρόνια μετά την ανακάλυψη της CVID από τον Janeway *et al.*<sup>36</sup> και από την εισαγωγή του όρου το 1973 από τους Cooper *et al.*<sup>39</sup>.

Η κύρια ανοσολογική διαταραχή της νόσου αποτελεί η αποτυχία των Β-κυττάρων στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών, παρόλο που διαταραχές έχουν περιγραφεί σε όλα τα άλλα τμήματα του ανοσοποιητικού συστήματος, με ορισμένη συσχέτιση με τον κλινικό φαινότυπο. Κλινικά τα

άτομα με CVID είναι ευάλωτα σε εμμένουσες λοιμώξεις κυρίως της αναπνευστικής οδού, αλλά και άλλες λοιμώξεις συμπεριλαμβανομένων αυτές του γαστρεντερικού συστήματος.

Κατά τη CVID εκδηλώνονται διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος μη λοιμώδους αιτιολογίας, όπως η αυτοανοσία (συνήθως αυτοάνοσες κυτταροπενίες), μη λοιμώδης γαστρεντερική νόσος, κοκκιοματώδης φλεγμονή, λεμφοϋπερπλασία, ενώ ο κίνδυνος κακοήθειας είναι αυξημένος.

Εξαιτίας της σπανιότητας και της ετερογένειας της νόσου, η πρόοδος στην κατανόησή της υπήρξε σχετικά αργή, αν και την τελευταία δεκαετία έχουν επιτευχθεί πρόοδοι (παράλληλα με την ανάπτυξη και την κατανόηση σε όλες τις πλευρές της ανοσολογίας) στην βελτίωση των γνώσεων των βασικών μηχανισμών καθώς και της κλινικής φροντίδας των ασθενών με CVID.

Ο προσδιορισμός της CVID πραγματοποιείται μέσω διάγνωσης διά αποκλεισμού. Τα τρέχοντα διαγνωστικά κριτήρια έτσι όπως έχουν οριστεί από την ESID, ορίζουν ότι<sup>40</sup> :

Η CVID είναι πιθανή σε ασθενή άνδρα ή γυναίκα ο οποίος επιδεικνύει αξιοσημείωτη μείωση της συγκέντρωσης της IgG (τουλάχιστον 2 SD κάτω του αντίστοιχου μέσου για την ηλικία) καθώς και αξιοσημείωτη μείωση στην συγκέντρωση σε τουλάχιστον έναν από τους ισοτύπους IgM ή IgA, ενώ πληροί και τα κάτωθι κριτήρια:

- 1) Εμφάνιση της ανοσοανεπάρκειας σε ηλικία πλέον των δύο ετών
- 2) Απούσες ισοαιμαγλουτινίνες και/ή φτωχή απόκριση σε εμβόλια
- 3) Έχουν αποκλεισθεί άλλες αιτίες υπογαμμασφαιριναιμίας

Η διάγνωση της κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας πραγματοποιείται στους περισσότερους ασθενείς κατά την δεύτερη, τρίτη, ή τέταρτη δεκαετία της ζωής αφού έχουν παρουσιάσει ορισμένα περιστατικά πνευμονίας. Παρόλ'αυτά μπορεί να προσβληθούν παιδιά καθώς και μεγαλύτεροι σε ηλικία ενήλικες. Αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν συχνές λοιμώξεις ιικές, μυκητιακές, παρασιτικές καθώς και βακτηριακές. Περίπου οι μισοί ασθενείς παρουσιάζουν φυσιολογικές συγκεντρώσεις της IgM. Είναι συχνή η παρουσία ανωμαλιών στους αριθμούς και στην λειτουργία των T κυττάρων. Οι πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζει φυσιολογικό αριθμό B λεμφοκυττάρων, αν και κάποιοι εμφανίζουν χαμηλότερους αριθμούς ή παρουσιάζουν και απουσία αυτών. Περίπου το 50% αυτών παρουσιάζει αυτοάνοσες εκδηλώσεις ενώ υπάρχει υψηλός κίνδυνος κακοήθειας<sup>41</sup>.

Επιπρόσθετα με την κατάταξη των αντισωματικών ανεπαρκειών, η σοβαρότητα της κατάστασης του κάθε ασθενούς μπορεί να αξιολογηθεί με ένα «point score», στο οποίο συνεκτιμούνται χαρακτηριστικά όπως οι αριθμοί των παρελθουσών πνευμονιών, η παρουσία βρογχεκτασίας ή άλλης παθολογίας του πνευμονικού παρεγχύματος, η παρουσία κοκκιωμάτων, η σπληνομεγαλία ή η λεμφοϋπερπλασία, η συνύπαρξη αυτοάνοσων καταστάσεων, κακοηθειών κλπ.

Τα διαγνωστικά κριτήρια για την κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια καθορίστηκαν αρχικά από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα για τις Ανοσοανεπάρκειες (ESID) και από την Παναμερικανική Ομάδα για την Ανοσοανεπάρκεια (PAGID) το 1999 <sup>40</sup>. Σύμφωνα με αυτά τα κριτήρια οι ασθενείς διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: Σε αυτούς που έχουν μεγάλη πιθανότητα να πάσχουν από CVID, στον ορό των οποίων οι συγκεντρώσεις των IgG, IgA και IgM είναι χαμηλότερες από 2 SD από τον ηλικιακό μέσο όρο. Η άλλη κατηγορία αφορά στους ασθενείς που έχουν πιθανότητα να πάσχουν από CVID, οι οποίοι επιδεικνύουν μείωση στη συγκέντρωση μίας εκ των IgG, IgA, και IgM, κάτω από 2 SD από τον ηλικιακό μέσο όρο. Επιπρόσθετα για να πληρούν τα κριτήρια πρέπει η εμφάνιση της νόσου να λαμβάνει χώρα σε ηλικία μεγαλύτερη των δύο ετών, πρέπει να παρουσιάζουν αποτυχία αντισωματικής απόκρισης σε συγκεκριμένα αντιγόνα (ισοαιμαγλουτινίες, ή εμβόλια) καθώς επίσης και να έχουν αποκλεισθεί άλλες αιτίες υπογαμμασφαιριναιμίας.

Έχει προταθεί ότι ως ελάχιστη ηλικία εμφάνισης της νόσου ως διαγνωστικό κριτήριο, πρέπει να ορισθούν τα τέσσερα έτη, αντί τα δύο έτσι ώστε να αποκλεισθούν ορθώς παιδιά με άλλες καταστάσεις, όπως η παροδική υπογαμμασφαιριναιμία των νεογνών<sup>42</sup>.

Η CVID πρέπει να διαχωριστεί από άλλες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες με προβλήματα στην παραγωγή αντισωμάτων:

1) Αγαμμασφαιριναιμίες όπως η φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία (X-linked agammaglobulinemia, XLA, με μεταλλάξεις στο γονίδιο της Btk), ή αυτοσωμικές υπολειπόμενες αγαμμασφαιριναιμίες (εξαιτίας μετάλλαξης στη μ-βαριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης). Όλοι οι τύποι αγαμμασφαιριναιμίας χαρακτηρίζονται από πλήρη έλλειψη Β-κυττάρων στην περιφέρεια, που οδηγεί σε έλλειψη όλων των ισοτύπων των ανοσοσφαιρινών. Κάποιες υπομορφικές μεταλλαγές στην κινήας τυροσίνης Btk των Β-λεμφοκυττάρων, παρόλ'αυτά επιτρέπουν ορισμένη υπολειπόμενη σηματοδότηση του υποδοχέα του Β-λεμφοκυττάρου, επιτρέποντας την επιβίωση ορισμένων Β-λεμφοκυττάρων και συνεπώς την υπολειπόμενη παραγωγή ανοσοσφαιρίνης. Γι'αυτό το λόγο και οι ασθενείς με XLA μπορούν ταυτοποιηθούν σε κοόρτες ασθενών με CVID <sup>43,44</sup>.

2) Βλάβες στην μεταστροφή τάξης (Class Switch Recombination, CSR), όπως αυτές που παρατηρούνται σε ασθενείς με υπερ-IgM σύνδρομο, θα οδηγήσουν επίσης σε μείωση των επιπέδων των IgG και IgA στον ορό <sup>45</sup>. Μεταξύ των βλαβών μεταστροφής τάξης και της CVID υφίσταται μια αξιοσημείωτη αλληλοεπικάλυψη. Για παράδειγμα ασθενείς με μεταλλάξεις στο ICOS έχουν ιστορικά καταταχθεί ως CVID, αλλά η έλλειψη ICOS στα Τ-λεμφοκύτταρα των ασθενών έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία μεταστροφής τάξης των ανοσοσφαιρινών των Β-κυττάρων και οι ασθενείς όταν

αρρωσταίνουν μπορούν και παράγουν σημαντικά ποσά IgM<sup>46</sup>. Γι' αυτό και η ανεπάρκεια ICOS μπορεί να καταταχθεί και ως βλάβη μεταστροφής τάξης. Πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο το 62,5% των ασθενών παρουσιάζει στην πραγματικότητα αυξημένα επίπεδα IgM.

3) Ασθενείς με φυλοσύνδετα λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα μπορεί επίσης να παρουσιάσουν υπογαμμασφαιριναιμία και να παρουσιάσουν φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν της CVID. Γι' αυτό και μεταλλάξεις στα SH2D1A και XIAP, ή ο προσδιορισμός των NK T κυττάρων μπορούν να αποκαλύψουν αυτή την υποκατηγορία ασθενών όταν υπάρχει σχετική υποψία<sup>47</sup>.

Στην κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια έχουν περιγραφεί πολλαπλές ανωμαλίες σχεδόν σε κάθε τμήμα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η κύρια εστίαση βρίσκεται στις ανωμαλίες των Β-λεμφοκυττάρων καθώς η κύρια βλάβη στην CVID έγκειται στην αδυναμία παραγωγής αντισωμάτων. Παρόλ' αυτά αξιόλογες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί και για το διαμέρισμα των Τ-λεμφοκυττάρων καθώς και πιο πρόσφατα στη φυσική ανοσία. Η ποικίλη και ευρεία κατανομή όλων αυτών των ανωμαλιών εξυπηρετεί περεταίρω στην επισήμανση της ετερογένειας που είναι παρούσα στην κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια καθώς και στην επισήμανση της πιθανότητας πολλοί παράγοντες να διαδραματίζουν ρόλο στην δημιουργία του φαινοτύπου. Παρόλο που αυτά τα ευρήματα μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου, είναι επίσης πιθανόν να αντιπροσωπεύουν και επιφαινόμενα, ως αποτέλεσμα της διαδικασίας της νόσου.

Οι περισσότερες από τις ανωμαλίες που έχουν περιγραφεί έχουν ταυτοποιηθεί σε κύτταρα του περιφερικού αίματος, ενώ περιορισμένες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλους ιστούς<sup>48</sup>.

## II.1. Κλινικές εκδηλώσεις της CVID

Οι οξείες και χρόνιες λοιμώξεις αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας των ασθενών με CVID, όπου πιο κοινές είναι οι λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού. Οι πιο κοινοί μικροοργανισμοί που απομονώνονται από αυτούς τους ασθενείς είναι οι *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* κ.α. ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζονται ασυνήθεις λοιμώξεις.

Οι ασθενείς με CVID παρουσιάζουν υψηλές συχνότητες γαστρεντερικής νόσου, με κυριότερη εκδήλωση την παροδική ή την εμμένουσα διάρροια, δεδομένου ότι η IgA διαδραματίζει μείζονα ρόλο στην άμυνα των βλεννογόνων. Οι αυτοάνοσες εκδηλώσεις είναι παρούσες στο 25-48% των ασθενών ανάλογα με τη χώρα προέλευσης με τις πιο κοινές από αυτές είναι οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες<sup>41</sup>.

Η κοκκιωματώδης φλεγμονή επηρεάζει το 8%-22% των ασθενών με CVID και μπορεί λανθασμένα να διαγνωσθεί ως σαρκοειδωση, με συνέπεια την καθυστερημένη ορθή διάγνωση. Συνήθως επηρεάζει τους πνεύμονες, τους λεμφαδένες, και τον σπλήνα αλλά μπορεί να παρατηρηθεί και σε πολλά άλλα όργανα συμπεριλαμβανομένου του συκωτιού, των παρώτιων αδένων, των μηνίγγων και του μυελού των οστών.

Ασθενείς με κοκκιωματώδη νόσο είναι περισσότερο ευαίσθητοι στην ανάπτυξη αυτοάνοσων φαινομένων. Χαρακτηριστικά 54% των ασθενών με κοκκιώματα είχαν και αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με κοκκιωματώδεις/ λεμφικές διάμεσες διηθήσεις μειώνεται συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν εμφανίζουν αυτές τις επιπλοκές με μέση επιβίωση 13,7 έτη και 28.8 έτη αντίστοιχα. Η αιτιολογία της κοκκιωματώδους νόσου παραμένει αδιευκρίνιστη, αν και πολυμορφισμοί στα γονίδια του TNF και της IL-10 έχουν συσχετισθεί με αυτή, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η τροποποίηση της ρύθμισης της φλεγμονώδους διαδικασίας μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεση<sup>49</sup>.

Η ολική επίπτωση της κακοήθειας είναι αυξημένη στην CVID παρόλο που ορισμένοι τύποι καρκίνου είναι σημαντικά συχνότεροι, όπως το γαστρικό καρκίνωμα και τα non-Hodgkin λεμφώματα, όπου ο κίνδυνος εμφάνισής τους είναι 7-16 και 12-18 φορές υψηλότερος αντίστοιχα, ανάλογα με τον υπό μελέτη πληθυσμό<sup>41</sup>.

Οι λόγοι για τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας στη CVID είναι πιθανόν να είναι πολυπαραγοντικοί<sup>50</sup>. Θα μπορούσαν να συμπεριλαμβάνουν μια περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της χρόνιας αντιγονικής διέγερσης από τις λοιμώξεις, των γενετικών ανωμαλιών και της απορρύθμισης του ανοσιακού συστήματος. Για παράδειγμα το Β-κυτταρικά σχετιζόμενο μόριο BAFF έχει δειχθεί ότι αυξάνεται κατά τη λοίμωξη καθώς και όταν οι NHL όγκοι γίνονται πιο επιθετικοί, γεγονός που συνδέει τους προαναφερθέντες παράγοντες μεταξύ τους<sup>41</sup>.

## II.2. IVIG και θνητότητα/λοιμώξεις

Η χορήγηση ανοσοσφαιρίνης ως θεραπεία υποκατάσταση για την αντισωματική ανεπάρκεια αποτελεί την κύρια θεραπεία επιλογής για την CVID. Παρόλο που τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές με εικονικά φάρμακα (placebo), δεν έχουν πραγματοποιηθεί ποτέ, έχει δειχθεί ότι η εν λόγω θεραπεία μειώνει τον ρυθμό των λοιμώξεων και τις μακροχρόνιες επιπλοκές τους<sup>51</sup>.

Η χορήγηση ανοσοσφαιρίνης μέσω ενδοφλέβιας και υποδόριας οδού φαίνεται να είναι εξίσου αποτελεσματική και ασφαλής<sup>52</sup>. Η παρούσα πρακτική για την υποκατάσταση ανοσοσφαιρίνης περιλαμβάνει αρχικά τη χορήγηση στο άτομο μηνιαίας δόσης 400 mg/kg και στη συνέχεια προβλέπει αύξηση της δοσολογίας μέχρι την επίτευξη ενός ελάχιστου επιπέδου-στόχου.



Επιπρόσθετα αξίζει να αξιολογηθεί η δυνατότητα θεραπείας υποκατάστασης με IgA/IgM επιπρόσθετα της IgG ως νέα στρατηγική θεραπείας, καθώς τα χαμηλά επίπεδα αυτών των ανοσοσφαιρινών έχουν σχετισθεί με μεγαλύτερη ευαισθησία στις λοιμώξεις<sup>41</sup>.

Για τις σοβαρές λοιμώξεις υιοθετείται η επιθετική προσέγγιση θεραπείας με αντιβιοτικά προκειμένου να αποφευχθούν οι χρόνιες επιπλοκές των λοιμώξεων.

### **II.3. Πρόγνωση και επιβίωση**

Η θνησιμότητα στη COVID είναι αυξημένη συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό παρόλο που τα πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι έχει επιτευχθεί αύξηση του προσδόκιμου ζωής.

Ανάλυση δεδομένων φέρνει στην επιφάνεια επιπλέον πληροφορίες. Ορισμένοι κλινικοί φαινότυποι (αυτοανοσία, λεμφοϋπερπλασία, εντεροπάθεια, λεμφική κακοήθεια), συσχετίστηκαν με μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου συγκριτικά με ασθενείς που είχαν μόνο υποτροπιάζουσες και χρόνιες λοιμώξεις. Η βρογχεκτασία έχει επίσης σχετισθεί με χειρότερη έκβαση για τον ασθενή<sup>41</sup>.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## IV. Ερευνητική Υπόθεση

Το ανοσιακό σύστημα ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες, αδυνατεί να εξαλείψει αποτελεσματικά εξωγενή αντιγόνα και έχει ως αποτέλεσμα μία χρόνια φλεγμονώδη απάντηση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ιστική βλάβη και εν τέλει στην εκδήλωση και άλλων διαταραχών όπως η αυτοανοσία και τα κακοήθη νοσήματα, λόγω της επακόλουθης δυσλειτουργίας ανοσορρυθμιστικών μηχανισμών<sup>53</sup>. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη των πρωτοπαθών αντισωματικών ανεπάρκειών και ιδιαίτερα της CVID η οποία αποτελεί την πιο συχνή από αυτές.

Στο φαινότυπο της CVID έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται ένας αριθμός ανοσιακών βλαβών με την κύρια φαινοτυπική βλάβη να αντανακλάται σε μια αποτυχία διαφοροποίησης των πρώιμων και όψιμων Β-κυττάρων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκκριση ανοσοσφαιρινών οποιουδήποτε ισοτύπου (εξού και ο όρος δυσγαμμασφαιριναιμία). Τα Β-κύτταρα των ασθενών με CVID χαρακτηρίζονται από ελαττωματική ανοδική ρύθμιση δεικτών ενεργοποίησης και βλάβες στις σωματικές υπερμεταλλάξεις, οδηγώντας κατεπέκταση στη παραγωγή αντισωμάτων με μειωμένη ή μηδαμινή συγγένεια για το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους<sup>54</sup>.

Εν τούτοις, ισχυρές ενδείξεις γενετικής αιτιολογίας δεν έχουν προκύψει παρά μόνο για το 10% περίπου των περιπτώσεων. Αυτές αφορούν κυρίως σε γονίδια που σχετίζονται με τα Β-λεμφοκύτταρα, όπως για παράδειγμα τα γονίδια των BAFRR και TACI<sup>53-57</sup>. Σημαντικές επιπτώσεις στον κλινικό φαινότυπο της CVID φαίνεται, επίσης, να έχει η συνύπαρξη βλαβών σε ανοσογονίδια που δεν σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων και με την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών, όπως του γονιδίου της συνδεδεμένης με τη μαννόζη λεκτίνης (mannose binding lectin, MBL)<sup>58</sup>. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η κλινική έκφραση της CVID ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα συρροής ανοσογενετικών βλαβών ή και περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν, άμεσα ή έμμεσα, την παραγωγή της IgG και, επί πλέον, συμβάλλουν, ακόμη και ανεξάρτητα από το βαθμό της αντισωματικής ανεπάρκειας, στη διαμόρφωση του κλινικού φαινοτύπου της νόσου (Germenis και Speletas, δημοσίευτα αποτελέσματα). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, οι ανοσογενετικές βλάβες που εμπλέκονται σε μια τέτοια διεργασία δεν είναι από μόνες τους ικανές να προκαλέσουν έκδηλη αντισωματική ανεπάρκεια ή να οδηγήσουν στην κλινική έκφραση ανοσοανεπάρκειας, επειδή οι μεμονωμένες

συνέπειες κάθε μιας από αυτές εξουδετερώνονται από τους αντιρροπιστικούς μηχανισμούς του ανοσιακού συστήματος<sup>59</sup>.

