



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ
ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 1

ΑΣΗΜΙΝΑ Ν. ΠΕΤΣΙΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ
ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 1

ΑΣΗΜΙΝΑ Ν. ΠΕΤΣΙΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Πέτσιου Ασημίνας: 3-3-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 638^α/3-6-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Τσατσούλης Αγαθοκλής, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας

Μέλη

Παπαδόπουλος Γεώργιος Καθηγητή Γεωργικής Χημείας και Φυσικής Τ.Ε.Ι. Ηπείρου –
Ερευνητής

Βούλγαρη Παρασκευή Επίκουρη Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-6-2008

«Μελέτη των Τ ρυθμιστικών κυττάρων σε συγγενείς ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1».

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 788^α/31-5-2016

1. Τσατσούλης Αγαθοκλής, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Γεωργίου Ιωάννης Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Δρόσος Αλέξανδρος, Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Παπαδόπουλος Γεώργιος Καθηγητή Γεωργικής Χημείας και Φυσικής Τ.Ε.Ι. Ηπείρου – Ερευνητής
5. Βούλγαρη Παρασκευή Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Τζαβάρας Θεόδωρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Τίγκας Στυλιανός, Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 10-6-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Σε εκείνους που τους έλειπα και
σε εκείνον που μου λείπει

"Και εμείς οι ίδιοι αισθανόμαστε πως αυτό που κάνουμε είναι σταγόνα στον ωκεανό. Αλλά ο
ωκεανός θα ήταν μικρότερος αν έλειπε αυτή η σταγόνα."

Μητέρα Τερέζα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Ερευνητική Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Επιβλέπων της διατριβής ήταν ο Καθηγητής Παθολογίας – Ενδοκρινολογίας κ. Αγαθοκλής Τσατσούλης. Είχα την τύχη και την τιμή να με εμπιστευτεί με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος για τη διατριβή μου, και να με φέρει σε επαφή με τους συνεργάτες του. Πάντα υπήρξε διαθέσιμος και σημαντικός αρωγός σε οποιοδήποτε εμπόδιο εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, κυρίως σε επίπεδο κλινικής πράξης. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συνεργασία μας, η οποία υπήρξε άπογη και δημιουργική.

Οι θερμές ευχαριστίες δεν αρκούν για τον Καθηγητή Τ.Ε.Ι. Ηπείρου κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο, μέλους της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Υπήρξε ο καθοδηγητής μου σε κάθε βήμα εκπόνησης της διατριβής. Το απίστευτο θεωρητικό του υπόβαθρο συνετέλεσε στη βελτίωση κάθε σταδίου της διατριβής, από τη συγγραφή του πρωτόκολλου, τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους έως και την τελική συγγραφή. Τον ευχαριστώ εκτός από τον κόπο του, για την προθυμία, τη διαθεσιμότητα και τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε. Τον ευχαριστώ και για τη στήριξή του σε προσωπικό επίπεδο όλα αυτά τα χρόνια καθώς για μένα υπήρξε κάτι παραπάνω από δάσκαλος.

Το ευχαριστώ μου ακούγεται φτωχό για κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, επιστημονικό υπεύθυνο της Μονάδας Μοριακής Βιολογίας. Υπήρξε για μένα η αφετηρία σε μια δύσκολη μεταβατική περίοδο της ζωής μου. Μου έδειξε τυφλή εμπιστοσύνη, μου παρείχε σπουδαίες ευκαιρίες και πολύτιμη στήριξη από την πρώτη μέρα της συνεργασίας μας. Η μύηση μου στον κόσμο της κυτταρομετρίας ροής και της βασικής επιστήμης, η υπομονή και ο ενθουσιασμός που μου εμφύσησε είναι λίγα από τα εφόδια τα οποία αποκόμισα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο. Ο ίδιος, μαζί με τους συνεργάτες του την Ελένη Μπαράκου, τον Αχιλλέα Καραμούτσιο και την Κατερίνα Χατζηγιάννη αποτελούν για μένα ανθρώπους με τους οποίους η συνεργασία μας ξεπέρασε το επαγγελματικό επίπεδο και αποτελούν πολύτιμους συνοδοιπόρους της ζωής μου.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω και τη Λίνα Πάσχου, που ήταν η πρώτη στο εργαστήριο που ασχολήθηκε με τα T ρυθμιστικά κύτταρα (Τρυθμ) στο διαβήτη, για τη σπουδαία συνεργασία μας και τις πολύτιμες συμβουλές της. Να ευχαριστήσω ακόμη και τον κ. Νικόλαο Κολαίτη, διευθυντή του Αιματολογικού Εργαστηρίου του ΠΓΝΙ για τη συνεργασία και την υλικότεχνική υποστήριξη. Επιπλέον, την κ. Ελευθερία Ζερβού, διευθύντρια της Αιμοδοσίας του ΠΓΝΙ, τους γιατρούς και τους νοσηλευτές της ενδοκρινολογικής και παιδιατρικής κλινικής ΠΓΝΙ για την διευκόλυνση στην ανεύρεση εθελοντών. Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συγγενείς διαβητικών και τους υγιείς εθελοντές που συμμετείχαν στην έρευνα με μοναδικό όφελος τη συμβολή έστω και στο ελάχιστο στον αγώνα για την αντιμετώπιση του Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1 (ΣΔ1).

Θερμές ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στο Ίδρυμα Μποδοσάκη για τη χρηματοδότηση τα πρώτα χρόνια διενέργειας της διατριβής μου ώστε να μπορώ να ασχοληθώ απερίσπαστα με το αντικείμενο αυτό. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία για το βραβείο στα πλαίσια της επιστημονικής μου εργασίας στο European Association in the Study of Diabetes (EASD), καθώς και την Ευρωπαϊκή Διαβητολογική Εταιρεία για την χρηματοδότηση της συμμετοχής μου στο αντίστοιχο συνέδριο.

Τέλος, πως θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη συνεχή υλική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Ιδιαίτερη αναφορά, ωστόσο θέλω να κάνω στις «σουπερ γιαγιάδες» που αποτέλεσαν επάξιους αντικαταστάτες μου, τις ατελείωτες ώρες της συγγραφής και των διορθώσεων. Ωστόσο, τίποτε από όλα αυτά

δε θα ήταν πράξη χωρίς την υποστήριξη του υπέροχου συζύγου μου. Αν δεν άλλαζε και εκείνος τη ζωή του για να είμαστε μαζί, αν δεν έκανε υπομονή τις ατέλειωτες ώρες της απουσίας μου, αν δεν φρόντιζε τα παιδιά για να μπορεί «η μαμά να διαβάζει» και εάν δεν επέμενε ήπια και διακριτικά δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ*Ελληνικά*

ΑΣ= Ανοσολογική σύναψη

ΔΜΣ = Δείκτης μάζας σώματος

ΡΑ = Ρευματοειδή αρθρίτιδα

ΣΕΛ = συστηματικού ερυθματώδη λύκου

ΣΚΠ = σκλήρυνση κατά πλάκας

ΣΔ= Σακχαρώδης διαβήτης τύπου

Τρυθμ= Τρυθμιστικά λεμφοκύτταρα / T regulatory lymphocytes

Τδραστ = Τ δραστικά λεμφοκύτταρα / T effector lymphocytes

Τπαρθ = Τ παρθένα λεμφοκύτταρα / T naive lymphocytes

Αγγλικά

AICD = Activation induced cell death / θάνατο μετά από ενεργοποίηση

APC = Antigen-presenting cell / αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου

APECED = autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy

APS-1 = autoimmune polyendocrinopathy syndrome

aTregs = active Tregs/ ενεργοποιημένα Τρυθμ

BB rat = BioBreeding rat

CAMTA1 = calmodulin-binding transcription activator 1/ ενεργοποιητής της μεταγραφής που προσδέεται στην ασβεστιοτροποποιητίνη

CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DD = death domain / δομική περιοχή θανάτου

EAE =Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

FoxP3 = forkhead box P3

FSC = Forward Scatter Light / προςθίως σκεδαζόμενη ακτινοβολία

GADA = Glutamic acid decarboxylase autoantibodies / Αντισώματα κατά της

Αποκαρβοξυλάσης Γλουταμινικού Οξέος

GARP = Glycoprotein A-repetitions predominant protein

GITR = Glucocorticoid Induced TNFR family related gene/ γονίδιο σχετιζόμενο με την επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή οικογένεια TNFR)

HLA = Human Leukocyte Antigen

IAA = Insulin autoantibodies / Αυτοαντισώματα κατά της Ινσουλίνης

IA-2A = Islet Antigen 2 (IA-2) Antibody/ Αντισώματα έναντι οιωνεί τυροσυλοφωσφατάσης των νησιδίων 2((IA-2)

ICA = Islet cell autoantibody/ αντινησιδιακά αντισώματα

ICAM-1 = Intercellular Adhesion Molecule-1

IFN-γ = interferon gamma /ιντερφερόνη γ

IL-2= interleukin 2 / ιντερλευκίνη 2

IL-2Rα = IL-2 Receptor α subunit / αλυσίδα α του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2

IL-10= interleukin10/ ιντερλευκίνη 10

IPEX = immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked

iTregs = in vitro induced Tregs / επαγόμενα στο εργαστήριο

LADA = Latent autoimmune diabetes of adults / καθυστερημένης έναρξης αυτοάνοσο διαβήτη ενηλίκων

LFA = Lymphocyte function-associated antigen

MHC = major histocompatibility complex

MFI = Mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού
 MIF = Migration Inhibitory Factor / παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μονοκυττάρων
 MODY = maturity onset diabetes of the young / νεανικό διαβήτη με έναρξη σε ώριμη ηλικία
 NFAT = Nuclear factor of activated T-cells
 NOD = Non-obese diabetic mouse
 Non-Tregs = non-Tregs/ μη κατασταλτικά Τρυθμ.
 ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό
 nTregs = natural Tregs /φυσικά Τρυθμ
 PBMCs = Peripheral blood mononuclear cell/ μονοπύρηννα κυττάρα περιφερικού αίματος
 pHLA-II = peptide HLA-II/ σύμπλοκο αντιγονικού πεπτιδίου HLA-II
 pMHCII= peptide MHC II/ σύμπλοκο αντιγονικού πεπτιδίου MHC II
 PTPN = protein tyrosine phosphatase, non-receptor/ πρωτεϊνική τυροσυλο- φωσφατάση μη συνδεδεμένη με υποδοχέα
 pTregs = peripherally derived Tregs / Τρυθμ που παράγονται στην περιφέρεια
 RR = relative risk, σχετικός κίνδυνος
 rTregs = resting Tregs / μη ενεργοποιημένα Τρυθμ
 SNP = single nucleotide polymorphism/ γενετικός πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου
 SSC = Side Scatter / καθέτως ή πλαγίως σκεδαζόμενη ακτινοβολία
 TCR = T cell receptor
 TGF-β= transforming growth factor β / μετασχηματιστικός αυξητικός παράγων β
 TGF-βRII = υποδοχέας TGF-β τάξης II
 T_H2 = T helper 2 / βοηθητικά κύτταρα T τύπου 2
 T_H3 = T helper 3 / βοηθητικά κύτταρα T τύπου 3
 T_H17 = T helper 17/ βοηθητικά κύτταρα T τύπου 17
 TNF = Tumor necrosis factor / παράγων νέκρωσης όγκων
 Tregs = T regulatory cells/ T ρυθμιστικά κύτταρα
 Tr1= Type 1 regulatory
 rTregs = resting Tregs/ μη ενεργοποιημένα Τρυθμ
 tTregs = thymus derived Tregs / Τρυθμ που παράγονται στο θύμο
 TSDR = Treg specific demethylated region
 ZnT8A = Zinc transporter 8 protein (ZnT8) islet autoantibody/ Αυτοαντισώματα κατά του ινσουλινο-κοκκιακού μεταφορέα ψευδαργύρου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. Εισαγωγή

1. Εισαγωγή στα Τρυθμ

- 1.1 Ιστορική αναδρομή
- 1.2 Γενικές πληροφορίες για τα Τρυθμ
- 1.3 Υποπληθυσμοί των Τρυθμ
- 1.4 Διαφοροποίηση Τρυθμ στο θύμο και στην περιφέρεια
- 1.5 Μηχανισμοί δράσης των Τρυθμ
- 1.6 Ρόλος των Τρυθμ

2. Σημαντικά δείκτες /μόρια για τα Τρυθμ

- 2.1 CD25
- 2.2 FoxP3
- 2.3 CD127
- 2.4 CD45RO και CD45RA
- 2.5 CTLA-4
- 2.6 CD122 και CD132
- 2.7 CD95 και CD178
- 2.8 CD44
- 2.9 Helios, GITR
- 2.10 Κυτταρική βιολογία μορίων σημαντικών για τα Τρυθμ
 - 2.10.1 CD28- CD27
 - 2.10.2 CD4, CD2, CD58, CD11α και CD54
 - 2.10.3 CD81
 - 2.10.4 CD221
- 2.11 Κυτταροκίνες και Τρυθμ

3. Νέος τρόπος ορισμού των υποπληθυσμών Τρυθμ- Τεχνική Miyaga και συνεργατών 2009

4. Εισαγωγή στο Σακχαρώδη Διαβήτη

- 4.1 Κλινική εικόνα
- 4.2 Ταξινόμηση
- 4.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

5. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1

- 5.1 Επιδημιολογία
- 5.2 Αυτοαντισώματα
 - 5.2.1 Εισαγωγή στα αυτοαντισώματα
 - 5.2.2 ICA, IA-2A, GADA, IAA, ZnT8A
 - 5.2.3 Αυτοαντισώματα και πρόβλεψη του ΣΔ1
- 5.3 Διάγνωση
- 5.4 Παθογένεια
- 5.5 Το σύνδρομο APS-1 ή APECED και το σύνδρομο IPEX

6. Γενετικοί παράγοντες

6.1 Το σύμπλεγμα HLA

6. Γενετικοί παράγοντες (συνέχεια)

6.1.1 Ορισμός, δομή, ονοματολογία, πολυμορφισμός

6.1.2 Βιολογικός ρόλος και κυτταρική βιολογία των HLA, CD74, CLIP

6.1.3 HLA –ΣΔ1

6.1.4 HLA- γεωγραφική συσχέτιση (ελληνικός πληθυσμός)

6.1.5 HLA- ηλικιακή συσχέτιση

6.1.6 HLA- αυτοαντισώματα

6.1.7 HLADR και έκφραση στα T λεμφοκύτταρα και Τρυθμ

6.2 *INS-VNTR*

6.3 *CTLA-4*

6.4 *PTPN22*

7. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

7.1 Ιογενείς λοιμώξεις

7.2 Διαιτητικοί παράγοντες

7.3 Τρέχουσες θεωρίες σχετικά με τη συσχέτιση γενετικών/ περιβαλλοντικών παραγόντων στην παθογένεση της νόσου

8. Σημαντικές μελέτες στα θέματα που άπτονται της παρούσας διατριβής

8.1 Μελέτες Τρυθμ σε διαβητικούς τύπου 1

8.2 Μελέτες σε συγγενείς ατόμων με ΣΔ1

9. Σκοπός της μελέτης

B. Υλικά και μέθοδοι

1. Ασθενείς και Μάρτυρες

2. Κυτταρομετρία ροής

2.1 Μέθοδος

2.2 Ορολογία

2.3 Υλικά

2.4 Πρωτόκολλο εκτέλεσης

2.4.1 Εργαστηριακή προετοιμασία δείγματος για τα επιφανειακά αντισώματα

2.4.2 Εργαστηριακή προετοιμασία δείγματος για τα ενδοκυττάρια αντισώματα

2.4.3 Εργαστηριακή προετοιμασία δείγματος για το ενδοπυρηνικό αντίσωμα κατά FoxP3

2.4.4 Διαδικασία κυτταρομετρίας ροής

2.4.5 Ανάλυση στο κυτταρόμετρο

2.4.5.1 Διαχωρισμός Τρυθμ με βάση την έκφραση του CD127

2.4.5.2 Επιβεβαίωση του διαχωρισμού με χρήση του κορυφαίου 7%

2.4.5.3 Μελέτη της έκφρασης διαφόρων μορίων στα Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ

2.4.5.4 Διαχωρισμός των υποπληθυσμών των Τρυθμ με βάση την έκφραση CD45RO

2.5 Στατιστική επεξεργασία

3. Διαδικασία ταυτοποίησης HLA

4. Στατιστική επεξεργασία

Γ. Αποτελέσματα

1. Αξιολόγηση του τρόπου μελέτης των Τρυθμ

1.1 Συσχέτιση του ποσοστού των Τρυθμ με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης

1.2 Συσχέτιση του ποσοστού των $CD25^+CD127^{-/low}$ με τα Τρυθμ και τον πληθυσμό επιβεβαίωσης.

1.3 Μελέτη έκφρασης Foxp3 στα Τρυθμ, $CD25^+CD127^{-/low}$ και στον πληθυσμό επιβεβαίωσης.

1.4 Συσχέτιση του ποσοστού των $CD25^+CD127^{-/low}$ και των Τρυθμ με τους υποπληθυσμούς βάσει της τεχνικής Miyara και συνεργατών 2009.

2. Ποσοτικές διαφορές των Τρυθμ μεταξύ πρώτου βαθμού συγγενών διαβητικών και φυσιολογικών μαρτύρων

2.1 Ποσοτικές διαφορές των Τρυθμ, $CD25^+CD127^{-/low}$ και του πληθυσμού επιβεβαίωσης

2.2 Ποσοτικές διαφορές των υποπληθυσμών των Τρυθμ

3. Μελέτη έκφρασης σημαντικών μορίων στους υποπληθυσμούς των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων T και μελέτη των διαφορών έκφρασης μεταξύ πρώτου βαθμού συγγενών διαβητικών και φυσιολογικών

3.1 CD122/ CD132

3.1.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

3.1.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

3.2 TGF-β/ TGF-βRII

3.2.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

3.2.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

3.3 HLA-DR/ HLA-DQ/ CD74/ CLIP

3.3.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

3.3.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

3.4 CD44

3.4.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

3.4.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

3.5 CD28/ CD152/ CD27

3.5.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

3.5.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

3.6 CD95/CD178

3.6.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

3.6.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

4. Μελέτη HLA

4.1 Κατανομή των γονοτύπων HLA-DR και HLA-DQ στους συγγενείς ατόμων με ΣΔ1

5. Μελέτη επιπλέον χαρακτηριστικών των υποπληθυσμών των Τρυθμ σε φυσιολογικούς μάρτυρες

5.1 CD127, FoxP3

5.2 CD54, CD11a, CD58, CD2, CD4

5.3 HLA-DR, CD122

5.4 CD81

5.5 CD221

Δ. Συζήτηση

Ε. Συμπεράσματα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή στα Τρυθμ

Αρκετοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί χρησιμοποιούνται για να διατηρήσουν την ομοιοστασία του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο εμποδίζοντας τους αυτοάνοσους μηχανισμούς, όσο και ρυθμίζοντας την φλεγμονώδη απόκριση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Πρωτεύοντα ρόλο ανάμεσα σε αυτούς τους μηχανισμούς έχουν τα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (Τρυθμ) που θεωρείται ότι αποτελούν από τους κύριους μεσολαβητές της «περιφερικής ανοχής».

1.1 Ιστορική αναδρομή

Το αρχικό ενδιαφέρον για την ύπαρξη των Τρυθμ (ή κατασταλτικών Τ όπως ήταν η αρχική τους ονομασία) ξεκίνησε το 1970, όταν οι Gershon και Kondo [1] έκαναν την ανακάλυψη ότι κάποια Τ κύτταρα διαφορετικά από τα Τ βοηθητικά είχαν τη δυνατότητα να μειώνουν την ανοσολογική απόκριση και ονόμασαν αυτά κατασταλτικά Τ (suppressor). Μετά τον αρχικό ενθουσιασμό και πληθώρα εργασιών για κύτταρα και κατασταλτικούς παράγοντες, η έννοια των κατασταλτικών Τ εγκαταλείφθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1980 όταν διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο του μορίου I-J στην περιοχή MHC των ποντικών, που θεωρούνταν το κλειδί για την κατασταλτική τους δράση, δεν υπάρχει [2],[3]. Έτσι μέσα σε δύο δεκαετίες είδαμε την ακμή και παρακμή των κυττάρων αυτών αλλά και παρελκόμενων εννοιών όπως αντι-κατασταλτικά Τ κύτταρα (contra suppressor cells) και αρνησικυριακά κύτταρα (veto cells) [4]. Το ίδιο συνέβη και με την πληθώρα παραγόντων που είχαν απομονωθεί ως υπερκείμενα (ποτέ όμως σε καθαρή μορφή), από καλλιέργειες τέτοιων κυττάρων [5].

1.2 Γενικές πληροφορίες για τα Τρυθμ

Το 1995 οι Sakaguchi S. και συν. εισήγαγαν έναν άλλο τρόπο διαχωρισμού μεταξύ των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων, που βασίζονταν στο μόριο CD25. Με τη βοήθεια του μορίου αυτού, χαρακτήρισαν τον πληθυσμό $CD4^+CD25^+$ στους ποντικούς, ο οποίος μπορούσε να προστατεύσει τα ζώα από αυτοάνοση γαστρίτιδα που προκαλούσε η θυμεκτομή στην 3^η ημέρα της ζωής τους. Αντίστοιχα, τα πειράματα του Don Mason έδειξαν την ύπαρξη ενός παρόμοιου πληθυσμού στους επίμυες. Οι δύο ερευνητικές ομάδες κατάφεραν να επαναφέρουν στο προσκήνιο τα κύτταρα που φαίνεται να προστατεύουν τα πειραματόζωα από αυτοανοσία [6],[7]. Το μόριο CD25 (IL-2R α) αποτελεί την αλυσίδα α του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (IL-2), ο οποίος και θεωρείται ως ένα πολύ καλός δείκτης ενεργοποίησης των κυττάρων Τ. Αυτά τα κύτταρα που βρέθηκε ότι παράγονται στο θύμο και αναγνωρίζονταν στο ποντίκι με το φαινότυπο $CD25^+CD4^+$ κύτταρα Τ ονομάστηκαν Τρυθμιστικά (T regulatory) λεμφοκύτταρα (T_R ή Tregs). [8]

Μελέτη του υποπληθυσμού σε ποντικούς και ιδιαίτερα με αυτοάνοσα σύνδρομα όπως κολίτιδα, ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα (EAE, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), έδειξε ότι έχουν προστατευτικό ρόλο και συγκεκριμένα η μετάγγισή τους σχετίζεται με βελτίωση της φλεγμονής. Ορόσημο στη μελέτη των Τρυθμ αποτέλεσε η ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 (forkhead box P3, winged helix transcription factor). Συγκεκριμένα οι μελέτες στους ποντικούς scurfy, έδειξαν ότι η μετάλλαξη στο γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα *FoxP3* σχετίζεται με απουσία Τρυθμ και κλινική εικόνα αυτοανοσίας, η οποία περιλαμβάνει μαζική λεμφοκυττάρωση και θάνατο μετά από τρεις μήνες. Με πολλές ομοιότητες εμφανίζεται το σύνδρομο IPEX (immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked) στον άνθρωπο, στο οποίο θα αναφερθούμε στη συνέχεια αναλυτικά [8].

Τα Τρυθμιστικά αποτελούν το 2-4% όλων των CD4 T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και έχουν τη δυνατότητα καταστολής της αυτοάνοσης ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού μηχανισμού μέσω διακυτταρικής επαφής [9].

1.3 Υποπληθυσμοί των Τρυθμ

Όσον αφορά τους υποπληθυσμούς των Τρυθμ τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια αρχικά προτάθηκε η χρήση δύο βασικών υποπληθυσμοί : των φυσικών Τρυθμ (natural Tregs, nTregs) και των επαγόμενων Τρυθμ (induced Tregs, iTregs ή adaptive Tregs, aTregs).

Με τον όρο nTregs αναφέρθηκαν τα Τρυθμ που παράγονται στο θύμο. Οι πρώτες αναφορές σε αυτά τα κύτταρα έγιναν από τους Sacaguchi και συν.(1995), και βρέθηκε ότι στα ποντίκια η θυμεκτομή 3 μέρες μετά τη γέννηση σχετίζεται με ανεπάρκεια Τρυθμ και αυτοανοσία. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η θυμεκτομή την τρίτη μέρα μπορεί να μειώσει/εξαφανίσει τον υποπληθυσμό των CD25⁺ T κυττάρων που φαίνεται να έχουν τη δυνατότητα ρύθμισης του πληθυσμού των αυτοδραστικών κυττάρων T. Η θυμεκτομή επομένως σχετίστηκε με την εμφάνιση αυτοάνοσων συνδρόμων όπως η αιμολυτική αναιμία, η γαστρίτιδα, η ορχίτιδα και η θυρεοειδίτιδα [6],[10].

Εκτός από το θύμο αδένα σημαντικό ρόλο στην παραγωγή Τρυθμ φαίνεται να κατέχει και η περιφέρεια. Τα τεκμήρια γι' αυτό είναι έμμεσα, κυρίως από in vitro πειραματικά δεδομένα. Τα ρυθμιστικά αυτά κύτταρα ονομάστηκαν iTregs. Τα iTregs θεωρήθηκε ότι παράγονται στην περιφέρεια κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων ή στο εργαστήριο για θεραπευτικές διαδικασίες και προέρχονται από διαφοροποίηση των CD4⁺CD25⁻ T λεμφοκυττάρων υπό συνθήκες παρουσίας αυτοαντιγόνων και παρουσία TGF-β (transforming growth factor β), IL-2 και ρετινοϊκού οξέος [11]. Στον άνθρωπο εντοπίστηκαν κυρίως στο λεμφικό ιστό των βλεννογόνων και διακρίθηκαν σε 2 υποομάδες, τα TH3 (T helper 3) και τα Tr1 (Type 1 regulatory). Για τα πρώτα θεωρήθηκε ότι παράγουν και ασκούν τη δράση τους κυρίως μέσω TGF-β ενώ η απουσία τους στα ποντίκια σχετίστηκε με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων του εντέρου. Ο ορισμός Tr1 αφορά τα Τρυθμ που παράχθηκαν κυρίως στο εργαστήριο και το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η έκκριση IL-10 (ιντερλευκίνης 10).

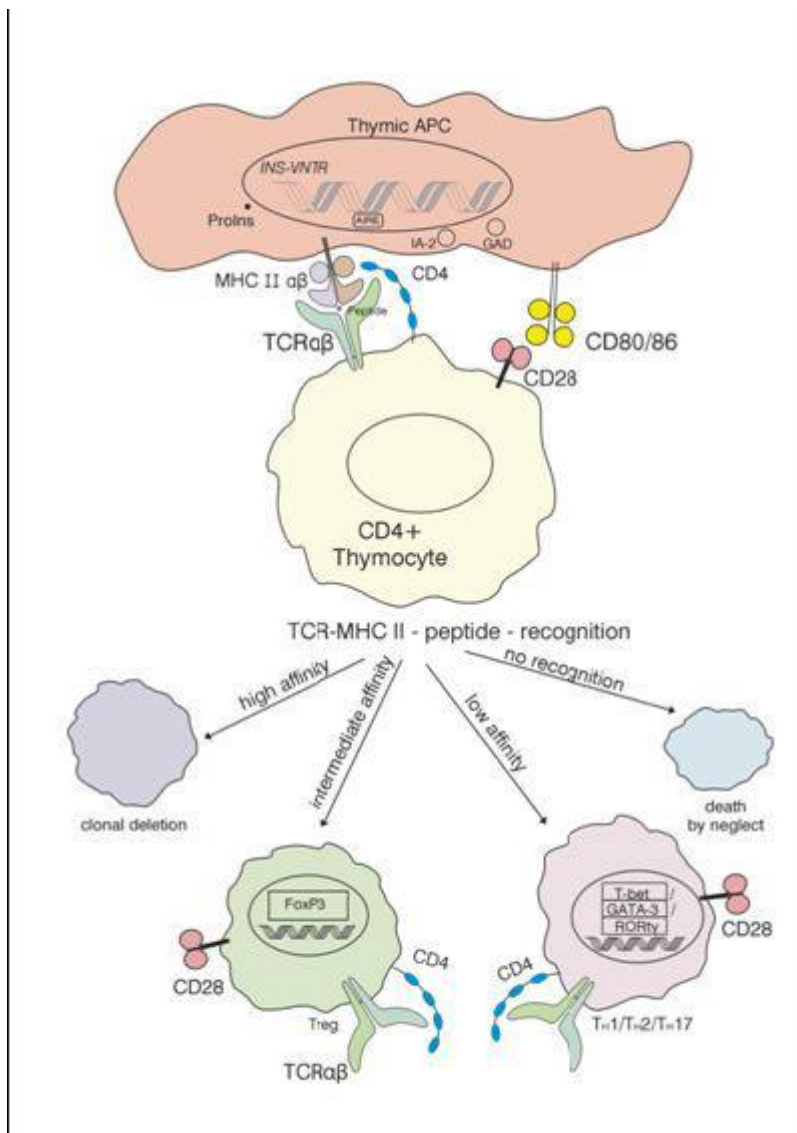
Ωστόσο, λόγω της προόδου στον τομέα της κατανόησης των μηχανισμών διαφοροποίησης, ομοιοστασίας και λειτουργίας των Τρυθμ ολοένα περισσότερες συντμήσεις και ορισμοί φαίνεται να εισάγονται στη βιβλιογραφία σχετικά με τους υποπληθυσμούς των Τρυθμ. Στα πλαίσια αυτά έχει πρόσφατα προταθεί από τους κορυφαίους του πεδίου η χρήση ενός ενιαίου τρόπου διάκρισης της ονοματολογίας.