Η παραγωγή της IgM και η ισοτυπική μεταστροφή σε IgA και IgD επάγονται από τη δράση των μορίων BAFF και APRIL μέσω ενός μονοπατιού που είναι ανεξάρτητο από τη δράση του CD40L, άρα και από τη δράση των T-λεμφοκυττάρων. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε την ομάδα των Cerutti και συν. στη διατύπωση της υπόθεσης ότι αυτό το μονοπάτι μπορεί να εμπλέκεται με την επαγωγή των B-λεμφοκυτταρικών απαντήσεων σε συμβιωτικά βακτήρια των βλεννογόνων, από αντιγονοπαρουσιαστικά DCs, καθώς και από άλλα κύτταρα της φυσικής ανοσίας<sup>60</sup>. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από μελέτες που έχουν δείξει την παραγωγή των μορίων BAFF<sup>12</sup> και APRIL<sup>61</sup> από ουδετερόφιλα. Πρόσφατα μελέτες έδειξαν ότι τα ουδετερόφιλα μπορούν και εποικίζουν την οριακή ζώνη του σπλήνα ως απόκριση σε βακτηριακά ερεθίσματα, αλλά και περιοχές περιφερειακά της οριακής ζώνης μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου της φλεγμονώδους απάντησης. Στην οριακή ζώνη του σπλήνα λαμβάνουν χώρα αντισωματικές απαντήσεις που δεν απαιτούν αντίδραση βλαστικού κέντρου η οποία εξαρτάται από τη δράση των T-λεμφοκυττάρων. Η οριακή ζώνη του σπλήνα αποτελεί περιοχή η οποία παρεμβάλλεται της περιφέρειας και του ανοσιακού συστήματος και σε αυτή είναι κυρίαρχη η παρουσία B-λεμφοκυττάρων, τα οποία διαφέρουν από αυτά που προκύπτουν από την κανονική αντίδραση βλαστικού κέντρου, καθώς εκφράζουν στην επιφάνειά τους IgM και CD27 αλλά όχι IgD<sup>13</sup>.

Στην εν λόγω μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα ουδετερόφιλα της περιοχής αυτής διαφέρουν φαινοτυπικά από τα ουδετερόφιλα της περιφέρειας και έχουν την ικανότητα να επάγουν την μεταστροφή τάξης των ανοσοσφαιρινών, τις σωματικές υπερμεταλλάξεις και εν τέλει την παραγωγή των αντισωμάτων ενεργοποιώντας τα B-λεμφοκύτταρα της περιοχής αυτής. Η αλληλεπίδραση αυτή παρατηρήθηκε ότι λαμβάνει χώρα μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τον σχηματισμό εξωκυττάρων ουδετεροφιλικών δικτύων χρωματίνης (NETs) και τη δράση των μορίων BAFF, APRIL και της κυτταροκίνης IL-21. Για το λόγο αυτό τα ουδετερόφιλα αυτά πήραν την ονομασία «B-cell Helper Neutrophils». Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι τα ουδετερόφιλα της περιφέρειας μπορούν και αποκτούν τις ιδιότητες των προαναφερθέντων, μετά από αλληλεπίδρασή τους με κύτταρα του ενδοθηλίου του σπλήνα (SECs). Τα ουδετερόφιλα αυτά όταν ενεργοποιηθούν από μικροβιακά σήματα εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως η IL-10, μέσω ενός μονοπατιού που εξαρτάται από το STAT3<sup>13</sup>.

Οι STATs αποτελούν μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, των οποίων η έκφραση επάγεται μετά από την επίδραση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και ορμονών, διαδραματίζοντας ρυθμιστικό ρόλο σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες. Επιπρόσθετα από τη σημαντική φυσιολογική τους δράση, έχει διαπιστωθεί ότι εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία διάφορων κακοηθειών. Σε πειράματα που έχουν γίνει στο εργαστήριό μας έχει δειχθεί η

ενεργοποίηση του STAT5 σε κύτταρα ασθενών που πάσχουν από χρόνια Β-λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Β-ΧΛΛ) και μάλιστα διαπιστώθηκε η ενεργοποίησή του σε μη κακοήθη κύτταρα της μυελικής σειράς και συγκεκριμένα στα ουδετερόφιλα. Το εύρημα αυτό οδήγησε στη διατύπωση της υπόθεσης ότι μετά από κάποιο ερέθισμα τα ουδετερόφιλα αλληλεπιδρούν με τα κακοήθη Β-λεμφοκύτταρα, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει πιθανά την ενεργοποίηση του STAT5, συμβάλλοντας στην παθολογία των λεμφοκυττάρων<sup>62</sup>. Η υπόθεση αυτή χρήζει διερεύνησης.

## **V. ΣΚΟΠΟΣ**

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η κατ'αρχήν διερεύνηση του ρόλου των ουδετεροφίλων στην φαινοτυπική έκφραση της CVID. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν να μελετηθούν το φαινόμενο της NETosis σε ουδετερόφιλα της περιφέρειας, ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες, θεωρώντας τα NETs ως πιθανά μέσα γεφύρωσης της φυσικής ανοσίας με τα Β-λεμφοκύτταρα.

Σε δεύτερο επίπεδο, για τον ίδιο σκοπό, διερευνώνται επιπέδων ενεργοποίησης του STAT5 σε ουδετερόφιλα ασθενών με CVID και την ικανότητα ενεργοποίησής του, μετά από επίδραση με ορό ασθενών με Β-ΧΛΛ, υποθέτοντας ότι ο ορός αυτός εμπεριέχει τα διεγερτικά μόρια-σήματα που επάγουν το φαινόμενο στα κύτταρα των ασθενών με Β-ΧΛΛ.

## VI. ΥΛΙΚΟ

### VI.1. Ασθενείς και μάρτυρες

Χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα από ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας υποκατάστασης, ασθενών με λοιμώξεις ποικίλης αιτιολογίας καθώς και υγιών μαρτύρων. Υλικό από ορισμένους δότες ασθενείς και υγιείς, υπεβλήθη σε χειρισμό παραπάνω από μία φορές, σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Ο αριθμός των ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμασιών που πραγματοποιήθηκαν περιγράφεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Στον πίνακα 1, παρατίθενται τα στοιχεία των ασθενών.

#### VI.1.1. Ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες χωρίς θεραπεία υποκατάστασης με IVIG

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος 4 ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες. Τα δείγματα προήλθαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ο χειρισμός του υλικού πραγματοποιήθηκε στη φάση της διάγνωσης, συνεπώς δεν βρίσκονταν υπό θεραπεία υποκατάστασης. Το κριτήριο για να μελετηθούν οι ασθενείς ήταν τα χαμηλά επίπεδα της IgG ή/και της IgA και IgM στον ορό. Στη συνέχεια παρατίθενται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των ασθενών.

Ο ασθενής (1) διεγνώσθη με CVID. Η διάγνωση της CVID έγινε βάση των τυπικών κριτηρίων. Συγκεκριμένα παρουσίασε χαμηλά επίπεδα IgG στον ορό καθώς και πλήρη απουσία των IgM και IgA ανοσοσφαιρινών. Μετά από αποκλεισμό άλλων αιτιών αντισωματικής ανεπάρκειας, επιβεβαιώθηκε η CVID με τη διαπίστωση αδυναμίας ειδικής αντισωματικής απάντησης μετά από εμβολιασμό.

Η ασθενής (2) είχε αδιευκρίνιστη ανοσοανεπάρκεια γιατί ενώ παρουσίασε χαμηλά επίπεδα IgG και IgM καθώς και πλήρη απουσία IgA στον ορό, οι ειδικές αντισωματικές απαντήσεις ήταν παρούσες.

Η ασθενής (3) διαγνώσθηκε αρχικά με υπογαμμασφαιριναιμία και κοκκιωματώδη φλεγμονή. Η τελική διάγνωση ήταν σαρκοείδωση.

Ο ασθενής (4) διεγνώσθη με εκλεκτική IgA ανεπάρκεια (sIgAD).

## **VI.1.2. Ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες σε θεραπεία υποκατάστασης με IVIG/SCIG.**

Το υλικό της μελέτης ήταν ολικό περιφερικό αίμα 6 ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες, σε θεραπεία υποκατάστασης με IVIG/SCIG. Τα δείγματα προήλθαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κριτήρια αποκλεισμού για την επιλογή των ασθενών ήταν η λήψη κορτικοστεροειδών καθώς και η χημειοθεραπεία.

Ειδικά μελετήθηκαν 4 ασθενείς με CVID (5,6α,6β,7,8). Η διάγνωση της CVID πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα τυπικά κριτήρια, ενώ η επιλογή των ασθενών για την μελέτη έγινε ανεξάρτητα των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου. Επιπρόσθετα μελετήθηκαν δύο ασθενείς (2',3'), με αντισωματικές ανεπάρκειες μετά από θεραπεία υποκατάστασης, οι οποίοι αξιολογήθηκαν και πριν τη λήψη της θεραπείας. Συγκεκριμένα η μία ασθενής έπασχε από αντισωματική ανεπάρκεια αδιευκρίνιστης αιτιολογίας (2'), ενώ η δεύτερη από σαρκοείδωση (3').

## **VI.1.3. Ασθενείς με λοιμώξεις**

Στην μελέτη εντάχθηκαν 3 ασθενείς με λοιμώξεις. Από αυτούς οι δύο έπασχαν από λοιμώξεις του αναπνευστικού (9,10) ενώ η άλλη ασθενής αξιολογήθηκε σε φάση ιογενών λοιμώξεων (11). Το υλικό των ασθενών με πνευμονία, παραχωρήθηκε από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, ενώ το υλικό της ασθενούς με ιογενείς λοιμώξεις προήλθε από το Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ειδικά, οι λοιμώξεις του αναπνευστικού ήταν βακτηριακής αιτιολογίας. Ο ένας ασθενής διεγνώσθη με λοίμωξη από *Pseudomonas aeruginosa* σε έδαφος χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, ενώ στην άλλη περίπτωση πνευμονίας δεν ταυτοποιήθηκε ο παθογόνος μικροοργανισμός και η ασθενής είχε ιστορικό άσθματος.

Στην περίπτωση αξιολόγησης των ιογενών λοιμώξεων, δεν υπάρχει γνωστό ιστορικό άλλων νοσημάτων.

# ΠΙΝΑΚΑΣ 1

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ										
n	Ηλικία	Φύλο	WBC (/ul)	NEUTROPHILS (/ul)	LYMPHOCYTES (/ul)	MONOCYTES (/ul)	CRP(mg/ml)	IgG(mg/ml)	IgM(mg/ml)	IgA(mg/ml)
1α	28	A	12300	9889	1697	246	2,3	225	0	0
1β	28	A	NA	NA	NA	NA	0,4	113	0	0
2	55	Θ	3700	2400	1000	200	1,6	316	21,8	0
3	32	Θ	6700	4147	1835	429	2,1	671	166	33,9
4	32	A	6600	3730	2240	360	0,2	1550	46,3	0

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΥΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ										
n	Ηλικία	Φύλο	WBC (/ul)	NEUTROPHILS (/ul)	LYMPHOCYTES (/ul)	MONOCYTES (/ul)	CRP(mg/ml)	IgG(mg/ml)	IgM(mg/ml)	IgA(mg/ml)
5	35	Θ	6400	3800	2100	400	0	1140	22	0
6α	38	Θ	6300	2900	3100	400	0,2	2190	26,2	0
6β	38	Θ	8100	4500	3300	300	0,5	1300	29	0
7	64	Θ	5200	2400	2000	600	0,4	902	146	28,8
8	47	A	4400	2520	1240	560	0,3	916	84,6	0
2'	55	Θ	4600	3150	1020	360	0,2	624	21,4	0
3'	32	Θ	NA	NA	NA	NA	0,3	664	143	32

ΑΝΟΣΟΕΠΑΡΚΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ										
n	Ηλικία	Φύλο	WBC (/ul)	NEUTROPHILS (/ul)	LYMPHOCYTES (/ul)	MONOCYTES (/ul)	CRP(mg/ml)	IgG(mg/ml)	IgM(mg/ml)	IgA(mg/ml)
9	82	Θ	7300	4900	1300	500	5,4	NA	NA	NA
10	47	A	28100	24970	830	2230	3,2	1330	131	350
11	25	Θ	4700	2928	1213	324	0,3	1310	158	170

**Πίνακας 1:** Δημογραφικά στοιχεία ασθενών. n: αύξων αριθμός ασθενούς, Θ: θήλυ, A: άρρεν, WBC: λευκά αιμοσφαίρια, NEUTROPHILS: ουδετερόφιλα, LYMPHOCYTES: λεμφοκύτταρα, MONOCYTES: μονοκύτταρα, CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, IgG, IgM, IgA: συγκεντρώσεις ανοσοσφαιρινών στον ορό. Κάθε αριθμός (n), αντιστοιχεί σε έναν ασθενή. Οι ασθενείς 1(α+β) και 6(α+β) αξιολογήθηκαν δύο φορές. Οι ασθενείς 2 και 3 αξιολογήθηκαν και μετά τη λήψη θεραπείας υποκατάστασης (2' και 3').

#### VI.1.4. Υλικό μελέτης p-STAT5

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε κατά την αξιολόγηση των επιπέδων του p-STAT5, ήταν ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων σε ολικό περιφερικό αίμα και ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων τα οποία είχαν απομονωθεί από ολικό περιφερικό αίμα σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Αξιολογήθηκε υλικό από δύο υγιείς μάρτυρες.

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν επίσης ουδετερόφιλα ενός ασθενούς που έπασχε από CVID, στον οποίο δεν είχε χορηγηθεί θεραπεία υποκατάστασης και μιας ασθενούς με CVID η οποία λάμβανε θεραπεία με IVIG. Από το υλικό των ασθενών αυτών, μελετήθηκαν τα ουδετερόφιλα και μετά από απομόνωσή τους.

Τέλος αξιολογήθηκαν και ουδετερόφιλα της περιφέρειας, ασθενούς που έπασχε από Β-ΧΛΛ σε συνθήκες ολικού αίματος.

#### VI.1.5. Υγιείς μάρτυρες

Απομονώθηκε ολικό περιφερικό αίμα από 7 υγιείς μάρτυρες (4 άνδρες/3 γυναίκες). Η επιλογή των μαρτύρων έγινε ανεξαρτήτως αντιστοιχίας φύλου και ηλικίας με τους ασθενείς, ενώ ως κριτήρια αποκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν οι πρόσφατες λοιμώξεις, η λήψη κορτικοστεροειδών και λοιπών φαρμάκων. Η λήψη του υλικού πραγματοποιήθηκε με συγκατάθεση των δωτών.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα δημογραφικά στοιχεία των υγιών μαρτύρων.

<b>Φυσιολογικοί Μάρτυρες</b>	
Αριθμός	7
Ηλικία (έτη) (Διάμεση Τιμή, Εύρος)	33, 25-67
Άνδρες/Γυναίκες	3/4
Λευκά (/ul) (Διάμεση Τιμή, Εύρος)	7600, 4500-8400
Ουδετερόφιλα (/ul)(Διάμεση Τιμή, Εύρος)	4300, 2500-5700
CRP (mg/ml) (Διάμεση Τιμή, Εύρος)	0,3, 0-0,3
IgG (mg/ml) (Διάμεση Τιμή, Εύρος)	1290, 887-1440
IgM (mg/ml) (Διάμεση Τιμή, Εύρος)	98,85 64,6-158
IgA (mg/ml) (Διάμεση Τιμή, Εύρος)	179,5, 150-337

**Πίνακας 2: Δημογραφικά στοιχεία φυσιολογικών μαρτύρων**



## **VII. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

### **VII.1. Προσδιορισμός αριθμού λευκοκυττάρων**

Μετά από τη λήψη όγκου αίματος σε σωληνάρια με αντιπηκτικό K<sub>3</sub>EDTA, πραγματοποιήθηκε γενική αιματολογική εξέταση και στα πλαίσια αυτής προσδιορισμός του αριθμού των λευκοκυττάρων και των ουδετεροφίλων, μέσω αυτόματου αιματολογικού αναλυτή (Coulter).

### **VII.2.Ορολογικός έλεγχος**

Μετά από λήψη όγκου αίματος, σε ειδικά σωληνάρια με μεμβράνη τύπου γέλης, για απομόνωση ορού, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του υλικού με ταχύτητα 3000 στροφών/λεπτό για 5 λεπτά. Έγινε αναρρόφηση του υπερκείμενου διαλύματος (ορός) και αφού τοποθετήθηκε σε πωματισμένα πλαστικά σωληνάρια (ependorf tubes), αποθηκεύτηκε άμεσα σε καταψύκτη θερμοκρασίας -80°C, μέχρι να πραγματοποιηθεί ο χειρισμός του υλικού. Η ορολογική ανάλυση και συγκεκριμένα ο ποσοτικός προσδιορισμός της CRP και των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών IgG, IgM και IgA σε ορό ασθενών και υγιών μαρτύρων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

### **VII.3.Μελέτη του *in vitro* σχηματισμού των NETs**

Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την μελέτη των NETs αφορούσε στον *in vitro* σχηματισμό τους και περιελάμβανε τα εξής βασικά στάδια: 1) Απομόνωση ουδετεροφίλων από ολικό περιφερικό αίμα, 2) καλλιέργεια ουδετεροφίλων, 3) δημιουργία παρασκευασμάτων για μικροσκοπική παρατήρηση με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, 4) μικροσκοπική παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού και ποσοτικοποίηση του φαινομένου<sup>63</sup>.