Αντί του όρου nTregs που υπονοεί ότι όσα κύτταρα δεν παράγονται στο θύμο είναι «αφύσικα», προτάθηκε η ονομασία Τρυθμ που παράγονται στο θύμο (thymus derived Tregs, tTregs). Κατά αντιστοιχία ο όρος iTregs ή aTregs μπορεί να αντικατασταθεί από τον όρο Τρυθμ που παράγονται στην περιφέρεια (peripherally derived Tregs, pTregs), όταν είναι γνωστό ότι η διαφοροποίηση των Τρυθμ γίνεται εκεί. Αντίθετα όταν δεν είναι γνωστό το σημείο διαφοροποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο γενικότερος όρος Foxp3⁺ Τρυθμ, ενώ όταν είναι γνωστή η παραγωγή τους στο εργαστήριο συνίσταται η χρήση του όρου επαγόμενα στο εργαστήριο (in vitro induced Tregs, iTregs) [12].

1.4 Διαφοροποίηση Τρυθμ στο θύμο και στην περιφέρεια

Όσον αφορά την παραγωγή των tTregs, θεωρείται ότι αυτή επιτελείται όπως σε όλα τα κύτταρα T που έρχονται σε επαφή με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μονοκύτταρα και δένδριτικά κύτταρα) τα οποία εκφράζουν αντιγόνα προσδεδεμένα σε μόρια του μείζονος

συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC (major histocompatibility complex). Ειδικά για τα T ρυθμιστικά, ο υποδοχέας TCR (T cell receptor) αναγνωρίζει το συνδυασμό αυτοαντιγονικών πεπτιδίων με μόρια MHC II (peptide MHC II, pMHCII) με μεγαλύτερη σθεναρότητα και η επιλογή τους γίνεται μετά από ενδιάμεσης έντασης πρόσδεση με το σύμπλοκο pMHCII. Μέχρι πρόσφατα είχε καθιερωθεί ότι το μεγάλο σθένος μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης οδηγεί σε απάλειψη του αντίστοιχου T λεμφοκυτταρικού κλώνου (αρνητική επιλογή), ενώ το πολύ μικρό έως ανύπαρκτο σθένος οδηγεί σε θάνατο λόγω άγνοιας (Εικόνα 1). Το χαμηλής έντασης σθένος οδηγεί σε θετική επιλογή. Πρόσφατα πειράματα κυρίως στα ποντίκια απέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση της οποίας το σθένος κυμαίνεται μεταξύ χαμηλού και μεγάλου οδηγεί σε θετική επιλογή Τρυθμ και έκφραση του FOXP3 που είναι καθοριστική για τη λειτουργία των Τρυθμ [13].



Εικόνα 1. Η διαφοροποίηση των υποπληθυσμών των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων στον θύμο με βάση την αλληλεπίδραση του υποδοχέα TCR με το σύμπλοκο MHCII-πεπτίδιο (pMHCII) που οδηγεί ανάλογα με το εάν είναι ισχυρής, ενδιάμεσης ή χαμηλής έντασης σε αρνητική επιλογή, παραγωγή *tTregs* ή θετική επιλογή αντίστοιχα.[14]

Αντίθετα, στα περιφερικά λεμφικά όργανα (σπλήνας, λεμφαδένες) τα pTregs παράγονται από πρόδρομα $CD4^+CD25^-$. Είναι πιθανό τα κύτταρα αυτά να προέρχονται από $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα που έχουν μεταναστεύσει πρόσφατα από το θύμο και έχουν διαφύγει της αρνητικής επιλογής παρά την ισχυρή τους πρόσδεση με το σύμπλοκο pMHCII. Με βεβαιότητα μπορούμε να πούμε ότι τα δενδριτικά κύτταρα παράγουν και παρουσιάζουν αυτοαντιγόνα αλλά ο ακριβής μηχανισμός παραγωγής των pTregs δεν είναι γνωστός, αν και καθοριστικό ρόλο φαίνεται να κατέχει η παρουσία της IL-2 και του TGF- β [14].

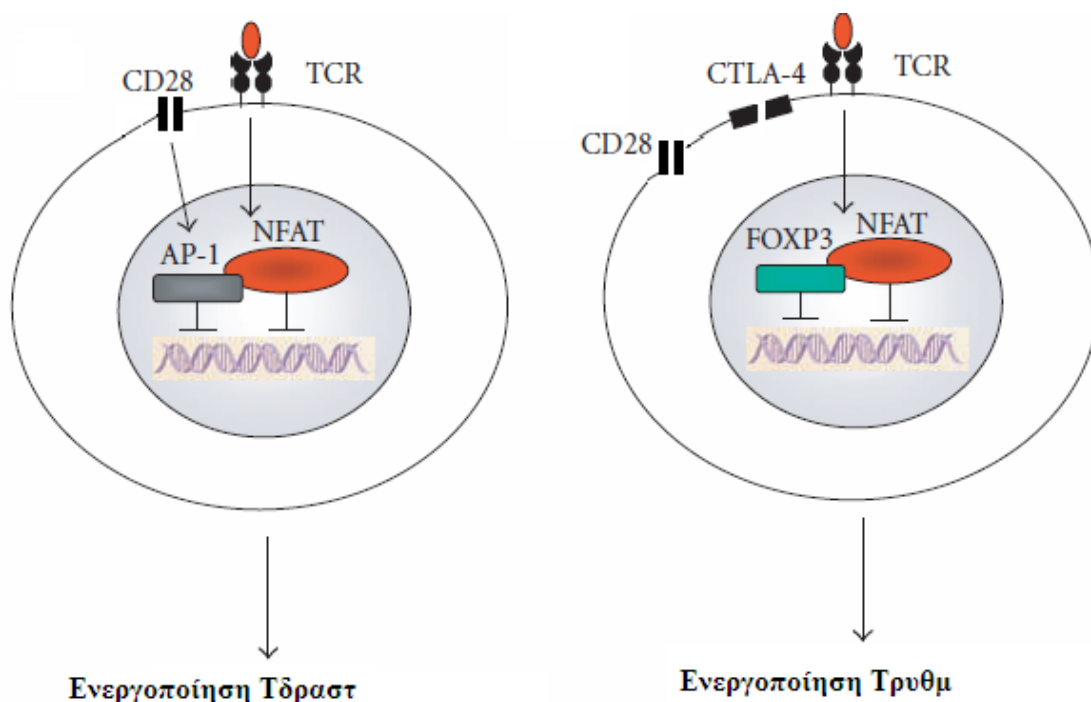
1.5 Μηχανισμοί δράσης των Τρυθμ

Τα Τρυθμ ελέγχουν την αντιδραστικότητα των αυτοδραστικών Τδραστ που δεν εξαλείφθηκαν στο θύμο και είναι επιπλέον υπεύθυνα για την διατήρηση της περιφερικής ανοχής και την ανοσολογική ομοιοστασία. Αρχικά, τα Τρυθμ ελέγχουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων στους περιφερικούς λεμφαδένες όπου αλληλεπιδρούν με τα δενδριτικά κύτταρα, ενώ έχουν εντοπιστεί και σε περιοχές φλεγμονής όπου ελέγχουν τη δράση των ανοσοκυττάρων στους επηρεασμένους ιστούς.

Σπουδαίο ρόλο στον καθορισμό της δράσης ενός Τρυθμιστικού κυττάρου κατέχει όπως ήδη αναφέραμε ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3. Το γονίδιο *FoxP3* που έχει υψηλή έκφραση στα Τρυθμ εδράζεται στο χρωμόσωμα X και κωδικεύει μια πρωτεΐνη με 431 αμινοξέα. Η σύνδεση του με τον παράγοντα Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) μετά την ενεργοποίηση των Τρυθμ μέσω του υποδοχέα TCR, οδηγεί σε μεταγραφή πάρα πολλών διαφορετικών γονιδίων (>800) σε αυτά τα κύτταρα σε σχέση με τα T δραστικά λεμφοκύτταρα (Τδραστ). Έτσι, παρατηρούμε καταστολή γονιδίων που αφορούν την έκφραση IL-2 και IFN- γ (ιντερφερόνη γ) και αντίστοιχα ενεργοποίηση γονιδίων όπως αυτών των μεμβρανικών υποδοχέων IL-2R α , GITR (Glucocorticoid Induced TNFR family related gene) και CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Μέχρι στιγμής έχουν διαπιστωθεί 20 διαφορετικοί τύποι μεταλλάξεων του FOXP3 που σχετίζονται με μειωμένη έκφραση του mRNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης και μειωμένη κατασταλτική ικανότητα των Τρυθμ.

Η δομή του καρβοξυ-τελικού άκρου του παράγοντα FoxP3 σε σύμπλοκο με το καρβοξυ-τελικό άκρο του παράγοντα NFAT1 και των αλληλουχιών DNA που αναγνωρίζονται από τις δύο αυτές πρωτεΐνες έχει δημοσιευθεί και δείχνει την αξιοσημείωτη αλληλεπίδραση και των δύο για δράση (Εικόνα 2). Το δραστικό μόριο FoxP3 λειτουργεί ως ομοδιμερές και όλες οι μεταλλάξεις του που συνδέονται με το σύνδρομο IPEX αφορούν την περιοχή ομοδιμερισμού. Η δραστική μείωση της ικανότητας ομοδιμερισμού του FoxP3 επιφέρει την απουσία Τρυθμ, λόγω ανικανότητας δράσης αυτού του παράγοντα [13],[15]. Η κλινική εικόνα του συνδρόμου IPEX σχετίζεται με αυτοάνοση διαταραχή σε πολλαπλά όργανα, μεταξύ των οποίων και το πάγκρεας, αλλά θα περιγραφεί αναλυτικά στη συνέχεια.

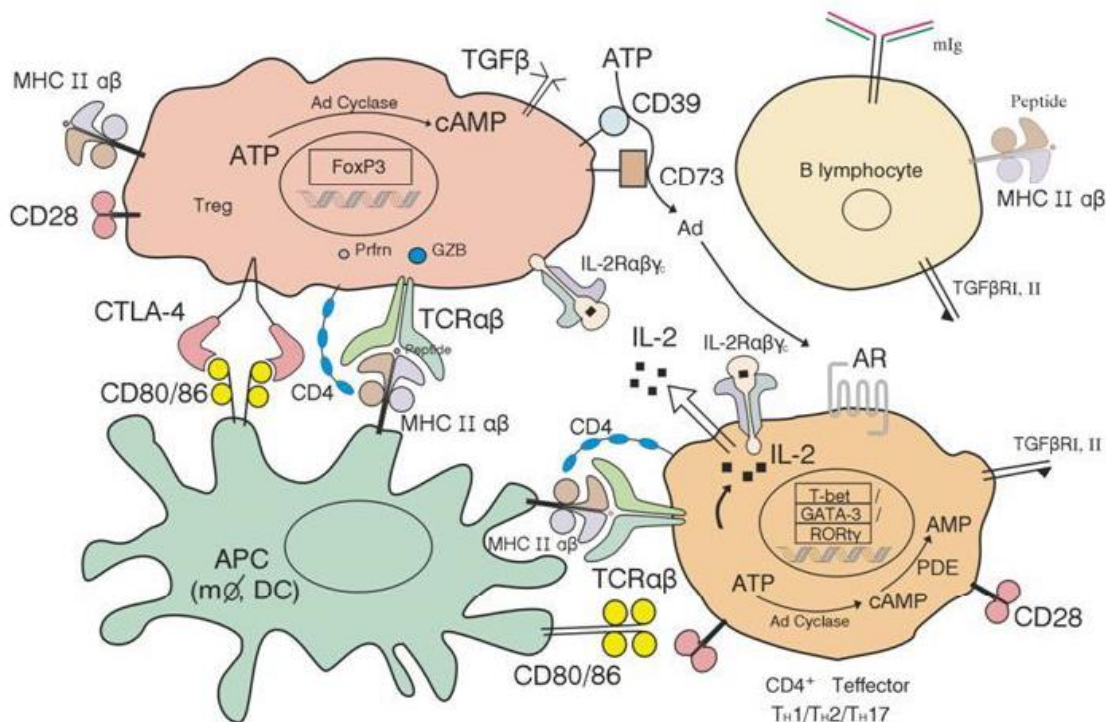
Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των Τρυθμ δεν είναι ξεκάθαρος αλλά φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση με τα Τδραστ είναι αδιαμφισβήτητη. In vivo η ενεργοποίηση των Τδραστ συνεπάγεται την ενεργοποίηση των Τρυθμ, τα οποία οδηγούν σε απενεργοποίηση της πορείας που σχετίζεται με τη δράση των Τδραστ και σε ενεργοποίηση της πορείας που έχει σχέση με τη συσσώρευση μορίων όπως το cAMP, το CTLA-4, τα HLA-DR/DQ, ο TGF- β , η IL-2 και η αδενοσίνη, τα οποία έχουν κατασταλτική δράση τόσο στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη, όσο και εξωκυττάρια (Εικόνα 3, [14]).



Εικόνα 2. Στην εικόνα βλέπουμε το ρόλο του *FoxP3* στην ρύθμιση των έκφρασης γονιδίων στα Τρυθμ. Τόσο στα Τδραστ όσο και στα Τρυθμ η ενεργοποίηση του υποδοχέα TCR αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT. Στα Τδραστ η ενεργοποίηση αυτή σε συνδυασμό με τη συνδιέγερση του CD28 οδηγεί σε πρόσδεση του AP-1 (αριστερά) ενώ αντίθετα στα Τρυθμ (δεξιά) βλέπουμε την πρόσδεση του *FoxP3* που οδηγεί σε έκφραση διαφορετικών γονιδίων [15].

Τα *in vitro* ενεργοποιημένα Τρυθμ έχουν τη δυνατότητα να θανατώσουν άμεσα τα ενεργοποιημένα $CD4^+$ και $CD8^+$ T μέσω της πρωτεάσης granzyme A η οποία εισάγεται μέσω των πόρων διατρητίνης στα κύτταρα και προκαλεί τη λύση τους. Αν και δεν υπάρχουν ενδείξεις *in vivo* για τον συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης, οι ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια που αφορούν τη διατρητίνη πάσχουν από αιμοφαγοκυτταρική ιστοκυττάρωση (haemophagolytic lymphohistiocytosis -HLH) υποδεικνύοντας το ρόλο του μορίου στην ανοσορρύθμιση, πιθανόν μέσω της δράσης των Τρυθμ [14],[16].

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός δράσης των Τρυθμ περιλαμβάνει τη χρήση του μορίου της αδενοσίνης. Ειδικότερα, το γονίδιο του ενζύμου της φωσφοδιεστεράσης 4 (phosphodiesterase 4 -*pde4*) που είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση του cAMP, καταστέλλεται στα Τρυθμ. Αυτό έχει ως συνέπεια την αυξημένη έκφραση του cAMP στα κύτταρα αυτά. Μετά την επαφή μέσω κυτταρικών συνδέσμων με τα Τδραστ, τα Τρυθμ μεταφέρουν σε αυτά cAMP και τα απενεργοποιούν. Επιπλέον, τα εκτοένζυμα CD39 και CD73 που βρίσκονται στην επιφάνεια των Τρυθμ χρησιμοποιούν το εξωκυττάριο ATP για να το μετατρέψουν σε αδενοσίνη, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τους κατασταλτικούς υποδοχείς των Τδραστ [14],[17].



Εικόνα 3. Απλοποιημένο σχήμα αλληλεπίδρασης Τρυθμ με άλλα ανοσοκύτταρα στα περιφερικά όργανα ή στις περιοχές φλεγμονής [14].

Το CTLA-4, ένα μεμβρανικό μόριο που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα Τρυθμ, προσδένεται 20 φορές ισχυρότερα σε σχέση με το CD28 με τον υποδοχέα CD80/CD86 που βρίσκεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό τα Τρυθμ εμποδίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγονοπαρουσιαστικού δραστικού κυττάρου T μέσω των μορίων CD28-CD80/86 που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των Τδραστ.

Η διατήρηση των $CD4^+CD25^+$ Τρυθμ στην περιφέρεια εξαρτάται από την δράση δύο κυτταροκινών, της IL-2 και του TGF- β . Αν και τα Τρυθμ δεν παράγουν IL-2, εξαρτώνται από αυτή την κυτταροκίνη για την ανάπτυξή τους στο θύμο και την ομοιοστασία και κατασταλτική τους δράση στην περιφέρεια. Τα Τρυθμ εκφράζουν και τα 3 μόρια του υποδοχέα της IL-2, συμπεριλαμβανομένων και των αλυσίδων α , β , και γ (CD25, CD122, και CD132, αντίστοιχα). Αναλυτικότερα στη δράση αυτού του υποδοχέα θα αναφερθούμε στη συνέχεια [18],[19].

Ο TGF- β , ένας παράγοντας απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των Τρυθμ, έχει βρεθεί πρόσφατα ότι στην ώριμη ή την ανώριμή του μορφή βρίσκεται στην επιφάνεια των Τρυθμ, προσδεμένος με την μεμβρανική πρωτεΐνη GARP (Glycoprotein A-repetitions predominant protein). Στο σημείο αυτό ο ανώριμος TGF- β μπορεί να μετατραπεί στην ώριμή του μορφή από μια ποικιλία πρωτεϊνών, όπως η φουρίνη και διάφορες ενσωματίνες. Αυτό το εύρημα θα μπορούσε να σχετίζεται με έναν ακόμη μηχανισμό δράσης. [20]

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί και η υψηλή έκφραση του μορίου ιστοσυμβατότητας HLA-DR στην επιφάνεια των Τρυθμ, καθώς και το ότι το ποσοστό των Τρυθμ που είναι HLA-DR⁺ εκφράζουν τη μεγαλύτερη ρυθμιστική δράση [14], [21].

1.6 Ρόλος των Τρυθμ

Ο ρόλος των Τ ρυθμιστικών είναι δύσκολο να καθορισθεί, αφενός διότι οι μελέτες γίνονται κυρίως σε περιφερικό αίμα και αφετέρου διότι ο πληθυσμός είναι ετερογενής. Ωστόσο φαίνεται η δράση τους να είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί η ισορροπία σε μια ζυγαριά που από τη μία βρίσκονται οι αυτοάνοσες νόσοι και από την άλλη ο καρκίνος και οι λοιμώξεις (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των Τρυθμ

Στις αυτοάνοσες νόσους φαίνεται να διαταράσσεται η κατασταλτική δράση των Τρυθμ έναντι κυττάρων Τδραστ που ενεργοποιούνται από αυτοαντιγόνα. Έτσι, σε αυτές διαπιστώνεται μειονεκτική δράση είτε ως προς τη λειτουργία ή το ποσοστό τους (και συνεπώς ο αριθμός τους) σε διάφορες αυτοάνοσες νόσους. Ειδικότερα, στη σκλήρυνση κατά πλάκας αναφέρεται μείωση στην κατασταλτική ικανότητα των Τρυθμ, στη βαριά μυασθένεια αναφέρεται μειωμένη έκφραση FoxP3 και ανεπάρκεια ως προς την κατασταλτική τους δράση, στον ΣΕΛ (συστηματικό ερυθματώδη λύκο) μειωμένα ποσοστά όσο και κατασταλτική ικανότητα, στη ΡΑ (ρευματοειδή αρθρίτιδα) μειωμένο ποσοστό σε άτομα με πρόσφατη ενεργή νόσο, ενώ στον ΣΔ1 οι μελέτες είναι αντιφατικές και θα αναφερθούμε διεξοδικά σε αυτές στη συνέχεια.

Μέχρι τώρα ήταν γνωστή η δράση των Τρυθμ προς όφελος του οργανισμού. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι πιθανώς χρησιμοποιούνται από τους κακοήθεις όγκους ως μέσο εισβολής στο ανοσοποιητικό μας σύστημα. Αυτό συμβαίνει τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στον ίδιο τον συμπαγή όγκο. Οποσδήποτε, ένας από τους υποβοηθητικούς παράγοντες σε τέτοια εξέλιξη είναι και η παραγωγή TGF- β από τον ίδιο τον όγκο. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις TGF- β σε ασθενείς με κακοήθεια σχετίζονται με υψηλή θνητότητα και μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Έχουν βρεθεί αυξημένα ποσοστά Τρυθμ στο περιφερικό αίμα σε άτομα που πάσχουν από συμπαγή όγκο ή αυξημένη συγκέντρωση στην περιοχή του όγκου. Πιθανώς η δράση τους σχετίζεται με την εξουδετέρωση της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των αντιγόνων του όγκου. [22]

Σχετικά με τη συμβολή των Τρυθμ στην ατοπία, ο ρόλος τους περιλαμβάνει την καταστολή της ενεργοποίησης των Τ κυττάρων λόγω έκθεσης σε αλλεργιογόνα. Επίσης, τα Τρυθμ εμποδίζουν τα δραστικά κύτταρα της αλλεργικής αντίδρασης, όπως τα μαστοκύτταρα, τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα, καθώς και την παραγωγή IgE. Το ποσοστό των Τρυθμ βρίσκεται αυξημένο σε ατοπικούς ασθενείς [23].

Για την περαιτέρω αξιολόγηση του ρόλου των T ρυθμ σε αυτές τις νόσους και την αξιοποίηση τους ως διαγνωστικό ή προγνωστικό εργαλείο, είναι απαραίτητη η παρουσία μοναδικών και ειδικών δεικτών για να διευκολύνουν τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίησή τους [22].

2. Σημαντικά δείκτες /μόρια για τα Τρυθμ

Στον άνθρωπο τα $CD4^+CD25^+$ T λεμφοκύτταρα είναι πάνω από το 10% των $CD4$ T λεμφοκυττάρων, αλλά δεν έχουν όλα ρυθμιστικές ιδιότητες, πράγμα που καθιστά αναγκαία την εύρεση επιπλέον δεικτών για τον προσδιορισμό τους. Ωστόσο, ένα από τα πιο σημαντικά εμπόδια στη μελέτη των ανθρωπίνων Τρυθμ είναι η έλλειψη εξειδικευμένων δεικτών επιφανείας για να διαχωριστούν από τα άλλα ρυθμιστικά ή δραστικά κύτταρα.

2.1 CD25

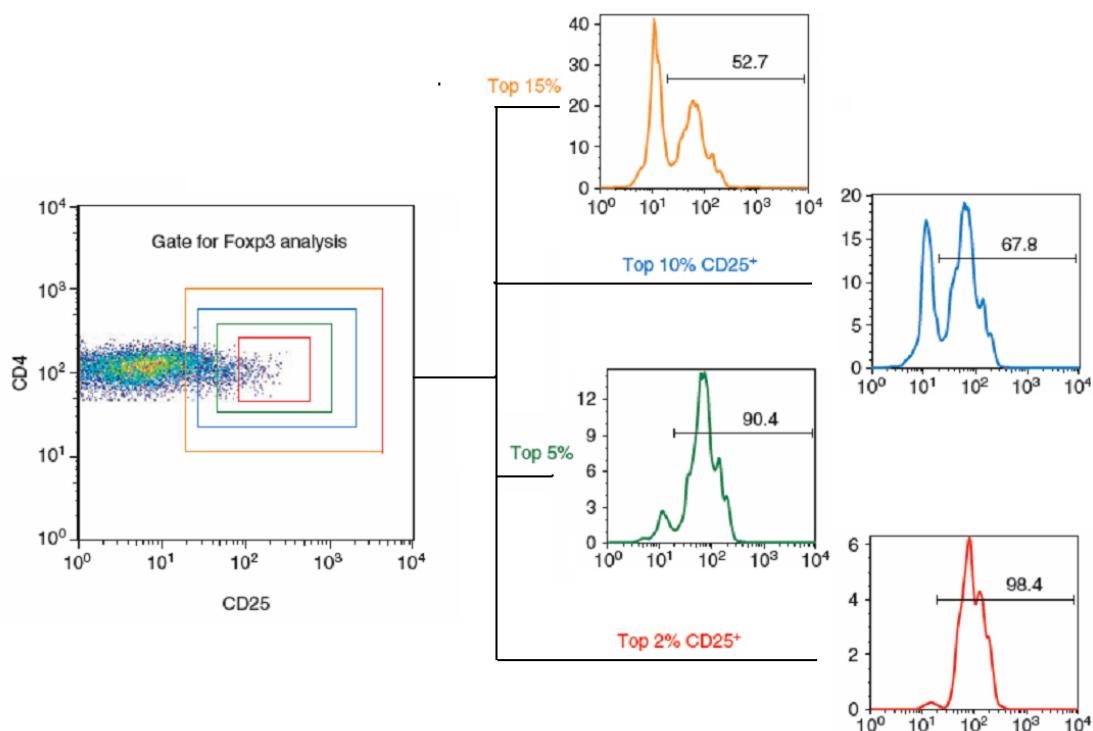
Το CD25, η αλυσίδα α του υποδοχέα της IL-2, θεωρήθηκε αρχικά ως ο πιο σημαντικός δείκτης επιφανείας, αλλά αντίθετα με τους ποντικούς αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο όσα $CD4^+ CD25^+$ κύτταρα T έχουν υψηλή έκφραση ως προς τον υποδοχέα αυτόν (CD25, IL-2R α), έχουν κατασταλτικές ιδιότητες. Το γεγονός ότι δεν υπάρχει αντικειμενικός τρόπος διαχωρισμού των $CD4^+$ κυττάρων T σύμφωνα με το μεμβρανικό επίπεδο του CD25, π.χ. υψηλής σε σχέση με ενδιάμεσης έντασης έκφραση, οδήγησε σε δυσχέρεια στον ποσοτικό προσδιορισμό των πληθυσμών αυτών. Επίσης ο δείκτης αυτός επάγεται σε ενεργοποιημένα T κύτταρα μετά από κατάλληλα ερεθίσματα

Άλλοι δείκτες όπως το HLA-DR, το CTLA-4 και το GITR έχει αναφερθεί να εκφράζονται εκτός από τα Τρυθμ και στα Τδραστ και επομένως ο διαχωρισμός των Τρυθμ με βάση αυτούς και μόνο τους δείκτες καθίσταται δυσχερής.

2.2 FoxP3

Ένα σημαντικό βήμα στη μελέτη των Τρυθμ στα ποντίκια αλλά και στους ανθρώπους είναι η ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 του οποίου οι μεταλλάξεις όπως αναφέραμε σχετίζονται με συγκεκριμένα κλινικά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο IPEX. Ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3 επηρεάζει γονίδια που αφορούν την ανάπτυξη, τον αριθμό και την ρυθμιστική ικανότητα των Τρυθμ. Έτσι η έκφραση του FoxP3 οδηγεί σε αδυναμία παραγωγής IL-2, IL-4 και IFN- γ , καθώς και μειωμένη έκφραση άλλων μεταγραφικών παραγόντων που οδηγούν με τη σειρά τους σε περαιτέρω μείωση της παραγωγής σημαντικών κυτταροκινών πράγμα χαρακτηριστικό των Τδραστ και σε μειωμένο πολλαπλασιασμό τους [9].

Αν και πολλές μελέτες αμφισβητούν το κατά πόσο όλα τα Τρυθμ είναι θετικά ως προς το δείκτη αυτό ή εάν όλα τα $FoxP3^+$ T κύτταρα έχουν ρυθμιστικές ιδιότητες, παραμένει ο καλύτερος και πιο ειδικός δείκτης για τον προσδιορισμό των Τρυθμ έως σήμερα (Εικόνα 5). Ωστόσο ο ίδιος μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να εκφράζεται μετά από ενεργοποίηση με αντιγόνα και από κύτταρα που δεν έχουν ρυθμιστικές ιδιότητες όπως τα αδρανή $CD4^+$ κύτταρα T καθώς και σε μερικά $CD8^+$. Οι Weihong Liu και συνεργάτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD25 και της έκφρασης του *FoxP3* [24]. Επίσης πρόκειται για έναν ενδοκυττάριο δείκτη ο οποίος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό μέσω κυτταρομετρίας ροή των Τρυθμ και τη χρήση τους σε λειτουργικές μελέτες ή σε κυτταρική θεραπεία μετά από πολλαπλασιασμό τους. Μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί επιβεβαιωτικά

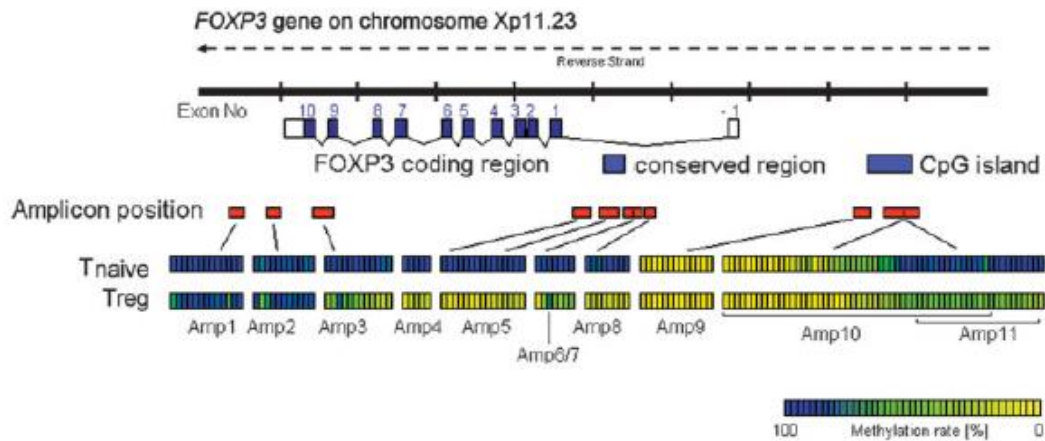


Εικόνα 5. Η έκφραση του *FoxP3* ως προς την έκφραση του *CD25*. Στα κουτάκια δεξιά, βλέπουμε πως μεταβάλλεται το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν *FoxP3* ανάλογα με την έκφραση του *CD25* στα ανθρώπινα *CD4* Τ λεμφοκύτταρα [24]

Είναι γνωστό ότι η απομεθυλίωση του DNA και η αναδόμηση της χρωματίνης ως αποτέλεσμα αυτής είναι σημαντικό στάδιο για την έκφραση των γονιδίων, καθώς φαίνεται να καθορίζει την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων ή των κατασταλτικών μορίων στα γονίδια. Οι μεθυλιωμένες αλληλουχίες ισοδυναμούν με σιωπηρά γονίδια. Στην περιοχή του *FoxP3* η απομεθυλίωση του DNA μας επιτρέπει την αναγνώριση των Τ κυττάρων με σταθερό φαινότυπο ρυθμιστικών κυττάρων Τ. Η απομεθυλίωση σε μια ισχυρά συντηρημένη περιοχή εντός του γονιδίου του FOXP3 (στην Treg specific demethylated region- *TSDR*) είναι ένα εύρημα που αφορά αποκλειστικά τα tTregs και όχι τα υπόλοιπα κύτταρα που εκφράζουν τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα.

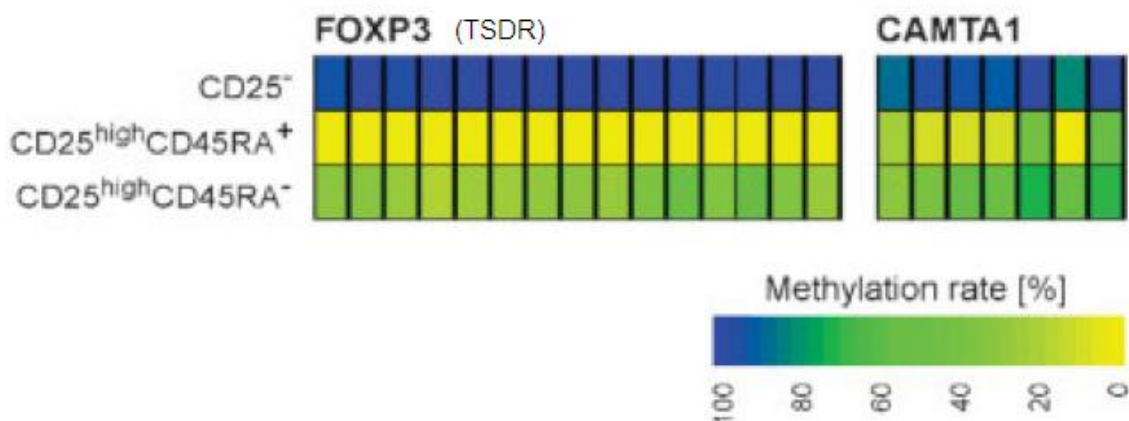
Σύμφωνα με τους Baron U και συν. στο άκρο 5' του γονιδίου *FoxP3*, η μεθυλίωση παρατηρήθηκε μόνο στα μη ενεργοποιημένα $CD4^+$ Τ κύτταρα ενώ η αντίστοιχη περιοχή στα Τρυθμ ήταν απομεθυλιωμένη (Εικόνα 6 [25]).

Η περιοχή *FoxP3* *TSDR* βρέθηκε μεθυλιωμένη στα μη ενεργοποιημένα $CD4$ Τ κύτταρα καθώς και σε όλους τους άλλους υπότυπους των λευκοκυττάρων και κυττάρων του σώματος που ελέγχθηκαν, και απομεθυλιωμένη μόνο στα Τρυθμ. Παρόμοια ευρήματα βρέθηκαν με τη σύγκριση της περιοχής της πρωτεΐνης CAMTA1 (calmodulin-binding transcription activator 1, ενεργοποιητής της μεταγραφής που προσδένεται στην ασβεστιοτροποποιητίνη). Η CAMTA1 είναι μέλος της πρόσφατα περιγραφείσας πρωτεϊνικής οικογένειας των ενεργοποιητών της μεταγραφής που προσδένονται σε ασβεστιοτροποποιητίνη και εμπλέκονται στην ανάπτυξη νευροβλαστώματος. Ο ρόλος και η λειτουργία τους δεν είναι ακόμη γνωστός, ωστόσο εμφανίζει διαφόρου βαθμού απομεθυλίωση σε μη λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς.



Εικόνα 6. Απομεθυλίωση του γονιδίου του FOXP3 στα $CD4^+CD25^{HIGH}FoxP3^+$ Tregs. Επάνω: Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών του γονιδίου που μελετήθηκαν μέσω πολλαπλασιασμού για απομεθυλίωση (amplicons). Κάτω: Επίπεδο μεθυλίωσης με βάση το χρώμα (κίτρινο= 0% μεθυλίωση, μπλέ = 100% μεθυλίωση) ([25]).

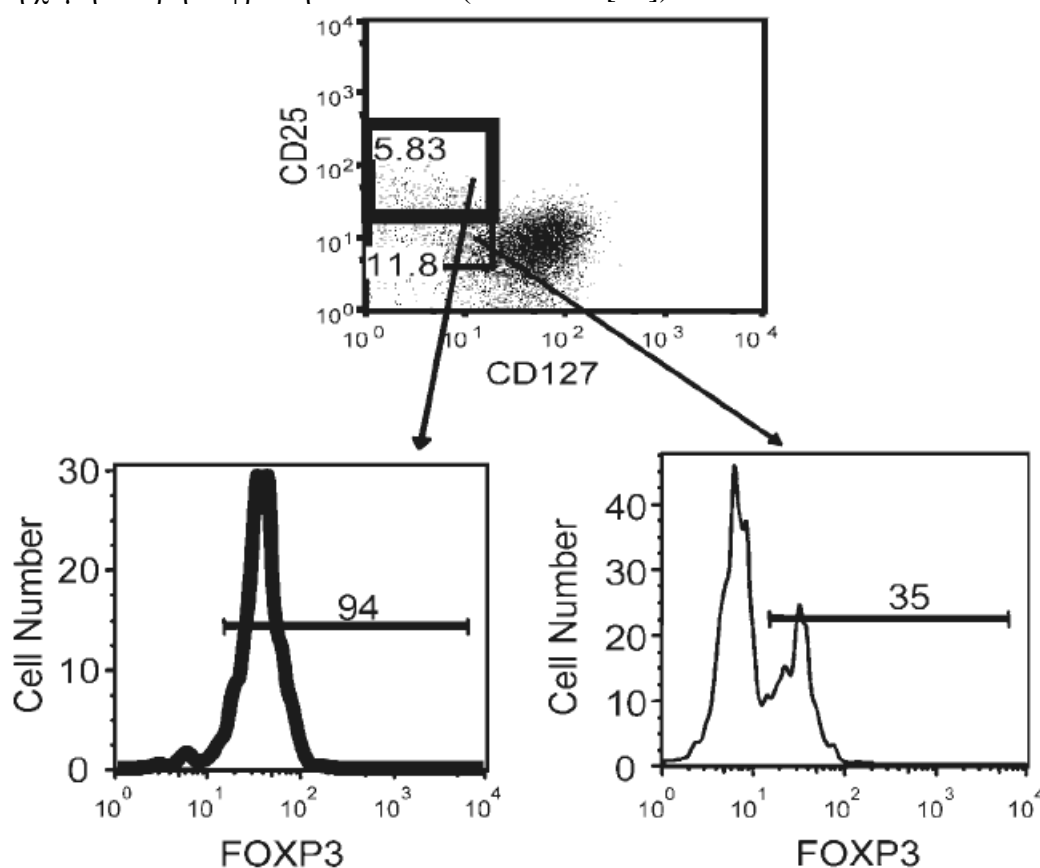
Πειράματα έγιναν και σε άωρα $CD4^+CD25^-CD45RA^+$ κύτταρα T που μετά από ενεργοποίηση εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD25 και FOXP3. Στα κύτταρα αυτά η γονιδιακή περιοχή *FoxP3 TSDR* όσο και η περιοχή *CAMTA1* βρέθηκαν μεθυλιωμένες, δίνοντάς μας τη δυνατότητα για διάκριση μεταξύ tTregs και των υπολοίπων κυττάρων που εκφράζουν παροδικά FoxP3 αλλά δεν έχουν ρυθμιστικές ιδιότητες (Εικόνα 7). Η ενεργοποίηση των $CD4^+$ κυττάρων T παρουσία TGF- β οδηγεί σε κύτταρα που εκφράζουν το FOXP3, έχουν ρυθμιστικές ιδιότητες αλλά δεν εμφανίζουν μόνιμες αλλαγές στη μεθυλίωση των περιοχών *FoxP3 TSDR* και *CAMTA1*. Τέλος, όπως θα δούμε αναλυτικά στη συνέχεια και βλέπουμε και στην εικόνα 7 η εκτεταμένη ενεργοποίηση των Τρυθμ ex vivo, οδηγεί σε δύο διαφορετικούς υποπληθυσμούς Τρυθμ με διαφορετικό βαθμό απομεθυλίωσης και διαφορετικές ιδιότητες, τους οποίους μπορούμε να διαχωρίσουμε με τη χρήση του δείκτη CD45RA [25].



Εικόνα 7. Μεθυλίωση των γονιδίων του FoxP3 και CAMTA1 σε T αδρανή και Τρυθμ μετά από πολλαπλασιασμό ex vivo. Παρά την παροδική έκφραση FoxP3 τα $CD4^+CD25^-$ κύτταρα T (πρώτο στρώμα) παραμένουν μεθυλιωμένα ενώ στα Τρυθμ βλέπουμε ότι η απομεθυλίωση διατηρείται για τα $CD25^{high}CD45RA^+CD4^+$ Τρυθμ (μεσαίο στρώμα) ενώ τα ενεργοποιημένα $CD25^{high}CD45RA^-CD4^+$ Τρυθμ εκφράζουν ατελή απομεθυλίωση και των δύο γονιδίων [25].

2.3 CD127

Ο υποδοχέας της IL-7 (**CD127**) είναι ο επόμενος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των Τρυθμ. Ο δείκτης αυτός εκφράζεται στην πλειοψηφία των Τ δραστικών και των κυττάρων μνήμης, ενώ τα FoxP3⁺ Τ κύτταρα παραμένουν CD127^{low/-}. Φαίνεται ότι ο παράγοντας FoxP3 αλληλεπιδρά με ρυθμιστική περιοχή του γονίδιου *CD127* και οδηγεί στην μειωμένη του έκφραση. Υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD127 και της παρουσίας του FoxP3 με την υψηλότερη έκφραση του ενός δείκτη να σχετίζεται με τη χαμηλότερη έκφραση του άλλου (Εικόνα 8 [24]).



Εικόνα 8. Η έκφραση του FoxP3 στα CD127^{low/-} κύτταρα Τ με βάση την έκφραση του μορίου CD25 (IL-2Rα) [24].

Οι Weihong Liu και συν. στην προσπάθεια συσχέτισμού μεταξύ του CD127 και του FoxP3 βρήκαν επίσης τα ακόλουθα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 8, η πλειοψηφία των CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} κυττάρων Τ εκφράζουν FoxP3, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό των κυττάρων CD4⁺CD25⁻CD127^{low/-} εκφράζει επίσης την πρωτεΐνη FoxP3 αν και σε μικρότερη ένταση φθορισμού. Αντίθετα λίγα Τ κύτταρα FoxP3⁺ βρέθηκαν στον υποπληθυσμό των CD4⁺CD127⁺ και αυτά έχουν μέση και όχι υψηλή έκφραση CD25 που χαρακτηρίζει τα «κλασικά» Τρυθμ.

Το μόριο CD127 φαίνεται να είναι καλύτερος δείκτης από το CD25 για τον προσδιορισμό των CD4⁺FoxP3⁺ Τ κυττάρων, αλλά ο συνδυασμός τους (CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}), προσδιορίζει με τη μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα τα FoxP3⁺ Τ κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό προσδιορισμού, το ποσοστό των Τρυθμ σε φυσιολογικούς μάρτυρες ανέρχεται στο 7–8% των CD4⁺ Τ κυττάρων, που είναι μεγαλύτερο από αυτό που ανευρίσκεται με άλλες μεθόδους, αλλά αυτά τα κύτταρα εξακολουθούν να έχουν κατασταλτικές ιδιότητες και ευρήματα παρόμοια με αυτά των CD4⁺CD25^{high} Τ κυττάρων.

2.4 CD45RO και CD45RA

Στους ανθρώπους η έκφραση των CD45RO και CD45RA ρυθμίζεται συνήθως με έναν αμοιβαία αλληλοαποκλειόμενο τρόπο, με την εναλλαγή μεταξύ των δύο δεικτών να συμβαίνει με βάση τον αντιγονικό υποδοχέα TCR. Μετά από θετική επιλογή στο θύμο τα CD4⁺ κύτταρα T εκφράζουν CD45RO, κατά την μετανάστευση στην περιφέρεια εκφράζουν CD45RA και μετά την αναγνώριση του ειδικού για αυτά αντιγόνου και τη συνεπαγόμενη ενεργοποίησή τους, εκφράζουν και πάλι CD45RO [26].

Ένα μικρό ποσοστό κυττάρων T και ιδιαίτερα μεταξύ αυτών που εκφράζουν CD8, μετατρέπουν την έκφραση CD45RO σε CD45RA μετά τη διαφοροποίησή τους σε δραστικά κύτταρα [27].

Τα CD4⁺ κύτταρα T με υψηλή έκφραση CD25 στο περιφερικό αίμα ενηλίκων έχουν χαρακτήρα κυττάρων μνήμης και εκφράζουν CD45RO. Αντίθετα, τα αντίστοιχα κύτταρα στο αίμα ομφάλιου λώρου εκφράζουν CD45RA, υποδηλώνοντας έτσι ότι δεν έχουν εκτεθεί στο ειδικό για το καθένα τους αντιγόνο.

Φαίνεται ότι στον άνθρωπο, τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στο θύμο, στους λεμφαδένες και στον σπλήνα περιλαμβάνονται δύο υποπληθυσμοί CD4⁺CD25⁺ κυττάρων T με ρυθμιστικές ικανότητες, ο πληθυσμός των CD25^{high}CD45RO⁺ T κυττάρων και ένας δεύτερο πληθυσμός CD45RA⁺ με ελαφρώς χαμηλότερη έκφραση CD25. [21]

Ο μέσος αριθμός CD45RA⁺ Τρυθμ στο περιφερικό αίμα ενηλίκων είναι σχεδόν ο μισός από αυτόν των CD45RO⁺ Τρυθμ και μειώνεται σημαντικά με την ηλικία. Ο κατασταλτικός ρόλος αυτών των υποπληθυσμών επιβεβαιώθηκε με αντίστοιχες δοκιμασίες ενώ τα επίπεδα του mRNA του *Foxp3* βρέθηκαν 100 με 500 φορές υψηλότερα σε σχέση με αυτά στα CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ κύτταρα T που δεν έχουν εκτεθεί στο ειδικό για το καθένα τους αντιγόνο [21].

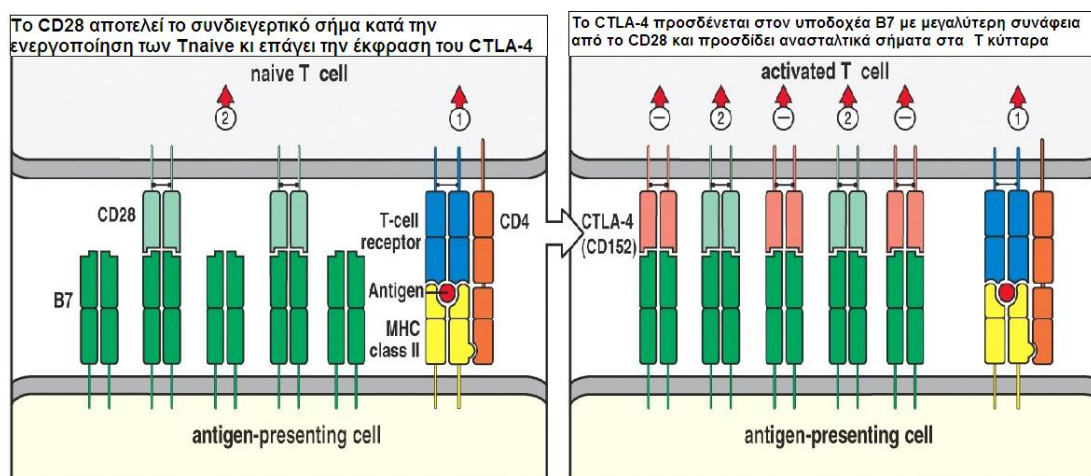
Ιδιαίτερη αναφορά στο διαχωρισμό και στη ρυθμιστική ικανότητα των υποπληθυσμών αυτών με βάση την έκφραση του CD45RO και CD45RA θα κάνουμε στη συνέχεια αναφερόμενοι στην τεχνική Miyara και συνεργατών 2009.

2.5 CTLA-4

Το μόριο CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) εμποδίζει την ενεργοποίηση και την έκκριση κυτταροκινών από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και λειτουργεί ως βασικός μηχανισμός καταστολής. Έχει βρεθεί ότι εκφράζεται από τα ανθρώπινα Τρυθμ σε υψηλά επίπεδα, ανεξάρτητα από την εντόπισή τους (στο περιφερικό αίμα, στο ομφαλικό αίμα, στους λεμφαδένες και στο σπλήνα). Οι αρχικές μελέτες αφορούσαν την έκφρασή του στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά πλέον η μελέτη του αφορά κυρίως την ενδοκυττάρια έκφρασή του με συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Ένα σημαντικό ποσοστό CD25⁻ κυττάρων T που εντοπίζεται ιδιαίτερα στους λεμφαδένες και στο σπλήνα εξακολουθεί να εκφράζει το δείκτη αυτό, περιορίζοντας έτσι τη χρηστική του αξία ως δείκτη διαχωρισμού [27]. Ωστόσο, πρόσφατη εργασία των Romano και συν. δείχνει ότι με τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος anti-CTLA-4-APC (isotype IgG2aκ' BD Biosciences), και την επώαση του στους 4°C για 20 λεπτά, το μόριο CTLA-4 εκφράζεται σε πολύ μεγαλύτερη ένταση στη μεμβράνη των Τρυθμ και λιγότερο σε αυτή των Τδραστ και Τπαρθ [28].

Η λειτουργία του μορίου του CTLA-4 στον έλεγχο των αποκρίσεων των T κυττάρων εξασκείται από συνεργειακή δράση στα Τδραστ και στα Τρυθμ. Το μόριο CTLA-4 έχει ανταγωνιστική δράση με το μόριο CD28 ως προς την πρόσδεση με τον υποδοχέα B7 (CD80/86), ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων

(Εικόνα 9). Το μόριο CD28 εκφράζεται διαρκώς στα κύτταρα T ενώ η έκφραση του CTLA-4 αυξάνεται μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα TCR, γεγονός που υποστηρίζει την άποψη ότι ο ρόλος του είναι να ρυθμίζει τις αποκρίσεις των κυττάρων T μετά από ενεργοποίησή τους. Η ισχυρότερη συγγένεια πρόσδεσης του CTLA-4 σε σχέση με το CD28 για την οικογένεια υποδοχέων B7 (προσδέεται με 20 φορές μεγαλύτερη συνάφεια), φαίνεται να είναι σημαντική για τη διατήρηση της ανοσοανοχής, γιατί έτσι ανταγωνίζεται την πρόωμη ενεργοποίηση των T κυττάρων και οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή IL-2, εμποδίζει την παραγωγή κυκλίνης και παρεμβαίνει στα σήματα του TCR.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης των μορίων CD28 και CTLA4 στον υποδοχέα B7 και της διεγερτικής τους δράση αντίστοιχα. (Immunology 2005)

Στους ποντικούς με καταστροφή του γονιδίου *CTLA-4*, αναπτύσσεται ένα λεμφοϋπερπλαστικό νόσημα και πεθαίνουν σε ηλικία 3-4 εβδομάδων. Αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη για το σημαντικό ρόλο του μορίου στην ρύθμιση των αποκρίσεων των κυττάρων T καθώς και στην ανοσορρύθμιση. Ωστόσο οι φυσιολογικοί αριθμοί των Τρυθμ στα ποντίκια με έλλειψη *CTLA-4* υποδεικνύουν ότι το μόριο αυτό δεν είναι απαραίτητο για τη ανάπτυξη και επιβίωση των Τρυθμ. Οι δοκιμές σε πειραματικά μοντέλα με κολίτιδα ή διαβήτη υποδεικνύουν ότι η απουσία του μορίου επηρεάζει την κατασταλτική λειτουργία των Τρυθμ. Επιπλέον, το *CTLA-4* εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των Τδραστ κυττάρων. Στους ποντικούς με καταστροφή του *CTLA-4* τα T κύτταρα διαφοροποιούνται κυρίως προς φαινότυπο Th2 (T helper 2), ενώ επίσης στα πειραματόζωα που εμποδίστηκε η δράση του *CTLA-4* βρέθηκε σημαντική μείωση της σύνθεσης του TGF- β . Το μόριο *CTLA-4* φαίνεται να επηρεάζει επίσης τις αποκρίσεις των Th17 (T helper 17).

Είναι σημαντικό ότι κάποιοι πολυμορφισμοί του μορίου έχουν συσχετιστεί με προδιάθεση σε ορισμένα αυτοάνοσα νοσήματα, συμπεριλαμβανομένου του ΣΔ1, της σκλήρυνσης κατά πλάκας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του συστηματικού ερυθρεμάτωδη λύκου.

Όλα αυτά αποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της σηματοδοτικής πορείας *CTLA-4*/ *CD80-86* στον έλεγχο της αυτοανοσίας και το αναδεικνύουν ως έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο για τον έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης. Ήδη η χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος ipilimumab που παρεμποδίζει την πρόσδεση του *CTLA-4* στον στόχο του έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα και οι μελέτες δείχνουν ότι αυξάνει το προσδόκιμο σε αυτούς τους ασθενείς [29].

2.6 CD122 και CD132

Μια από τις μοναδικές ιδιότητες της πλειοψηφίας των Τρυθμ που εκφράζουν Foxp3 είναι η συνέκφραση και των τριών αλυσίδων του υποδοχέα της IL-2, του CD25 (IL-2R α), του CD122 (IL-2R β) και του CD132 (IL-2R γ). Τα ετεροδιμερή α/β διευκολύνουν την πρόσδεση με μεγάλη συνάφεια και το σύμπλοκο σταθεροποιείται από την αλυσίδα γ αυξάνοντας κατά πολύ τη σταθερότητα του συμπλόκου κυτταροκίνης-υποδοχέα.

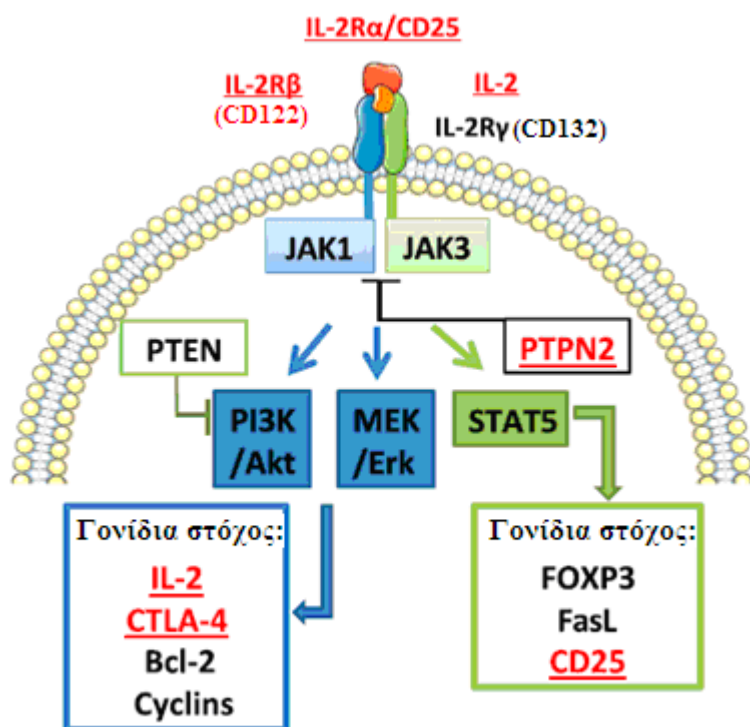
Πίνακας 1. Στον πίνακα βλέπουμε τη συγγένεια κάθε αλυσίδας με την IL-2 καθώς και τα κύτταρα στα οποία βρίσκονται οι επιμέρους συνδυασμοί αλυσίδων σχηματίζοντας τους αντίστοιχους υποδοχείς. Να σημειωθεί ότι K_d είναι η σταθερά διάστασης μεταξύ υποδοχέα και της ιντερλευκίνης, η οποία είναι αντιστρόφως σχετιζόμενη με τη συγγένεια [30]

Υπομονάδες	Συγγένεια (K_d), \approx pM	Κύτταρα έκφρασης
IL-2R		
α	10.000	
β	100.000	
γ	>50.000.000	
$\beta\gamma$	1.000	NK
$\alpha\beta\gamma$	10	Τρυθμ, Τδραστ, B

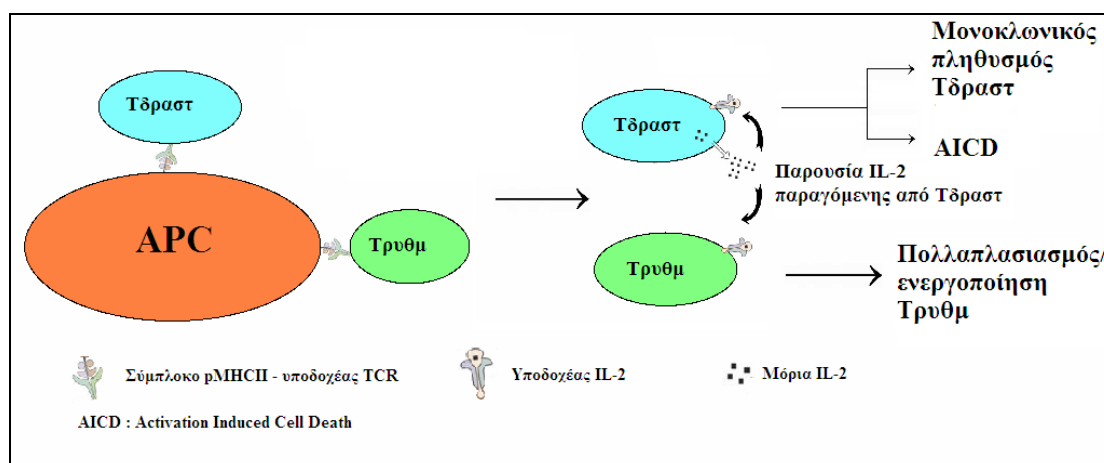
Η IL-2 προσδέεται ισχυρά στον συγκεκριμένο υποδοχέα (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) με σταθερά διάστασης (K_d) περ. 10 pM, ενώ για τον υποδοχέα IL-2R $\beta\gamma$, που βρίσκεται κυρίως στα φυσικά φονικά κύτταρα, η σταθερά διάστασης είναι περ. 1000 pM. Η συμπλοκοποίηση IL-2 με τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα της, οδηγεί μέσω της φωσφορυλίωσης της κινάσης JAK στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT5 (Εικόνα 10). Η ενεργοποίηση μέσω της IL-2 είναι σημαντική για την ανάπτυξη, τη διατήρηση και τη λειτουργία των Τρυθμ, όμως παρά το σημαντικό της ρόλο δεν παράγεται από τα ίδια τα Τρυθμ, αλλά η παραγωγή της προκύπτει από τα ενεργοποιημένα Τδραστ.