#### **VII.3.1. Απομόνωση ουδετεροφίλων από ολικό περιφερικό αίμα.**

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

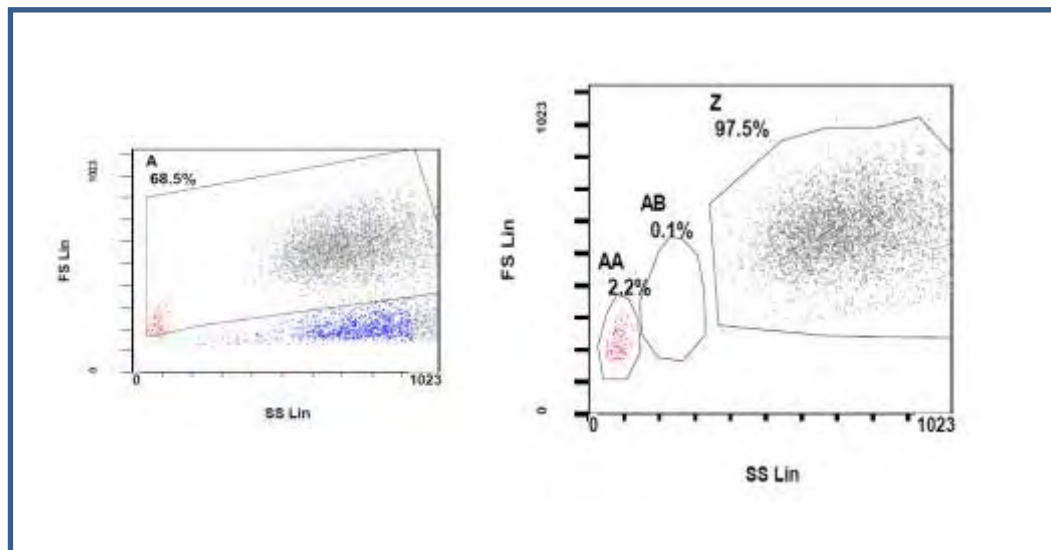
Αρχικά πραγματοποιείται λήψη 2 ml περιφερικού αίματος μέσω φλεβοτομής, με ηπαρηνισμένη σύριγγα. Ο όγκος αυτός αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X) μέχρι τελικού όγκου 6 ml. Σε falcon tube τοποθετούνται 3 ml φικόλης πυκνότητας 1,119 mg/ml (Histopaque 1119 – Sigma) και στη συνέχεια επιστοιβάζονται 3 ml φικόλης πυκνότητας 1,077 mg/ml (Biochrom Biocoll Separating Solution), με τέτοιο τρόπο ώστε να μην αναμειχθούν τα δύο διαλύματα. Τέλος επιστοιβάζονται 6 ml αραιωμένου αίματος. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται με τέτοια ταχύτητα έτσι ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο, η διάχυση μεταξύ των διαλυμάτων. Μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος για 30 λεπτά, με ταχύτητα 2000 στροφές/λεπτό, επιτυγχάνεται διαχωρισμός των έμμορφων συστατικών του αίματος με βάση την πυκνότητά τους, χάρη στη διαφορετική ταχύτητα καθίζησης που αναπτύσσουν κατά τη διαδικασία της φυγοκέντρησης και λόγω οσμωτικών φαινομένων. Συγκεκριμένα, με το πέρας της φυγοκέντρησης το υλικό έχει διαχωριστεί στις εξής διακριτές φάσεις: Η ανώτερη φάση αποτελεί το πλάσμα του αίματος, το οποίο είναι εμπλουτισμένο με αιμοπετάλια. Ακολουθεί η κυτταρική στιβάδα των μονοπύρηνων λευκοκυττάρων, η φάση διαλύματος φικόλης πυκνότητας 1,077 mg/ml και η κυτταρική στιβάδα των πολυμορφοπύρηνων ουδετεροφίλων. Τέλος της στοιβάδας των ουδετεροφίλων υπόκειται το διάλυμα φικόλης πυκνότητας 1,119 mg/ml και τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Μετά από απόρριψη των υπερκείμενων φάσεων μέσω αναρρόφησης με πιπέτα Pasteur, λαμβάνεται με τον ίδιο τρόπο η επιθυμητή στοιβάδα των ουδετεροφίλων, η οποία τοποθετείται σε νέο falcon tube, με στόχο την πλύση των κυττάρων για την απομάκρυνση υπολειμμάτων διαλύματος φικόλης. Η πλύση πραγματοποιείται μετά από προσθήκη 10 ml PBS (1X), και φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων για 10 λεπτά, με ταχύτητα 1400 στροφών/λεπτό. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η λήψη ιζήματος ουδετεροφίλων το οποίο μετά από απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, επαναδιαλύεται σε θρεπτικό υλικό Iscove Basal Medium (Biochrom) για περαιτέρω πειραματική μεταχείριση.

### **VII.3.2. Εκτίμηση καθαρότητας απομονωμένου κυτταρικού πληθυσμού και βιωσιμότητας κυττάρων**

Προκειμένου να εκτιμηθεί η καθαρότητα του απομονωμένου κυτταρικού πληθυσμού, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρική αξιολόγηση και συγκεκριμένα ταυτοποίηση των κυτταρικών τύπων με κριτήριο το μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων. Σε όλες τις διαδικασίες

απομόνωσης των ουδετεροφίλων που πραγματοποιήθηκαν η καθαρότητα του πληθυσμού ήταν μεγαλύτερη από 95% (> 95%). (Εικόνα 1)



**Εικόνα 1:** Κυτταρομετρική αξιολόγηση καθαρότητας πληθυσμού, απομονωμένων ουδετεροφίλων. Τα ουδετερόφιλα (Z), εμφανίζουν μεγαλύτερο μέγεθος και κοκκίωση από τα μονοκύτταρα (AB) και από τα λεμφοκύτταρα (AA). Τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 97,5% του πληθυσμού.

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

#### VII.4. Καλλιέργεια ουδετεροφίλων

Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την μελέτη του *in vitro* σχηματισμού των NET περιελάμβανε την καλλιέργεια απομονωμένων ουδετεροφίλων, παρουσία και απουσία PMA (Phorbol Myristate Acetate- Sigma), μόριο που είναι γνωστό ότι επάγει τη NETosis. Σε κάθε καλλιεργητική συνθήκη, τοποθετήθηκαν  $\sim 2 \times 10^5$  ουδετερόφιλα, σε τελικό όγκο 500  $\mu$ L. Η διάρκεια της καλλιέργειας ήταν τρεις ώρες και πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και παροχής CO<sub>2</sub> (5%).

Αναλυτικότερα, σε καλλιεργητικές πλάκες 24 βοθρίων (24-well plates, Corning) τοποθετήθηκαν γυάλινες στρογγυλές καλυπτρίδες (Poly-L-Lysine Coated Round Coverslips 12mm– BD Biosciences), με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να έρχονται σε πλήρη επαφή με την επιφάνεια του

πυθμένα. Οι καλυπτρίδες ήταν καλυμμένες με poly-L-Lysine ούτως ώστε να διευκολυνθεί η προσκόλληση των κυττάρων σε αυτές.

Σε κάθε βοθρίο έγινε προσθήκη 400  $\mu\text{L}$  διαλύματος θρεπτικού υλικού (Iscove Basal Medium, Biochrom) και 30  $\mu\text{L}$  ανθρώπινου φυσιολογικού ορού (NHS) (η περιεκτικότητα του ορού στον τελικό όγκο ανά βοθρίο ήταν 6%  $\text{V}/\text{V}$ ). Στη συνέχεια τοποθετήθηκε η πλάκα στους 37°C για να προσεγγίσει την επιθυμητή θερμοκρασία της καλλιέργειας

Εν τω μεταξύ με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των απομονωμένων ουδετεροφίλων, μετά από την ανασύσταση του κυτταρικού ιζήματος σε θρεπτικό υλικό. Σε κάθε βοθρίο προστέθηκαν 100  $\mu\text{l}$  κυτταρικού εναιωρήματος, όγκο στον οποίο περιέχονταν  $\sim 2 \times 10^5$  ουδετερόφιλα και η πλάκα τοποθετήθηκε στον κλίβανο για 20 λεπτά, έτσι ώστε να επιτραπεί η επικάθηση και η προσκόλληση των κυττάρων στις καλυπτρίδες.

#### **VII.4.1. Επίδραση με PMA**

Για την παρασκευή διαλύματος PMA (Sigma), παρασκευάστηκε διάλυμα περιεκτικότητας 1%  $\text{V}/\text{V}$  (1 $\mu\text{L}$  PMA σε 99  $\mu\text{L}$  PBS), από αρχικό διάλυμα περιεκτικότητας 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{w}/\text{v}$ . Από αυτό προστέθηκαν 3 $\mu\text{L}$  σε κάθε βοθρίο στο οποίο θέλαμε να επάγουμε τη NETosis, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του PMA να είναι 100 nM. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετήθηκε στον κλίβανο για τρεις ώρες.

#### **VII.4.2. Επίδραση IVIG**

Για την αξιολόγηση της δράσης της IVIG στην επίδραση του PMA στην επαγωγή της NETosis, ακολουθήθηκαν οι ίδιες συνθήκες καλλιέργειας, με τη διαφορά ότι στον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος της καλλιέργειας προστέθηκε το σκεύασμα της IVIG (Privigen, CSL Behring) σε διαβάθμιση συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε η προσέγγιση της μελέτης της επίδρασης του φαρμάκου όταν αυτό προστίθεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις οι οποίες ήταν: 5  $\text{mg}/\text{ml}$ , 10  $\text{mg}/\text{ml}$  (θεραπευτική συγκέντρωση) και 20  $\text{mg}/\text{ml}$ .

## **VII.5. Παρασκευή παρασκευασμάτων για μικροσκοπική παρατήρηση**

### **VII.5.1. Στερέωση**

Από αρχικό διάλυμα φορμαλδεΐδης περιεκτικότητας 40% παρασκευάσαμε διάλυμα φορμαλδεΐδης 8%, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη νερό (water for injection). Μετά την παρασκευή του, το διάλυμα τοποθετήθηκε στους 4 °C για 30 min πριν ολοκληρωθεί ο χρόνος της καλλιέργειας. Σε κάθε βοθρίο προσθέσαμε 500 μL διαλύματος έτσι ώστε η τελική περιεκτικότητα να είναι 4%. Η διάρκεια της στερέωσης ήταν 1 ώρα και πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C. Με το πέρας της διαδικασίας της στερέωσης, πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση του διαλύματος από κάθε βοθρίο και με τη βοήθεια ειδικής λαβίδας με λεπτά και κυρτά άκρα έγινε λήψη των καλυπτρίδων, προκειμένου να υποβληθούν σε διαδικασία πλύσεων και μετέπειτα στη δοκιμασία ανοσοφθορισμού. Εναλλακτικά, οι καλυπτρίδες αφέθηκαν στην καλλιεργητική πλάκα, σε διάλυμα PBS για φύλαξη (“overnight”) και η δοκιμασία ανοσοφθορισμού έλαβε χώρα την επόμενη μέρα.

### **VII.5.2.Ανοσοφθορισμός**

Η δοκιμασία του ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε με διαδοχική μεταφορά των καλυπτρίδων στην επιφάνεια διαλυμάτων της επιθυμητής σύστασης, όγκου 150 μL και όλα τα στάδια πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε κατασκευή από “στατώ για DB Falcon tubes”, στα οποία είχε προσαρμοστεί ειδική υδρόφοβη ταινία (parafilm), με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να σχηματίζονται βοθρία, εντός των οποίων όταν τοποθετήθηκαν τα διαλύματα, σχημάτιζαν «σταγόνες». Στις σταγόνες αυτές μπορούσαν να τοποθετηθούν οι καλυπτρίδες, χωρίς να βυθιστούν, χάρη στην υπάρχουσα επιφανειακή τάση, με τέτοιο προσανατολισμό έτσι ώστε η επιφάνεια στην οποία είχαν επιστρωθεί τα ουδετερόφιλα να έρχεται σε επαφή με τα διαλύματα.

#### ***VII.5.2α. Εκχύλιση με απορρυπαντικά***

Με το πέρας της διαδικασίας της στερέωσης πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις ανά πέντε λεπτά με PBS, για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φορμαλδεΐδης. Η εκχύλιση με απορρυπαντικά είναι μία διαδικασία που αποσκοπεί στην διαπερατοποίηση των μεμβρανών των κυττάρων για να

διευκολυνθεί η είσοδος των αντισωμάτων σε αυτά. Το απορρυπαντικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Triton X-100 (Sigma) σε περιεκτικότητα 1%  $V/V$  σε PBS. Η διαδικασία αυτή διήρκησε 1 λεπτό και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις ανά 5 λεπτά με PBS, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του απορρυπαντικού.

### ***VII.5.2β. Blocking.***

Για την απομάκρυνση μορίων που εμφανίζουν αυτοφθορισμό και για την αποτροπή της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε επώαση με διάλυμα «blocking» και συγκεκριμένα με BSA (Bovine Serum Albumin- BioLabs) σε περιεκτικότητα 1%  $V/V$  σε PBS. Η επώαση με το διάλυμα «blocking», διήρκησε 30 λεπτά και με το πέρας αυτής έγινε απευθείας μετάβαση στο στάδιο χρώσης με αντισώματα χωρίς να παρεμβληθούν πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα.

### ***VII.5.2γ. Χρώση με αντισώματα***

Το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν rabbit, anti-human NE (Santa Cruz), με ειδικότητα σύνδεσης έναντι της ανθρώπινης ουδετεροφιλικής ελαστάσης και χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία περιεκτικότητας 1:200 σε διάλυμα «blocking». Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα διήρκησε 2 ώρες, σε συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος και με το πέρας αυτής πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με PBS ανά 5 λεπτά, πριν γίνει η μετάβαση στη διαδικασία της επώασης με το δεύτερο αντίσωμα, για την απομάκρυνση της περισσειάς του.

Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είχε ειδικότητα σύνδεσης έναντι του πρώτου και ήταν συζευγμένο με φθοριόχρωμα με φάσμα εκπομπής ακτινοβολίας μήκους κύματος 488 nm (πράσινο χρώμα). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το Alexa Fluor 488, goat- anti- rabbit IgG (H+L) (Molecular Probes A). Χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία περιεκτικότητας 1:300 σε διάλυμα «blocking», ενώ ο χρόνος επώασης ήταν 1,5 ώρα (90 λεπτά), σε συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Με το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με PBS ανά 5 λεπτά για απομάκρυνση της περισσειας του αντισώματος.

### **VII.5.3. Χρώση DNA**

Μετά τη χρώση με αντισώματα, πραγματοποιήθηκε χρώση του DNA των ουδετεροφίλων με τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (DAPI, Sigma), συγκέντρωσης 300 nM. Ο χρόνος επώασης με τη χρωστική ήταν 2,5 λεπτά.

Για την παρασκευή της χρωστικής πραγματοποιήθηκε ανασύσταση 10 mg της σκόνης DAPI του αρχικού σκευάσματος, σε 1 mL απεσταγμένου νερού. Από αυτό παρασκευάστηκε ενδιάμεσο διάλυμα όγκου  $V_2=100 \mu\text{L}$ , από αρχικό όγκο  $V_1=10\mu\text{L}$  χρησιμοποιώντας ως διαλύτη PBS (περιεκτικότητα διαλύματος:  $10\% \text{ V/V}$ ). Για την παρασκευή του τελικού διαλύματος, διαλύθηκαν  $1,03 \mu\text{L}$  του ενδιάμεσου διαλύματος σε 10 mL PBS, έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση της χρωστικής ίση με 300 nM. Κάθε διάλυμα παρασκευάστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες περιτυλιγμένους με αλουμινόχαρτο, καθώς η χρωστική είναι φωτοευαίσθητη. Σε κάθε στάδιο διάλυσης, πραγματοποιήθηκε ισχυρή ανάδευση με αναδευτήρα (vortex) και κάθε διάλυμα φυλάχθηκε σε θερμοκρασία  $4^\circ\text{C}$ .

Με το πέρας της χρώσης του DNA, πραγματοποιήθηκε πλύση των καλυπτρίδων για 20 δευτερόλεπτα με απεσταγμένο νερό, για απομάκρυνση περίσσειας της χρωστικής και τέλος έγινε αποστράγγισή τους με διηθητικό χαρτί.

#### **VII.5.4. Κάλυψη κυττάρων**

Σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήθηκαν από 5  $\mu\text{L}$  υγρού κάλυψης (Mowiol), για κάθε καλυπτρίδα. Σε αυτές αποτέθηκαν οι καλυπτρίδες κατά τέτοιο τρόπο ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του επιστρωμένου υλικού. Μετέπειτα το παρασκεύασμα αφέθηκε να στεγνώσει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό χώρο.

Για την παρασκευή του διαλύματος Mowiol χρησιμοποιήθηκαν 2,4 gr Mowiol 4-88 (Sigma), 6 gr γλυκερόλης (Sigma), 6 mL δισαπεσταγμένου νερού (Water For Injections-WFI) και 12 ml 0,2 M Tris-HCL pH=8,5. Η διάλυση των συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα και θέρμανσης του διαλύματος σε υδατόλουτρο  $55^\circ\text{C}$ . Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά, έτσι ώστε να απομακρυνθούν αδιάλυτοι κρύσταλλοι και ο συνολικός όγκος επιμερίστηκε σε πωματισμένα σωληνάρια (eppendorf tubes).

#### **VII.5.5. Φύλαξη παρασκευασμάτων**

Τα παρασκευάσματα φυλάσσονται σε ειδικές κασετίνες για αντικειμενοφόρους σε θερμοκρασία  $4^\circ\text{C}$ , στο σκοτάδι, για διάστημα 6 μηνών.

## **VII.6. Μικροσκοπική παρατήρηση**

Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο του Τμήματος Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το μικροσκόπιο ήταν οπτικό μικροσκόπιο τύπου “Zeiss Axioscope 40”, εφοδιασμένο με πηγή προσπίπτουσας υπεριώδους ακτινοβολίας και κατάλληλα φίλτρα. Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή τύπου “Leica” προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο, μέσω του προγράμματος «LAS core» και η αποθήκευσή τους έγινε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ως αρχεία .tif. Η μετέπειτα ψηφιακή επεξεργασία των φωτογραφιών, έγινε μέσω του προγράμματος “Photoshop CS6” και αποθηκεύτηκαν ως αρχεία .jpg.

Η ταυτοποίηση των NETs πραγματοποιήθηκε μέσω της αναγνώρισης των συστατικών τους στοιχείων, μετά από μικροσκοπική παρατήρηση. Κριτήριο αναγνώρισής τους, αποτέλεσε ο ταυτόχρονος χωρικός εντοπισμός της ουδετεροφιλικής ελαστάσης και DNA, σε χαρακτηριστικές δομές εξωκυττάρων δικτύων.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της NETosis πραγματοποιήθηκε με άμεση καταμέτρηση της ποσοστιαίας αναλογίας των NETs μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Η καταμέτρηση διεξήχθη από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές (διπλή τυφλή παρατήρηση). Συγκεκριμένα διεξήχθη καταμέτρηση του αριθμού των NETs και του αριθμού των ουδετεροφύλων σε δέκα οπτικά πεδία κατά μέσο όρο ανά παρασκεύασμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις ορισμένα δείγματα αξιολογήθηκαν εις διπλούν (δύο παρασκευάσματα για το ίδιο δείγμα) και αξιολογήθηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων. Το σύνολο των φθορίζοντων δομών (δηλαδή το άθροισμα ουδετεροφύλων και NETs) που καταμετρήθηκαν σε κάθε παρασκεύασμα-καλυπτρίδα ήταν κατά μέσο όρο 300. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η εκατοστιαία αναλογία NETs/σύνολο δομών.

## **VII.7. Μέτρηση επιπέδων p-STAT5**

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε αφορούσε στην κυτταρομετρική αξιολόγηση των επιπέδων του p-STAT5, το οποίο αποτελεί ενδοκυττάριο αντιγόνο. Για την εντόπιση του μορίου η διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

### **VII.7.1. Μέτρηση επιπέδων p-STAT5, σε ουδετερόφιλα ολικού περιφερικού αίματος**

Για την μέτρηση των επιπέδων του p-STAT5 σε ολικό περιφερικό αίμα υγιών μαρτύρων και ασθενών χρησιμοποιήθηκε όγκος αίματος ανά περίπτωση που περιείχε ~500.000 κύτταρα. Μετά από λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με διάλυμα Versalyse (Immunotech – Beckman Coulter),



για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών μέσω φυδοκέντρησης των δειγμάτων στις 1600 στροφές ανά λεπτό, με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Μετά από απόρριψη των υπερκείμενων διαλυμάτων, προστέθηκε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα αντίσωμα CD45 ECD, για τη ιχνηθέτηση των λευκοκυττάρων. Η επώαση με το αντίσωμα πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαδικασία διαπερατοποίησης και στερέωσης των κυττάρων, έτσι ώστε να επιτραπεί στο αντίσωμα του p-STAT5 να εισέλθει στα κύτταρα. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το kit “Dako Cytomation Intra Stain”. Αρχικά προστέθηκαν 100  $\mu$ L του διαλύματος Dako Intra Stain A σε κάθε σωλήνα, όπου μετά από επώαση για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στο σκοτάδι, πραγματοποιήθηκε πλύση με PBS μέσω φυγοκέντρησης με επιτάχυνση 300g, για 15 λεπτά. Μετά από απόρριψη του υπερκείμενου και επανασύσταση του κυτταρικού ιζήματος στον υπολειπόμενο όγκο, μέσω ισχυρής ανάδευσης (vortex), προστέθηκαν 100  $\mu$ L του διαλύματος Dako Intra Stain B, με χρόνο επώασης 5 λεπτών και ακολούθησε η χρώση με τα αντισώματα εκλογής.