Τα Τδραστ παράγουν IL-2 μετά την ενεργοποίησή τους και σταδιακά αυξάνουν την έκφραση του CD25 η οποία ενισχύει την πρόσδεση της IL-2 και την περαιτέρω ενεργοποίηση των Τ κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους. Ωστόσο πάντα εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό σε μικρότερο βαθμό από τα Τρυθμ [31],[32].

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 11, η παραγόμενη από τα Τδραστ, IL-2 έχει αρχικά αυτοκρινή δράση, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός μονοκλωνικού πληθυσμού ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων. Με την πάροδο του χρόνου, η πλειοψηφία των Τδραστ οδηγείται σε θάνατο μετά από ενεργοποίηση- AICD (Activation induced cell death) παρά την παρουσία της IL-2, με μηχανισμούς που δεν είναι ξεκάθαροι (Εικόνα 11). Από την άλλη πλευρά, η αυξημένη έκφραση CD25 από τα Τρυθμ οδηγεί, σε δεύτερη φάση, σε αυξημένη κατανάλωση IL-2 με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των Τρυθμ και την καταστολή της δράσης των Τδραστ ώστε να αποφευχθεί η αυτοάνοση απόκριση [19].



Εικόνα 10. Η δράση της IL-2 (πορτοκαλί στο σχήμα) μέσω της πρόσδεσης στον υποδοχέα και συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση του JAK1 και του JAK3 από τις αλυσίδες β (μπλε στο σχήμα) και γ (πράσινο στο σχήμα) οδηγεί στην μεταγωγή του σήματος μέσω ποικίλων σηματοδοτικών πορειών που ενεργοποιούν διαφορετικά μόρια και σε διαφορετικό βαθμό στα Τρυθμ (πράσινα στο σχήμα) και στα Τδραστ (μπλε στο σχήμα). Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι πρωτεΐνες, οι γενετικοί πολυμορφισμοί των οποίων, είναι γνωστό ότι σχετίζονται με τον ΣΔ1 [32].

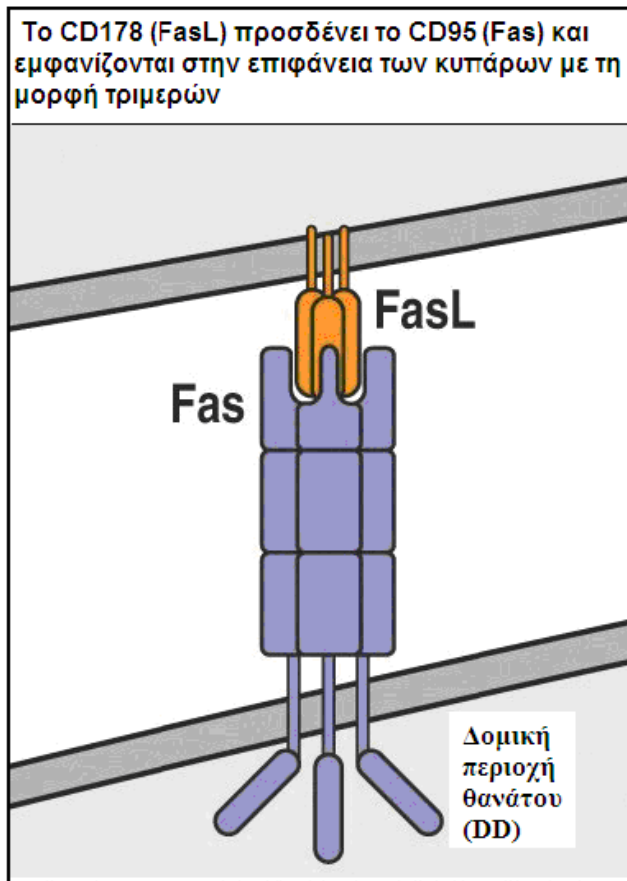


Εικόνα 11. Δράση της IL-2 στα Τρυθμ και Τδραστ

2.7 CD95 και CD178

Το μόριο Fas (CD95) και ο προσδέτης του, FasL (CD178/ CD95L), αποτελούν μέλη της οικογένειας των υποδοχέων TNF-α (Tumor necrosis factor-α) αλλά χαρακτηρίζονται από την έκφραση μιας κυτταροπλασματικής δομικής περιοχής γνωστής ως «δομικής περιοχής

θανάτου» (death domain-DD, Εικόνα 12). Τα μόρια αυτά αποτελούν μεσολαβητές του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου /απόπτωσης. Επίσης, ο θάνατος έπειτα από ενεργοποίηση (AICD) μια διεργασία απαραίτητη για την αποφυγή λεμφοκυττάρωσης μετά από κάθε λοίμωξη, εξαρτάται εν μέρει από τα μόρια αυτά. Έτσι τα συμβατικά κύτταρα T μετά από πολλαπλασιασμό εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD95 και CD178.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των μορίων CD95 και CD178

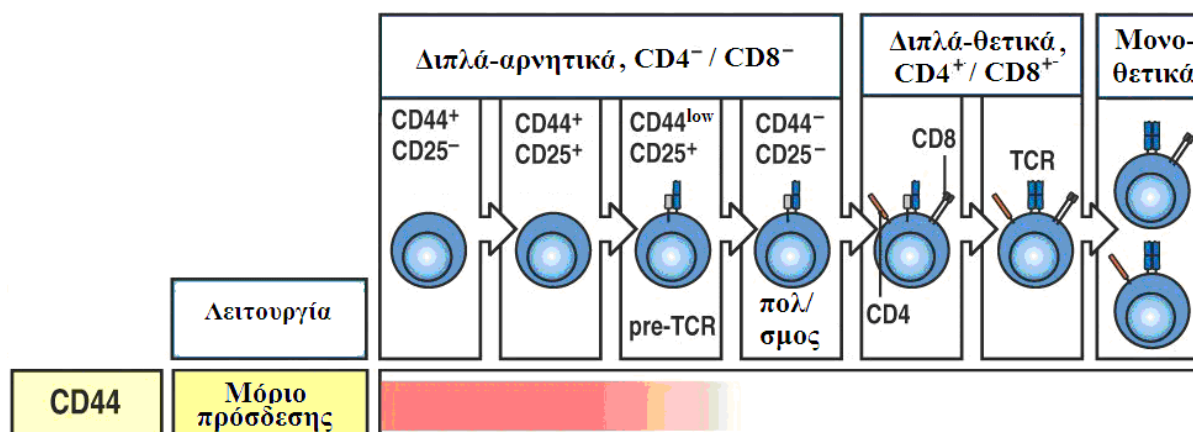
Τα Τρυθμ ωστόσο διαφοροποιούνται ως προς το ότι τα $CD45RO^+$ Τρυθμ, που αντιστοιχούν στα ενεργοποιημένα Τρυθμ (active Tregs, aTregs), παρόλο που εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD95 δεν οδηγούνται σε AICD, ενώ τα $CD45RA^+$ Τρυθμ, μη ενεργοποιημένα (resting Tregs, rTregs), εκφράζουν χαμηλά επίπεδα CD95 και είναι επίσης ανθεκτικά στην απόπτωση που επάγεται μέσω εξωγενούς χορήγησης CD95. Έχει βρεθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Foxp3 προσδένεται εγγύς του γονιδίου *CD95L*, ωστόσο η ακριβής σημασία αυτής της πρόσδεσης δεν έχει βρεθεί [33].

Παρόλο που τα μόρια CD95/CD178 φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση του συστήματος, οι διαφωνίες σχετικά με το ρόλο του CD95 και το μηχανισμό έκφρασης του CD178 πρέπει να μελετηθούν [33],[34].

2.8 CD44

Το μόριο CD44 (Pgp1, ή HUTCH-1 ή ECM-III) αποτελεί ένα αντιγόνο επιφανείας των T κυττάρων και συγκεκριμένα μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα του υαλουρονικού οξέος και χρησιμοποιείται ως μόριο πρόσδεσης που εμπλέκεται στις

αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση, την μετανάστευση και την απόπτωση τους. Το γονίδιο αυτού του μορίου βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και μέχρι τώρα μαζί με το CD25 χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των σταδίων της πρώιμης ανάπτυξης των T κυττάρων στο θύμο αδέν (τέσσερα στάδια εξέλιξης των CD4⁻CD8⁻ θυμοκυττάρων). Ο ακριβής ρόλος της έκφρασης του μορίου σε αυτό το επίπεδο δεν είναι γνωστός (Εικόνα 13)



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του CD44 στο θύμο αδέν, ανάλογα με τα στάδια διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων (Immunology 2008).

Επιπλέον, το CD44 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα μνημονικά κύτταρα T και αποτελεί χρήσιμο δείκτη για την ανίχνευσή τους. Τα κύτταρα αυτά, χαρακτηρίζονται από «αντίθετο» φαινότυπο από αυτόν των Τρυθμ καθώς εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD127 και χαμηλά επίπεδα CD25, γεγονός που πιθανώς σχετίζεται με διαφορετικές πορείες στην εξέλιξη και επιβίωση αυτών των T υποπληθυσμών (Εικόνα 14)

Η έκφραση του CD44 και ιδιαίτερα της ισομορφής CD44v, έχει συσχετιστεί με την έκφραση του FoxP3 και τη λειτουργία των Τρυθμ [35]. Πειραματικά μοντέλα σε ποντίκια, υποδεικνύουν ότι το CD44 εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό αλλά επάγει την φαινοτυπική σταθερότητα των Τρυθμ. Η αυξημένη συγκέντρωση υαλουρονικού (του προσδέτη του CD44) στα σημεία χρόνιας φλεγμονής δημιουργεί περιβάλλον που εμποδίζει την διαφοροποίηση των Τρυθμ και ευνοεί την αυτοανοσία. Ειδικότερα, οι Nagy N και συν. έδειξαν σε πειραματικά μοντέλα διαβητικών ποντικών, ότι η χορήγηση 4-MU (4-methylumbelliferone), ενός αναστολέα της σύνθεσης του υαλουρονικού οξέος, επιτρέπει την διαφοροποίηση των Τρυθμ και την αύξηση της αναλογίας Τρυθμ/ Τδραστ στα σημεία φλεγμονής, ενισχύοντας έτσι την «περιφερική ανοχή» και προστατεύοντας από την εξέλιξη σε διαβήτη. [36]

Σε πειράματα σε ποντικούς οι Tie Liu et al, βρήκαν ότι τα CD4⁺CD25⁺CD44⁺ Τρυθμ εκφράζουν *in vitro* υψηλά επίπεδα Foxp3 και IL-10 και εμφανίζουν κατασταλτικές ιδιότητες σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα CD4⁺CD25⁺CD44^{low}. Επιπλέον πρότειναν τη χρήση του CD44 για το διαχωρισμό των Τρυθμ του θύμου σε υποπληθυσμούς [37]. Όπως και με άλλα μόρια επιφανείας που έχει αναφερθεί ότι χαρακτηρίζουν τα Τρυθμ, πρέπει να επισημανθεί ότι και ο δείκτης αυτός, εκφράζεται και σε άλλα ενεργοποιημένα κύτταρα, κάτι που ενδεχομένως να μειώνει την αξία του.

Δείκτης επιφανείας	Naive	Effector	Memory
CD44	+	+++	+++
CD45RO	+	+++	+++
CD45RA	+++	+	+++
CD122	+/-	++	++
CD25	-	++	-
CD127	++	-	+++

Εικόνα 14. Έκφραση βασικών μορίων επιφανείας στα κύτταρα μνήμης σε σύγκριση με τα Τδραστ και τα Τπαρθ (Immunology 2008).

Τέλος, μια άλλη και πολύ ενδιαφέρουσα ιδιότητα του μορίου CD44, είναι ότι αποτελεί απαραίτητο επικουρικό μόριο του τριμερούς του CD74 (Ii, αμετάβλητη αλυσίδα μορίου ιστοσυμβατότητας τάξης II), τον υποδοχέα του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης των μονοκυττάρων (Migration Inhibitory Factor, MIF) [38].

2.9 Helios, GITR

Πρόσφατα δεδομένα έχουν αποκαλύψει μια ιδιαίτερα σημαντική πρωτεΐνη στα Τρυθμ, τον μεταγραφικό παράγοντα Helios. Ο Helios ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών Ikaros και δείχνει μια ιδιαίτερα υψηλή έκφραση στα Τρυθμ. Η πρόσδεσή του στον προαγωγέα του *FoxP3* αυξάνει την έκφραση του *FoxP3*. Η διαρκής έκφραση του παράγοντα Helios κατά την ανάπτυξη Τρυθμ συνδέεται με υψηλή έκφραση του *FoxP3* και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσότερο σταθερών υποπληθυσμών [39]. Ο Helios προτάθηκε ως ένας καλός δείκτης για τη διάκριση των *tTregs* από τα *iTregs* [40]. Όσον αφορά τα παραγόμενα *in vitro* *iTregs*, αυτά προσδιορίζονται με τη βοήθεια του φαινοτύπου $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+HELIOS^-$ και μεθυλίωση *TSDR*, ωστόσο *in vivo* πρέπει να βρεθούν και άλλοι δείκτες για τον καλύτερο προσδιορισμό τους [11]. Φαίνεται ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Helios σχετίζεται περισσότερο με την λειτουργία των Τρυθμ παρά με το βαθμό ενεργοποίησης [41].

Από την άλλη πλευρά παρατεταμένη κυτταρική ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός οδηγεί σε απώλεια της κατασταλτικής ικανότητας των κυττάρων και σχετίζεται με έναν άλλο μεταγραφικό παράγοντα τον SATB1. Η παρουσία αυτού του μεταγραφικού παράγοντα καταστέλλει την έκφραση του *FoxP3* μέσω πρόσδεσης στον προαγωγέα του. Η ικανότητα

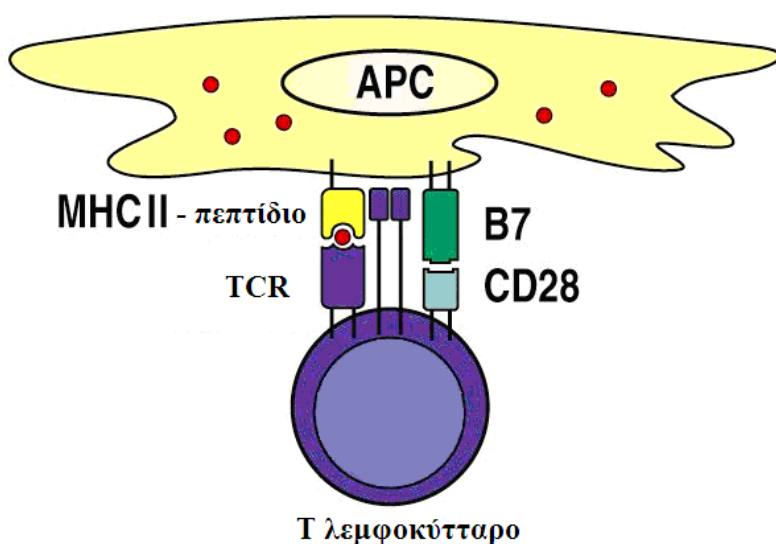
ελέγχου των μηχανισμών σε μοριακό επίπεδο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο τομέα παρέμβασης σε αυτοάνοσες ή φλεγμονώδεις νόσους [39].

Τα κύτταρα που εκφράζουν τα υψηλότερα επίπεδα **GITR** (Glucocorticoid-Induced TNFR family related gene- γονίδιο σχετιζόμενο με την επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή οικογένεια TNFR) είναι $CD4^+CD25^-$ αλλά ούτε αυτός ο δείκτης είναι επαρκής για το διαχωρισμό μεταξύ υψηλής και ενδιάμεσης έκφρασης CD25.

2.10 Κυτταρική βιολογία μορίων σημαντικών για τα Τρυθμ

2.10.1 CD28- CD27

Όπως είναι γνωστό, εκτός από το σήμα που οδηγεί μετά από την πρόσδεση του υποδοχέα TCR με το σύμπλοκο p-MHCII στην ενεργοποίηση του T κυττάρου, η πρόσδεση του μορίου B7 (CD80/CD86), που βρίσκεται στην επιφάνεια του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, με το μόριο CD28, που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου T, δίνει το σήμα για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του τελευταίου (*Εικόνα 15*).



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου (APC) με το T λεμφοκύτταρο (Immunology 2007)

Ο υποδοχέας B7 εκτός από το CD28 έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης ενός ακόμη μορίου με παρόμοια αλληλουχία, του CTLA-4 (CD152) στο οποίο έχουμε ήδη αναφερθεί διεξοδικά.

Ένα ακόμη μόριο που δρα ως συνδιεγέρτης στα λεμφοκύτταρα T κατά τη διέγερσή τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά, είναι ένα μέλος της οικογένειας των υποδοχέων TNF, το CD27. Το CD27 εμφανίζεται στα θυμοκύτταρα και εκφράζεται στο 75% των ώριμων $CD4^+$ και $CD8^+$ T κυττάρων του περιφερικού αίματος. Η έκφρασή του αυξάνεται μετά από την ενεργοποίηση, αλλά εκφράζεται με σταθερό τρόπο όταν πολλαπλασιάζονται $CD45RA^+$ κύτταρα T και χάνεται στα $CD45RO^+CD4^+$ κύτταρα T. Οι Jacquot και συν. έχουν δείξει ότι η συνδιέγερση με το CD27 είναι απαραίτητη για τη ρυθμιστική λειτουργία των Τρυθμ [42],[43]

Ιδιαίτερα για τα Τρυθμ έχει βρεθεί ότι συνδιεγερτικά σήματα (CD28 και CD27) είναι απαραίτητα για να γίνουν πλήρως λειτουργικά. Στους ποντικούς NOD με έλλειψη CD28 προκαλείται εμφάνιση ΣΔ, ενώ στα θυμοκύτταρα η συνδιέγερση με το CD28 είναι απαραίτητη για την έκφραση του FOXP3. Τα επαγόμενα Τρυθμ απαιτούν την ύπαρξη CD28

για την επιβίωσή τους. Το CD27 είναι ένα ακόμη μόριο που εκφράζεται κυρίως στα Τπαρθ και τα Τρυθμ ενώ τα Τδραστ τείνουν να χάνουν την έκφραση αυτή κατά τη διαφοροποίησή τους [44]. Σύμφωνα με τους Duggleby RC και συν. το CD27 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για το διαχωρισμό των Τρυθμ στα κύτταρα που προκύπτουν από πολλαπλασιασμό CD4CD25 κυττάρων T [45].

2.10.2 CD4, CD2, CD58, CD11a και CD54

Τα επιφανειακά μόρια CD4, CD2, CD58, CD11a και CD54 αποτελούν μόρια πρόσδεσης που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις των λευκοκυττάρων (Εικόνα16 Α.).

Το CD4 αποτελεί μέρος της σηματοδότησης μέσω TCR που οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης p56^{lck} μετά από την πρόσδεση του συμπλόκου pMHCII στον αντιγονικό υποδοχέα TCR. Μια ακόμη παρατήρηση που αφορά τα Τρυθμ είναι η χαμηλότερη ως προς την ένταση φθορισμού έκφραση του CD4 (CD4^{int}) [46],[47],[48],[49]. Η μειωμένη έκφραση CD4 από τα Τρυθμ μπορεί να σχετίζεται με διαφοροποίηση στον τρόπο ενεργοποίησης μέσω του υποδοχέα TCR σε σχέση με τα Τδραστ και Τπαρθ, ή ακόμη και με μικρότερο επίπεδο ενεργοποίησης κατά την έκθεση στο ίδιο ερέθισμα.

Τα μόρια CD2 (LFA-2, Lymphocyte function-associated antigen-2), CD58 (LFA-3, Leukocyte Function Associated antigen-3) και CD54 (ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule 1) ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin superfamily) και αποτελούν σημαντικά μόρια πρόσδεσης για τα λεμφοκύτταρα. Το CD11a (LFA-1, Lymphocyte Function Associated antigen-1) ανήκει στις ενσωματινές, οι οποίες είναι μόρια που οδηγούν σε ισχυρές αλληλεπιδράσεις.

Το CD2 (LFA-2) εκφράζεται στα κύτταρα T, στα θυμοκύτταρα και στα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα. Προσδένεται με το CD58 (LFA-3) και μετά την ενδοκυττάρια πρόσδεση της κινάσης Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) οδηγεί στην ενεργοποίηση των T κυττάρων.

Η αρχική πρόσδεση ενός Τδραστ με το κύτταρο-στόχο είναι μια μη ειδική αλληλεπίδραση που μεσολαβείται από το CD11a και το CD2. Τα επίπεδα έκφρασης αυτών των μορίων στα Τδραστ είναι διπλάσια έως τετραπλάσια σε σχέση με τα Τπαρθ και επομένως έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται πιο αποτελεσματικά με τα κύτταρα-στόχο. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι παροδική εκτός εάν αναγνωριστούν από τον αντιγονικό υποδοχέα TCR, σύμπλοκα pMHCII που επάγουν την ισχυροποίηση της πρόσδεσης.

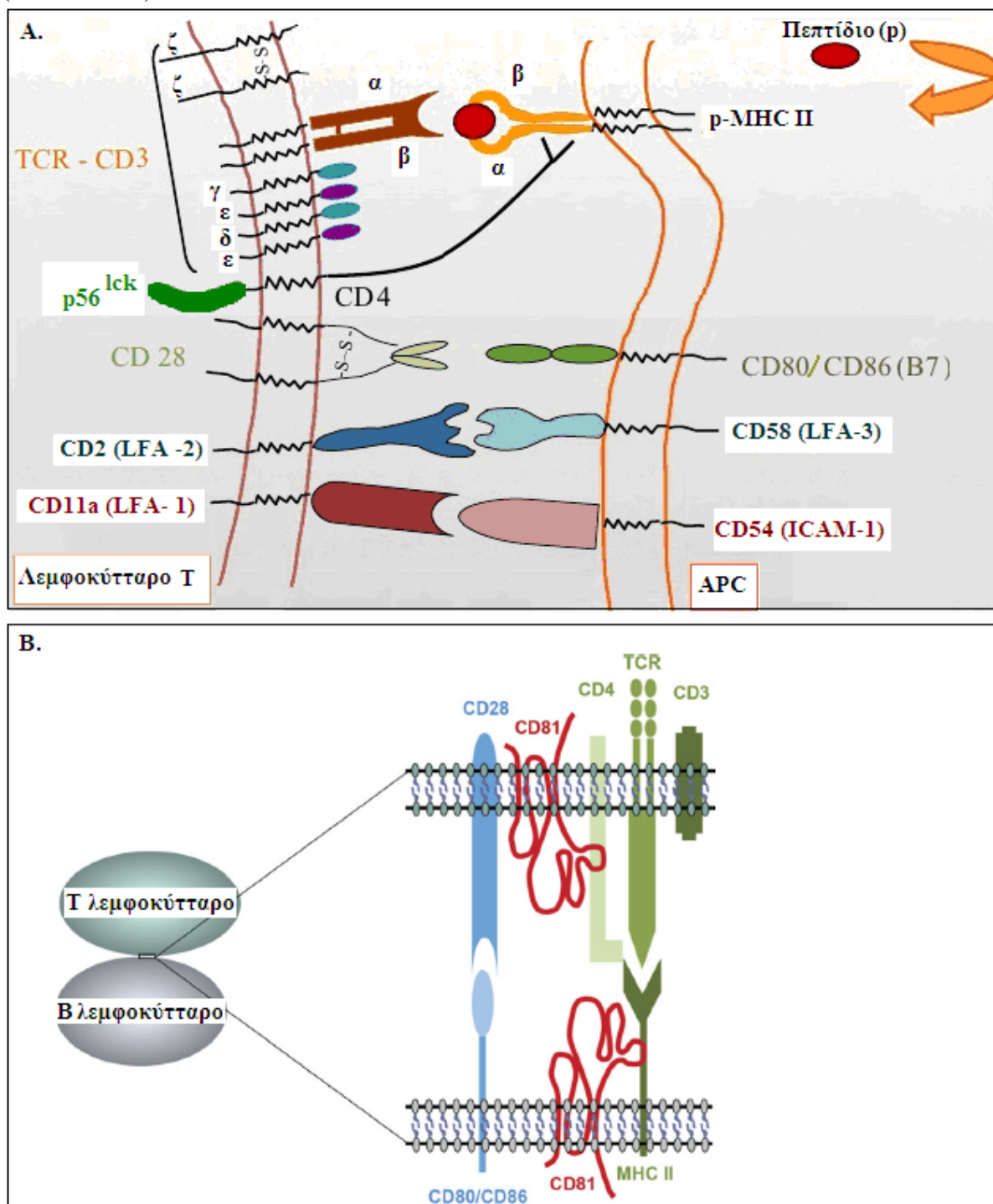
Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκφράζουν σε μεγαλύτερο βαθμό το μόριο πρόσδεση CD2 στην επιφάνειά τους, αυξάνοντας την ένταση πρόσδεσης με εν δυνάμει κύτταρα-στόχους. Μετά την ενεργοποίηση, η έκφραση της L-επιλεκτίνης (ένα μόριο μέσω του οποίου τα κύτταρα T προσδένονται στους λεμφοαδένες) μειώνεται, ενώ αντίθετα παράγονται μεγάλες ποσότητες CD11a. Το μόριο αυτό προσδένεται με τα μόρια CD54 (ICAM-1) και CD102 (ICAM-2) στο ενδοθήλιο. Πρέπει να επισημάνουμε ότι με βάση τα έως τώρα δεδομένα, το CD54 μετά την πρόσδεσή του με τις ενσωματινές που εκφράζονται στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων ενισχύει την πρόσδεση τους στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και έτσι διευκολύνει τη διαπήδηση και τη μεταφορά τους στο σημείο της φλεγμονής.

Αντίθετα, τα μη ενεργοποιημένα κύτταρα T εκφράζουν σε χαμηλότερο βαθμό μόρια πρόσδεσης όπως το CD2 και το CD11a.

2.10.3 CD81

Το CD81 είναι μια ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά την μεμβράνη τέσσερις φορές (tetraspanin) και σχετίζεται με τα HLA-DR/DQ, καθώς και με άλλα σημαντικά συμπλέγματα για τη μεταφορά σήματος στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων B

και T. Στα κύτταρα T, το CD81 σχετίζεται με το CD4 και το CD8 και αποτελεί ένα συνδιεγερτικό μόριο μαζί με το CD3 [50]. Κατά την αντιγονοπαρουσίαση μέσω των B κυττάρων, το CD81 βρέθηκε στην επιφάνεια τόσο των B όσο και των T λεμφοκυττάρων (Εικόνα 16.B).



Εικόνα 16.A. Σχηματική απεικόνιση των επιφανειακών μορίων πρόσδεσης των T λεμφοκυττάρων, και των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC). B. Η παρουσία του μορίου CD81 στην ανοσολογική σύναψη κατά την αλληλεπίδραση των λεμφοκυττάρων T και B [51]. Η απεικόνιση της αλληλεπίδρασης CD4-MHCII στο B είναι εσφαλμένη· τα δεδομένα συνηγορούν με αυτήν στην A.

Σύμφωνα με τους Secrist και συν. το CD81, εκτός από το γνωστό κεντρικό του ρόλο στην ενεργοποίηση και το πολλαπλασιασμό των B κυττάρων, κατέχει κεντρικό ρόλο στη σύνθεση κυτταροκινών στα T κύτταρα. Επίσης φαίνεται ότι σχετίζεται με την έκφραση του MHC τάξης II και παρατηρήθηκε ότι η σύνδεσή του με το μόριο αυτό ενισχύει τη σύνθεση της IL-4. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν την ικανότητα των B κυττάρων να επάγουν τη σύνθεση IL-4 στα T κύτταρα η οποία μπορεί να ενισχυθεί από τη σύνδεση επιφανειακών μορίων όπως το CD81 και τα MHC τάξης II [52]. Στους ανθρώπους, η συνδιέγερση με CD28 και CD81 υποδεικνύει ότι καθένα από τα μόρια ενεργοποιεί σε μεγαλύτερο βαθμό διαφορετικούς υποποληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων, με το CD28 να ενεργοποιεί κυρίως τα Τδραστ και T κύτταρα μνήμης ενώ το CD81 ενεργοποιεί κυρίως τα Tπαρθ [51].

2.10.4 CD221

Ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα IGF-1 (Insulin like growth factor 1, IGF-1R-JTK13), προσδένει ένα αυξητικό μόριο παρόμοιο με την ινσουλίνη με υψηλή συνάφεια. Έχει δράση τυροσυλο-κινάσης και αποτελείται από δύο υπομονάδες, την α και τη β .

Ο IGF-1, ο προσδέτης του IGF-1R, είναι ένας από τους πλέον ισχυρούς ενεργοποιητές της πορείας Akt/PI3K (protein kinase B/ phosphatidylinositol 3-kinase), ενός ενεργοποιητή της κυτταρικής ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού και ενός ισχυρού αναστολέα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ο IGF-1 προσδέεται σε τουλάχιστον δύο υποδοχείς: τον υποδοχέα IGF-1R, και τον υποδοχέα της ινσουλίνης. Στον πρώτο προσδέεται με πολύ ισχυρότερη συνάφεια σε σχέση με το δεύτερο. Ο IGF1R εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στους ανθρώπινους λεμφαδένες και επομένως θα μπορούσε να είναι ένας αυξητικός παράγοντας που δρα στα λεμφοκύτταρα και στα μονοκύτταρα που ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται τοπικά [53].

2.11 Κυτταροκίνες και Τρυθμ

Η IL-2, είναι μια 'πρώιμη' κυτταροκίνη καθώς παράγεται άμεσα από τα ενεργοποιημένα Τδραστ κύτταρα στους λεμφαδένες για τη δική τους ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι απαραίτητη για την κυτταρική ενεργοποίηση των Τρυθμ που στη συνέχεια θα ρυθμίσουν την απόκριση των κυττάρων T. Αν και η IL-2 δεν είναι απαραίτητη για την παραγωγή των Foxp3⁺ κυττάρων T στο θύμο είναι εντελώς απαραίτητη για την ομοιοστασία και την επιβίωση των Τρυθμ στην περιφέρεια.

Αντίθετα η IL-7 παράγεται τοπικά στις θέσεις της φλεγμονής οδηγώντας σε αυξημένη επιβίωση και πολλαπλασιασμό των Τδραστ.

Η IL-10 είναι μια κυτταροκίνη που συμμετέχει στην καταστολή που μεσολαβείται μέσω του υποπληθυσμού Tr1 και φαίνεται να έχει ρυθμιστικές ιδιότητες. Η παρουσία της σχετίζεται με έμμεση καταστολή της παραγωγής κυτταροκινών και του πολλαπλασιασμού των αντιγονοειδικών Τδραστ και φαίνεται να έχει αντιφλεγμονώδη δράση.

Υπάρχουν ισχυρά δεδομένα ότι η IL-2 και ο TGF- β είναι παράγοντες σημαντικοί για τη διατήρηση των iTregs, και είναι απαραίτητοι για τη διαρκή έκφραση του FoxP3 από τα tTregs και pTregs. Τα Τρυθμ φαίνεται να συμμετέχουν στην παραγωγή TGF- β , γεγονός που έχει σημαντικό ρόλο στην αυτοανοσία. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η κατασταλτική δράση των Τρυθμ εξαρτάται από την παρουσία του TGF- β που είναι προσδεμένος στην κυτταρική μεμβράνη με την μεμβρανική πρωτεΐνη GARP, ενώ η δράση του στα Τρυθμ γίνεται μέσω των υποδοχέων (TGF- β RI και TGF- β RII) [20],[35],[54].

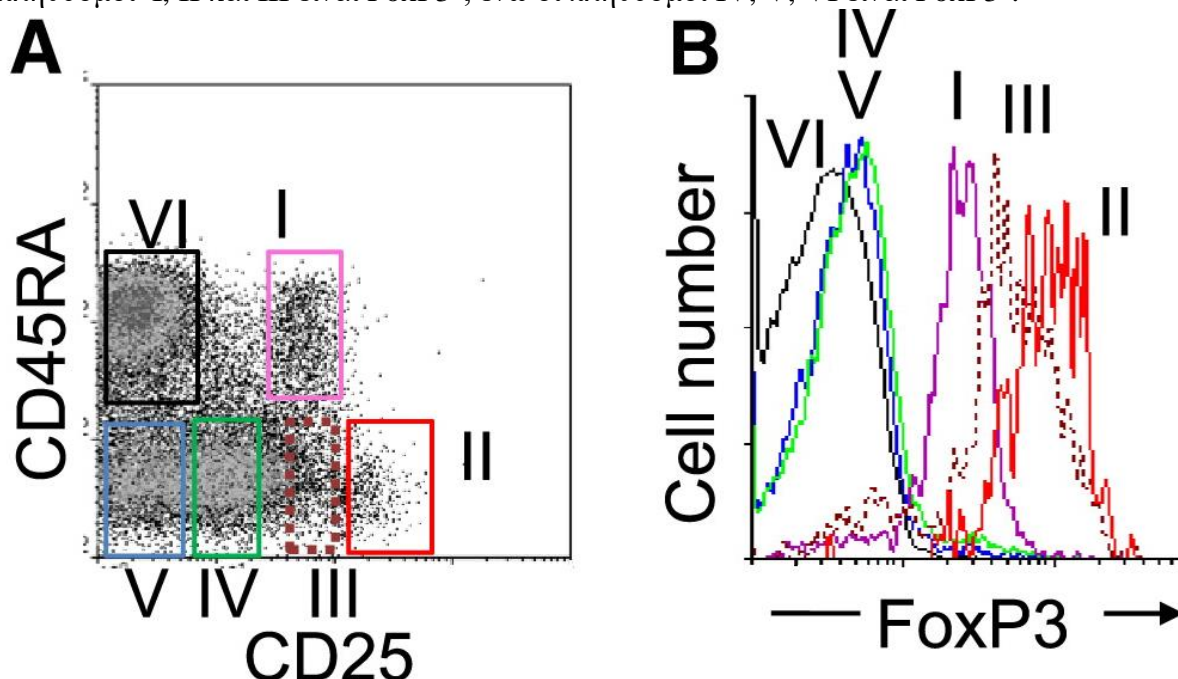
Η καταστολή μέσω Τρυθμ όπως ήδη αναφέραμε εξαρτάται από την επαφή μεταξύ Τρυθμ και των στόχων τους (Τδραστ, δενδριτικά κύτταρα). Επιπλέον, οι ανοσοκατασταλτικές

κυτταροκίνες TGF- β και IL-10 μέσω της συνδυαστικής τους δράσης διασφαλίζουν μια φλεγμονώδη απόκριση ειδικά στοχευμένη χωρίς να προκαλούνται αποκρίσεις έναντι των αντιγόνων του εαυτού [20].

3. Νέος τρόπος ορισμού των υποπληθυσμών Τρυθμ : Τεχνική Miyara και συνεργατών 2009

Μια επιπλέον προσέγγιση στα ανθρώπινα Τρυθμ, που συμβάλλει στο διαχωρισμό και στην λεπτομερέστερη μελέτη και κατανόησή τους είναι αυτή που παρουσιάστηκε από την ομάδα του Shimon Sakaguchi το 2009 και περιγράφουμε αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Οι Miyara και συνεργάτες έδειξαν ότι από το συνδυασμό του CD25 και του CD45RA στα CD4⁺ κύτταρα Τ προκύπτουν έξι τουλάχιστον υποπληθυσμοί που εκφράζουν FoxP3 σε διαφορετικά επίπεδα [21]. Έτσι, όπως φαίνεται και από το κοκκιογράμμα (Εικόνα 17Α) οι υποπληθυσμοί I, II και III είναι FoxP3⁺, ενώ οι πληθυσμοί IV, V, VI είναι FoxP3⁻.



Εικόνα 17.Α. Οι υποπληθυσμοί των Τρυθμ rTregs (I- πορφυρό στο σχήμα), aTregs (II- κόκκινο στο σχήμα) και non-Tregs (III-καφέ στο σχήμα) Β. Αντίστοιχα η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 [21].

Σύμφωνα με τους συγγραφείς τα FoxP3⁺ κύτταρα Τ δεν αποτελούν ένα λειτουργικά και φαινοτυπικά ενιαίο πληθυσμό και με βάση την έκφραση του CD25 και του CD45RA (ή CD45RO, του οποίου η έκφραση σε όλα τα κύτταρα Τ, συμπεριλαμβανομένων και των Τρυθμ είναι αλληλοαποκλειόμενη με αυτή του CD45RA), μπορούν να διακριθούν σε 3 υποπληθυσμούς :

τα ενεργοποιημένα Τρυθμ (activated- aTregs) που έχουν φαινότυπο CD45RA⁻FoxP3^{high} CD4⁺ (πληθυσμός II), τα μη ενεργοποιημένα (resting- rTregs) με φαινότυπο CD45RA⁺FoxP3^{low}CD4⁺ (πληθυσμός I), και τα μη κατασταλτικά (non-Tregs) με φαινότυπο CD45RA⁻FoxP3^{int}CD4⁺ (πληθυσμός III, int = intermediate/ ενδιάμεση). Κατ'έξοχην κατασταλτική/ ρυθμιστική δράση ασκούν τα aTregs (στόχος κύτταρα του πληθυσμού VI), ενώ τα rTregs έχουν το ήμισυ τέτοιας δραστηριότητας, με τους υπόλοιπους πληθυσμούς (III-

VI) να μην επιδεικνύουν καθόλου ρυθμιστική ή κατασταλτική δράση. Ο διαχωρισμός στους υποπληθυσμούς αυτούς, υποδεικνύει τις διαφορετικές πορείες διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών. Φαίνεται ότι τα περισσότερα από τα FoxP3^{high} aTregs προέρχονται από τα rTregs, αν και κάποια από αυτά θα μπορούσαν να προέρχονται από FoxP3⁻ κύτταρα (Πίνακας 2).

Τα περισσότερα rTregs είναι σε κατάσταση ηρεμίας, αλλά όταν ενεργοποιηθούν (παρουσία anti-CD3/ OKT3 mAb) αυξάνουν την έκφραση του FoxP3 καθώς και CD45RO, διαφοροποιούνται σε aTregs και πολλαπλασιάζονται. Ο πληθυσμός των rTregs αλλά όχι των aTregs, εκφράζει το μόριο CD31 (PECAM-1), που είναι γνωστό ότι εκφράζεται σε κύτταρα που πρόσφατα μετακόμισαν από το θύμο και υποδεικνύει την πρόσφατη προέλευσή τους από εκεί.

Τα aTregs φαίνεται να πεθαίνουν γρήγορα με απόπτωση, και η διατήρηση της δεξαμενής αυτής των κυττάρων που είναι τα τελικώς διαφοροποιημένα Τρυθμ, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της διαρκούς διαφοροποίησής τους από rTregs μετά από το κατάλληλο ερέθισμα, και της απόπτωσής τους αφού ασκήσουν την κατασταλτική τους δράση.

Η κυτταροπλασματική έκφραση του CTLA-4, κατ' εξοχήν κατασταλτικού μορίου, στα aTregs αλλά όχι στα rTregs δείχνει ότι τα aTregs είναι αυτά που δρουν κυρίως ως κατασταλτικά. Τα κύτταρα αυτά συναγωνίζονται τα άωρα κύτταρα T κατά τη συσσώρευσή τους γύρω από τα δενδριτικά κύτταρα με αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των ανοσοδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86. Να σημειωθεί ότι η μεμβρανική έκφραση του CTLA-4 δε μελετήθηκε. Όσον αφορά την πιθανή κατασταλτική τους δράση μέσω έκκρισης κυτταροκινών όπως η IL-10 και ο TGF-β, τα aTregs είναι πιο ενεργά στην μεταγραφή της IL-10, αλλά λιγότερο ενεργά στην μεταγραφή του TGF-β σε σχέση με τα rTregs. Ωστόσο για την αξιολόγηση αυτών των αποτελεσμάτων, πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες σε επίπεδο έκφρασης πρωτεϊνών.

Στα FoxP3⁺CD4⁺ κύτταρα T περιέχονται και μη κατασταλτικά T δραστικά κύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως η IL-17. Σε αυτά τα κύτταρα που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα FoxP3 και έχουν τον φαινότυπο CD4⁺CD45RA⁻FoxP3^{low} παρατηρήθηκε απομεθυλίωση στην περιοχή STAT5 σε χαμηλό βαθμό. Αυτή η γονιδιακή περιοχή στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *FoxP3* είναι σημαντική για επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *FoxP3* μετά από ενεργοποίηση του TCR παρουσία IL-2. Αυτό θα μπορούσε να τα αντιστοιχεί με τα κύτταρα που εκφράζουν παροδικά FoxP3 μετά από ενεργοποίηση στα οποία αναφερθήκαμε ανωτέρω. Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρόλο που το CD127 είναι ένας πολύ βολικός δείκτης για την απομόνωση των FoxP3⁺ που αντιστοιχούν με τα CD25^{high}CD127^{low} CD4⁺ κύτταρα T σε αυτά περιλαμβάνονται και κύτταρα FoxP3⁺ που δεν είναι Τρυθμ.

Όσον αφορά την αξιολόγηση των ποσοστών των Τρυθμ με το συγκεκριμένο διαχωρισμό, βλέπουμε ότι σε αντίθεση με τα aTregs που αυξάνονται με την πάροδο της ηλικίας, ο πληθυσμός των rTregs μειώνεται. Αυτή η μεταβολή θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη μειωμένη λειτουργία του θύμου σε μεγαλύτερη ηλικία, που έχει ως συνέπεια να αυξάνονται τα aTregs στην περιφέρεια για να αντισταθμίσουν τη μειωμένη παραγωγή των rTregs στον θύμο. Δεν έχει ωστόσο μελετηθεί σε αυτή την ηλικιακή ομάδα (79-90 ετών) αν τα aTregs έχουν μικρότερη τάση για απόπτωση και έτσι διατηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Πίνακας 2. Παρουσίαση των υποπληθυσμών I-VI με απεικόνιση βασικών χαρακτηριστικών σε επίπεδο πολλαπλασιασμού και έκφρασης πρωτεϊνών

Πληθυσμός	Κύτταρο	Δράση ως Τρυθμ	Απόπτωση μετά από διέγερση	Χαρακτηριστικά
I	<p>CD45RA, CD25, Ki67, FOXP3, Met, FoxP3, AHR, CD31</p>	50% του πληθυσμού	λίγη	Πολλαπλασιασμός in vivo αλλά μόνο παρουσία Τδραστ Οδηγεί σε έκφραση FoxP3 ^{high} και CD45RO Πρόσφατη μετανάστευση από το θύμο (CD31+)
II	<p>CD45RO, CD25, Ki67, CTLA-4, Δ IL-17 (9%), RORC, AHR, AHRR, FoxP3</p>	υψηλή, δρα και επί του πληθυσμού I	υψηλή	
III	<p>CD45RO, CD25, Ki67, CTLA-4, Δ Δ IL-17 (16%), ● ● IL-2 (19%), ○ ○ IFN-γ (30%), RORC, AHR, AHRR, FoxP3, Met Met Met Met</p>	καθόλου	δεν υπάρχουν στοιχεία, ίσως μέσω AICD	
IV/ V	<p>CD45RO, CD25, CTLA-4, Δ IL-17 (7%), ● ● ● ● IL-2 (71%), ○ ○ ○ ○ IFN-γ (64%), RORC, AHR, FoxP3, Met Met Met Met</p>	καθόλου	δεν υπάρχουν στοιχεία, ίσως μέσω AICD	Πολλαπλασιασμός in vivo, παρουσία πληθυσμού I (κυρίως) Μικρός πληθυσμός διαφοροποιείται σε FoxP3 ⁺ κύτταρα (~4%)
VI	<p>CD45RA, ● ● IL-2 (24%), ○ ○ IFN-γ (4%), RORC, AHR, AHRR, FoxP3, Met Met Met Met</p>	καθόλου		(δεν γίνεται διάκριση μεταξύ των πληθυσμών IV, V και VI)

ΥΠΟΜΝΗΜΑ mRNA διαλυτές πρωτεΐνες, μεταγραφικοί παράγοντες, κυτταροκίνες

DNA μεμβρανικές πρωτεΐνες

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor AHRR : Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor RORC: RAR-related orphan receptor C

Επίσης, τα ποσοστά σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες επηρεάζονται από αυτοάνοσες νόσους. Στη σακχαρώδη, ασθενείς με ενεργό νόσο εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό aTregs και μειωμένο ποσοστό rTregs, ενώ αντίθετα στον ΣΕΛ εμφανίζεται μείωση των aTregs και αύξηση του ποσοστού των rTregs. Πρέπει να σημειωθεί ότι στον ΣΕΛ παρατηρείται επίσης αύξηση του ποσοστού των CD45RA⁺FoxP3^{int} non-Tregs σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Συμπερασματικά, η ανάλυση των Τρυθμ με βάση τον ανωτέρω διαχωρισμό φαίνεται να είναι βασική για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των αυτοάνοσων νοσημάτων, αν και υπάρχουν ακόμη πολλά κενά στην κατανόηση της λειτουργίας τους [21].

4. Σακχαρώδης Διαβήτης

4.1 Κλινική εικόνα

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια κλινική νόσος που χαρακτηρίζεται από σχετική ή απόλυτη ανεπάρκεια έκκρισης ινσουλίνης και συνακόλουθη έλλειψη ευαισθησίας ή αντίσταση στην μεταβολική δράση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους. Ως συνέπεια των ανωτέρω δημιουργείται υπεργλυκαιμία, η οποία μακροπρόθεσμα επηρεάζει σχεδόν κάθε οργανικό σύστημα.

4.2 Ταξινόμηση

Σύμφωνα με την Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρεία (ADA), ο διαβήτης μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο κύριους τύπους, τον τύπου 1 και τον τύπου 2. Επιπρόσθετα υπάρχει μια επιπλέον ομάδα η οποία αφορά ειδικότερους τύπους διαβήτη και αποτελείται από: γενετικές διαταραχές της λειτουργίας των κυττάρων β και της δράσης της ινσουλίνης, νόσους του εξωκρινούς παγκρέατος ή άλλες ενδοκρinoπάθειες, επαγόμενος από φάρμακα ή άλλες ουσίες, σχετιζόμενος με λοιμώξεις καθώς και με άλλα γενετικά σύνδρομα ή εκ γενετής διαβήτης [212] (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Η αιτιολογική ταξινόμηση του διαβήτη (MODY: Maturity onset diabetes of the youth) [55]

I. Διαβήτης τύπου 1
A. Ανοσολογικής αιτιολογίας
B. Ιδιοπαθής
II. Διαβήτης τύπου 2
III. Άλλοι ειδικοί τύποι διαβήτη
A. Γενετικές διαταραχές της ανάπτυξης ή λειτουργίας των κυττάρων β που αφορούν μεταλλάξεις στο
1. Χρωμόσωμα 20, γονίδιο <i>HNF-4a</i> (MODY 1)
2. Χρωμόσωμα 7, γλυκοκινάση (MODY 2)
3. Χρωμόσωμα 12, γονίδιο <i>HNF-1a</i> (MODY 3)
4. Σπανιότερες μορφές MODY
Χρωμόσωμα 13, γονίδιο <i>IPF-1</i> (MODY 4)
Χρωμόσωμα 17, γονίδιο <i>HNF-1β</i> (MODY 5)

<p>Χρωμόσωμα 2, γονίδιο NeuroD1 (MODY 6)</p> <p>5. Υποομάδες του ευαίσθητου σε ATP διαύλου K^+</p> <p>6. Μιτοχονδριακό DNA</p> <p>7. Ινσουλίνη ή προϊνσουλίνη</p> <p>8. Άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες των νησιδίων του παγκρέατος όπως KLF11, PAX4, BLK GATA4, GATA6, SCL2A2, RFX6, GLIS3</p>
<p><i>B. Γενετικές διαταραχές στη δράση της ινσουλίνης</i></p> <p>1. Αντίσταση στην ινσουλίνη τύπου A</p> <p>2. Λεπρεχωνισμός</p> <p>3. Σύνδρομο Rabson-Mendenhall</p> <p>4. Σύνδρομο λιποδυστροφίας</p> <p>5. Άλλες</p>
<p><i>Γ. Νόσοι της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος</i></p> <p>1. Παγκρεατίτιδα</p> <p>2. Τραύμα/ παγκρεατεκτομή</p> <p>3. Νεοπλασία</p> <p>4. Κυστική ίνωση</p> <p>5. Αιμοχρωμάτωση</p> <p>6. Ινολιθιασική παγκρεατοπάθεια</p> <p>7. Άλλα</p>
<p><i>Δ. Ενδοκρινοπάθειες</i></p> <p>1. Μεγαλακρία</p> <p>2. Σύνδρομο Cushing</p> <p>3. Γλυκαγόνομα</p> <p>4. Φαιοχρωμοκύτωμα</p> <p>5. Υπερθυρεοειδισμός</p> <p>6. Σωματοστατίνωμα</p> <p>7. Αλδοστερόνομα</p> <p>8. Άλλες</p>
<p><i>Ε. Σχετιζόμενα με φάρμακα ή χημικές ουσίες</i></p> <p>1. Vacor (τροκτικοκτόνο)</p> <p>2. Πενταμιδίνη</p> <p>3. Νικοτινικό οξύ</p> <p>4. Γλυκοκορτικοειδή</p> <p>5. Θυρεοειδικές ορμόνες</p> <p>6. Διαζοξειδή</p> <p>7. αγωνιστές β-αδρενεργικών υποδοχέων</p> <p>8. Θειαζίδες</p> <p>9. Ιντερφερόνη γ</p> <p>10. Φαιντοϊνη</p> <p>11. Κλοζαπίνη</p> <p>12. Άλλα</p>

<i>ΣΤ. Λοιμώξεις</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Συγγενής ερυθρά 2. Κυτταρομεγαλοϊός 3. Άλλα
<i>Ζ Ασυνήθειες μορφές ανοσομεσολαβούμενου διαβήτη</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Σύνδρομο δύσκαμπτου βραχίονα («Stiff-man» syndrome), σε όσους έχουν τα προδιαθεσικά αλληλόμορφα DR3/ DQ2, DR4/DQ 2. Αντισώματα έναντι του υποδοχέα της ινσουλίνης 3. Άλλες
<i>Η. Άλλα γενετικά σύνδρομα που ενίοτε σχετίζονται με το διαβήτη</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Σύνδρομο Down 2. Σύνδρομο Klinefelter 3. Σύνδρομο Turner 4. Σύνδρομο Wolfram 5. Αταξία Friedreich 6. Χορεία Huntington 7. Σύνδρομο Laurence-Moon-Biedl 8. Μυοτονική δυστροφία 9. Πορφυρία 10. Σύνδρομο Prader-Willi 11. Άλλα
<i>Θ. Διαβήτης κύησης</i>

Οι δύο μεγάλες κατηγορίες του ΣΔ καθορίζονται ως τύπος 1 και τύπος 2 αντικαθιστώντας τις προϋπάρχουσες ονομασίες ινσουλινοεξαρτώμενος και μη ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ, δεδομένου ότι πολλά άτομα με ΣΔ2 χρειάζονται τελικά θεραπεία με ινσουλίνη για τον έλεγχο της γλυκόζης πλάσματος. Ο ΣΔ1 είναι αποτέλεσμα καταστροφής των κυττάρων β των νησιδίων του παγκρέατος και χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια ινσουλίνης. Στο μηχανισμό καταστροφής των κυττάρων β μπορεί να εμπλέκονται ανοσολογικοί μηχανισμοί και σε ένα μικρότερο ποσοστό (<10%) να υπάγονται στην κατηγορία ΣΔ1Β που θεωρείται ιδιοπαθής, και αφορά κυρίως άτομα αφρικανικάνικης ή ασιατικής καταγωγής. Ενώ η ηλικία αποτέλεσε το κύριο κριτήριο ταξινόμησης στις αρχές της δεκαετίας του 1970, έχει πλέον εγκαταλειφθεί. Αν και ο τύπου 1 συνήθως αναπτύσσεται πριν την ηλικία των 30 ετών, μια αυτοάνοση καταστροφή των κυττάρων β μπορεί να αρχίσει σε οποιαδήποτε ηλικία. Εκτιμάται ότι το 5-10% των ατόμων που αναπτύσσουν διαβήτη μετά την ηλικία των 30 ετών, έχουν διαβήτη τύπου 1. Τέλος, αν και ο διαβήτης τύπου 2 αναπτύσσεται κυρίως σε μεγάλες ηλικίες, πλέον διαγιγνώσκεται όλο και συχνότερα σε νέους ενήλικες, ιδιαίτερα σε παχύσαρκους έφηβους [55].

Από τις υπόλοιπες αιτίες που προκαλούν διαβήτη, ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στον νεανικό διαβήτη με έναρξη σε ώριμη ηλικία (maturity onset diabetes of the young, MODY), ο οποίος αποτελείται από περισσότερες από 10 κατηγορίες και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατώντα τύπο κληρονομικότητας. Χαρακτηρίζεται συνήθως από πρόωμη έναρξη υπεργλυκαιμίας και μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης ενώ ανάλογα με τον υπότυπο μπορεί να χρειάζεται ή όχι χορήγηση ινσουλίνης. Μελέτες σε διαβητικούς τύπου 2,

δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις σε γονίδια σχετιζόμενα με MODY αποτελούν σπάνιο αίτιο τύπου 2 διαβήτη (< 5 %).

Παρά την αναλυτική ταξινόμηση που περιγράψαμε, στην κλινική πράξη ο διαχωρισμός μεταξύ τύπου 1 και τύπου 2 διαβήτη μπορεί να είναι δυσχερής δίνοντας χώρο για εισαγωγή νέων υποτύπων. Διευρύνοντας την ταξινόμηση του διαβήτη, στη βιβλιογραφία συναντά κανείς τους όρους κεραυνοβόλο διαβήτη τύπου 1 [56], διπλό διαβήτη [57] και καθυστερημένης έναρξης αυτοάνοσο διαβήτη ενηλίκων (Latent autoimmune diabetes of adults, LADA) [58],(Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Άλλες ονομασίες που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση του διαβήτη.

Κεραυνοβόλος διαβήτης	Υπότυπος του ΣΔ1 με ιδιαίτερα οξεία έναρξη Έχει περιγραφεί κυρίως στην Ιαπωνία και στις άλλες χώρες της ανατολικής Ασίας
Καθυστερημένης έναρξης αυτοάνοσος διαβήτης ενηλίκων (LADA)	Κλινική εικόνα ΣΔ2 αλλά με αυτοαντισώματα θετικά Δεν είναι απαραίτητη η χορήγηση ινσουλίνης
Διπλός διαβήτης ή διαβήτης τύπου 1,5	Υπεργλυκαιμία σε παιδιά και εφήβους με δείκτες ΣΔ1 και ΣΔ2 (δηλαδή παρουσία αυτοαντισωμάτων και κλινική εικόνα παχυσαρκίας και αντίστασης στην ινσουλίνη.)

4.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Αυτή η μορφή του διαβήτη ο ΣΔ2, που αφορά το 90-95% των διαβητικών και ονομάζονταν παλαιότερα μη ινσουλινοεξαρτώμενος, αναφέρεται σε άτομα που έχουν αντίσταση στην ινσουλίνη και συνήθως σχετική (όχι απόλυτη) έλλειψη ινσουλίνης. Ειδικότερα, παρόλο που τα κύτταρα β εξακολουθούν να παράγουν ινσουλίνη, η ποσότητά της είναι ανεπαρκής σε σχέση με τις αυξημένες απαιτήσεις λόγω της συνυπάρχουσας αντίστασης στην ινσουλίνη. Τουλάχιστον αρχικά η αντιμετώπιση της νόσου δε βασίζεται στην ινσουλίνη και η αιτιολογία της δεν έχει σχετιστεί με αυτοάνοση καταστροφή των κυττάρων β .

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΣΔ2 είναι παχύσαρκοι, ή μπορεί να έχουν αυξημένο ποσοστό πάχους κατανεμημένο κυρίως στην περιοχή της κοιλιάς. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας, του δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) και την έλλειψη φυσικής άσκησης, ωστόσο υπάρχει έντονη οικογενειακή προδιάθεση.

Πρόσφατες μελέτες [59], ανέδειξαν νέους γονιδιακούς τόπους που περιέχουν μεταλλάξεις που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2, επιπλέον της ήδη γνωστής συσχέτισης με το γονίδιο *TCF7L2* [60]. Αυτοί οι γονιδιακοί τόποι περιλαμβάνουν έναν πολυμορφισμό του γονιδίου *SLC30A8*, το οποίο εκφράζεται κατ' αποκλειστικότητα στα κύτταρα β του παγκρέατος και άλλες δύο περιοχές που εκφράζουν γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και λειτουργία των β κυττάρων (*IDE-KIF11-HHEX* και *EXT2-ALX4*, [59]).

Όσον αφορά την κλινική εικόνα της νόσου, η υπεργλυκαιμία εμφανίζεται σταδιακά, και σπάνια οι ασθενείς παρουσιάζουν οξέωση.

5. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1

Οι ασθενείς με τύπου 1 σακχαρώδη διαβήτη έχουν λίγη ή καθόλου ενδογενή έκκριση ινσουλίνης. Η αρχή της νόσου είναι συνήθως κλινικά απότομη με σημαντική πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία, απώλεια βάρους και κόπωση. Οι ασθενείς αυτοί είναι πολύ

επιρρεπείς σε κέτωση και συχνά μπορεί να εμφανιστούν με διαβητική κετοξέωση. Η συνηθέστερη ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι το μέσο της πρώτης δεκαετίας και πάλι κατά την εφηβεία χωρίς όμως να μπορεί να αποκλειστεί η εμφάνισή της σε οποιαδήποτε ηλικία.