Συγκεκριμένα για κάθε δείγμα, παρασκευάστηκαν ένας δοκιμαστικός σωλήνας στον οποίο προστέθηκαν 2  $\mu$ L ισοτυπικού αντισώματος Rabbit IgG Isotype Control συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa Fluor 488 (Cell Signalling). Στον άλλο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 2  $\mu$ L rabbit μονοκλωνικού αντισώματος p-STAT5, συζευγμένου με φθοριόχρωμα Alexa Fluor 488 (Cell Signalling). Η επώαση με τα αντισώματα έλαβε χώρα για 15 λεπτά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά από πλύση με PBS για 5 λεπτά, με ταχύτητα 1600 στροφών/λεπτό, απορρίφθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, επανασυστάθηκε το κυτταρικό ίζημα στον υπολειπόμενο όγκο διαλύματος και προστέθηκε 0,5ml PBS. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μέτρηση των επιπέδων του p-STAT5 με κυτταρομετρία ροής, σε κυτταρόμετρο τύπου Beckmann-Coulter. Σε κάθε δείγμα τα επίπεδα φθορισμού του μορίου, υπολογίστηκαν με βάση το φθορισμό του ισοτυπικού αντισώματος (control).

## **VII.7.2. Μέτρηση επιπέδων p-STAT5 σε ουδετερόφιλα σε καλλιέργεια παρουσία ανθρώπινου φυσιολογικού ορού και ορού ασθενών με Β-ΧΛΛ**

Αφού πραγματοποιήθηκε απομόνωση των ουδετεροφίλων από ολικό περιφερικό αίμα σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των ουδετεροφίλων σε καλλιεργητικές πλάκες των 24 βοθρίων, σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και παροχής CO<sub>2</sub> (5%), για 4 ώρες. Η καλλιέργεια των ουδετεροφίλων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υλικό Iscove Basal Medium (Biochrom), παρουσία ανθρώπινου φυσιολογικού ορού και ορού ασθενών που έπασχαν από Β-ΧΛΛ. Με το πέρας του χρόνου της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων και πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρική αξιολόγηση των επιπέδων του p-STAT5 σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.

Η πειραματική προσέγγιση της μελέτης των επιπέδων του p-STAT5 με τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν κατά τη μελέτη, περιλαμβάνονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, χάριν λογικής συνέχειας της παράθεσης των τελευταίων και άμεσης σύνδεσής τους με τις διάφορες μελετούμενες παραμέτρους.

## VIII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

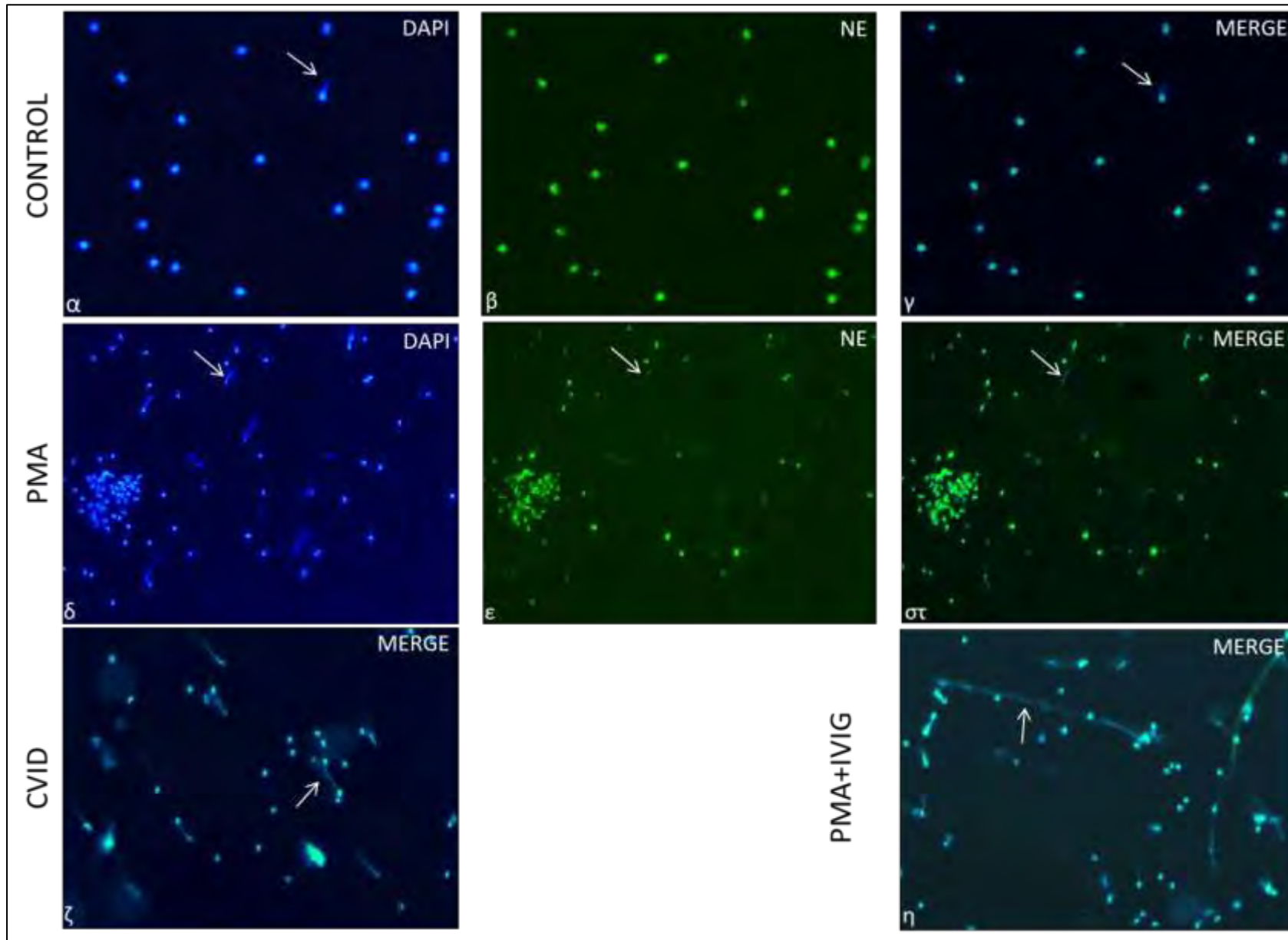
### VIII.1. Μικροσκοπική παρατήρηση των NETs

Με το πέρας της διαδικασίας ανοσοσήμανσης της ουδετεροφιλικής ελαστάσης (NE) και της χρώσης του DNA, συστατικά τα οποία είναι χαρακτηριστικά των NETs και των ουδετεροφίλων και υποβοηθούν στην ταυτοποίησή τους, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση, με μικροσκόπιο φθορισμού.

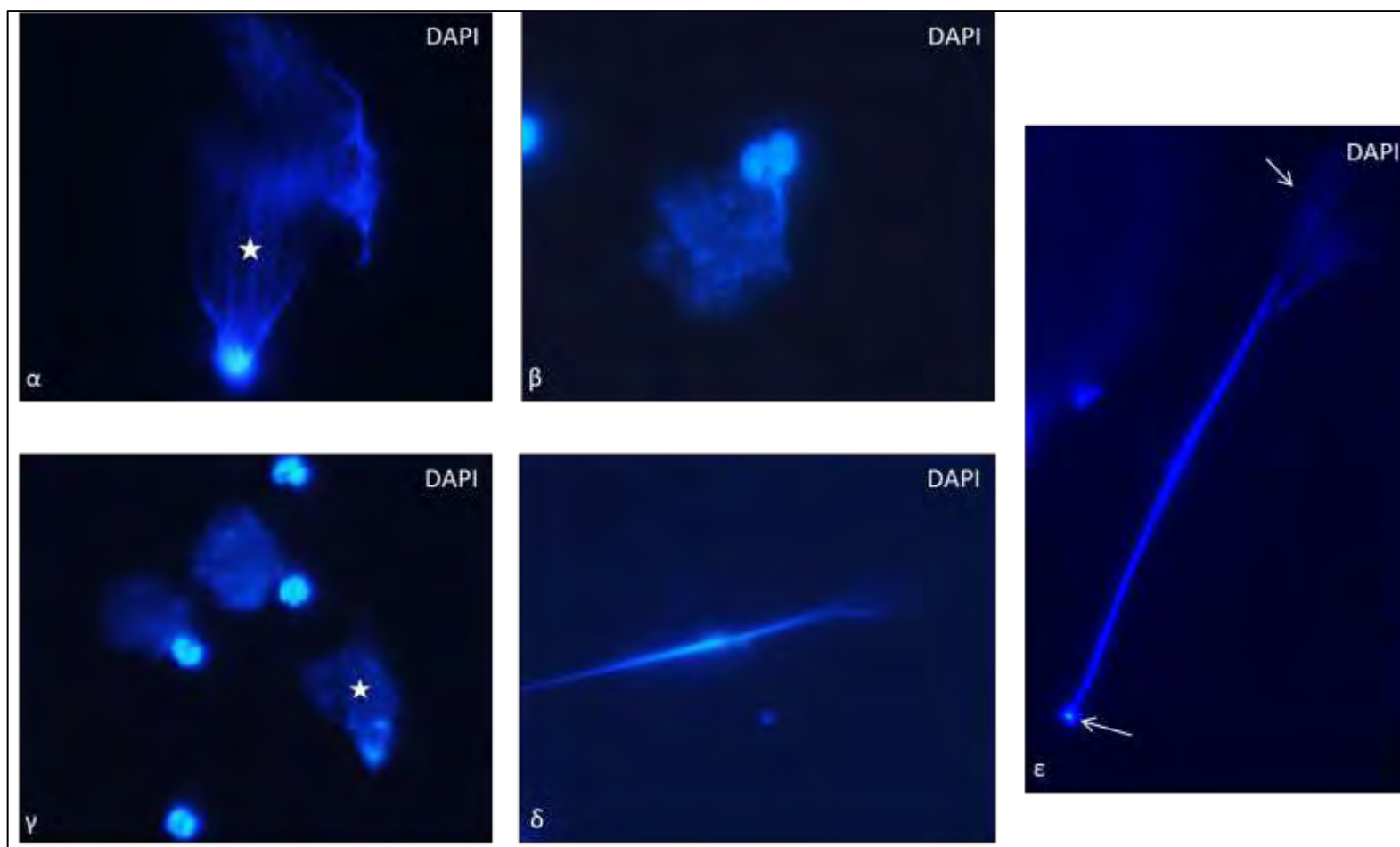
Τα μη διεγερμένα ουδετερόφιλα, φέρουν τον χαρακτηριστικό πολύλοβο πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από 2-4 λοβία. Η χρωματίνη βρίσκεται σε συμπυκνωμένη μορφή ενώ δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ ετεροχρωματίνης και ευχρωματίνης, γεγονός που έγκειται στη διακριτική ικανότητα του οργάνου. Περιapurηνικά εντοπίζεται η ουδετεροφιλική ελαστάση.

Τα NETs εμφανίζουν τη δομή χαρακτηριστικών δικτύων διαφορετικού μεγέθους. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιείται με τη διαπίστωση της συνεντόπισης DNA και NE. Μετά από μικροσκοπική παρατήρηση διαπιστώθηκαν ως γραμμικές δομές οι οποίες έχουν σαν αφετηρία το σημείο όπου εδράζονταν το ουδετερόφιλο από το οποίο προήλθαν, μπορούν να καλύπτουν ποικίλα μήκη (φαινόμενο που πιθανά σχετίζεται με την ένταση που πραγματοποιήθηκε η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και η έκπτυξή της στον εξωκυττάριο χώρο), ενώ στο τερματικό τους σημείο εμφανίζουν χαρακτηριστική «δομή βεντάλιας». Ορισμένα από τα NETs φαίνονται ως διάχυτες δομές, χωρίς ευδιάκριτη γεωμετρία. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με το γεγονός ότι τα NETs αποτελούν τρισδιάστατες δομές, οι οποίες εκτείνονται προς όλες τις διευθύνσεις στο χώρο. Από την άλλη μπορεί να αντιπροσωπεύουν «νετοτικά ουδετερόφιλα», τα οποία δεν έφτασαν στο τελικό στάδιο της πλήρους έκπτυξης της χρωματίνης.

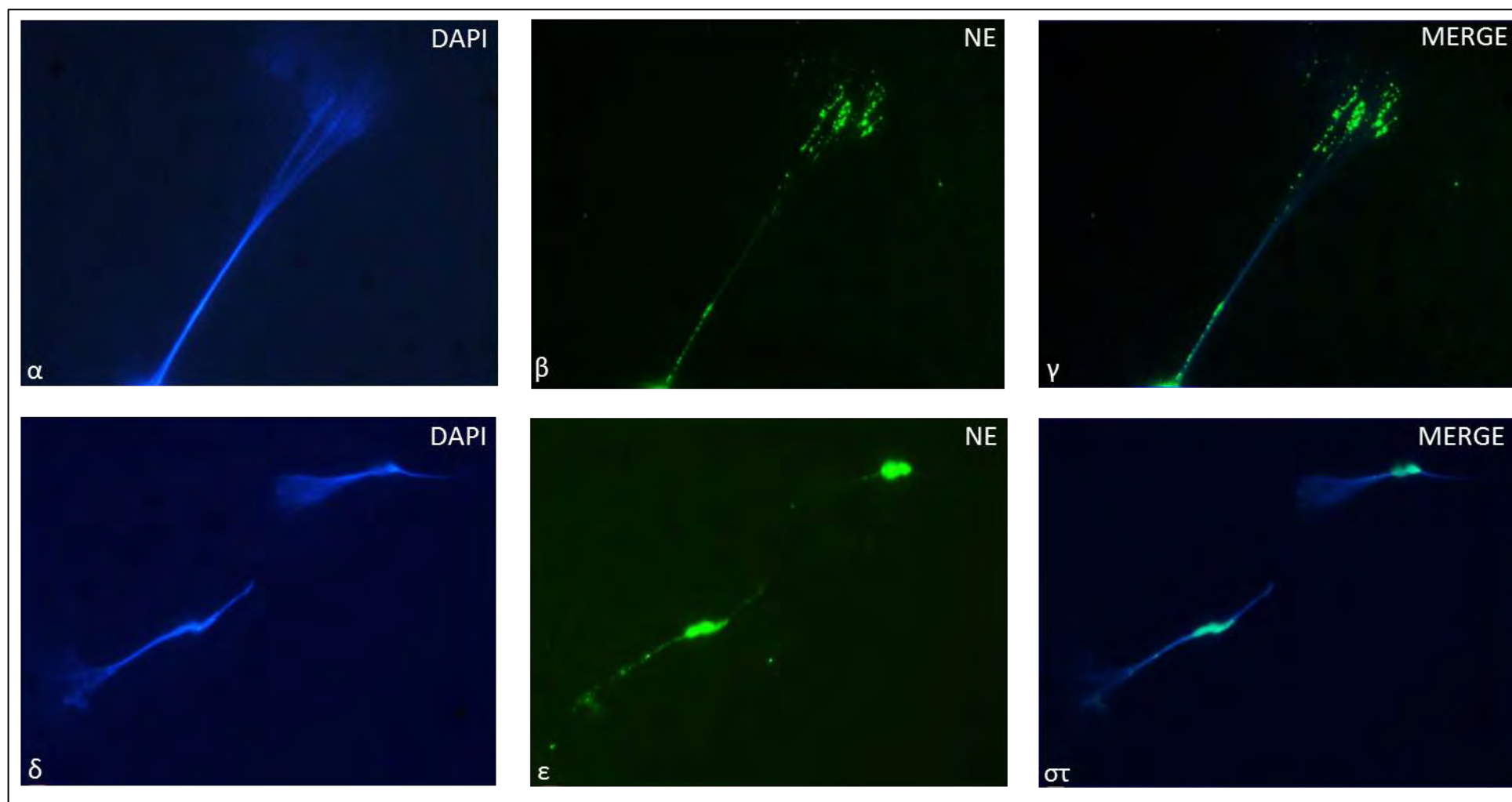
Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την παρατήρηση διαπιστώθηκε η ύπαρξη ουδετεροφίλων τα οποία είχαν χάσει τη δομή του κατατμημένου, πολύλοβου πυρήνα. Αυτό υποδηλώνει πιθανή αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, που αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό της NETosis, συνεπώς τα εν λόγω ουδετερόφιλα θα μπορούσαν να χαρακτηρισθούν ως «νετοτικά». Παρόλ' αυτά κατά την ποσοτικοποίηση του φαινομένου δεν συνυπολογίστηκαν, γεγονός που μπορεί να οδήγησε σε πιθανή υποεκτίμησή του.



**Εικόνα 2: Σχηματισμός NETs *in vitro*, μετά από επίδραση με PMA και μετά από ταυτόχρονη επίδραση PMA και IVIG. (Μεγέθυνση: (10x). Τα βέλη σε κάθε φωτογραφία υποδεικνύουν ένα NET). DAPI: Χρώση DNA. NE: Ανοσοεντόπιση ουδετεροφιλικής ελαστάσης. MERGE: Συνεντοπισμός DNA και NE. (α-γ). Ουδετερόφιλα φυσιολογικών μαρτύρων (δ-στ). Ουδετερόφιλα φυσιολογικών μαρτύρων μετά από επίδραση με PMA. (ζ). Ουδετερόφιλα ασθενούς με CVID, χωρίς θεραπεία υποκατάστασης. (η). Ουδετερόφιλα φυσιολογικού μάρτυρα μετά από επίδραση με PMA, παρουσία IVIG (10 mg/ml).**

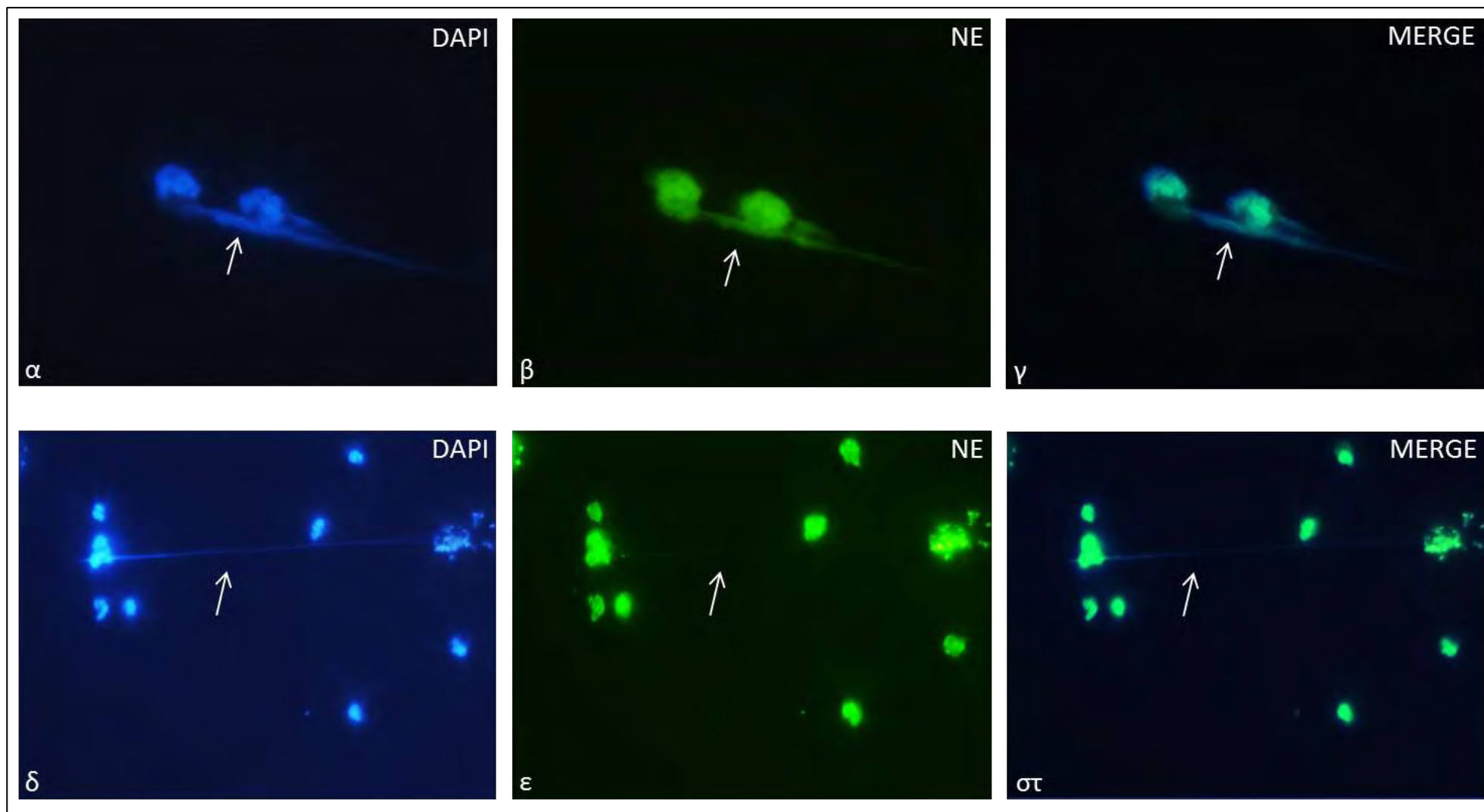


**Εικόνα 3: Τα NETs διαφέρουν μορφολογικά μεταξύ τους (Μεγέθυνση: 40x). (α).** Ουδετερόφιλο στο οποίο πιθανά δεν έχει ολοκληρωθεί η NETosis. Διακρίνεται το νεοσχηματιζόμενο πολύπλοκο δίκτυο ινιδίων χρωματίνης καθώς και ο μητρικός πυρήνας που βρίσκεται σε διαδικασία αποσυμπύκνωσης. **(β).** NET και παρακείμενο ουδετερόφιλο του οποίου ο πυρήνας έχει απολέσει το τυπικό σχήμα. Ο σχηματισμός των NETs δεν επιτελείται ταυτόχρονα σε όλα τα ουδετερόφιλα. **(γ).** NETs τα οποία φαίνονται ως νεφελώδεις σχηματισμοί. Διακρίνεται NET (αστερίσκος) όπου διακρίνονται μέσω του εντονότερου φθορισμού, ίχνη DNA που δεν έχει αποσυμπυκνωθεί πλήρως. **(δ,ε).** NETs τα οποία διακρίνονται από ένα εκτενές γραμμικό τμήμα, μεγάλης διαμέτρου. Στην φωτογραφία (ε), επιδεικνύονται με βέλη, η θέση του κυττάρου από το οποίο σχηματίστηκε το NET, καθώς και η θέση του τερματικού σημείου που χαρακτηρίζεται από «δομή βεντάλιας».



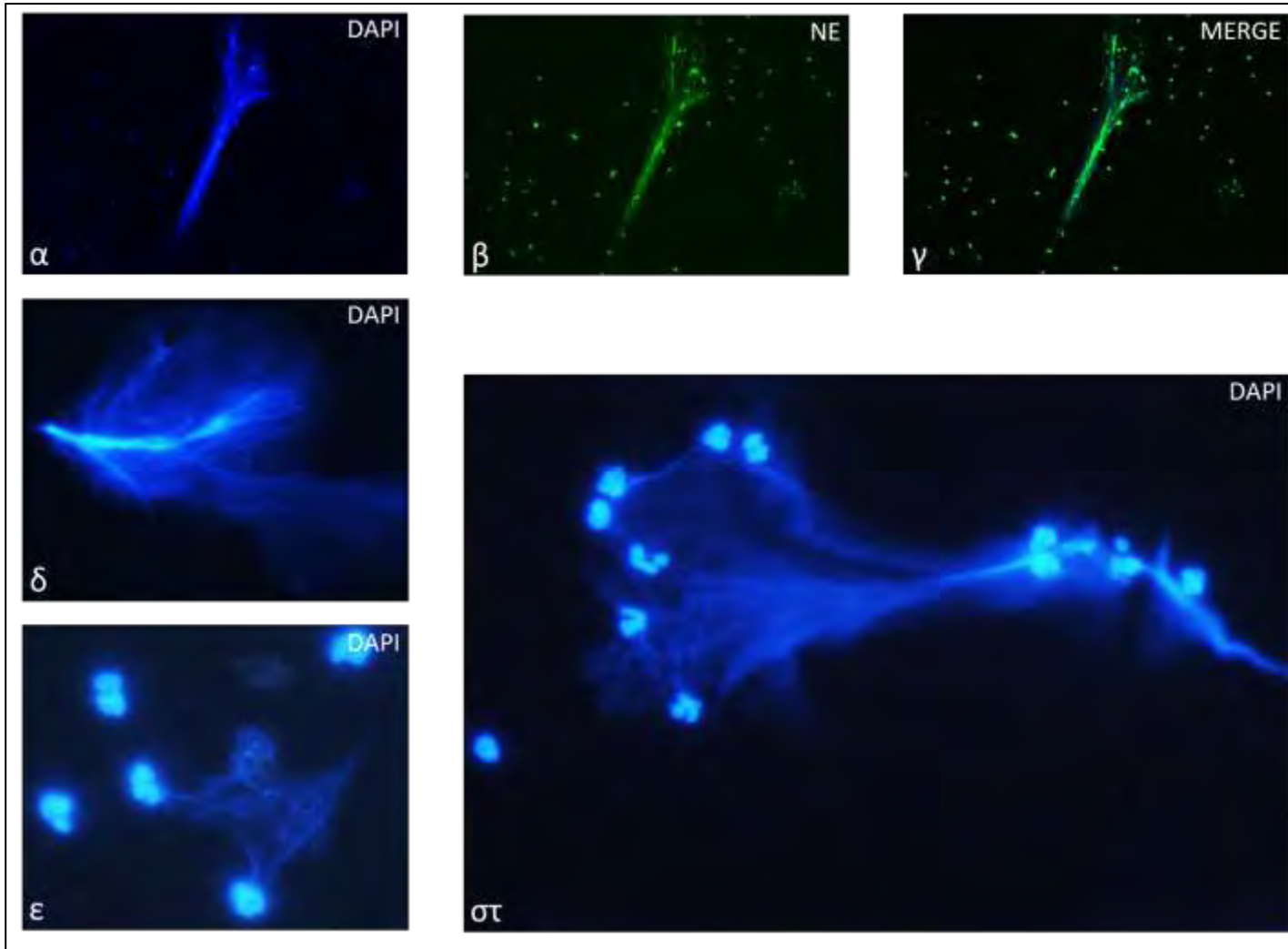
**Εικόνα 4: Ο σκελετός του DNA των NETs, φέρει συστατικά των κοκκίων των ουδετεροφίλων. Ανοσοεντόπιση ουδετεροφιλικής ελαστάσης (NE) στα NETs (Μεγέθυνση: 40x).**

**(α, δ).** Χρώση DNA (DAPI). **(β, ε).** Ανοσοεντόπιση ουδετεροφιλικής ελαστάσης (NE). **(γ,στ).** Συνεντοπισμός DNA και NE (MERGE).



Εικόνα 5: Το μήκος έκτασης των ευθύγραμμων γραμμικών τμημάτων των NETs ποικίλει (Μεγέθυνση: 40x).





**Εικόνα 6: NETs προερχόμενα από διαφορετικά ουδετερόφιλα, αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας πολυπλοκότερα εξωκυττάρια δίκτυα. (α-γ).** Διακρίνεται εκτεταμένο δίκτυο NETs, το οποίο καλύπτει μεγάλη επιφάνεια του οπτικού πεδίου. Περιφερειακά αυτού, διακρίνονται «νεοτοικά» και φυσιολογικά ουδετερόφιλα (Μεγέθυνση: 10x).  
**(δ).** Εκτεταμένο δίκτυο NETs (Μεγέθυνση: 40x).  
**(ε, στ).** Πολύπλοκα δίκτυα NETs, σε επαφή με παρακείμενα ουδετερόφιλα.

Υποσημείωση: Η μεγέθυνση που αναγράφεται σε κάθε φωτογραφία, αφορά στην μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού, που χρησιμοποιήθηκε κατά τη λήψη της φωτογραφίας. Η μεγέθυνση της φωτογραφικής μηχανής ήταν 60x. Άρα όπου αναγράφεται μεγέθυνση 10x, η πραγματική είναι 600x και όπου 40x, 2400x. Η εκάστοτε μεγέθυνση μπορεί να μεταβάλλεται λόγω της μετέπειτα ψηφιακής επεξεργασίας των φωτογραφιών.



## **VIII.2. Ποσοτικοποίηση της NETosis**

### **VIII.2.1. Υγιείς μάρτυρες**

Τα ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων μετά από επώαση διάρκειας 3 ωρών παρουσίασαν κατά μέσο όρο NETosis 8%, ενώ όταν επώαστηκαν παρουσία PMA τότε το ποσοστό NETosis ήταν κατά μέσο όρο 21%. Η απόλυτη μεταβολή ήταν 12%. Στις συνθήκες καλλιέργειας τα ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων παρουσιάζουν φυσιολογικά NETs σε ποσοστό μικρότερο του 10%. Το PMA αποτελεί ισχυρό επαγωγέα του φαινομένου καθώς μετά από προσθήκη του παρουσιάζεται αύξηση κατά 2,6 φορές.

### **VIII.2.2.. Ασθενείς με υπογαμμασφαιριναιμία**

Τα ουδετερόφιλα ασθενών με υπογαμμασφαιριναιμία και συγκεκριμένα ασθενών με χαμηλή συγκέντρωση IgG στον ορό, παρουσιάζουν υψηλότερη NETosis (25%) συγκριτικά με τα ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων. Η αθρόα NETosis παρατηρήθηκε σε ασθενείς με ανεπάρκεια IgG ανεξάρτητα της υποκείμενης νόσου.

Οι ανωτέρω μετρήσεις αφορούν σε τέσσερις ανεξάρτητες πειραματικές δοκιμασίες και σε υλικό που προήλθε από τρεις ασθενείς με ανεπάρκεια IgG. Ο ένας ασθενής έπασχε από COVID και το υλικό του υποβλήθηκε σε δύο ανεξάρτητες μετρήσεις προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υφίσταται επαναληψιμότητα του φαινομένου, όπου πράγματι επιβεβαιώθηκε. Οι άλλες δοκιμασίες αφορούσαν μια ασθενή με ανεπάρκεια IgG αδιευκρίνιστης αιτιολογίας, ενώ η τρίτη ασθενής έπασχε από σαρκοείδωση.

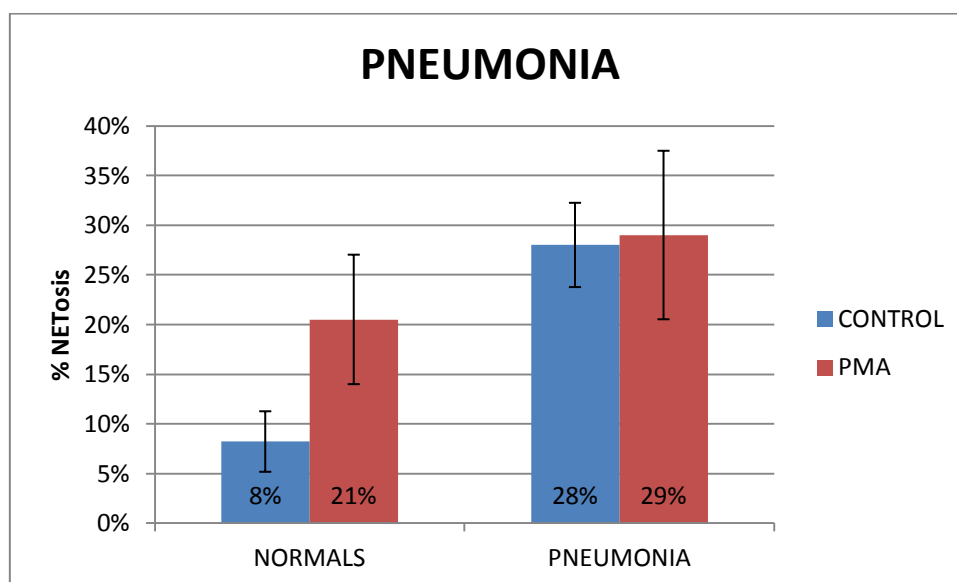
Όταν έγινε διέγερση με PMA παρατηρήθηκε NETosis 30%. Η μεταβολή της NETosis μετά από διέγερση ήταν 6% γεγονός που επιβεβαιώνει το βιβλιογραφικό δεδομένο ότι περίπου το 30% των ουδετεροφίλων μπορούν να παραγάγουν NETs δηλαδή το 1/3 αυτών στο μέγιστο.

Όταν πραγματοποιήσαμε δοκιμασία επαγωγής σχηματισμού NETs σε ασθενή με εκλεκτική ανεπάρκεια IgA, παρατηρήθηκαν φυσιολογικά επίπεδα σχηματισμού NETs όταν τα ουδετερόφιλα επώαστηκαν παρουσία ανθρώπινου φυσιολογικού ορού, ενώ παρουσίασαν την αναμενόμενη διέγερση παρουσία του PMA.

### VIII.2.3. Ασθενείς με λοιμώξεις

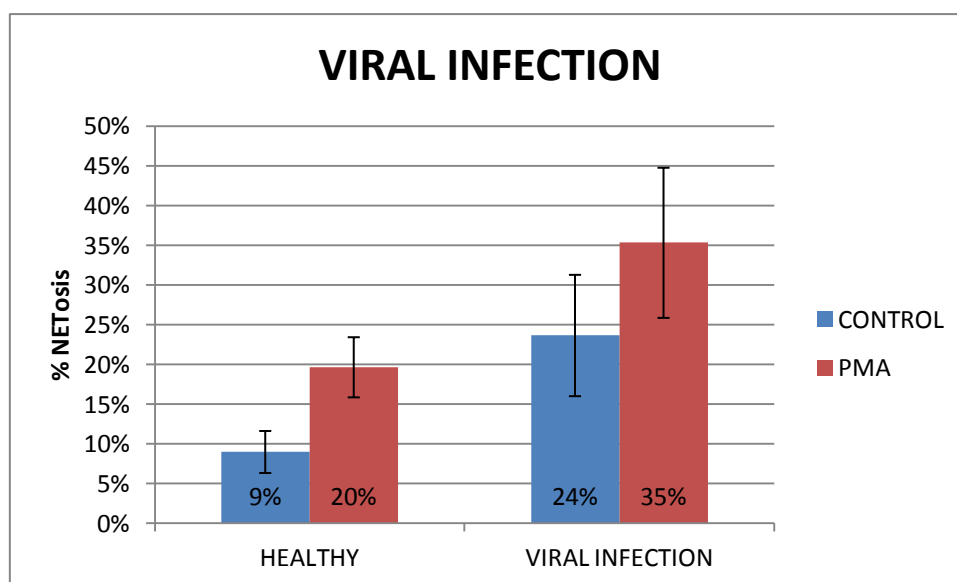
Το φαινόμενο της NETosis έχει μελετηθεί σε συσχέτιση με λοιμογόνους παράγοντες και έχει διαπιστωθεί *in vitro* αλλά και *in vivo* ότι μικρόβια αλλά και μικροβιακά συστατικά επάγουν το σχηματισμό των NETs. Στις περιπτώσεις των αντισωματικών ανεπαρκειών είναι γνωστή η παρουσία επαναλαμβανόμενων και υποτροπιάζουσών λοιμώξεων, οι οποίες οφείλονται στα χαμηλά επίπεδα ανοσοσφαιρινών και ιδιαίτερα της IgG. Γι'αυτό κι εμείς διατυπώσαμε το ερώτημα κατά πόσον το φαινόμενο της αθρόας NETosis οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα της IgG ή/και στις επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις και στην επακόλουθη ύπαρξη φλεγμονής.

Η δοκιμασία μελέτης της NETosis πραγματοποιήθηκε σε δύο ασθενείς με λοίμωξη βακτηριακής αιτιολογίας στους πνεύμονες, όπου επιβεβαιώθηκαν τα αναμενόμενα από τη βιβλιογραφία αποτελέσματα. Ο ένας ασθενής είχε ιστορικό χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας ενώ ο άλλος ιστορικό άσθματος. Τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών στον ορό των ασθενών ήταν φυσιολογικά. Σε ουδετερόφιλα τα οποία δεν είχαν υποστεί διέγερση, η NETosis ανήλθε σε ποσοστό 28% κατά μέσο όρο ενώ μετά από διέγερση με PMA σε ποσοστό 29% κατά μέσο όρο. Η παρατηρούμενη μεταβολή ήταν 1%, γεγονός που συνάδει με προηγούμενη διαπίστωση ότι όταν τα ουδετερόφιλα μπορούν να διεγερθούν φυσιολογικά μετά από επίδραση με PMA, το μέγιστο ποσοστό της NETosis είναι κατά μέσο όρο 30%, ανεξάρτητα από την αρχική κατάσταση διέγερσης των ουδετεροφίλων.



**Γράφημα 1: Ποσοτικοποίηση NETosis σε ασθενείς με πνευμονία.** (Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ποσοστού NETosis και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. Η κατηγορία «NORMALS» αντιπροσωπεύει 10 ανεξάρτητα πειράματα και η κατηγορία «PNEUMONIA» 2 ανεξάρτητα πειράματα. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η NETosis χωρίς διέγερση και με κόκκινο χρώμα η NETosis, μετά από διέγερση των ουδετεροφίλων με PMA).

Η μελέτη του φαινομένου πραγματοποιήθηκε και σε ασθενή με ιογενείς λοιμώξεις, χωρίς γνωστό ιστορικό άλλων νοσημάτων. Στο εν λόγω άτομο πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα όταν βρίσκονταν σε υγιή κατάσταση και τρία ανεξάρτητα πειράματα όταν ήταν σε φάση ιογενούς λοίμωξης, όλα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η παρουσία ιογενούς λοίμωξης διαπιστώθηκε με εκτίμηση εργαστηριακών αναλύσεων και συγκεκριμένα με τη διενέργεια ανοσοφαινοτύπου ή/και με εκτίμηση των κλινικών συμπτωμάτων. Σε υγιή κατάσταση τα ουδετερόφιλα τα οποία δεν είχαν υποστεί διέγερση επέδειξαν NETosis 9%, ενώ μετά από διέγερση με PMA, 20%. Όταν όμως το άτομο βρίσκονταν σε φάση ιογενούς λοίμωξης τότε παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση των δομών NETs. Συγκεκριμένα χωρίς διέγερση το ποσοστό NETosis ανήλθε στο 24% ενώ μετά από διέγερση στο 35%. Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι το φαινόμενο της NETosis επάγεται ισχυρά σε ουδετερόφιλα ασθενών με λοιμώξεις, ανεξάρτητα του τύπου της λοίμωξης.