5.1 Επιδημιολογία

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη (International Diabetes Federation, IDF), στην Ευρώπη, στις ΗΠΑ και στον Καναδά ο ΣΔ1 αντιστοιχεί στο 5-10 % όλων των περιπτώσεων διαβήτη, ωστόσο ο επιπολασμός του αυξάνεται παγκοσμίως με μια συχνότητα της τάξης 3-9 % κάθε χρόνο [61].

Η μέση ηλικία έναρξης του ΣΔ1 έχει μειωθεί τις δύο τελευταίες δεκαετίες. Ειδικότερα, στην ηλικία 0-4 προβλέπεται ο διπλασιασμός του επιπολασμού της νόσου μέχρι το 2020. Ωστόσο, μια αντίθετη τάση παρατηρείται στα παιδιά που γεννήθηκαν στη Σουηδία μετά το 2000 υποδεικνύοντας σημαντικό ρόλο εξωγενών παραγόντων που επιδρούν στην ανάπτυξη αυτοανοσίας έναντι των κυττάρων β , οι οποίοι θα αναλυθούν διεξοδικά παρακάτω [62].

5.2 Αυτοαντισώματα

5.2.1 Εισαγωγή στα αυτοαντισώματα

Δείκτες της αυτοάνοσης διεργασίας στον ΣΔ1 είναι τα νησιδιακά αυτοαντισώματα. Ο όρος νησιδιακά αυτοαντισώματα (“Islet autoantibodies”) χρησιμοποιείται για ένα σύνολο αυτοαντισωμάτων που στρέφονται εναντίον των νησιδίων του παγκρέατος ή σε μερικές περιπτώσεις εναντίον ειδικών αυτοαντιγόνων των ινσουλινοεκκριτικών κυττάρων. Η μεθοδολογία ανίχνευσής τους αφορά ανοσοφθορισμό σε κρυοτομές παγκρέατος, συνεπώς ανιχνεύονται αντισώματα κατά κυτταροπλασματικών κυρίως στόχων των κυττάρων β .

Τα νησιδιακά αυτοαντισώματα είναι συνήθως παρόντα κατά την έναρξη της νόσου και εξακολουθούν να υπάρχουν για ποικίλο διάστημα. Επίσης, αρκετά συχνά προϋπάρχουν από μήνες έως χρόνια της έναρξης της νόσου [63]. Σύμφωνα με τη γερμανική μελέτη BABY-DIAB και την αμερικανική μελέτη DAISY, τα νησιδιακά αυτοαντισώματα πρωτοεμφανίζονται σε νεαρή ηλικία και προδιαθέτουν σε εμφάνιση της νόσου, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης χωρίς να μπορούν να θεωρηθούν η αιτία εμφάνισης της νόσου.

Τα αυτοαντισώματα εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της διαταραχής της ανοσολογικής απόκρισης και συγκεκριμένα μετά την ενεργοποίηση του ανοσολογικού μηχανισμού από αυτοαντιγόνα. Συγκεκριμένα τα αυτοαντισώματα τάξης IgG παράγονται από λεμφοκύτταρα B με τη συμβολή βοηθητικών κυττάρων T. Εκτός από την ινσουλίνη και την καρβοξυπεπτιδάση H, όλα τα υπόλοιπα αυτοαντιγόνα είναι ενδοκυττάρια και η απελευθέρωσή τους, είναι πιθανόν αποτέλεσμα της αυτοάνοσης καταστροφής των κυττάρων που πιθανόν προηγείται ως αποτέλεσμα ενδογενούς βλάβης των κυττάρων β . Μια εναλλακτική υπόθεση για να εξηγήσει την αυτοανοσία είναι η μοριακή ομοιότητα (μιμητισμός) μεταξύ ενός περιβαλλοντικού παράγοντα (ιός, βακτήριο, εξωγενής χημική ουσία) και ενός αυτοαντιγόνου που οδηγεί σε διασταυρούμενη ανοσολογική απόκριση και την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων [62]. Ο κατάλογος των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων είναι μεγάλος όπως φαίνεται στον πίνακα 5.

Από τον πίνακα αυτό να σημειώσουμε ιδιαίτερα τα αντισώματα Glima 38, που φαίνεται να είναι τα μόνα μεμβρανικά αντισώματα με ταυτοποιημένο αντιγόνο που έχουν μελετηθεί σε σχέση με την προδιάθεση για εμφάνιση ΣΔ1. Αρχικά φαίνεται να προσδιορίστηκαν με βάση τα νησιδιοκύτταρα του επίμυος και σήμερα αναγνωρίζονται σχεδόν στο 20% των ασθενών με ΣΔ1 [64],[65].

Πίνακας 5. Αυτοαντισώματα στο ΣΔ1 (τροποποιημένος από [62]).

Αυτοαντισώματα στο ΣΔ1
Ινσουλίνη, παραγωγή και αποθήκευση ινσουλίνης
Αυτοαντισώματα έναντι της καρβοξυπεπτιδάσης Η [66] IAA [67] Αυτοαντισώματα έναντι προινσουλίνης [68] ZnT8A [69]
Πρωτεϊνικής τυροσύλο-φωσφατάσης
IA-2A [70] IA-2BA [71]
Ένζυμα
Ανθρακική ανυδράση II [72] Αυτοαντίσωμα σχετιζόμενο με το χυμοθρυψινογόνο του παγκρέατος [73] Αυτοαντισώματα έναντι DNA τοποϊσομεράσης II [74] GADA [75] Αυτοαντισώματα έναντι της αποκαρβοξυλάσης των αρωματικών αμινοξέων [76]
Διάφορα
Αυτοαντισώματα έναντι της συνθετάσης του αμινο- ακυλο-tRNA (aa-tRNA) [77] Αυτοαντισώματα έναντι του μεμβρανικού αντιγόνου Glima 38 [78] Αυτοαντισώματα έναντι GLUT2 [79] Αυτοαντισώματα έναντι γλυκολιπιδίων [80] Αυτοαντισώματα έναντι γαγγλιοζίτη - GM2 των νησιδίων [81] Αυτοαντισώματα έναντι πρωτεϊνών οξείας φάσης [82] Αυτοαντισώματα έναντι επιφανείας των νησιδιοκυττάρων - ICSA [64] Αντινησιδιακά αντισώματα- ICA [83] Αυτοαντισώματα έναντι ειδικής αλληλουχίας των νησιδίων μεγέθους 38-kDa [84]

5.2.2 ICA, IA-2A, GADA, IAA, ZnT8A

Ιδιαίτερα θα αναφερθούμε στα αυτοαντισώματα που είναι εύκολα μετρήσιμα και είναι επαρκώς ευαίσθητα και ειδικά για να χρησιμοποιηθούν στις μελέτες για την παθογένεια της νόσου. Σε αυτά τα αντισώματα περιλαμβάνονται :

- Αντινησιδιακά αντισώματα, που στοχεύουν έναντι κυτταροπλασματικών αντιγόνων (islet cell cytoplasmic autoantibodies -ICA)
- Αντισώματα έναντι οίωνει τυροσυλο-φωσφατάσης των νησιδίων 2((IA-2)-associated autoantibodies -IA-2A)
- Αντισώματα κατά της Αποκαρβοξυλάσης Γλουταμινικού Οξέος IgG (glutamic acid decarboxylase autoantibodies- GADA),
- Αυτοαντισώματα κατά της Ινσουλίνης (insulin autoantibodies -IAA),
- Αυτοαντισώματα κατά του ινσουλινο-κοκκιακού μεταφορέα ψευδαργύρου (zinc transporter 8 protein (ZnT8) islet autoantibody (ZnT8A)).

Τα ICA περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1974 από τους Bottazzo και συν. [83] Είναι τα πιο δύσκολα από τα αυτοαντισώματα για να εκτιμηθούν, διότι η μέτρησή τους βασίζεται στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, μια μέθοδο που είναι απαιτητική στο εργαστήριο και υπόκειται σε

διαβαθμίσεις λόγω των μεταβολών στον παγκρεατικό ιστό, στον χρόνο επώασης και την υγρασία καθώς και την ερμηνεία από τον ερευνητή. Τα ICA ανιχνεύονται στο 70% με 80% των ατόμων με νεοδιαγνωσθέντα ΣΔ1 αλλά η συχνότητά τους πέφτει μετά την εξέλιξη της νόσου και παραμένουν θετικά περίπου στο 5% των ατόμων μετά από 10 χρόνια. Επίσης, μπορεί να ανιχνευθούν μέχρι και 12 χρόνια πριν την εμφάνιση της νόσου, όπως έχει βρεθεί σε προοπτικές μελέτες με συγγενείς [63]. Τα ICA μπορεί να είναι χρήσιμα σε κλινικές μελέτες. Παραδείγματος χάριν, στη μελέτη DPT-1, οι υγιείς συγγενείς ατόμων με ΣΔ1, θετικά ICA και χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης μετά από δοκιμασία ανοχής γλυκόζης είχαν 5ετη κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔ1 στο 60 %, και 10ετη περίπου 90 %. Ωστόσο σε κανένα από αυτούς, η πρόδρομη χορήγηση ινσουλίνης δεν εμπόδισε την εκδήλωση της νόσου.

Τα αυτοαντισώματα GADA, IA-2A και IAA αναφέρονται συνολικά ως «βιοχημικά» αυτοαντισώματα, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα αντίστοιχα νησιδιακά αυτοαντιγόνα έχουν αναγνωρισθεί και κλωνοποιηθεί. Τα αυτοαντισώματα GADA, IA-2A και IAA ανιχνεύονται με δοκιμασίες ανοσοκαθίζησης και σύνθετης ELISA.

Η πρωτεΐνη GAD καταλύει την μετατροπή του γλουταμινικού οξέως στον ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή GABA (γ-αμινο βουτυρικό οξύ). Το 1990 η GAD βρέθηκε να είναι το αυτοαντιγόνο με MB 64.000 Da, που ανοσοκαθίζάνει μετά από επώαση με ορό διαβητικών και όχι φυσιολογικών ατόμων. Το αντιγόνο ήταν ήδη γνωστό ως αντιγόνο-στόχος από τον ορό των ατόμων με σύνδρομο δύσκαμπτου βραχίονα (stiff-arm syndrome, παλαιότερα stiff-man). Ανευρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες σε ποικιλία ιστών, αλλά έχει υψηλότερη συγκέντρωση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στα νησιδιοκύτταρα β. Η GAD είναι ένα ενδοκυττάριο ένζυμο και βρίσκεται σε δύο ισομορφές, 65 και 67 kDa που προέρχονται από δύο διαφορετικά γονίδια, αλλά τα αυτοαντισώματα δημιουργούνται κυρίως έναντι της ισομορφής GAD65 (MB=65 000). Οι αρχικές μελέτες των Baekkeskov, Lernmark και συνεργατών θεώρησαν ότι η αντίστοιχη πρωτεΐνη MB 64 kDa που προέκυπτε από ανοσοκαθίζηση εκχυλίσματος ανθρώπινων νησιδίων με Triton X-114 με ορούς νεοδιαγνωσθέντων ατόμων με ΣΔ1 ήταν μεμβρανική. Αυτό μπορεί να συμβεί μόνο σε μια μειοψηφία των μορίων της τα οποία συνδέονται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης μέσω δεσμού κυστεΐνης της αμινο-τελικής της περιοχής με παλμιτικό οξύ [85],[86],[87]. Τα αυτοαντισώματα GADA βρίσκονται σε ίδιο ποσοστό (70%–80%) όπως τα ICA σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, αλλά διατηρούνται σε μεγαλύτερο βαθμό στη συνέχεια [62].

Το IA-2 είναι μέλος της οικογένειας των τυροσυλοφωσφατασών και είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Οι κυρίως επίτοποι που δρουν ως αυτοαντιγόνα βρίσκονται στο C-τελικό άκρο και είναι γνωστοί ως αυτοαντισώματα ICA512. Παρόλο που τα αντιγόνα IA-2 και IA-2B έχουν περιοχές με ομόλογη δομή πρωτεϊνικής τυροσυλο-φωσφατάσης (PTPs), ωστόσο δεν φαίνεται να έχουν την παραμικρή αντίστοιχη ενζυμική δράση. Η ακριβής λειτουργία τους παραμένει άγνωστη, αν και στα κύτταρα β του παγκρέατος μπορεί να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης της ινσουλίνης και στην ανάπτυξη των β κυττάρων [88],[89]. Αυτοαντισώματα έναντι και των δύο αντιγόνων ανιχνεύονται δεκαετίες πριν την εμφάνιση της νόσου σε πρώτου βαθμού συγγενείς διαβητικών τύπου 1, και η παρουσία τους χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει άτομα με αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο. Τα IA-2A είναι λιγότερο συχνά στην έναρξη της νόσου (περίπου στο 60%) σε σχέση με τα άλλα [90],[91].

Οι Palmer και συν. το 1983 περιέγραψαν τα IAA σε νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς πριν την έναρξη της ινσουλινοθεραπείας. Τα αντισώματα αυτά είναι περισσότερο συχνά σε νεοδιαγνωσθέντα παιδιά (σχεδόν 60% θετικά) σε σχέση με τους ενήλικες. Μετά την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για τουλάχιστον 10 μέρες, η ανίχνευση των IAA δεν είναι πια

αξιόπιστη. Επιπλέον, σε σχέση με τα προηγούμενα αντισώματα, είναι ιδιαίτερα δύσκολο να μετρηθούν με ακρίβεια και επαναληψιμότητα [67].

Η ανακάλυψη των αυτοαντισωμάτων έναντι του ZnT8, είναι μια πρόσφατη, πολλά υποσχόμενη ανακάλυψη. Το ZnT8 αντιπροσωπεύει μια μεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από 369 αμινοξέα και έχει MB 41 kDa. Το αντίσωμα ZnT8A εμφανίζεται με τη μορφή τριών ισομορφών ανάλογα με το αμινοξύ στη θέση 325 του αυτοαντιγόνου - στόχου: ZnT8-R (αργινίνη), ZnT8-W (τρυπτοφάνη) και ZnT8-Q (γλουταμίνη)[90]. Το ZnT8A που ανιχνεύεται με ανοσοκαθίζηση, βρέθηκε θετικό στο 63 % νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών νεαρής ηλικίας, στη συνέχεια όμως οι συγκεντρώσεις του αντισώματος έπεσαν γρήγορα. Επίσης, το 26% των νεοδιαγνωσθέντων που ήταν αρνητικοί για τα άλλα αυτοαντισώματα ήταν θετικοί ως προς ZnT8A. Τα ZnT8A μπορεί να παρατηρηθούν και σε άλλες αυτοάνοσες νόσους όπως η νόσος του Addison (8,6%) ενώ η συχνότητά τους αυξάνεται σε νεοδιαγνωσθέντες μεγαλύτερης ηλικίας. Όσον αφορά παιδιά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (πρώτου βαθμού συγγενείς διαβητικών με γονότυπο ιστοσυμβατότητας που προδιαθέτει στην εμφάνιση της νόσου), σύμφωνα με τη μελέτη DAISY το συγκεκριμένο αυτοαντίσωμα βρέθηκε στο 62,9% των ατόμων πριν την έναρξη της νόσου (έναντι 70,3% των GADA, 51,8% των IA-2A, και 85,1% για τα IAA). Αν και δεν υπήρχε επαναληψιμότητα στη σειρά εμφάνισης των αντισωμάτων, φαίνεται ότι τα IAA ήταν συνηθέστερα τα πρώτα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονταν και ακολουθούσαν τα GADA, τα ZnT8A και τα IA-2A. Η καθυστερημένη εμφάνιση των ZnT8A θα μπορούσε να τα σχετίζει με μια προοδευτική καταστροφή των κυττάρων β . Τα ευρήματα αυτά είναι πάρα πολύ ενδιαφέροντα, παραμένει όμως να επιβεβαιωθούν και σε άτομα που εμφανίζουν ΣΔ1 σε ηλικίες 14-30 ετών (περ. το 60 % των νέων περιπτώσεων) [93].

5.2.3 Αυτοαντισώματα και πρόβλεψη του ΣΔ1

Η συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με την πρόβλεψη της νόσου σε υγιή άτομα έχει να κάνει με τον αριθμό των αυτοαντισωμάτων. Γενικώς ο αριθμός των αυτοαντισωμάτων που εκφράζει ένα άτομο είναι πιο σημαντικός από οποιονδήποτε συνδυασμό αυτοαντισωμάτων. Στη μελέτη DPT-1 ο ετήσιος κίνδυνος ανάπτυξης ΣΔ1 σε πρώτου και δεύτερου βαθμού συγγενείς διαβητικών που είχαν κατ'επανάληψη θετικά ICA και είχαν χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης μετά από δοκιμασία ανοχής γλυκόζης, ήταν 15%. Η ύπαρξη κάθε άλλου αυτοαντισώματος από τα υπόλοιπα, αύξανε στατιστικά σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Έτσι ο κίνδυνος για ΣΔ1 σε άτομα με 4 θετικά αυτοαντισώματα ήταν 50%, σε άτομα με 3 θετικά ήταν 40.3%, στα άτομα με 2 θετικά αυτοαντισώματα ο κίνδυνος ήταν 16.1%, σε ένα θετικό είναι 3.1% και σε κανένα θετικό αυτοαντίσωμα ο κίνδυνος ήταν 0.5%. Υψηλότεροι τίτλοι ICA και υψηλότερες συγκεντρώσεις GADA είναι πιο ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες σε σχέση με τους χαμηλότερους, αλλά κανένα αυτοαντίσωμα δεν είναι αρκετά ευαίσθητο από μόνο του για να σχετιστεί με τη διάγνωση ή την πρόβλεψη της νόσου [94].

Οι μελέτες της εξέλιξης του ΣΔ1 σε συγγενείς με ένα αντίσωμα θετικό δεν είναι σπάνιες, ξεκινώντας με τη μελέτη Barts-Windsor το 1978 που έδειξε ότι τα ICA προδιαθέτουν σε ΣΔ1 [95],[96]. Από τότε περισσότερες από 250 μελέτες εξέλιξης του ΣΔ1 αναφέρονται με σκοπό τον προσδιορισμό παραγόντων που οδηγούν στην σταδιακή καταστροφή των κυττάρων β , την εξέλιξη της νόσου και στην πρόληψη αυτών.

Στην κλινική πράξη, η χρήση των αυτοαντισωμάτων ενδείκνυται όταν δεν μπορεί να γίνει διαφορική διάγνωση μεταξύ του διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2. Για παράδειγμα, σε έναρξη ΣΔ με κετοξέωση σε ένα παχύσαρκο έφηβο ή έναρξη χωρίς κετοξέωση σε ένα αδύνατο άτομο. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει η δυνατότητα πρόληψης της νόσου, δεν έχει

νόημα ο έλεγχος του γενικότερου πληθυσμού, ωστόσο το γεγονός ότι αποτελούν ένα πολύ σημαντικό προγνωστικό δείκτη δίνει τη δυνατότητα για παρέμβαση κάποια στιγμή στο μέλλον [62].

5.3 Διάγνωση

Τα κριτήρια για τη διάγνωση της νόσου βασίζονται στις μετρήσεις γλυκόζης που καθορίζονται ως ακολούθως :

- τυχαία γλυκόζη πλάσματος ≥ 200 mg/dl μαζί με συμπτωματολογία διαβήτη
- γλυκόζη νηστείας ≥ 126 mg/dl
- γλυκόζη πλάσματος ≥ 200 mg/dl, δύο ώρες μετά τη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (OGTT)
- γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) $\geq 6.5\%$.

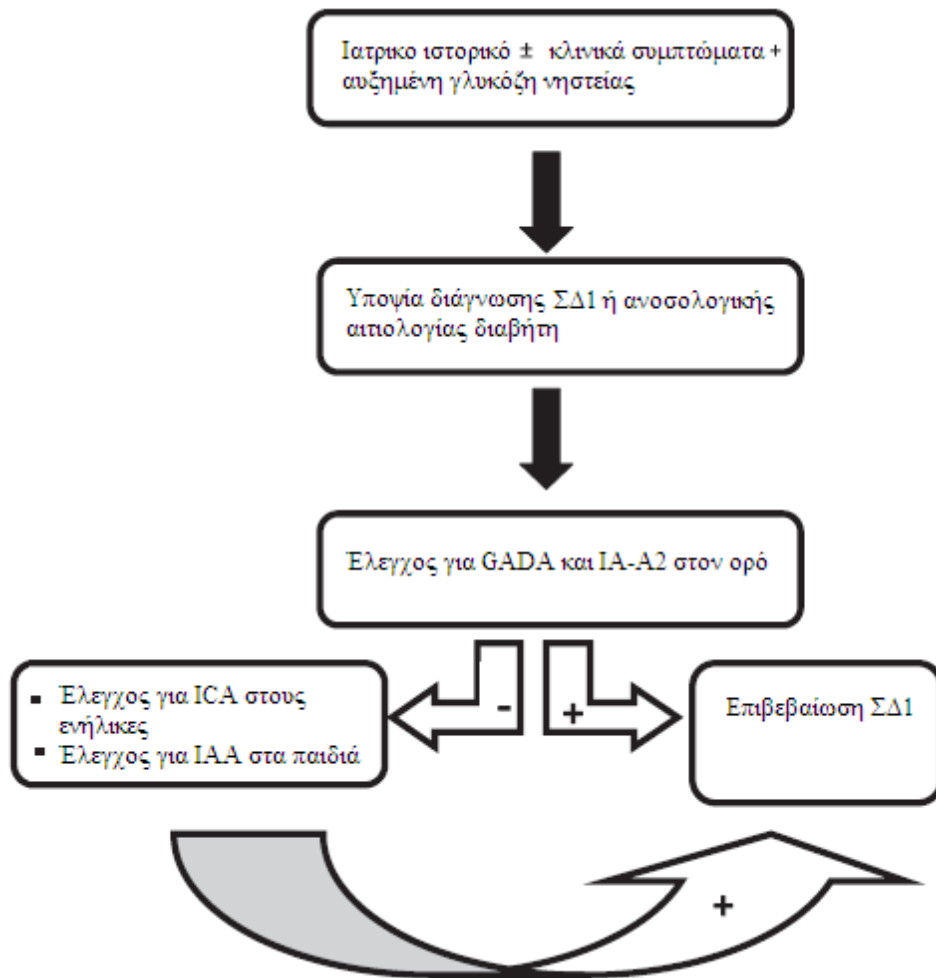
Όπως είναι εμφανές τα ανωτέρω κριτήρια δεν επαρκούν για τη διάκριση του ΣΔ1 από άλλες μορφές διαβήτη. Αυτή η διάκριση γίνεται δυσχερέστερη λόγω του ότι παρά την ηλικιακή έξαρση σε άτομα 12-20 ετών, η νόσος μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Επίσης, η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι των νησιδίων σε άτομα με διαβήτη επιβεβαιώνει την αυτοάνοση αιτιολογία της νόσου (ΣΔ1Α), ωστόσο, η απουσία τους δεν αποκλείει τη διάγνωση καθώς μπορεί να εμφανιστούν αργότερα στην εξέλιξη της νόσου. Τέλος, σε μη διαβητικά άτομα, η παρουσία αυτοαντισωμάτων αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι αργότερα ενδέχεται να αναπτύξουν ΣΔ1. Προς το παρόν η μέτρηση των βιοχημικών αυτοαντισωμάτων GADA και IA-2A συνιστάται για την αρχική επιβεβαίωση της νόσου. Εάν αυτά είναι αρνητικά πρέπει να ακολουθήσει έλεγχος για ICA και στα παιδιά για IAA. Τα παραπάνω συνοψίζονται στην εικόνα 18 [97].

5.4 Παθογένεια

Στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 φαίνεται να υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ ανοσορρύθμισης και αυτοαντιδραστικότητας, η οποία έχει ως συνέπεια την καταστροφή των κυττάρων β του παγκρέατος. Έχει ωστόσο παρατηρηθεί ότι ακόμη και σε μακράς διάρκειας διαβητικούς υπάρχουν νησίδια με λειτουργικά κύτταρα β , πράγμα που υποδηλώνει ότι η καταστροφή αυτή είναι ενδεχομένως ένα τοπικό γεγονός, κάτι αντίστοιχο με την προσβολή του δέρματος στη λεύκη ή την προσβολή του εγκεφάλου στη σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ). Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί αρκετά μοντέλα σχετικά με τον τρόπο που αλληλεπιδρούν οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες ώστε να προκύψει η νόσος του ΣΔ1 [98]. Η θεωρία του Eisenbarth του 1986 για τη γραμμική μείωση των κυττάρων β αποτελεί το πιο διαδεδομένο σημείο αναφοράς. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο τα άτομα με γενετική προδιάθεση, σε κάποια φάση εκτίθενται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, που οδηγούν στην έναρξη της αυτοάνοσης απόκρισης η οποία σχετίζεται με τη γραμμική μείωση των κυττάρων β , την υπεργλυκαιμία και την απώλεια του συνδετικού (C) πεπτιδίου [99]. Ενώ αυτή η άποψη παρέχει μια ενιαία θεωρία σχετικά με την αλληλουχία των γεγονότων που συμβαίνουν κατά την πορεία της νόσου, δεν ερμηνεύει τους παράγοντες που συμβάλλουν στη διαφορετική εξέλιξη κατά τη φάση του προδιαβήτη.

Μερικοί συγγραφείς ισχυρίζονται ότι ο ΣΔ1 δεν είναι μια γραμμική αλληλουχία γεγονότων, αλλά προχωράει ενδεχομένως με ποικίλα βήματα σε κάθε ασθενή. Ίσως με τη σημερινή γνώση η αρχική υπόθεση του Eisenbarth να διορθωνόταν σε διαρκή μείωση των κυττάρων β , που δεν είναι απαραίτητα γραμμική, αλλά με εξάρσεις και υφέσεις. Φαίνεται λογικό ότι στο έδαφος ενός γονοτύπου πολύ υψηλού κινδύνου (π.χ. IPEX, APS-1 ή ακόμη και κάποιων αλληλόμορφων HLA) η δράση ενός ή περισσότερων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων έχει λίγη ή καθόλου σημασία για την εγκατάσταση της νόσου. Από την άλλη, ήπια προδιαθετικές

μεταλλάξεις, μπορεί να μην οδηγήσουν ποτέ σε ΣΔ1 ή να χρειάζονται ισχυρά περιβαλλοντικά ερεθίσματα για να οδηγήσουν σε υπεργλυκαιμία [100].



Εικόνα 18. Διαγνωστικά κριτήρια για τον ΣΔ1 [97]

Υπάρχουν θεωρίες που υποστηρίζουν ότι η ανισορροπία μεταξύ των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων T και των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων T οδηγούν στην απόπτωση των κυττάρων β . Ενώ η εργασία αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη, παροδικά υπάρχει απόκριση/ άμυνα από τα κύτταρα β (ίσως και παραγωγή νέων κυττάρων β), οδηγώντας σε μειωμένες απαιτήσεις σε ινσουλίνη και δημιουργώντας αυτό που ονομάζουμε «περίοδο του μέλιτος».

Ενώ μέχρι τώρα η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων θεωρούνταν το πρώτο σημάδι για την έναρξη της αυτοάνοσης διαδικασίας στους διαβητικούς πρόσφατα οι Oresic και συν. πρότειναν ότι μια μεταβολική απορρύθμιση προηγείται. Αυξημένα επίπεδα στο αίμα διαφόρων λιπιδίων όπως η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη [(lysophosphatidylcholine (lysoPC)] και το γλουταμινικό οξύ προηγούνται της εμφάνισης αυτοαντισωμάτων και φαίνεται να λειτουργούν ως προφλεγμονώδη μόρια που συμμετέχουν ως επιπλέον ενεργοποιητές της αυτοάνοσης διεργασίας [101],[102].

Όπως αναφέραμε, τα κύρια αυτοαντισώματα που εμφανίζονται στον ΣΔ1 είναι τα νησιδιακά αυτοαντισώματα και περιλαμβάνουν τα IA-2A, GADA, IAA και ZnT8A, που μελετώνται κατά κύριο λόγο. Η παρουσία τους υπονοεί την ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων ως ένα

από τα πρώτα στάδια της ανοσολογικής απόκρισης. Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα αντιγονοπαρουσίασης στα $CD4^+$ και $CD8^+$ λεμφοκύτταρα T, που είναι τα κυρίως κύτταρα που διηθούν τα νησίδια και προκαλούν στην καταστροφή των κυττάρων β .