**Γράφημα 2: Ποσοτικοποίηση NETosis σε ασθενή με ιογενείς λοιμώξεις.** (Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ποσοστού NETosis τριών ανεξάρτητων πειραμάτων για κάθε συνθήκη και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η NETosis χωρίς διέγερση και με κόκκινο χρώμα η NETosis, μετά από διέγερση των ουδετεροφίλων με PMA).

## VIII.2.4. Ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες υπό θεραπεία υποκατάστασης.

Η έκταση του φαινομένου της NETosis μελετήθηκε και σε ασθενείς με ανεπάρκεια IgG, στους οποίους είχε χορηγηθεί IVIG ή SCIG, προκειμένου να διερευνηθεί η επίπτωση της θεραπείας.

Σε αυτήν την προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε υλικό από τέσσερις ασθενείς με CVID, από μια ασθενή με αντισωματική ανεπάρκεια αγνώστου αιτιολογίας και από μία ασθενή με σαρκοείδωση και ανεπάρκεια IgG, οι οποίοι βρίσκονταν υπό θεραπεία υποκατάστασης. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν επτά ανεξάρτητα πειράματα.

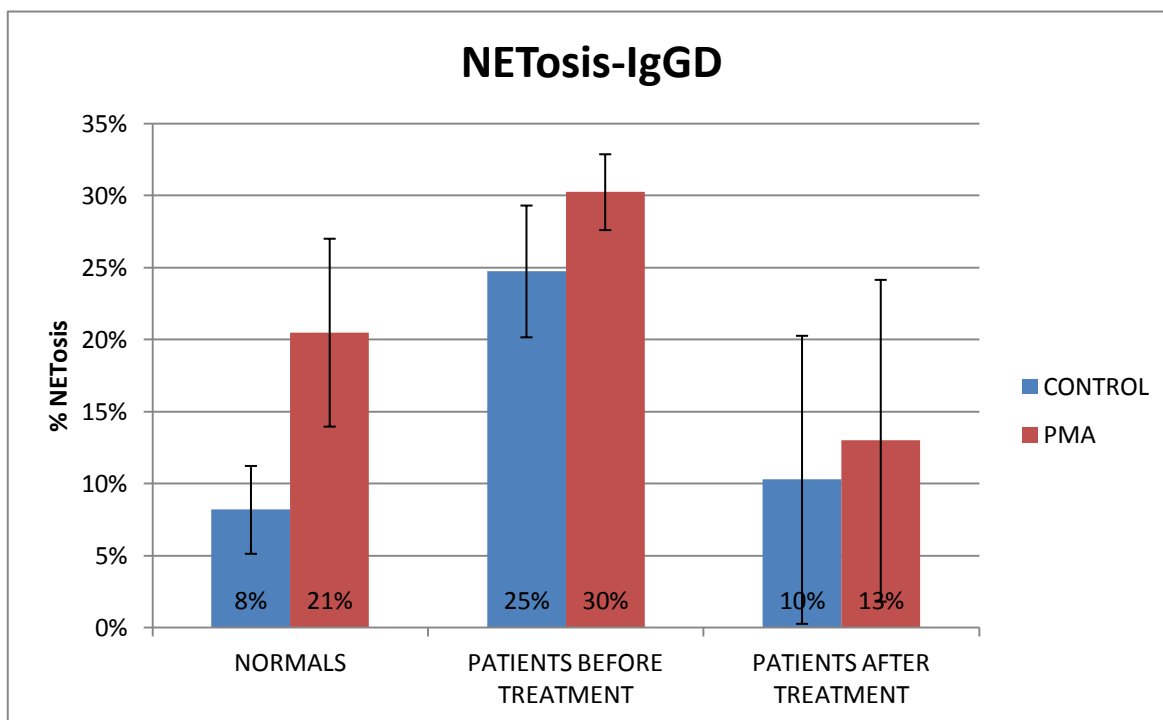
Διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς που βρίσκονται υπό θεραπεία υποκατάστασης παρουσίασαν κατά μέσο όρο 10% NETosis σε ουδετερόφιλα τα οποία δεν είχαν υποστεί επίδραση με PMA, ποσοστό το οποίο προσεγγίζει αυτό των φυσιολογικών μαρτύρων. Μετά από διέγερση με PMA όμως το ποσοστό της NETosis ανήλθε στο 13%. Η απόλυτη μεταβολή που παρατηρήθηκε μετά από διέγερση ήταν 3%, σημαντικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη μεταβολή στους φυσιολογικούς μάρτυρες (12%).

NORMALS				PATIENTS BEFORE TREATMENT				PATIENTS AFTER TREATMENT			
n	CONTROL	PMA	INCREASE	n	CONTROL	PMA	INCREASE	n	CONTROL	PMA	INCREASE
1	7%	18%	11%	1	27%	30%	3%	1	29%	24%	-5%
2	8%	17%	9%	2	26%	34%	8%	2	0%	1%	1%
3	12%	24%	12%	3	18%	29%	11%	3	6%	2%	-4%
4	10%	25%	15%	4	28%	28%	0%	4	11%	13%	2%
5	13%	34%	21%	AVERAGE	25%	30%	6%	5	7%	18%	11%
6	10%	21%	11%	S.DEV	4,57%	2,63%	4,93%	6	2%	4%	2%
7	4%	10%	6%	S.E.	2,29%	1,31%	2,47%	7	17%	29%	12%
8	5%	17%	12%					AVERAGE	10%	13%	3%
9	8%	16%	8%					S.DEV	10,00%	11,17%	6,63%
10	5%	23%	18%					S.E.	3,78%	4,22%	2,50%
AVERAGE	8%	21%	12%								
S.DEV.	3,05%	6,52%	4,57%								
S.E.	0,96%	2,06%	1,45%								

PNEUMONIA				HEALTHY				Viral infection			
n	CONTROL	PMA	INCREASE	n	CONTROL	PMA	CONTROL	PMA			
1	25%	23%	2%	1	7%	18%	17%	46%			
2	31%	35%	4%	2	8%	17%	32%	28%			
AVERAGE	28%	29%	3%	3	12%	24%	22%	32%			
SDEV	4,24%	8,49%	1,41%	AVERAGE	9%	20%	24%	35%			
S.E.	3,00%	6,00%	1,00%	S.DEV.	2,65%	3,79%	7,64%	9,45%			
				S.E.	1,53%	2,19%	4,41%	5,46%			

**Πίνακας 3:** Ποσοστά NETosis και μεταβολή NETosis σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς. (n: αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων, AVERAGE: μέσος όρος, S.DEV: τυπική απόκλιση, S.E.: τυπικό σφάλμα)



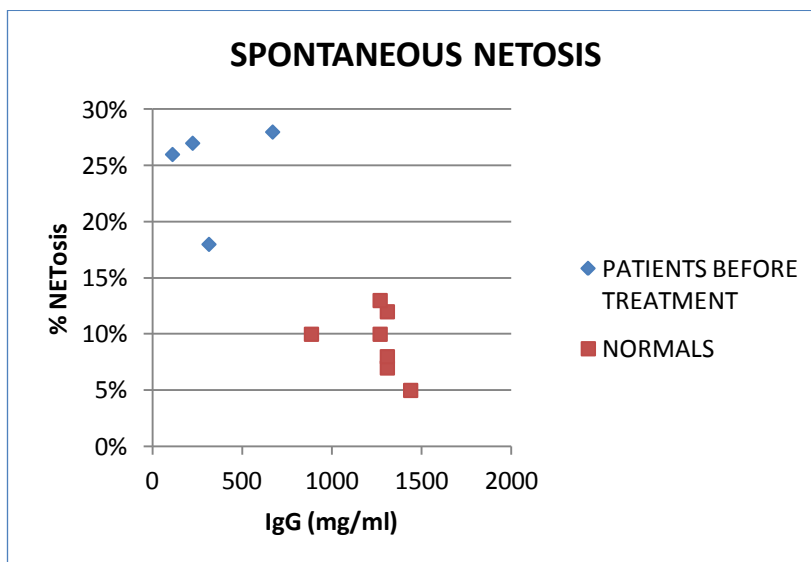
**Γράφημα 3:** Ποσοτικοποίηση NETosis σε υγιείς μάρτυρες και σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες πριν και μετά τη θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη. (Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ποσοστού NETosis και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η NETosis χωρίς διέγερση και με κόκκινο χρώμα η NETosis, μετά από διέγερση των ουδετεροφίλων με PMA).

NORMALS				PATIENTS BEFORE TREATMENT				PATIENTS AFTER TREATMENT			
n	IgG (mg/ml)	CONTROL	PMA	n	IgG (mg/ml)	CONTROL	PMA	n	IgG (mg/ml)	CONTROL	PMA
1	1310	7%	18%	1	225	27%	30%	1	1140	29%	24%
2	1310	8%	17%	2	113	26%	34%	2	2190	0%	1%
3	1310	12%	24%	3	316	18%	29%	3	1300	6%	2%
4	1270	13%	34%	4	671	28%	28%	4	902	11%	13%
5	1270	10%	25%	AVERAGE	331,25	25%	30%	5	916	7%	18%
6	887	10%	21%					6	624	2%	4%
7	1440	5%	23%					7	664	17%	29%
AVERAGE	1256,714	9%	23%					AVERAGE	1105,143	10%	13%

**Πίνακας 4:** Ποσοστά NETosis σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς και συγκέντρωση IgG στον ορό. (n: αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων, AVERAGE: μέσος όρος, S.DEV: τυπική απόκλιση, S.E.: τυπικό σφάλμα)

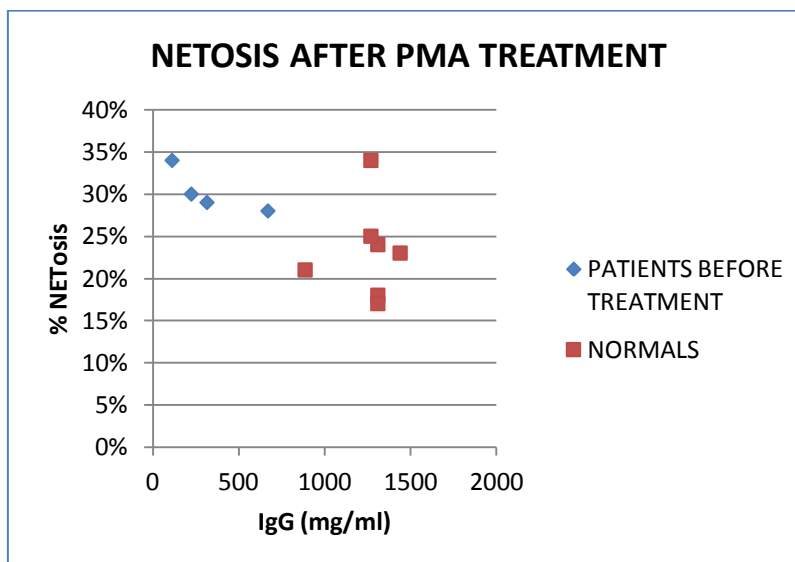
Από τα ανωτέρω δεδομένα διαπιστώνεται ότι ναι μεν στους ασθενείς στους οποίους χορηγείται γ-σφαιρίνη, υφίσταται κατά μέσο όρο μειωμένη απόκριση των ουδετεροφίλων στην επίδραση του PMA, αλλά η απόκριση αυτή παρουσιάζει ποικιλότητα ανά ασθενή και υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Για το λόγο αυτό θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανότητα η διαφορές αυτές στην απόκριση να οφείλονται στα επίπεδα της χορηγούμενης IgG στον ορό. Από το γράφημα διαπιστώνεται ότι δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για τη συσχέτιση της

μειωμένης ικανότητας διέγερσης που παρουσιάζει η πλειοψηφία των ασθενών με τη συγκέντρωση της IVIG λόγω του μικρού αριθμού των μετρήσεων. Γι' αυτό και κρίνεται σκόπιμη η μελέτη του φαινομένου σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών προκειμένου να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα.



**Γράφημα 4:** Αυθόρμητη NETosis σε ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων (n=7 ανεξάρτητα πειράματα) και ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες πριν τη λήψη θεραπείας (n=4 ανεξάρτητα πειράματα), συναρτήσει της συγκέντρωσης της γ-σφαιρίνης (IgG). Η συσχέτιση του ποσοστού NETosis με τη συγκέντρωση IgG είναι στατιστικά σημαντική.

( $r = -0,8457$ ,  $p < 0,05$ ).

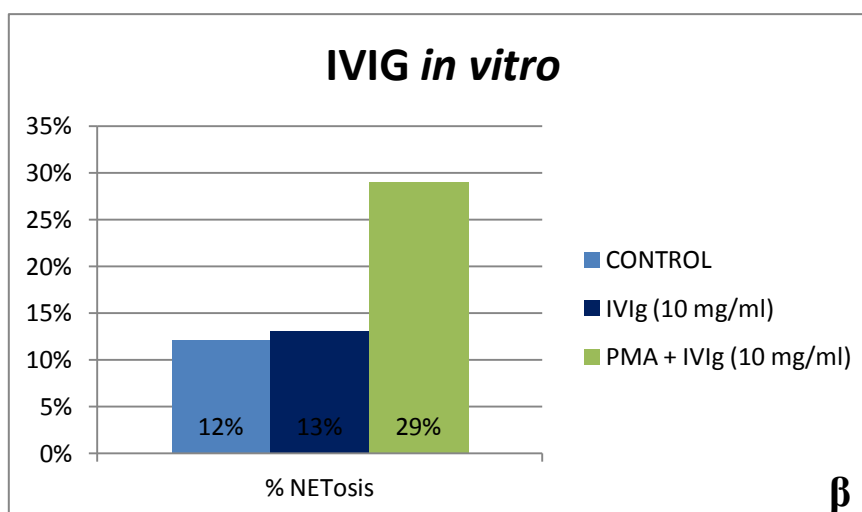
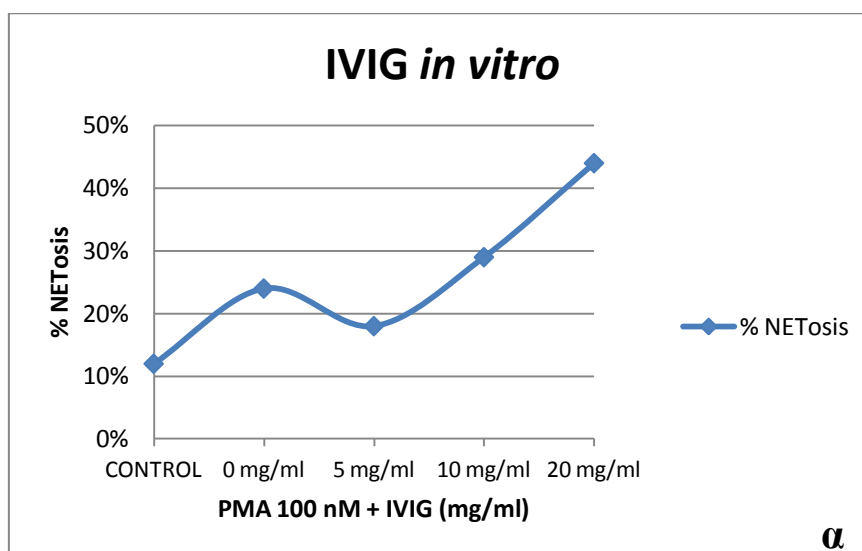


**Γράφημα 5:** NETosis μετά από επίδραση με PMA, σε ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων (n=7 ανεξάρτητα πειράματα) και ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες πριν τη λήψη θεραπείας (n=4 ανεξάρτητα πειράματα), συναρτήσει της συγκέντρωσης της γ-σφαιρίνης (IgG). Η συσχέτιση του ποσοστού NETosis με τη συγκέντρωση IgG είναι στατιστικά σημαντική. ( $r = -0,7120$ ,  $p < 0,05$ ).

### VIII.2.5. In vitro επίδραση της IVIG στη NETosis

Στην περίπτωση των ασθενών η παράμετρος της IVIG αφορούσε σε *in vivo* σύστημα και η επίδρασή της είχε προηγηθεί της μελέτης του φαινομένου της NETosis, μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* σύστημα μετά από απομόνωση των ουδετεροφίλων από περιφερικό αίμα. Ορμώμενοι από την ανωτέρω παρατήρηση επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την *in vitro* επίδραση της IVIG στην ικανότητα του PMA να διεγείρει το σχηματισμό NETs σε ουδετερόφιλα υγιών μαρτύρων, τα οποία επώαστηκαν με ταυτόχρονη παρουσία των δύο παραγόντων. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Από περιφερικό αίμα υγιούς μάρτυρα, αφού πραγματοποιήθηκε απομόνωση των ουδετεροφίλων, αυτά επώαστηκαν παρουσία PMA συγκέντρωσης 100 nM (θετικός μάρτυρας), παρουσία PMA και IVIG σε διαβάθμιση συγκέντρωσης (5, 10, 20 mg/ml) καθώς και απουσία των δύο παραγόντων (αρνητικός μάρτυρας- Control). Σκοπός της πειραματικής προσέγγισης ήταν η μελέτη της επίδρασης της θεραπευτικής συγκέντρωσης της IVIG (10 mg/ml), καθώς και της υποδιπλάσιας (5 mg/ml) και διπλάσιας συγκέντρωσης (20 mg/ml) στην ικανότητα του PMA να επάγει τη NETosis.

Το PMA όπως αναμενόταν οδήγησε σε άνοδο του ποσοστού της NETosis. Όταν όμως η επίδραση του PMA πραγματοποιήθηκε παρουσία της θεραπευτικής συγκέντρωσης της IVIG διαπιστώθηκε περεταίρω αύξηση. Σε συγκέντρωση διπλάσια της θεραπευτικής δε, παρατηρήθηκε ότι το φαινόμενο έλαβε ακόμα μεγαλύτερη έκταση. Αυξανόμενη δηλαδή της συγκέντρωσης της IVIG με ταυτόχρονη διέγερση με PMA, τα ουδετερόφιλα επιδεικνύουν αυξανόμενη ικανότητα σχηματισμού NETs η οποία στις υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να ξεπεράσει ακόμα και το 1/3 αριθμού τους (44%). Όταν όμως η συγκέντρωση της IVIG ήταν η μισή της θεραπευτικής παρατηρήθηκε μειωμένη NETosis συγκριτικά με αυτή που παρατηρήθηκε μετά από διέγερση με PMA απουσία σφαιρίνης. Αυτό μπορεί να αποτελεί τυχαίο φαινόμενο, ή να υποδεικνύει τη διαφορετική δράση της IVIG εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση όπως είχε παρατηρηθεί σε μελέτη της δράσης της στην απόπτωση.



**Γράφημα 6:** *In vitro* επίδραση γ-σφαιρίνης στην επαγόμενη από το PMA NETosis ουδετεροφίλων υγιών μαρτύρων. (α) Η επαγόμενη από το PMA NETosis ενισχύεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης της IVIG. (β) Η IVIG δεν επάγει τη NETosis.

### VIII.3. Ενεργοποίηση STAT5 σε ουδετερόφιλα ασθενών με COVID

Σε πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας είχε διαπιστωθεί ότι τα ουδετερόφιλα ασθενών που πάσχουν από Β-ΧΛΛ, εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα p-STAT5, συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες. Βασιζόμενοι σε αυτήν την παρατήρηση θελήσαμε να διερευνήσουμε την κατάσταση ενεργοποίησης του STAT5 σε ουδετερόφιλα ασθενών που πάσχουν από COVID.