Τα κυτταροτοξικά $CD8^+$ λεμφοκύτταρα T έχουν τη δυνατότητα να καταστρέψουν τα κύτταρα β μέσω απόπτωσης των τελευταίων. Συγκεκριμένα, τα μόρια MHC τάξης I που εκφράζονται στα κύτταρα β ενεργοποιούν αυτοαντιδραστικά $CD8^+$ λεμφοκύτταρα T, οδηγώντας στην απελευθέρωση κυτταρολυτικών ουσιών (π.χ. κοκκιοενζύμων A και B) ή μέσω απόπτωσης που μεσολαβείται από αλληλεπίδραση Fas-Fas ligand. Τα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα T δρουν κυρίως ως βοηθητικά των λεμφοκυττάρων B και $CD8^+$ κυττάρων T παράγοντας κυτταροκίνες. Παρ' ότι είναι σχεδόν αδύνατον να διερευνηθεί αυτή η διεργασία στον άνθρωπο, στους ποντικούς NOD είναι προφανής η αυτοάνοση διεργασία με τη συμμετοχή όλων αυτών των κυτταρικών πληθυσμών, πρώτα στους παγκρεατικούς λεμφαδένες (αλλά όχι σε άλλους λεμφαδένες της περιτοναϊκής κοιλότητας), και στη συνέχεια στο ενδοκρινές πάγκρεας.

Η διήθηση των νησιδίων διαβητικού παγκρέατος από λεμφοκύτταρα έχει βρεθεί από το 1965 και έχει έκτοτε αναγνωριστεί ως φλεγμονή των κυττάρων β που ονομάζεται «νησιδίτιδα» (“insulitis”). Οι μελέτες έχουν βασιστεί σε υλικό από μη ζώντες νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς ηλικίας μικρότερης των 19 ετών καθώς και από βιοπτικό υλικό ζώντων διαβητικών που λήφθηκε μέσω λαπαροσκόπησης μεγαλύτερης ωστόσο ηλικίας [103],[104],[105]. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, τα $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα είναι από τα βασικά κύτταρα που διηθούν τα νησίδια και ο αριθμός τους σχετίζεται με το βαθμό της απόπτωσης των κυττάρων β , με τα μακροφάγα να εμφανίζονται μόνο σε μέτριες ποσότητες. Τα Τρυθμ ανιχνεύτηκαν σε έναν μόνο ασθενή, υποδεικνύοντας ότι το κύριο πεδίο δράσης τους είναι οι παγκρεατικοί λεμφαδένες και ο σπλήνας. Εναλλακτικά η απουσία τους, μπορεί να είναι και ο λόγος της έναρξης της φλεγμονής στα νησίδια. Εντελώς παράδοξα, στην αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα υπάρχει αξιοσημείωτη διήθηση Τρυθμ στο θυρεοειδή αδένα κατά τη διάρκεια ενεργού νόσου [100].

Είναι προφανές ότι κατά την κλινική εμφάνιση της νόσου οι αυτοάνοσες διεργασίες βρίσκονται στο τελικό τους στάδιο. Περίπου 60-90% των κυττάρων β υπολογίζεται ότι έχουν καταστραφεί ή δυσλειτουργούν. Στην περίοδο του μέλιτος, συμβαίνει μια παροδική υποχώρηση της νόσου που παρατηρείται στο 60% των διαβητικών μετά την έναρξη της ινσουλινοθεραπείας και διαρκεί τουλάχιστον 3-6 μήνες. Αυτή, εκτιμάται ότι συμβαίνει λόγω της παροδικής «ανακούφισης» των δυσλειτουργικών κυττάρων β μετά την ανακούφιση της υπεργλυκαιμίας. Σύμφωνα με κάποιες έρευνες στο περιφερικό αίμα [105],[106], τα επίπεδα των Τρυθμ βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα αυτή την περίοδο, υποδεικνύοντας διαφορετική ανοσορύθμιση στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ωστόσο στις μελέτες που αφορούν τα επίπεδα των Τρυθμ στο ΣΔ1 θα αναφερθούμε αναλυτικά στη συνέχεια

5.5 Το σύνδρομο APS-1 ή APECED και το σύνδρομο IPEX

Όπως σε τόσες άλλες περιπτώσεις στην ιατρική, έτσι και στον ΣΔ1 αξιοσημείωτες πληροφορίες και κατανόηση σε βάθος, μπορούν να προκύψουν από συγκεκριμένα νοσήματα ή σύνδρομα στα οποία ο ΣΔ1 μπορεί να είναι ένα από τα συμπτώματα. Δύο σπάνια ενδοκρινικά σύνδρομα που προκαλούνται από δυσλειτουργικές μεταλλάξεις σε δύο γονίδια τα οποία παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσολογική ρύθμιση έστρεψαν αρχικά το ενδιαφέρον στην ανεύρεση γονιδίων που προδιαθέτουν στην εμφάνιση του ΣΔ1.

Το σύνδρομο APS-1 (autoimmune polyendocrinopathy syndrome) ή APECED (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy) το οποίο εκδηλώνεται με αυτοάνοση πολυενδοκρινόπαθεια (νόσος Addison, υποπαραθυρεοειδισμός, ΣΔ1, καντιντίαση και

εξωδερμική δυστροφία) προκαλείται από δυσλειτουργία του γονιδίου *AIRE* (AutoImmune REgulator). Το γονίδιο αυτό κωδικεύει έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος σε υγιείς ανθρώπους, φαίνεται να ελέγχει την έκφραση των κατά ιστό περιοριζόμενων πρωτεϊνών στο θύμο (μεταξύ των οποίων και ορμόνες όπως η ινσουλίνη) προλαμβάνοντας την παραγωγή ειδικών προς αυτές αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων και επομένως επάγει την ανοσολογική ανοχή. Η μετάλλαξη σε αυτόν τον μεταγραφικό παράγοντα εμποδίζει την έκφραση μορίων περιφερικών ιστών στο θύμο, οδηγώντας έτσι στη διαταραχή των μηχανισμών ανοσορρύθμισης και στην εκδήλωση του συνδρόμου που περιγράψαμε. Η παρουσία ΣΔ1 στους ασθενείς με μετάλλαξη *AIRE* αποδεικνύει πως η έκφραση και παρουσίαση στο θύμο σχετικών αυτοαντιγόνων υπόκειται στην επιτήρηση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα [108],[109].

Ένα ακόμη σπάνιο σύνδρομο που οδηγεί σε εμφάνιση ΣΔ1 πριν το 1^ο έτος της ζωής στον άνθρωπο είναι το σύνδρομο IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked). Τα άτομα με το σύνδρομο αυτό εμφανίζουν αυτοανοσία σε πολλαπλά όργανα. Έτσι, η νόσος εμφανίζεται συνήθως νωρίς στην παιδική ηλικία με ΣΔ1 και σοβαρή εκκριτική διάρροια καθώς και δερματίτιδα (έκζεμα ή ψωριασικές πλάκες). Η κλινική εικόνα της νόσου περιλαμβάνει επίσης αιμολυτική αναιμία, θρομβοπενία, αυτοάνοση πολυενδοκρινοπάθεια και σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις. Στην παθογένεια της νόσου εμπλέκεται η εκ γενετής διαταραχή του κύριου ρυθμιστικού μορίου της κυτταρικής ανοχής, του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 ο οποίος εδράζεται στο χρωμόσωμα X. Ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3, όπως ήδη έχουμε αναφέρει, μόνος ή σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες επηρεάζει γονίδια που αφορούν την ανάπτυξη, τον αριθμό και την ρυθμιστική ικανότητα των Τρυθμ. Χωρίς αντιμετώπιση (μεταμόσχευση μυελού) τα άτομα που πάσχουν από τη νόσο οδηγούνται στο θάνατο, λόγω λοιμώξεων στο έδαφος της ανοσοανεπάρκειας [15].

Παρά τις μελέτες, κανένας πολυμορφισμός κανενός από τα δύο γονίδια δεν έχει σχετιστεί με τον ΣΔ1. Πρέπει ωστόσο να αναφέρουμε τα αποτελέσματα της μεταμόσχευσης μυελού των οστών σε ένα αγόρι 1,4 ετών με σύνδρομο IPEX, που είχε ως αποτέλεσμα στη μείωση της απαιτούμενης δόσης ινσουλίνης στο μισό και σε σημαντική μείωση του τίτλου του αντισώματος GAD65, ακριβώς πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα [110].

6. Γενετικοί παράγοντες

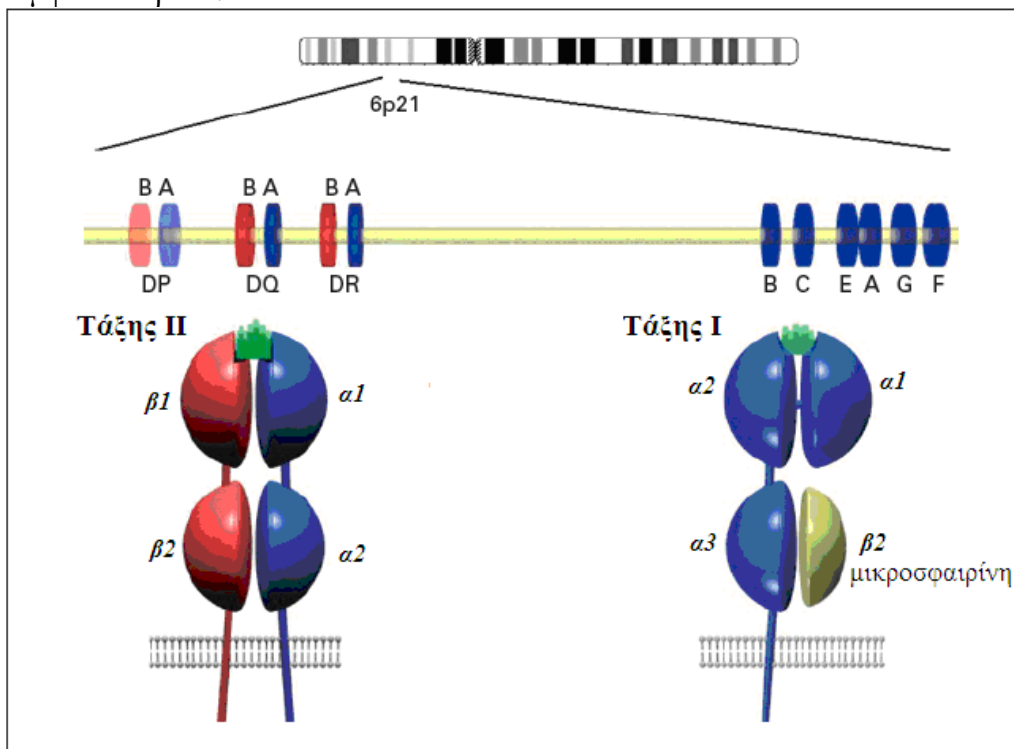
Ο ΣΔ θεωρήθηκε από τον μεγάλο γενετιστή JV Neal ως ο εφιάλτης των γενετιστών. [111] Από τη στιγμή όμως που διαφοροποιήθηκε ο ΣΔ1 από τον ΣΔ2 και ο ΣΔ1 ταυτοποιήθηκε ως αυτοάνοσο νόσημα, στράφηκε η προσοχή των γενετιστών προς γονιδιακούς τόπους που σχετίζονται με την ανοσιακή απόκριση. Αυτό έγινε πρώτα με αναλύσεις συσχέτισης (linkage analyses), και πιο πρόσφατα με πολλές μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (genome wide screening). Έτσι, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αναζήτηση γονιδίων που προδιαθέτουν στην εμφάνιση ΣΔ1 στην περιοχή HLA (στην οποία βρίσκονται αλληλόμορφα που ευθύνονται για το 40-50% του γενετικού κινδύνου εμφάνισης ΣΔ1) καθώς και στην περιοχή του προαγωγέα της ινσουλίνης (*INS-VNTR*) και στο γονίδιο *CTLA-4*. Στη συνέχεια θα δούμε αναλυτικότερα το ρόλο και τη συσχέτιση των περιοχών αυτών με την εμφάνιση της νόσου, καθώς και του περιβαλλοντικούς παράγοντες που θεωρείται ότι επηρεάζουν την εκδήλωση της νόσου δρώντας σε άτομα με γονότυπο υψηλού κινδύνου. Πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι αν και το 70% των διαβητικών φέρουν υψηλού κινδύνου γονότυπο όσον αφορά την περιοχή HLA, μόνο το 3–7% αυτών που φέρουν αυτόν τον γονότυπο αναπτύσσουν διαβήτη [112].

6.1 Το σύμπλεγμα HLA

6.1.1 Ορισμός, δομή, ονοματολογία, πολυμορφισμός

Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC), κατέχει έναν ιδιαίτερα σημαντικό βιολογικό ρόλο στην διάκριση του «ιδίου» από το «ξένο» και στη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης που επιτελείται από τα κύτταρα T. Στον άνθρωπο, τα συστατικά του γονίδια και πρωτεΐνες αποκαλούνται HLA (Human Leucocyte Antigen) τάξης I, II ή III (βλ. παρακάτω). Το σύστημα HLA ορίζεται ως μια ομάδα στενά συνδεδεμένων γενετικών τόπων, οι οποίοι κωδικεύουν μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και κατευθύνουν την ειδικότητα των λεμφοκυττάρων T να αναγνωρίζουν αντιγόνα με ένα και μόνο τρόπο: ως συνδυασμό των μορίων ιστοσυμβατότητας I ή II και πεπτιδικών θραυσμάτων από πρωτεΐνες (ξένες ή του εαυτού). Αυτή η ιδιότητα ονομάζεται *περιορισμός ως προς MHC I ή II* (MHC restriction). Με βάση την δράση των προϊόντων τους οι τόποι και τα μόρια HLA διακρίνονται σε τάξης I, όπου ο περιορισμός αναγνώρισης αντιγόνων αφορά τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα T, ενώ ο περιορισμός από τόπους και μόρια τάξης II αφορά την αναγνώριση κυρίως από τα βοηθητικά λεμφοκύτταρα T.

Τα μόρια τάξης I είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο αλυσίδες (μια βαριά ή αλυσίδα α και μία ελαφριά αλυσίδα, τη β_2 μικροσφαιρίνη που κωδικεύεται στο χρωμόσωμα 15· Εικόνα 19). Στο εξωκυττάριο τμήμα του HLA τάξης I συνδέονται κυρίως ενδογενώς παραγόμενα πεπτιδικά αντιγόνα και παρουσιάζονται στα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα T.



Εικόνα 19. Η δομή των γονιδίων και η οργάνωση της περιοχής του συμπλέγματος HLA στον άνθρωπο καθώς και η δομή των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Ο τόπος HLA τάξης I αποτελείται από τα γονίδια -A, -B και -C και ο αντίστοιχος τάξης II από τα γονίδια -DP, -DQ και -DR [113].

Τα μόρια τάξης II είναι επίσης γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και αποτελούνται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες τις α και β (Εικόνα 19). Στο εξωκυττάριο τμήμα των μορίων HLA-II και συγκεκριμένα στην περιοχή πρόσδεσης, προσδένονται κυρίως αντιγονικά πεπτίδια. Στόχος του συμπλέγματος αντιγονικού πεπτιδίου HLA-II (pHLA-II) είναι η αναγνώρισή του από τα βοηθητικά λεμφοκύτταρα T.

Το σύμπλεγμα HLA βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 στους ανθρώπους και περιέχει περισσότερα από 200 γονίδια τα οποία οργανώνονται σε τρεις περιοχές: τάξης I, II, III. Στις περιοχές I και II διακρίνονται περαιτέρω λειτουργικοί τόποι. Ειδικότερα για την τάξη HLA-I οι λειτουργικοί τόποι είναι οι HLA-A, -B, -C και κωδικεύουν την αλυσίδα α της αντίστοιχης πρωτεΐνης HLA τάξης I. Τα γονίδια τάξης II διακρίνονται στους λειτουργικούς τόπους HLA-DR, -DP και -DQ και κωδικεύουν τις αλυσίδες α και β της αντίστοιχης πρωτεΐνης (Εικόνα 19). Η αλυσίδα DR α είναι ουσιαστικά μονομορφική ενώ οι αλυσίδες DQ α και DP α είναι πολυμορφικές. Ειδικότερα, ο λειτουργικός τόπος HLA-DR περιέχει σε ορισμένα αλληλόμορφα και δύο ακόμη γονιδιακούς τύπους που κωδικεύουν δύο επιπλέον αλυσίδες β που έχουν τη δυνατότητα να συνδεθούν με την αλυσίδα HLA-DR α [113].

Όσον αφορά την ονοματολογία τους, τα αντιγόνα HLA χαρακτηρίζονται από ένα γράμμα της αλφαβήτου που αντιπροσωπεύει τη γονιδιακή θέση στην οποία κωδικεύονται (A, B, DR, DQ) και έναν αριθμό που τους έχει δοθεί με βάση τη σειρά της ανακάλυψής τους. Μερικά αντιγόνα φέρουν το γράμμα w (workshop), το οποίο υποδηλώνει ότι η ονομασία τους δεν είναι ακόμη οριστική. Τα αλληλόμορφα μπορεί να είναι πολλαπλά για κάθε υπότυπο HLA και χαρακτηρίζονται από την αναγραφή ενός αστερίσκου μετά τα γράμματα της γονιδιακής τους θέσης και τετραψήφιους ή πενταψήφιους αριθμούς. Πρόσφατα υιοθετήθηκε ο τρόπος γραφής με τον οποίο οι πρώτοι δύο αριθμοί ακολουθούνται από άνω και κάτω τελεία και μετά ακολουθούν οι τελευταίοι δύο αριθμοί (για παράδειγμα, για το αρχικό υπότυπο αλληλόμορφου HLA-A2, έχουν αναχνευθεί 22 αλληλόμορφα- A*02:01 έως A*02:22).

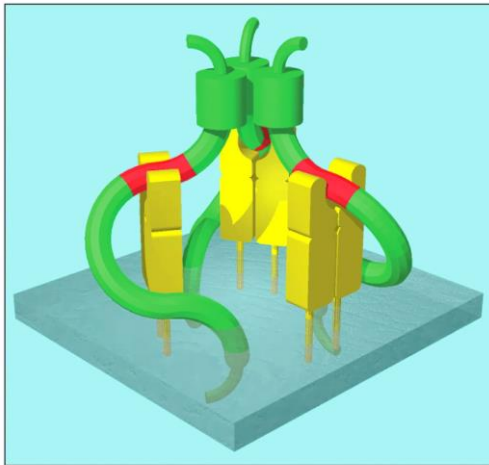
Εξαιτίας της πολυγονιδιακής οργάνωσης του HLA που περιγράψαμε ήδη, κάθε άτομο εκφράζει τουλάχιστον 3 διαφορετικά μόρια τάξης I και 3 (ακόμη και 4 μερικές φορές) μόρια τάξης II. Ο αριθμός αυτός είναι ακόμη μεγαλύτερος αν λάβει κανείς υπόψιν τον πολυμορφισμό των μορίων λόγω των γονιδιακών μεταλλάξεων (γονιδιακός πολυμορφισμός). Επιπλέον, στον τόπο HLA-DQ έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατόν να υπάρχουν μέχρι και τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα καθώς είναι δυνατοί μέχρι και 4 διαφορετικοί μοριακοί συνδυασμοί σε ορισμένα άτομα (φαινοτυπικός πολυμορφισμός). Δεδομένου ότι κάθε άνθρωπος έχει δύο χρωμοσώματα 6 (πατρικής και μητρικής προέλευσης) κατά τη μεταβίβαση των οποίων είναι δυνατό να γίνει διάσπαση και χιασματυπία κατά τη μείωση, είναι προφανές ότι η πιθανότητα ομοιότητας του φαινοτύπου HLA μεταξύ των διαφορετικών ατόμων είναι εξαιρετικά μικρή.

6.1.2 Βιολογικός ρόλος και κυτταρική βιολογία των HLA, CD74, CLIP

Ο κύριος βιολογικός ρόλος των μορίων HLA είναι η ρύθμιση την οποία ασκούν στην ανοσιακή απάντηση όπου λειτουργούν ως το αναγκαίο μέσο για να εκπαιδευτούν τα θυμοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα T ώστε να αναγνωρίζουν και να μην επιτίθενται εναντίον των συνιστωσών (κυρίως πρωτεϊνικών) του εαυτού. Αυτές οι συνιστώσες είναι πεπτίδια από πρωτεΐνες του ίδιου του οργανισμού, τα οποία προσδένονται επιλεκτικά στην αύλακα δέσμευσης αντιγόνου που διαθέτει κάθε μόριο HLA τάξης I ή II (ως οκταπεπτίδια μέχρι ενδεκαπεπτίδια στα μόρια τάξης I και πάντα ως πυρήνας εννεαπεπτιδίων στα τάξης II). Η παρουσίασή τους στον θύμο ή δευτερευόντως στην περιφέρεια οδηγεί σε εκμάθηση του εαυτού (βλ. υποκεφάλαιο 1.4 όπου εξηγήθηκε η θετική και η αρνητική επιλογή στον θύμο). Επομένως, η ανοσοαπόκριση προς το ξένο τουλάχιστον για τα λεμφοκύτταρα T αφορά

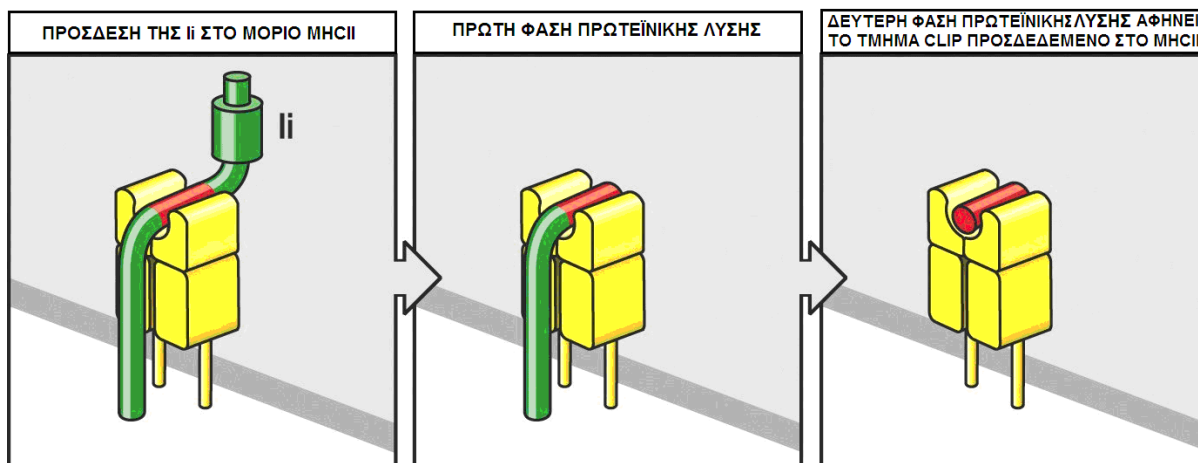
εκείνους τους κλώνους που αναγνωρίζουν με πολύ χαμηλή συγγένεια τον συνδυασμό p-HLA του εαυτού, οπότε και έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για κάποιους συνδυασμούς p'-HLA, όπου p' είναι ένα πεπτίδιο ξένου οργανισμού. Συνεπώς, όλες οι ανοσοαποκρίσεις των κυττάρων T πραγματοποιούνται μέσω της αναγνώρισης πεπτιδίων προσδεμένων σε μόρια HLA. Με αυτό τον τρόπο τα μόρια HLA λειτουργούν ως δείκτες του «ιδίου» για περιορισμό της αναγνώρισης του «ξένου» από τα T- λεμφοκύτταρα.

Ειδικότερα για τα μόρια HLA-II η πρόσδεση με πεπτίδια γίνεται στα ενδοσώματα, σε αντίθεση με τα μόρια MHC τάξης I που προσδέονται με πεπτίδια στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αρχικά τα μόρια MHCII συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ακολούθως προσδέονται με μια τύπου II γλυκοπρωτεΐνη που ονομάζεται αμετάβλητη αλυσίδα (invariant chain, Ii ή CD74) και εμποδίζει την πρόσδεση πεπτιδίων και διαταραγμένων ως προς τη δομή πρωτεϊνών στην αύλακα πρόσδεσης (groove) του MHCII, σχηματίζοντας τριμερή $[Ii(\alpha\beta)]_3$ τα οποία βοηθούν ώστε να διατηρηθεί η κατάλληλη δομή στα διμερή $\alpha\beta$ (Εικόνα 20).



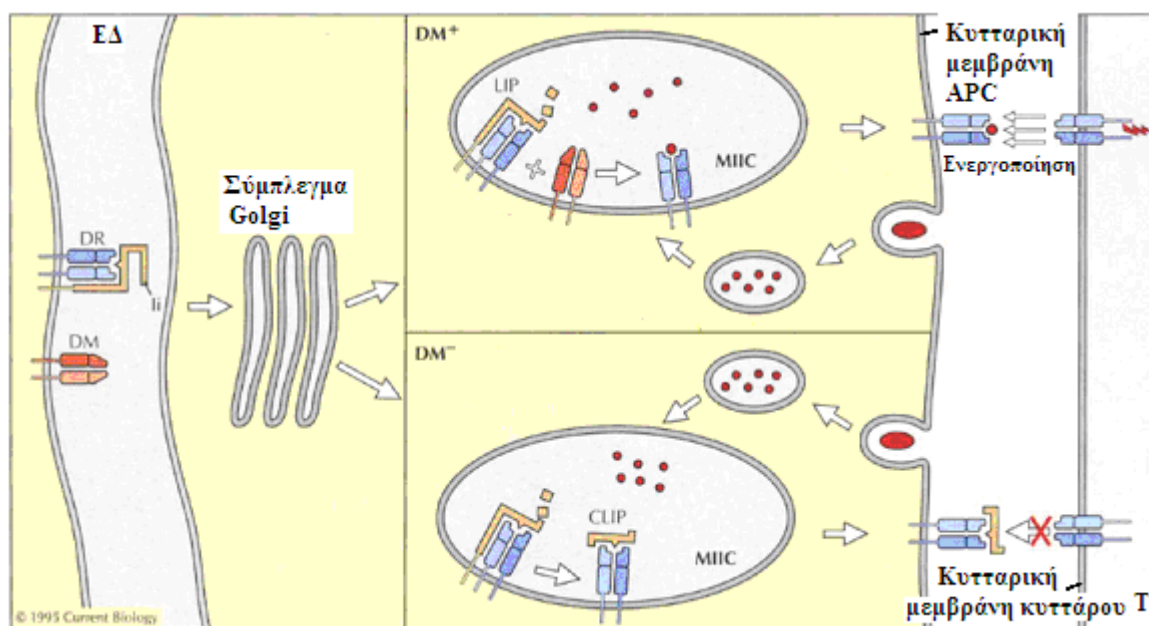
Εικόνα 20. Ένα μοντέλο του τριμερούς $[Ii(\alpha\beta)]_3$: τρία μόρια Ii (πράσινα στην εικόνα) με τρία μόρια HLA τάξης II (κίτρινα στην εικόνα). Με κόκκινο απεικονίζεται η περιοχή CLIP. (Immunology, 2007)

Το σύμπλεγμα $[Ii(\alpha\beta)]_3$ εισέρχεται στα ενδοσώματα όπου η αμετάβλητη αλυσίδα υφίσταται υδρολυτική διάσπαση των τμημάτων της, ωστόσο ένα τμήμα που αντιστοιχεί στη περιοχή 87-105 της αλυσίδας, γνωστό ως Class II associated Ii peptide (CLIP) παραμένει προσδεμένο στην αύλακα πρόσδεσης του MHCII (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Η διαδικασία αποκοπής τμημάτων της αμετάβλητης αλυσίδας μέχρι την δημιουργία του τριμερούς α, β , CLIP, που λαμβάνει χώρα στα ενδοσώματα (Immunology, 2007)

Στο ενδόσωμα γίνεται ανταλλαγή του θραύσματος CLIP με πεπτιδικό αντιγόνο και μετατόπιση του συμπλόκου στην κυτταρική μεμβράνη. Σε ειδικά ενδοκυττάρια οργάνια το ετεροδιμερές HLA-DM (μόριο που κωδικεύεται στην περιοχή HLA τάξης II) καταλύει την αποσύνδεση του μορίου CLIP και την επακόλουθη σύνδεση του πεπτιδικού αντιγόνου (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Η ανταλλαγή του θραύσματος CLIP με εξωκυττάρια πεπτίδια (κόκκινα σφαιρίδια) εντός των ενδοσωμάτων, με απαραίτητη την παρουσία του HLA-DM, για είναι δυνατή η αντιγονοπαρουσίαση και η ενεργοποίηση των T κυττάρων [114].

6.1.3 HLA –ΣΔ1

Οι συσχετίσεις HLA με νοσήματα είναι συνήθως αποτέλεσμα της συμμετοχής των μορίων αυτών στις ανοσολογικές αποκρίσεις σε φλεγμονές, κακοήθειες ή αλλεργικές αντιδράσεις. Έτσι αναφέρονται συσχετίσεις αντιγόνων HLA (κυρίως τάξης II και ιδιαίτερα -

DR) με νοσήματα όπως η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, η νόσος του Reiter, η βαρεία μυασθένεια, διάφορες θυρεοειδίτιδες, η ΣΚΠ, η ερπητική δερματίτιδα και ο ΣΔ1. Στον ΣΔ1 οι συσχετισμοί με συγκεκριμένα αλληλόμορφα ή απλότυπους HLA αφορούν κατά κύριο λόγο την περιοχή τάξης II, όπως συμβαίνει στα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα.