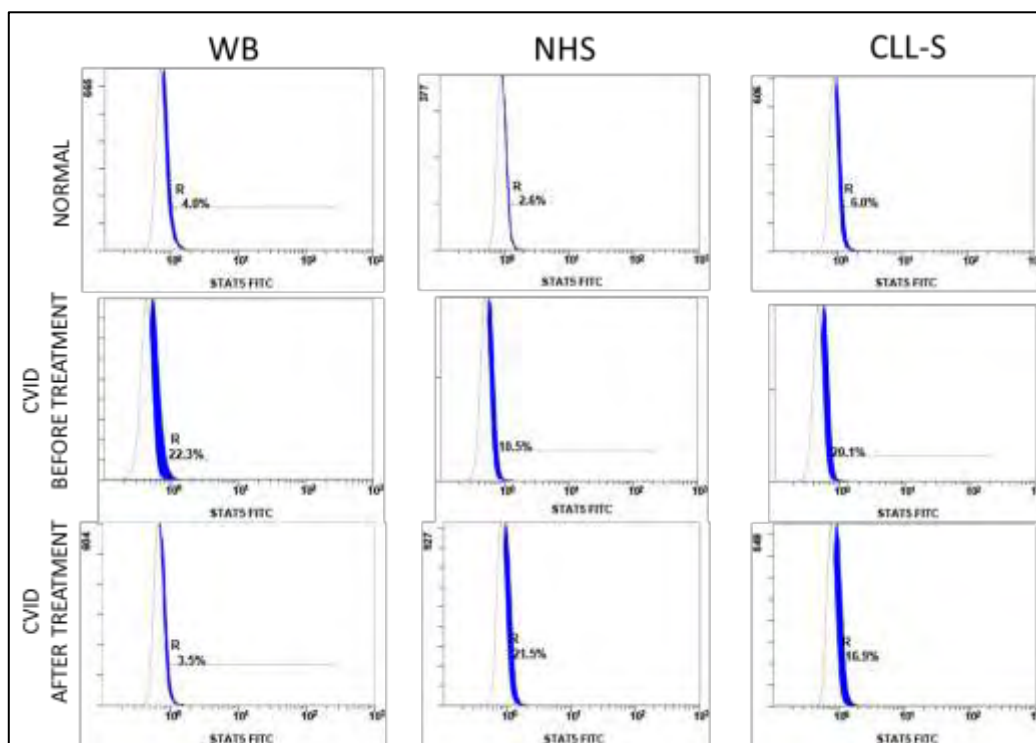
Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρική αξιολόγηση των επιπέδων του p-STAT5, σε ουδετερόφιλα ασθενών με COVID και φυσιολογικών μαρτύρων σε περιφερικό αίμα. Ο ένας



ασθενής ήταν υπό θεραπεία υποκατάστασης με IVIG ενώ στον άλλο ασθενή δεν είχε χορηγηθεί IgG.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων στο περιφερικό αίμα, διαπιστώθηκε, ότι δεν φαίνεται να υπάρχει αξιολογήσιμη διαφορά στα επίπεδα του p-STAT5 σε ουδετερόφιλα ασθενών με CVID πριν και μετά τη θεραπεία υποκατάστασης, καθώς και μεταξύ ουδετεροφίλων ασθενών και υγιών μαρτύρων.

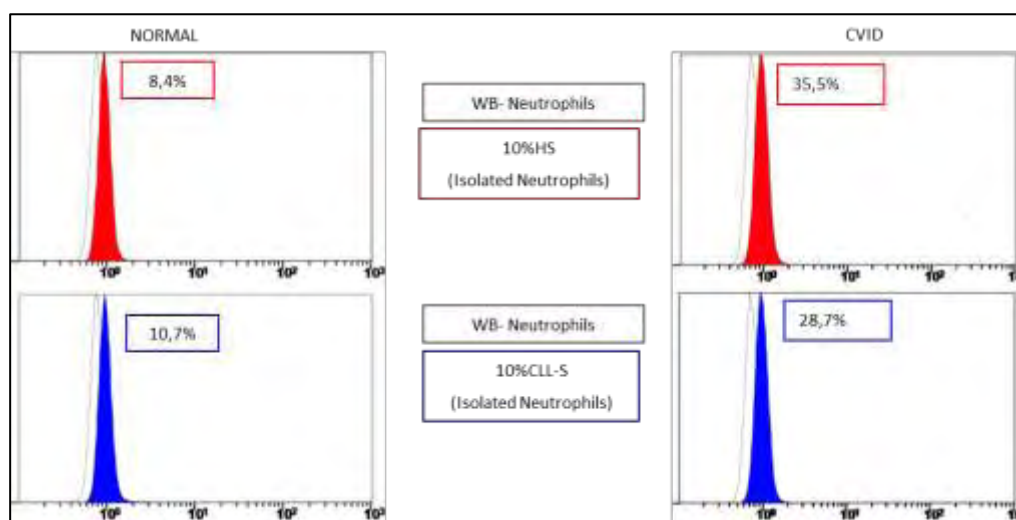
Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε εάν υπάρχουν κάποιοι διαλυτοί παράγοντες στον ορό ασθενών με Β-ΧΛΛ, που προκαλούν από μόνοι τους την ενεργοποίηση του STAT5 και αν αυτοί μπορούν να επάγουν την ενεργοποίησή του σε ουδετερόφιλα ασθενών με CVID. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρική αξιολόγηση των επιπέδων του p-STAT5 σε απομονωμένα ουδετερόφιλα από το περιφερικό αίμα, ασθενών με CVID και υγιών μαρτύρων, μετά από καλλιέργεια 4 ωρών, παρουσία ανθρώπινου φυσιολογικού ορού (NHS) ή με ορό ασθενών με Β-ΧΛΛ (CLL-S). Χρησιμοποιήθηκαν οροί από δύο διαφορετικούς ασθενείς με ΧΛΛ, έτσι ώστε να αξιολογηθούν τυχόν διαφορές.



**Εικόνα 7:** Έκφραση p-STAT5 σε ουδετερόφιλα φυσιολογικών μαρτύρων και ασθενών με CVID. Η αξιολόγηση των επιπέδων πραγματοποιείται σε ουδετερόφιλα ολικού περιφερικού αίματος αλλά και σε απομονωμένα ουδετερόφιλα, μετά από καλλιέργεια παρουσία NHS ή CLL-S. WB= ολικό αίμα, NHS= ανθρώπινος φυσιολογικός ορός, CLL-S= ορός ασθενών με Β-ΧΛΛ, NORMAL= φυσιολογικός μάρτυρας, CVID BEFORE TREATMENT= ασθενής με CVID χωρίς θεραπεία υποκατάστασης, CVID AFTER TREATMENT= ασθενής με CVID υπό θεραπεία υποκατάστασης. Σε κάθε περίπτωση απεικονίζεται η έκφραση (μπλε χρώμα), σε σύγκριση με το ισotypικό (λευκό χρώμα).

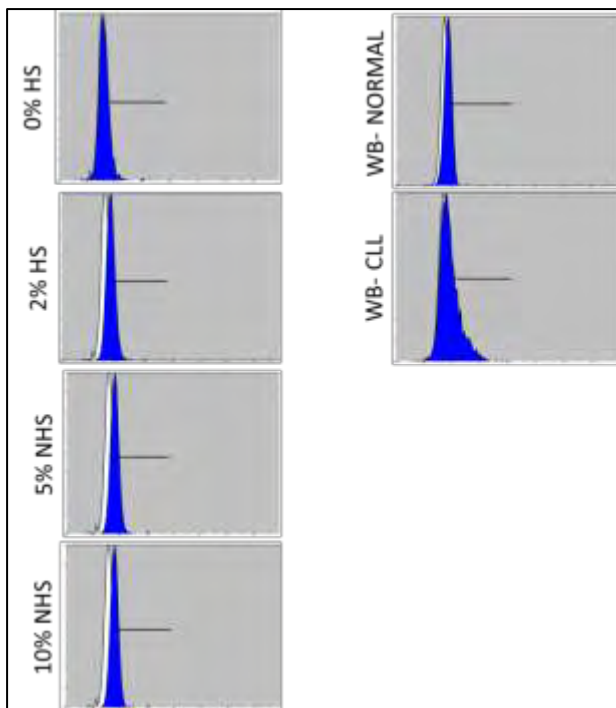
Οι παρατηρήσεις είναι οι εξής:

- 1) Δεν παρατηρείται ουσιαστική μεταβολή στην έκφραση του p-STAT5, μεταξύ των ασθενών (πριν τη θεραπεία και μετά τη θεραπεία), ενώ δεν διαπιστώνεται διαφορά συγκριτικά με τα επίπεδα των υγιών μαρτύρων.
- 2) Όταν χρησιμοποιείται ως διεγέρτης NHS ή B-CLL-ορός, το STAT5 δεν φαίνεται να ενεργοποιείται, ακόμα και όταν χρησιμοποιείται ορός CLL με προέλευση από διαφορετικούς ασθενείς.
- 3) Στις συνθήκες καλλιέργειας, φαίνεται να υπάρχει μια μικρή μετατόπιση στα επίπεδα του p-STAT5 συγκριτικά με το ολικό αίμα.



**Εικόνα 8:** Σύγκριση επιπέδων p-STAT5 απομονωμένων ουδετεροφίλων (isolated neutrophils) ασθενών και μαρτύρων μετά από καλλιέργειά τους παρουσία HS και CLL-S και ουδετεροφίλων ολικού περιφερικού αίματος (WB- Neutrophils). (Λευκό: Ουδετερόφιλα ολικού αίματος, Κόκκινο: Ουδετερόφιλα σε καλλιέργεια παρουσία ανθρώπινου φυσιολογικού ορού-HS, Μπλε: Ουδετερόφιλα σε καλλιέργεια παρουσία ορού από ασθενή με Β-ΧΛΛ (CLL-S)).

Βασίζόμενοι στην παρατήρηση ότι το STAT5 ενεργοποιείται στα απομονωμένα ουδετερόφιλα μετά από καλλιέργεια 4 ωρών, εξετάσαμε το ενδεχόμενο της συσχέτισης αυτής της ενεργοποίησης με τη συγκέντρωση του ορού. Για το σκοπό αυτό ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης του STAT5 σε απομονωμένα ουδετερόφιλα φυσιολογικού μάρτυρα συναρτήσει διαφόρων συγκεντρώσεων NHS (0%, 2%, 5%, 10%). Και σε αυτήν την πειραματική δοκιμασία δεν διαπιστώθηκε ουσιαστική μεταβολή στην έκφραση του STAT5. Φαίνεται δηλαδή ότι η συγκέντρωση του ορού δεν αποτελεί καλλιεργητική συνθήκη η οποία επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του p-STAT5 σε ουδετερόφιλα φυσιολογικού μάρτυρα.



Εικόνα 9: Έκφραση p-STAT5 σε απομονωμένα ουδετερόφιλα φυσιολογικού μάρτυρα, μετά από καλλιέργειά τους παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ανθρώπινου φυσιολογικού ορού (HS). Σύγκριση επιπέδων p-STAT5 σε ουδετερόφιλα περιφερικού αίματος ασθενούς με Β-ΧΛΛ (WB-CLL) και φυσιολογικού μάρτυρα (WB-NORMAL). (Λευκό: έκφραση ιστοτυπικού αντισώματος, Μπλε: έκφραση p-STAT5).

## IX. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### IX.1. Η NETosis σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες

Τα δεδομένα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι οι ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες παρουσιάζουν υπέρμετρη NETosis, ανεξάρτητα από την υποκείμενη αιτιολογία της ανεπάρκειας και ικανότητα περεταίρω επαγωγής του φαινομένου, μετά από επίδραση με PMA. Ειδικά ασθενείς με CVID, σαρκοείδωση και με αντισωματική ανεπάρκεια αγνώστου αιτιολογίας στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί ενδοφλέβια σφαιρίνη, παρουσίασαν υψηλά ποσοστά NETs, φαινόμενο το οποίο παρουσίασε επαναληψιμότητα. Παρόλ'αυτά σε ασθενή με εκλεκτική ανεπάρκεια IgA, διαπιστώθηκαν φυσιολογικά επίπεδα NETs. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα χαμηλά επίπεδα της IgG είναι αυτά που σχετίζονται πιθανά με την παρουσία αθρόας NETosis σε ουδετερόφιλα ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες αν και κρίνεται σκόπιμο να επαναληφθεί η δοκιμασία σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με IgAD, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εν λόγω παρατήρηση.

Όταν έγινε αξιολόγηση του φαινομένου σε ασθενείς με λοιμώξεις βακτηριακής και ιογενούς αιτιολογίας, διαπιστώθηκε ισχυρή επαγωγή του, ανεξάρτητα του τύπου της λοίμωξης, ενισχύοντας την υπόθεση ότι αυτός ο τύπος κυτταρικού θανάτου των ουδετεροφίλων συμμετέχει ενεργά σε κάποιο βαθμό τουλάχιστον στην ανοσιακή άμυνα έναντι εισβαλλόντων παθογόνων<sup>17</sup>. Αυτή η παρατήρηση μας οδηγεί στη διατύπωση της υπόθεσης ότι η αθρόα NETosis των ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες οφείλεται πιθανά στην παρουσία επαναλαμβανόμενων και υποτροπιάζουσών λοιμώξεων και/ή στην χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση. Πράγματι οι τρεις ασθενείς που μελετήθηκαν, παρουσίαζαν υψηλές τιμές CRP (ενδεικτικό φλεγμονής και πιθανής λοίμωξης), κατά την πρώτη αξιολόγηση.

Παρόλ' αυτά ο ένας εξ αυτών που έπασχε από CVID, όταν επαναξιολογήθηκε σε δεύτερο χρόνο χωρίς να έχει προηγηθεί θεραπεία υποκατάστασης (IVIg/SCIG), παρουσίασε φυσιολογικές τιμές CRP στον ορό. Τα επίπεδα της IgG διαπιστώθηκαν και πάλι εξαιρετικά χαμηλά, ενώ παρουσίασε υψηλά ποσοστά της NETosis. Η ασθενής που έπασχε από σαρκοείδωση αξιολογήθηκε σε δεύτερο χρόνο ένα μήνα μετά από τη χορήγηση IVIg. Τα επίπεδα της CRP στον ορό είχαν επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα αλλά η IgG στον ορό ήταν στα ίδια περίπου χαμηλά επίπεδα με την πρώτη αξιολόγηση. Η NETosis που επέδειξαν τα ουδετερόφιλα της ασθενούς *in vitro* χωρίς διέγερση συνέχιζε να είναι υψηλή, αν και χαμηλότερη συγκριτικά με

την πρώτη αξιολόγηση. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι η εκδήλωση υψηλών ποσοστών NETosis σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες, κατά πάσα πιθανότητα δεν σχετίζεται με τα επίπεδα της CRP στον ορό.

Όταν το φαινόμενο αξιολογήθηκε σε ασθενείς υπό θεραπεία υποκατάστασης παρατηρήθηκε επαναφορά των ποσοστών των NETs, στα επίπεδα των φυσιολογικών μαρτύρων. Αυτό το φαινόμενο πιθανά σχετίζεται με τη βελτίωση της γενικότερης κλινικής εικόνας των ασθενών λόγω της θεραπείας. Παρόλ' αυτά μετά από διέγερση των ουδετεροφίλων των ασθενών με PMA, διαπιστώθηκε αδυναμία επαγωγής της NETosis. Αυτό υποδεικνύει ότι πιθανά μετά τη χορήγηση IVIG ή SCIG η ικανότητα των ουδετεροφίλων να σχηματίζουν NETs μετά από επίδραση με PMA καταστέλλεται σημαντικά, μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος είναι άγνωστος. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εμπλέκει το μονοπάτι ενεργοποίησης της PKC από την οξειδάση του NADPH, το οποίο αποτελεί και στόχο του PMA.

Προκειμένου να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση κρίνεται σκόπιμη η επίδραση και με άλλους παράγοντες επαγωγής NETosis σε ουδετερόφιλα ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες οι οποίοι βρίσκονται υπό θεραπεία υποκατάστασης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας ασθενής με CVID που λάμβανε θεραπεία υποκατάστασης αλλά και θεραπεία κορτιζόνης λόγω αυτοάνοσης εκδήλωσης, αξιολογήθηκε ενώ λάμβανε κορτιζόνη και σε δεύτερο χρόνο μετά από διακοπή χορήγησής της. Ενώ λάμβανε κορτιζόνη παρουσίασε ποσοστά NETosis χωρίς επίδραση και μετά από επίδραση με PMA, 2% και 4% αντίστοιχα. Μετά τη διακοπή της κορτιζόνης και ενώ συνέχιζε να λαμβάνει IVIG τα ποσοστά NETosis ανήλθαν στα 7% και 18% αντίστοιχα. Διαπιστώνουμε λοιπόν την επίδραση της κορτιζόνης σε συνδυασμό με την IVIG στο φαινόμενο της NETosis, όπου *in vivo* δρα κατασταλτικά στην ικανότητα των ουδετεροφίλων να σχηματίσουν NETs μετά από επίδραση με PMA *in vitro*. Μετά την παύση χορήγησής της τα ουδετερόφιλα επέδειξαν ικανότητα διέγερσης (Επισήμανση: Στη μελέτη του φαινομένου της NETosis σε ασθενείς με θεραπεία υποκατάστασης αξιολογήθηκε μόνο η μέτρηση μετά την παύση χορήγησης κορτιζόνης).

Όπως προαναφέρθηκε η δράση της IVIG *in vivo* καταστέλλει την ικανότητα των ουδετεροφίλων να σχηματίζουν NETs μετά από επίδραση με PMA. Όταν όμως μελετήθηκε η *in vitro* δράση της, οδηγηθήκαμε σε αντίθετα συμπεράσματα, καθώς παρατηρήθηκε περεταίρω επαγωγή του φαινομένου. Μια εξήγηση μπορεί να αποτελεί η χρονικότητα των γεγονότων καθώς στην περίπτωση των ασθενών προηγείται η επίδραση των ουδετεροφίλων με IVIG, η οποία μεταβάλλει πιθανά τη φυσιολογία των ουδετεροφίλων και έπεται η διέγερσή τους με PMA ως «δεύτερο χτύπημα» (second hit), αδυνατώντας να ενεργοποιήσει την παραγωγή των ROS, που είναι προαπαιτούμενο για την επαγωγή της NETosis από το PMA. Όταν όμως η χρονικότητα της δράσης των δύο παραγόντων ταυτίζεται, δρουν με συνέργεια, όπου η IVIG «ενισχύει» την

επαγωγή του καταρράκτη μεταγωγής σήματος για την ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH, τον επακόλουθο σχηματισμό των ROS και εν τέλει τον σχηματισμό των εξωκυττάρων ουδετεροφιλικών δικτύων χρωματίνης. Από την άλλη, τα αντιφατικά αποτελέσματα μπορεί να έχουν τη βάση τους στο γεγονός ότι από τη μια η δράση της σφαιρίνης λαμβάνει χώρα *in vivo* όπου πιθανά στη δράση της συμμετέχουν και άλλα στοιχεία του ανοσιακού συστήματος, είτε αυτά αφορούν σε κύτταρα του ανοσιακού συστήματος είτε σε παράγωγά τους. Απουσίας του συνόλου αυτών των αλληλεπιδράσεων στο απομονωμένο σύστημα της καλλιέργειας των ουδετεροφίλων, το φαινόμενο φαίνεται να λαμβάνει αντίθετη τροπή. Εξάλλου η IVIG χρησιμοποιείται ως ανοσοτροποποιητικό μόριο και σε άλλα νοσήματα, όπου ο μηχανισμός δράσης της είναι άγνωστος.

Είναι γνωστό ότι υψηλές δόσεις της IVIg καταστέλλουν τη δραστηριότητα δένδριτικών κυττάρων, λεμφοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων, μονοκυττάρων και μακροφάγων, ενώ επίσης ρυθμίζουν τη σύνθεση κυτταροκινών και του συστήματος του συμπληρώματος. Οι λίγες δημοσιευμένες μελέτες για την επίδραση της IVIg στα ουδετερόφιλα έχουν καταλήξει σε συγκρουόμενα αποτελέσματα. Κάποιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι η IVIg από μόνη της διεγείρει την αποκοκκίωση των ουδετεροφίλων, ενώ άλλοι περιγράφουν αύξηση στα αποπτωτικά ουδετερόφιλα, τα οποία επιδεικνύουν χαμηλότερη προφλεγμονώδη δραστηριότητα. Έχει προταθεί επίσης ότι η IVIg μπορεί να δρα σαν ανοσορρυθμιστικός παράγοντας παρεμποδίζοντας την επαγόμενη από ερέθισμα αποκοκκίωση και την επιβίωση των ουδετεροφίλων. Παρόλ' αυτά οι Jarius και συν. ανέφεραν μια διεγερτική επίδραση της IVIg στην οξειδωτική έκρηξη των ουδετεροφίλων σε απόκριση στον TNF.

Η θεραπεία υποκατάστασης με ανοσοσφαιρίνη μειώνει σημαντικά την εμφάνιση λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού και πνευμονίας σε ασθενείς με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες<sup>59</sup>. Παρόλο που είναι γνωστό ότι η IVIg περιέχει αντισώματα ενάντια σε διάφορα παθογόνα, η ωφέλιμη δράση της μπορεί να μην περιορίζεται μόνο στην ουδετεροποίηση των παθογόνων. Φυσικά αντισώματα τα οποία είναι παρόντα στην IVIg υποβοηθούν την οψωνοποίηση και γι' αυτό προωθούν τη φαγοκυττάρωση και την κυτταροτοξικότητα η οποία μεσολαβείται από αντισώματα. Το δεύτερο επίπεδο της ευεργετικής δράσης μπορεί να έγκειται στην καταστολή της φλεγμονής μέσω της παρεμπόδισης της στρατολόγησης των ουδετεροφίλων<sup>75</sup>.

Η αθρόα NETosis, δηλαδή η εμμένουσα παραμονή τους-αδυναμία απομάκρυνσής τους από την κυκλοφορία ή από τους ιστούς συνεπάγεται την παρατεταμένη δράση πρωτεασών και άλλων τοξικών για τον οργανισμό συστατικών τους και την χρόνια επαγωγή ή επιδείνωση της φλεγμονής<sup>76-79</sup>. Επιπλέον υπερβάλλουσα NETosis συνεπάγεται τη χρόνια έκθεση αυτοαντιγόνων, γεγονός που αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την επαγωγή αυτοανοσίας. Τέλος η NETosis έχει συσχετισθεί με κακοήθεια και λεμφοϋπερπλασία<sup>80</sup>. Όλα τα παραπάνω

αποτελούν κλινικές επιπλοκές της COVID, γι' αυτό κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση της συμβολής του φαινομένου της NETosis στην εκδήλωση κλινικών φαινοτύπων της νόσου, στο μέλλον.

Από την άλλη έχει δειχθεί ότι τα συσσωματώματα των NETs μπορούν και επιδεικνύουν αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της αποδιάταξης κυτταροκινών και χημειοκινών από τις υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεασών που φέρονται στο ικκρίωμα<sup>34</sup>. Κατ' αυτό τον τρόπο μπορεί να συμβάλλουν υπό συνθήκες<sup>81</sup> και στην καταστολή της οξείας φλεγμονώδους απάντησης που εκδηλώνεται σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες, επιπρόσθετα της αντιμικροβιακής δράσης που επιδεικνύουν εκ των πραγμάτων.

Η δράση των NETs μπορεί να είναι ωφέλιμη ή επιβλαβής για τον οργανισμό, ανάλογα με το προς τα πού είναι μετατοπισμένη η δυναμική ισορροπία σχηματισμού και αποδιάταξής τους, ισορροπία η οποία φαίνεται να υπόκειται σε λεπτή ρύθμιση και η οποία εξαρτάται από το εκάστοτε μικροπεριβάλλον εκδήλωσης του φαινομένου.

Διαπιστώνεται λοιπόν ότι ο ρόλος των NETs πρέπει να διερευνηθεί στα πλαίσια των ευρύτερων διαλεκτικών αλληλεπιδράσεων των κυτταρικών αλλά και των μη-κυτταρικών στοιχείων του ανοσιακού συστήματος.

### **IX.1.1. Θέματα προς διερεύνηση**

Η NETosis αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλές διεργασίες του ανοσοποιητικού συστήματος, είτε αυτές αφορούν σε φυσιολογικές αποκρίσεις, είτε εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία διάφορων νόσων. Από τα μέχρι τώρα δεδομένα ανακύπτουν πολλά ερωτήματα όπως π.χ. κατά πόσον ο υπέρμετρος σχηματισμός και/ή η μειωμένη αποικοδόμηση των NETs σχετίζονται με τις οξείες και χρόνιες φλεγμονές και με ορισμένα αυτοάνοσα νοσήματα. Ένα ενδιαφέρον πεδίο αποτελεί η φαινοτυπική και λειτουργική διάκριση των NETs, το κατά πόσον δηλαδή αυτά σχηματίζονται ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα και η ταυτοποίηση των ερεθισμάτων αυτών σε συνάρτηση και συσχέτιση με το στόχο δράσης των NETs. Πρέπει επίσης να ολοκληρωθεί η ταυτοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των NETs και η διερεύνηση της ειδικότητάς τους σε κάθε νόσο. Τέλος ένα άλλο ζήτημα αποτελεί η ολοκλήρωση του χαρακτηρισμού του σχηματισμού και του ρόλου τους, *in vivo* καθώς οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε *in vitro* συστήματα.

Οι μέχρι τώρα μελέτες όσον αφορά στα NETs, οδηγούν στην πιθανή επανανομηματοδότηση του ρόλου του ουδετερόφιλου στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς φαίνεται να διαμορφώνεται μια νέα ταυτότητα για το κύτταρο αυτό. Είναι πιθανόν το ουδετερόφιλο να «εκπαιδεύεται» στην

πορεία της ύπαρξής του και ο τρόπος δράσης του να αφορά εν τέλει μια προσαρμοστική διαδικασία, ανατρέποντας τα μέχρι τώρα δεδομένα για την «φυσική» ανοσία.

## **IX.2. Ενεργοποίηση STAT5 σε ουδετερόφιλα ασθενών με COVID**

Τα δεδομένα μελέτης του STAT5, επιβεβαιώνουν το εύρημα ότι είναι ενεργοποιημένο σε ουδετερόφιλα ασθενών με Β-ΧΛΛ. Συμπεραίνεται ότι οι διαλυτοί παράγοντες στον ορό ασθενών με Β-ΧΛΛ, δεν προκαλούν ενεργοποίηση του STAT5, τουλάχιστον όχι από μόνοι τους, καθώς όταν χρησιμοποιήθηκε ως διεγέρτης ο ορός, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές των επιπέδων του p-STAT5. Το αίτιο για την ενεργοποίηση του STAT5 σε ουδετερόφιλα ασθενών με Β-ΧΛΛ μπορεί να έγκειται στην αλληλεπίδραση των ουδετεροφίλων με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ή να απαιτεί την ταυτόχρονη επίδραση κυτταρικού ερεθίσματος και διαλυτού παράγοντα, ή τέλος να πρόκειται για ενδογενές φαινόμενο των ουδετεροφίλων αυτών καθ'αυτών. Τέλος η αύξηση των επιπέδων του p-STAT5, σε ουδετερόφιλα που υποβλήθηκαν σε καλλιέργεια, αποτελεί φαινόμενο που οφείλεται σε πιθανή καταπόνησή τους κατά τη διαδικασία της απομόνωσής ή στο περιβάλλον της καλλιέργειας.

Για την μελέτη της ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων των ασθενών με πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες, μέσω κυτταρομετρίας ροής, κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση άλλων δεικτών, όπως το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης CD62L (σελεκτίνη).



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection* 2003; 5:1299–1306.
2. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 2002; 14: 136–145.
3. Ciz M, Denev P, Kratchanova M, Vasicek O, Ambrozova G, Lojek A. Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 2012: 181295.
4. Arruda MA, Barja-Fidalgo C. NADPH oxidase activity: in the crossroad of neutrophil life and death. *Frontiers in Bioscience*. 2009; 14: 4546–4556.
5. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*; 1999: 232, 3–14.
6. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews*.2007; 219: 88–102.
7. Weinrauch Y *et al.* Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*. 2002; 417: (6884), 91–94.
8. Belaouaj A *et al.* Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase. *Science* 2000 ;289: (5482), 1185–1188.
9. Foreman-Wykert, AK *et al.* Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram positive bacteria. *The Journal of clinical investigation*1999; 103: (5), 715–721.
10. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L,. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation* 2000; 80: 617–653.
11. Pruchniak MP, Arazna M, Demkow U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2013; 187 (): 68– 73.
12. Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C, et al.. G-CSF-stimulated Neutrophils Are a Prominent Source of Functional BLyS. *J. Exp. Med.* 2003 ; 197(3): 297-302.
13. Puga I, Cols M , Barra CM , He B , Cassis L , Gentile M. B cell- helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature Immunology* 2012 ; 13 (2): 170-180.

14. Beauvillain, C., Delneste, Y., Scotet, M., Peres, A., Gascan, H., Guermonprez, P., Barnaba, V., Jeannin, P., Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* 2007; 110: 2965–2973.
15. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303:1532–1535.
16. Chuammitri, P., J. Ostojčić, C.B. Andreasen, S.B. Redmond, S.J. Lamont, and D. Palić. 2009. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129:126–131.
17. Brinkmann V, Zychlinsky A: Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 577–582
18. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozłowski E et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 2008; 14:949–953.
19. Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 2008; 111: 3070–3080.
20. Kaplan MJ and Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J Immunol* 2012; 189: 2689-2695.
21. Wen F, White, G.J. Van Etten, H.D., Xiong, Z., and Hawes, M.C. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol.* 2009; 151: 820–829.
22. Wartha F, Henriques-Normark B: ETosis: a novel cell death pathway. *Sci Signal* 2008; 1:pe25.
23. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, and Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 2007 ; 176(2): 231-241
24. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 2009; 114(13): 2619-2622.
25. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, and Arturo Zychlinsky. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010; 191 (3 ): 677-691.
26. Remijsen Q, Berghe TM, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al.. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Research* 2011; 21(): 290-304..

27. Mesa MA and Vasquez G. NETosis. *Hindawi Publishing Corporation Autoimmune Diseases* 2013; Volume 2013(Article ID 651497): 7 page.
28. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al.. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine* 2007; 13(4): 463-469.
29. Papayannopoulos V and Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology Vol.No.* 2009; 30 (11):
30. Urban C.F., Reichard U, Brinkmann V, Arturo Zychlinsky. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology* 2006; 8 (4): 668-676.
31. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, Guarnotta C, Cappetti B, Casalini P, et al.. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012 ; 120(15): 3007-3018.
32. Kessenbrock K, Krumbholz M, SchÄ¶nermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al.. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* doi:10.1038/nm.1959.; 15(6): 623-625.
33. Knight JK, Carmona-Rivera C and Kaplan MJ. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Frontiers In Immunology* 2012; 3(380): 1-12.
34. Schauer C., Janko C., Munoz L.E., Zhao Y., Kienhfer D., Frey B., et al.,. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature Medicine* 2014; doi:10.1038/nm.3547.
35. Bournazou I *et al.* Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 20–32
36. Elliott MR *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009; 461: 282–286.
37. Gathmann B, Grimbacher B, Beate J, et al. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: Results 2006–2008. *Clin. Exp. Immunol.* 2009; 157(Suppl 1): 3–11.
38. Janeway C, Apt, L, and Gitlin D. Agammaglobulinemia. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1953; 66: 200–202.
39. Cooper, M. D., Faulk, W. P., Fudenberg, H. H., *et al.* Classification of primary immunodeficiencies. *N. Engl. J. Med.* 1973; 288(18): 966–967.

40. Conley ME, Notarangelo LD, and Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin. Immunol.* 1999; 93(3): 190–197.
41. Yong PFK, Thaventhiran JED, and Grimbacher B. “A Rose is a Rose is a Rose,” but CVID is Not CVID: Common Variable Immune Deficiency (CVID), What do we Know in 2011?. *Advances in Immunology* 2011; 111(Chapter 12): . DOI: 10.1016/B978-0-12-385991-4.00002-7
42. Chapel H, and Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br. J. Haematol.* 2009;145(6): 709–727.
43. Kanegane, H., Tsukada, S., Iwata, T., *et al.* Detection of Bruton’s tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 120(3): 512–517.
44. Sigmon JR, Kasasbeh E, and Krishnaswamy G. X-linked agammaglobulinemia diagnosed late in life: Case report and review of the literature. *Clin. Mol. Allergy* 2008; 6: 5.
45. Kracker S, Gardes P, Mazerolles F, and Durandy A. Immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Clin. Immunol.* 2010; 135(2): 193–203.
46. Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, *et al.* Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 2006; 107(8): 3045–3052.
47. Eastwood D, Gilmour KC, Nistala K, *et al.* (). Prevalence of SAP gene defects in male patients diagnosed with common variable immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 137(3):584–588.
48. Gomes Ochtrop ML, Goldacker S, May AM, *et al.* T- and B-lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood.* 2011; 118: 309–318.
49. Mullighan CG, Fannin GC, Chapel HM, and Welsh KI. TNF and lymphotoxin- alpha polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: Role in the pathogenesis of granulomatous disease. *J. Immunol.* 1997; 159(12): 6236–6241.
50. Chua I, Quinti I, and Grimbacher B. Lymphoma in common variable immunodeficiency: Interplay between immune dysregulation, infection and genetics. *Curr. Opin. Hematol.* 2008; 15(4): 368–374.
51. Busse PJ, Razvi SF, and Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109(6): 1001–1004.

52. Chapel HM, Spickett GP, Ericson D, Engl W, Eibl MM, and Bjorkander J. The comparison of the efficacy and safety of intravenous versus subcutaneous immunoglobulin replacement therapy. *J. Clin. Immunol.* 2000; 20(2): 94–100
53. Knight AK, Cunningham-Rundles C. Inflammatory and autoimmune complications of common variable immune deficiency. *Autoimmunity Reviews* 2006; 5: 156–159.
54. Bonilla FA and Geha RS. Common Variable Immunodeficiency. *Pediatric Research* 2009; 65(5): 13R-19R.
55. Pan-Hammarstrom Q, Hammarstrom L. Antibody deficiency diseases. *Eur J Immunol* 2008; 38:327–333
56. Conley ME. Genetics of hypogammaglobulinemia: What do we really know? *Curr Opin Immunol.* 2009; 21:466–471.
57. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F *et al.* TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *J Clin Immunol* 2011; 31:550–559.
58. Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency. *Scand J Immunol* 2000; 51:111–122.
59. Σπελέτας Μ.Γ. , Γερμενής Α.Ε. . Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες στους ενήλικες. Σύγχρονη κλινική προσέγγιση. *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής* 2013; 30(4): 420-435.
60. Cerutti A, Chen K & Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu. Rev. Immunol.* 2011; 29: 273 – 293.
61. Litinskiy MB *et al.* DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL . *Nat. Immunol.* 2002; 3: 822 – 829
62. Theodorou M, Speletas M, Mamara A, Papachristopoulou G, Lazou V, *et al.* Identification of a STAT5 Target Gene, Dpf3, Provides Novel Insights in Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE* 2013; 8(10): e76155. doi:10.1371/journal.pone.0076155.
63. Brinkmann V., Laube B., Abu Abed U., Goosmann C., Zychlinsky A.. Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. *JoVE.* 2010; 36: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1724>, doi: 10.3791/1724 (accessed ).
64. Casulli S, TopcÂ,u S, Fattoum L, von Gunten S, Simon H-U, Teillaud J-L, *et al.* A Differential Concentration-Dependent Effect of IVIg on Neutrophil Functions: Relevance for Anti-Microbial and Anti-Inflammatory Mechanisms. *PLoS ONE* 2011; 6(10): e26469. doi:10.1371/journal.pone.0026469.
65. Simon HU, Spath PJ. IVIG–mechanisms of action. *Allergy* 2003; 58: 543–552.

66. Tha-In T, Bayry J, Metselaar HJ, Kaveri SV, Kwekkeboom J. Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol* 2008; 29: 608–615.
67. Seite JF, Shoenfeld Y, Youinou P, Hillion S. What is the contents of the magic draft IVIg? *Autoimmun Rev* 2008; 7: 435–439.
68. Maddur MS, Kaveri SV, Bayry J. Comparison of different IVIg preparations on IL-17 production by human Th17 cells. *Autoimmun Rev* 2011; 10(12): 809–810.
69. Teeling JL, De Groot ER, Eerenberg AJ, Bleeker WK, Van Mierlo G, *et al.* Human intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations degranulate human neutrophils in vitro. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 264–270.
70. von Gunten S, Schaub A, Vogel M, Stadler BM, Miescher S, *et al.* Immunologic and functional evidence for anti-Siglec-9 autoantibodies in intravenous immunoglobulin preparations. *Blood* 2006; 108: 4255–4259.
71. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR. Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 2003; 170: 3357–3368.
72. van Mirre E, Teeling JL, van der Meer JW, Bleeker WK, Hack CE () Monomeric IgG in intravenous Ig preparations is a functional antagonist of FcγRII and FcγRIIIb. *J Immunol* 2004; 173: 332–339.
73. Takeshita S, Tsujimoto H, Nakatani K. Intravenous immunoglobulin preparations promote apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils via an oxygen-dependent pathway in vitro. *APMIS* 2005; 113: 269–277.
74. Jarius S, Eichhorn P, Albert MH, Wagenpfeil S, Wick M, *et al.* Intravenous immunoglobulins contain naturally occurring antibodies that mimic antineutrophil cytoplasmic antibodies and activate neutrophils in a TNF-α dependent and Fc-receptor-independent way. *Blood* 2007; 109: 4376–4382.
75. von Gunten S., Simon H-U. Cell Death Modulation by Intravenous Immunoglobulin. *J Clin Immunol* 2010; 30 (Suppl 1): S24-S30.
76. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, *et al.* Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis* 2013; (). doi:10.1136/annrheumdis-2013-203430 (accessed ).
77. Fuchs, T.A., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D.D. Myers Jr., S.K. Wroblewski, T.W. Wakefield, J.H. Hartwig, and D.D. Wagner. 2010. Extracellular DNA

traps promote thrombosis. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 107:15880–15885.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005743107>

78. Almyroudis NG, Grimm MJ, Davidson BA, Röhm M, Urban CF and Segal BH. NETosis and NADPH oxidase: at the intersection of host defense, inflammation, and injury.. *Frontiers In Immunology* 2013; 4(45 ): 1-7.

79. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, Kourtzelis I, *et al.* Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 $\beta$  and autophagy-related signaling in gout. *PloS one.* 2012; 6(12):e29318

80. Sangaletti S, Tripodo C, Vitali C, *et al.* Defective Stromal Remodeling and Neutrophil Extracellular Traps in Lymphoid Tissues Favor the Transition from Autoimmunity to Lymphoma. *Cancer Discovery* 2014; 4: 110-129.

81. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A. *et al.* Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 $\beta$ -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2014; doi:10.1136/annrheumdis-2014-205958