Παλαιότερα, τα HLA-DRB1*03 (DR3) και HLA-DRB1*04 (DR4) είχαν βρεθεί ως τα κύρια αλληλόμορφα που σχετίζονται με τη νόσο. Μια ερμηνεία για το ρόλο τους στην παθογένεια του ΣΔ1 ήταν ότι αυτά τα μόρια εμπλέκονται στην παρουσίαση αυτοαντιγόνων των κυττάρων β σε αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα T στην περιοχή των νησιδίων του παγκρέατος, και ενδεχόμενα και στους επιχώριους λεμφαδένες. Η παρουσία αμφοτέρων των αλληλόμορφων DR3 και DR4 στο ίδιο άτομο δημιουργεί τον υψηλότερο γνωστό γενετικό κίνδυνο για τη νόσο, αλλά και η παρουσία του ενός μόνο αλληλόμορφου αποτελεί παράγοντα κινδύνου [108],[116].

Ωστόσο μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η περιοχή που σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης (αλλά και προστασία από) ΣΔ1 είναι η περιοχή *HLA-DQ* [117]. Τα ετεροδιμερή HLA-DQ που κωδικεύονται από τα γονίδια HLA-DQA1 και -DQB1 θεωρούνται βασικοί καθοριστές του κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Ωστόσο, σημαντικό ρόλο κατέχει ο πολυμορφισμός της περιοχής και η παρουσία μορίων που αυξάνουν ή μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη.

Πίνακας 6. Η συσχέτιση των διαφόρων απλότυπων HLA σε σχέση με την εκδήλωση ΣΔ1 σε ασθενείς με έναρξη αυτοανοσίας έναντι των κυττάρων β όπως βρέθηκαν στις αντίστοιχες μελέτες (rs: συμβολισμός για το αντίστοιχο SNP, single nucleotide polymorphism/ γενετικός πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου) [115].

Μελέτη	Απλότυπος	Αποτέλεσμα
DIPP [115],[120]	HLA-A*03	Προστατεύει
	HLA-B*39	Προδιαθέτει
	PTPN22 rs2476601 T αλληλόμορφο	Προδιαθέτει
BABYDIAB [213]	IFIH1 rs2111485 GG γονότυπος:	Προδιαθέτει
DPT-1 [214]	HLA-DQB1*0301	Προστατεύει
	HLA-DQB1*0302	Προδιαθέτει
Australian Type 1 Diabetes Study [215]	DR6	Προστατεύει
	DR9	Προστατεύει
	DR3/4	Προδιαθέτει
	HLA-A*24 *A30 *B18	Προδιαθέτει
	HLA-A*01 *A28 *B14 *B56	Προστατεύει
The Melbourne Prediabetes mellitus Study [216]	HLA-A*24	Προδιαθέτει

Τα γονίδια HLA-DQB1*02 και DQB1*0302 θεωρούνται προδιαθεσικά για την εμφάνιση της νόσου, ενώ τα DQB1*0301, DQB1*0602 και DQB1*0603 θεωρούνται προστατευτικά. Οι συνδυασμοί μεταξύ τους, δημιουργούν γονότυπους με διαφορετικό σχετικό κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου. Ειδικότερα, ο μέγιστος κίνδυνος σχετίζεται με το γονότυπο HLA-DQB1*02 / DQB1*0302, μέσου κινδύνου θεωρείται ο γονότυπος DQB1*0302/x (όπου x αλληλόμορφο διάφορο των αναγραφόμενων), χαμηλού αλλά αυξημένου κινδύνου ο γονότυπος DQB1*0301/ DQB1*0302, HLA-DQB1*02/ x, DQB1*0602 / DQB1*0302,

DQB1*0603 / DQB1*0302 ενώ προστατευτικός θεωρείται ο γονότυπος DQB1*0301/x, HLA-DQB1*02/ DQB1*0602, HLA-DQB1*02/ DQB1*0603, DQB1*0602/x, DQB1*0603/x.

Εξαιτίας του πολύ ισχυρού συσχετισμού HLA-DQA1 και DQB1, είναι συχνά απαραίτητο να καθοριστεί μόνο το αλληλόμορφο DQB1 και η έκφραση του DQA1 συμπεραίνεται με βάση την ήδη γνωστή τους ανισοροπία σύνδεσης, αν και μπορεί να υπάρχουν εξαιρέσεις.

Η παρουσία του αλληλόμορφου HLA-DQB1*0302 σχετίζεται με το DQA1*0301, ενώ το DQB1*0602 πρακτικά σχετίζεται πάντοτε με το DQA1*0102, καθώς επίσης και με τα αλληλόμορφα DRB1*15 και DRB5*0101. Το HLA-DQB1*0301 μπορεί να σχετίζεται είτε με το DQA1*0301 (απλότυπος DR4) είτε με το DQA1*0501 (απλότυπος DR5 και DR6). Το γεγονός ότι κανένα από αυτά τα αλληλόμορφα δεν αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη, (αν και σχετίζονται με διαφορετικό βαθμό προστασίας έναντι της νόσου) καθιστά προαιρετικό τον καθορισμό τους. Αντίθετα, είναι σημαντικός ο καθορισμός του αλληλόμορφου DQA1 που σχετίζεται με το DQB1*02, γιατί μπορεί να συνδυαστεί με τα αλληλόμορφα DQA1*0201, DQA1*0501, DQA1*0301 με διαφορετικό κίνδυνο έκφρασης της νόσου κάθε φορά και με διαφοροποίηση των απλοτύπων ανάλογα με τον μελετώμενο πληθυσμό, όπως θα δούμε στη συνέχεια.

Συνοψίζοντας, οι συνδυασμοί των αλληλόμορφων DQA1*0301/ B1*0302 (μόριο DQ8), και HLA-DQA1*0501/B1*0201 (μόριο DQ2) σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Τα άτομα με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι τα ετερόζυγα για DR3/4-DQ2/8 και αντιστοιχούν στο 30-50% των διαβητικών. Σύμφωνα με έρευνα στο Denver του Κολοράντο, ο συγκεκριμένος απλότυπος σχετίζεται με πιθανότητα 55% για εμφάνιση της νόσου μέχρι την ηλικία των 12 ετών. Η παρουσία του απλότυπου DR3/4-DQ2/8 σε αδέρφια διαβητικών που έχουν ίδιο γονότυπο σχετίζεται με κίνδυνο ίσο με 80% για εμφάνιση αυτοαντισωμάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα, και 60% για εμφάνιση της νόσου έως την ηλικία των 15 ετών [112],[118].

Μια παρόμοια συσχέτιση, αν και όχι τόσο ισχυρή, βρίσκεται στα μόρια HLA τάξης I. Μια πρόσφατη μελέτη από τους Nejentsev και συν. δείχνει ότι παίρνοντας υπόψιν την κυρίαρχη δράση των μορίων τάξης II, η υπολειπόμενη συσχέτιση στα μόρια HLA μπορεί να αποδοθεί στα γονίδια HLA-B και HLA-A. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η παρουσία του αλληλόμορφου HLA-B*39 που σχετίζεται και με μικρότερη ηλικία εμφάνισης της νόσου [119] και έχει θετική συσχέτιση με την εξέλιξη σε νόσο στον Φιλανδικό πληθυσμό ιδιαίτερα παρουσία των DR3/DR4 [120]. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, στο Βέλγικο πληθυσμό δεν επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση του HLA-B*39 ενώ το HLA-B*18 βρέθηκε να σχετίζεται με επιτάχυνση εμφάνισης της νόσου σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, όπως οι συγγενείς πρώτου βαθμού με θετικά αυτοαντισώματα, παρουσία του HLA-DQ2. Ενώ για το HLA-A*24 είναι απαραίτητη η παρουσία του HLA-DQ8 [121]. Τέλος, το αλληλόμορφο HLA-A*02 που είναι ένα από τα πιο συχνά συναντώμενα σε διαβητικούς (περίπου 60%) αυξάνει τον κίνδυνο σε άτομα που ήδη έχουν τα υψηλού κινδύνου τάξης II αλληλόμορφα DR3/4- DQ2/8 [112],[122],[123].

6.1.4 HLA- γεωγραφική συσχέτιση (ελληνικός πληθυσμός)

Είναι ενδιαφέρον ότι τα αλληλόμορφα HLA-DQ που σχετίζονται με προδιάθεση ή προστασία έναντι του ΣΔ1 μπορεί να διαφέρουν από πληθυσμό σε πληθυσμό εξαιτίας της διαφορετικής κατανομής των αλληλόμορφων σε διαφορετικές εθνικότητες (Πίνακας 7).

Ιδιαίτερα για τους Καυκάσιους πληθυσμούς πρέπει να επισημάνουμε ότι τα ίδια μόρια HLA-DQ, σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη αν και η σχετική συχνότητα κάθε γονοτύπου διαφέρει. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση μεταξύ Ελλάδας και

Φιλανδίας που αποτελούν χώρες με πολύ διαφορετική συχνότητα εμφάνισης της νόσου (η χαμηλότερη και η υψηλότερη αντίστοιχα), καθώς και πολύ διαφορετική γεωγραφική κατανομή (νοτιότερο και βορειότερο σημείο της Ευρώπης) [125].

Ειδικότερα, ενώ τα γονίδια που προδιαθέτουν ή προστατεύουν στην εμφάνιση της νόσου, είναι τα ίδια και στις δύο περιοχές, ωστόσο στην Φιλανδία τα περισσότερα παιδιά με ΣΔ1 φέρουν το γονότυπο DQB1*0302, ενώ στην Ελλάδα το DQB1*02 είναι το συχνότερα εμφανιζόμενο αλληλόμορφο σε αυτά τα άτομα. Η χαμηλή συχνότητα του DQB1*0302, σε συνδυασμό με την υψηλή συχνότητα του προστατευτικού αλληλόμορφου DQB1*0301, θα μπορούσε να συσχετιστεί με την χαμηλή συχνότητα εμφάνισης της νόσου στην Ελλάδα. Αυτός ο συσχετισμός ωστόσο δεν είναι απόλυτος, καθώς το ισχυρά προστατευτικό αλληλόμορφο DQB1*0602 είναι σπάνιο στην Ελλάδα και σε άλλες Μεσογειακές χώρες. [126]

Όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι σημαντικός ο καθορισμός του αλληλόμορφου DQA1 που σχετίζεται με το DQB1*02, γιατί στις βορειοευρωπαϊκές χώρες το τελευταίο σχετίζεται είτε με το DQA1*0201 (απλότυπος DR7 που είναι προστατευτικός ή ουδέτερος) είτε με το DQA1*0501 (απλότυπος DR3 που σχετίζεται με αύξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου). Αντίθετα στις Μεσογειακές χώρες και στους μαύρους το DQB1*02 μπορεί να σχετίζεται με το DQA1*0301 που υποδεικνύει αυξημένο κίνδυνο, αν και σημαντικό ρόλο παίζει και το αλληλόμορφο DR, που μπορεί να είναι είτε DR7 είτε DR4 (DRB1*0405) [126].

Πίνακας 7. Συνδυασμοί των αλληλόμορφων HLA-DQA1, HLA-DQB1 σχετιζόμενοι με προδιάθεση ή προστασία έναντι του ΣΔ1 σε διάφορους πληθυσμούς (Μαύρους, Καυκάσιους, Ιάπωνες) (τροποποιημένος από [124]).

<i>DQA1, DQB1</i>	Θέση ^a	Ορολογικό DQ ^b	Σχετιζόμενο DR ^γ	Σχετικός κίνδυνος
Προδιαθεσικό				
0301, 0302	c	DQ8	DR4	8–12
0501, 0201	c	DQ2	DR3	3–5
0301, 0201	c/t			5–20
0501, 0302	t			8–35
0301, 0303 ^δ	c	DQ9	DR9	2
0301, 0401 ^δ	c	DQ4	DR4	4
0301, 0402	t			5–15
Προστατευτικό				
0102, 0602	c	DQ6	DR2, DR11 ^ε	0.2
0103, 0603 ^ζ	c	DQ6	DR6	0.2
0103, 0601 ^δ	c	DQ6	DR2, DR8	0.2
0501, 0301	c	DQ7	DR5	0.2–0.4

^a Θέση c = cis ή t = trans των συγκεκριμένων αλληλόμορφων DQA1 και DQB1.
^b Ορολογικός υπότυπος DQ που κωδικοεύεται από αυτόν τον απλότυπο.
^γ Συσχέτιση με τον ορολογικό υπότυπο DR που συνήθως κωδικοεύεται από αυτόν τον απλότυπο.
^δ Σημαντικά αυξημένος ή μειωμένος στους Ιάπωνες. Αυτοί οι απλότυποι είναι πολύ σπάνιοι στους Μαύρους ή στους Καυκάσιους.
^ε Αυτή η σύνδεση δεν ανευρίσκεται στον ελληνικό πληθυσμό.
^ζ Σημαντικά μειωμένο στους Μαύρους και στους Καυκάσιους. Αυτός ο απλότυπος είναι πολύ σπάνιος στους Ιάπωνες.

Στον Ελληνικό πληθυσμό, στον απλότυπο DQB1*0302, ο περαιτέρω καθορισμός του DR4 είναι σημαντικός, καθώς η συχνότητα του επικρατούντος προστατευτικού αλληλόμορφου DRB1*0403 είναι υψηλή. Όσον αφορά τον ρόλο των προστατευτικών αλληλόμορφων DRB1*1501, και DQA1*0102/B1*0602, ειδικά στον Ελληνικό πληθυσμό φαίνεται ότι η συγκεκριμένη προστασία οφείλεται αποκλειστικά στο αλληλόμορφο HLA-DQA1*0102/B1*0602, καθώς το DRB1*1501 δεν βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με το πρώτο [127].

6.1.5 HLA- ηλικιακή συσχέτιση

Στους Καυκάσιους φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του γονότυπου με την ηλικία εμφάνισης της νόσου, υποδεικνύοντας ότι τα αλληλόμορφα υψηλού κινδύνου εμφανίζονται κυρίως σε διαβητικούς με μικρότερη ηλικία έναρξης της νόσου [128]. Η συχνότητα του γονότυπου HLA-DR3/DR4 φαίνεται να μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας έναρξης της νόσου (μετά τα 15) σύμφωνα με τους Caillat-Zucman και συν., ενώ τα αλληλόμορφα HLA-DQB1 (DQB1*0201 και DQB1*0302) εμφανίζονται σε μικρότερο ποσοστό σε ενήλικες σε σχέση με διαβητικά παιδιά κάτω των 9 ετών σύμφωνα με τους Ongagna και συν. [129],[130]. Επίσης, σύμφωνα με μελέτη των Valdes και συν. σε αδέρφια, η ηλικία έναρξης της νόσου στον έναν αδερφό δεν σχετίζεται ισχυρά με την ηλικία έναρξης στον άλλο, παρά μόνο όταν έχουν κοινό έναν τουλάχιστον απλότυπο HLA-DR/DQ [128].

6.1.6 HLA- αυτοαντισώματα

Ο απλότυπος HLA-DRB1*03-DQB1*02 σχετίζεται κυρίως με αυτοαντισώματα GADA ενώ ο απλότυπος DRB1*04-DQB1*03:02 σχετίζεται με αυτοαντισώματα IAΑ και IA-2A, καθώς και νεαρότερη ηλικία έναρξης της νόσου. Τα IAΑ επίσης βρίσκονται πιο συχνά σε νεαρά παιδιά και σε άτομα θετικά ως προς HLA-DR4-DQ8 και πολυμορφισμό στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της ινσουλίνης (*INS-VNTR*, βλ. παρακάτω) που προδιαθέτει στην εμφάνιση διαβήτη [115]. Δεδομένου ότι οι γονότυποι HLA με το μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου είναι συχνοί στο γενικό πληθυσμό, αλλά μόνο ένα μικρό ποσοστό των φορέων εκδηλώνουν ΣΔ1, αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχουν και άλλοι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου, καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες.

6.1.7 HLA-DR και έκφραση στα T λεμφοκύτταρα και Τρυθμ

Τα εργαστήρια των Schlossman και Kunkel υποδεικνύουν ότι τα κυκλοφορούντα ανθρώπινα περιφερικά T κύτταρα εκφράζουν MHC τάξης II και ότι η συχνότητά τους στα CD4⁺ κύτταρα T αυξάνεται μετά από ενεργοποίηση. Αν και τα μόρια αυτά παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση με τη παρουσίαση πεπτιδίων στα κύτταρα T, η έκφρασή τους στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα T έχει θεωρηθεί απλά ως ένας δείκτης ενεργοποίησης χωρίς να είναι σαφής ο λειτουργικός τους ρόλος. Είναι ωστόσο γνωστό, ότι τα μόρια MHC-II που εκφράζονται σε αυτά, διατηρούν την αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα, καθώς υπάρχουν CD4⁺ HLA-DR⁺ κύτταρα T που παρουσιάζουν πεπτίδια σε άλλα λεμφοκύτταρα T [131],[132].

Όσον αφορά τα Τρυθμ, σύμφωνα με τους Baecher-Allan C και συν. τα Τρυθμ που εκφράζουν HLA-DR σε ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 30% αποτελούν έναν λειτουργικά ξεχωριστό πληθυσμό ώριμων Τρυθμ αλλά όχι μια ξεχωριστή σειρά μέσα στον υποπληθυσμό των CD4⁺CD25^{high} κυττάρων T. Τα κύτταρα αυτά ασκούν τη δράση τους αποκλειστικά μέσω κυτταρικής επαφής που σχετίζεται με υψηλή έκφραση FoxP3. Αντίθετα τα HLA-DR⁻ Τρυθμ αρχικά ενισχύουν την έκκριση IL-10 και IL-4, και στη συνέχεια επάγουν μια καθυστερημένη καταστολή του πολλαπλασιασμού που συνοδεύεται από την αύξηση του mRNA του *FoxP3*.

Επομένως ενώ και οι δύο υποπληθυσμοί ασκούν κατασταλτική δράση μέσω διακυτταρικής επαφής, μόνο τα HLA-DR⁻ Τρυθμ φαίνεται να έχουν τη δυνατότητα καταστολής και μέσω έκκρισης IL-10. Αντίθετα τα HLA-DR⁺ επάγουν μια πιο έντονη καταστολή των Τ κυττάρων και έχουν μικρότερη ικανότητα πολλαπλασιασμού [133].

6.2 *INS-VNTR*

Οι μεταβλητού αριθμού επαναλαμβανόμενες περιοχές (Variable Number Tandem Repeats - *VNTR*) που βρίσκονται στην περιοχή του προαγωγέα της ινσουλίνης, καθώς και δευτερευόντως οι πολυμορφισμοί του γονιδίου έχουν σχετισθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ1. Το γονίδιο της προϊνσουλίνης εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11. Η περιοχή του προαγωγέα, περίπου 600 bp από το σημείο έναρξης της κωδικεύουσας περιοχής του γονιδίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μεταγραφής της προϊνσουλίνης. Οι περιοχές *VNTR* αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 14–15 bp του τύπου ACAGGGGTGTGGGG [134]. Στους καυκάσιους, η περιοχή *VNTR* έχει δύο τάξεις μεγέθους, τη μικρή τάξη που αποτελείται από 26-63 επαναλήψεις (τύπου I) και την μεγάλη τάξη που αποτελείται από 141 - 209 επαναλήψεις (τύπου III). Τα αλληλόμορφα ενδιάμεσου μεγέθους (τύπου II) είναι σπάνια στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Η ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο τύπου I σχετίζεται με σχετικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου 2-3 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με το αλληλόμορφο τύπου III. Επομένως, η παρουσία του αλληλόμορφου τύπου III θεωρείται προστατευτική έναντι της νόσου [135].

Το ότι ο πολυμορφισμός αυτός δεν επηρεάζει την αλληλουχία του γονιδίου της προϊνσουλίνης και εντοπίζεται στην περιοχή του προαγωγέα της ινσουλίνης, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός *VNTR* είναι πιθανό να σχετίζεται με διαφορετικά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου της προϊνσουλίνης. Ωστόσο η μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA της προϊνσουλίνης στα αλληλόμορφα τύπου I σε σχέση με τα τύπου III στο πάγκρεας τόσο των ενηλίκων όσο και των εμβρύων δεν μπορεί να εξηγήσει την εκδήλωση της νόσου. Εκτός από το πάγκρεας, μικρές ποσότητες προϊνσουλίνης εκφράζονται στο θύμο και σχετίζονται με την κεντρική ανοσιακή ανοχή. Πειραματικές μετρήσεις έδειξαν ότι τα τύπου I αλληλόμορφα προδιαθέτουν σε μικρότερη έκφραση της ινσουλίνης στο θύμο (και σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης), εμποδίζοντας έτσι την αρνητική επιλογή, οδηγώντας σε μικρότερης έκτασης απάλειψη των κυττάρων Τ που είναι αυτο-αντιδραστικά έναντι της προϊνσουλίνης [136],[137]. Η υπόθεση αυτή έχει επιβεβαιωθεί και στους ποντικούς, όπου η μειωμένη έκφραση ινσουλίνης στο θύμο οδήγησε σε αυξημένη έκφραση της νόσου [138].

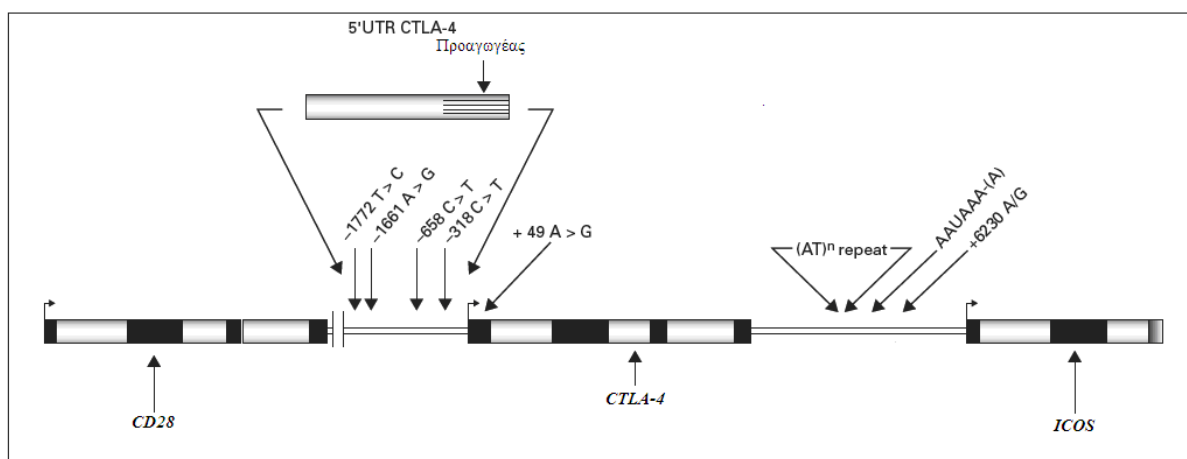
Οι μελέτες DAISY και DIPP που μελέτησαν την επίδραση του πολυμορφισμού της προϊνσουλίνης (*rs689*) δεν βρήκαν κάποια επίδραση στην εξέλιξη της νόσου. Παρομοίως η μελέτη DPT-1 δεν βρήκε συσχέτιση στους συγγενείς που έχουν ήδη θετικά αυτοαντισώματα. Ο γονότυπος *VNTR I*, της προϊνσουλίνης που σχετίζεται με ΣΔ1 έχει κυρίως συσχετισθεί με την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων έναντι της ινσουλίνης, με χαμηλότερη έκφραση των επιπέδων ινσουλίνης στον θύμο και γενικότερα φαίνεται να επιδρά στην αποτυχία ανοχής έναντι της ινσουλίνης, παρά να επιδρά στην ανοσομεσολαβούμενη καταστροφή των κυττάρων β που εμφανίζεται αργότερα κατά την εξέλιξη της νόσου [115].

6.3 *CTLA-4*

Το γονίδιο για το *CTLA-4* βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 2 (2q33) και έχει μελετηθεί για τη συσχέτισή του με την εμφάνιση του ΣΔ1, δεδομένης της εμπλοκής του μορίου *CTLA-4* στην απόπτωση των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων, με τους μηχανισμούς που περιγράψαμε αναλυτικότερα παραπάνω. Η περιοχή αυτή εμπεριέχει τα

γονίδια *CD28* και *ICOS* τα προϊόντα των οποίων μαζί με το μόριο CTLA-4 φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσορρύθμιση.

Η συσχέτιση του CTLA-4 με τον ΣΔ1 έχει επιβεβαιωθεί από αρκετές μελέτες [139],[140]. Επιπλέον, σε μία από αυτές [139] βρέθηκε συσχέτιση της ίδιας περιοχής με τη νόσο του Graves και την αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα. Ειδικότερα, στη μη μεταγραφόμενη περιοχή 3' του CTLA-4 το A6230G SNP αποτελεί μια από τις περιοχές που εμπλέκονται στην παθογένεια των ανωτέρω νόσων, με έναν μηχανισμό που ωστόσο δεν είναι γνωστός. Έχουν προταθεί επιδράσεις των αλληλόμορφων στα επίπεδα mRNA, οδηγώντας σε μια διαλυτή ισομορφή του CTLA-4 του οποίου η διαμεμβρανική περιοχή αποκόπτεται [139]. Ωστόσο, αυτός ο μηχανισμός αμφισβητήθηκε αργότερα [141].



Εικόνα 23. Η δομή του CTLA-4 στο χρωμόσωμα 2q33. Τα γονίδια *CD28* και *ICOS*, βρίσκονται εκτός της ομάδας απλοτύπου του CTLA-4. Επισημαίνονται επίσης και οι μοναδικοί πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων (SNP) στα άκρα 3' και 5', ορισμένοι εκ των οποίων φαίνεται να έχουν ισχυρή συσχέτιση με τη νόσο. Τα εξόνια των γονιδίων επισημαίνονται με μαύρο χρώμα [1175].

Ποικίλα SNP, φαίνονται να ενοχοποιούνται και στη μη μεταγραφόμενη περιοχή 5' είτε με τη μορφή του πολυμορφισμού του προαγωγέα του γονιδίου, είτε με την απλή αντικατάσταση ενός αμινοξέος στο πεπτίδιο της σηματοδοτικής αλληλουχίας. Αυτή η περιοχή περιλαμβάνει ένα μη συνώνυμο SNP του A49G (Thr17Ala), το οποίο σχετίζεται με την αντικατάσταση της Thr17Ala, η οποία φαίνεται να επηρεάζει την γλυκοζυλίωση και τα μόρια επιφανείας του CTLA-4 [142]. Η τελευταία μελέτη βρήκε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του CTLA-4 ανάλογα με το αλληλόμορφο, αλλά σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης.

Ωστόσο, επειδή ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι διάφοροι πολυμορφισμοί εμπλέκονται στη νόσο δεν έχουν επιβεβαιωθεί, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες. Να σημειωθεί ότι ο σχετικός κίνδυνος σε σχέση με τα αλληλόμορφα HLA και *INS-VNTR* είναι σχετικά χαμηλός (RR = 1.2) [113].

6.4 PTPN2, PTPN22

Τα μόρια PTPN's (protein tyrosine phosphatase, non-receptor) εμπλέκονται σε μια μεγάλη ποικιλία ενδοκυττάρων διεργασιών μετάδοσης σήματος είτε με θετικό είτε με ανασταλτικό τρόπο.

Το PTPN2 είναι μια φωσφατάση που εκφράζεται κυρίως στα αιμοποιητικά κύτταρα και έχει βρεθεί ότι ένας πολυμορφισμός SNP στο άκρο 3' του γονιδίου PTPN2 (PTPN2rs1893217)

σχετίζεται με νόσο του Crohn, με ΣΔ1 και με ρευματοειδή αρθρίτιδα, ενώ 2 επιπλέον SNPs σχετίζονται με ΣΔ1. Αν και ο σχετικός κίνδυνος για κάθε έναν από αυτούς τους πολυμορφισμούς είναι μέτριος ($RR \leq 1.3$), όλα μαζί υποδεικνύουν ένα σημαντικό ρόλο του υποδοχέα της IL-2 στην εκδήλωση αυτοανοσίας. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι άτομα με το υψηλού κινδύνου αλληλόμορφο PTPN2rs1893217 έχουν μειωμένη απόκριση έναντι της IL-2 στα $CD4^+CD25^{high}$ λεμφοκύτταρα T, όπως προκύπτει με βάση την έκφραση του μορίου STAT5 και του FoxP3 [143],[144].

Ιδιαίτερα σηματικός φαίνεται να είναι ο πολυμορφισμός του γονιδίου *PTPN22*, και συγκεκριμένα το αλληλόμορφο *PTPN22* R620W (*PTPN22*W*) καθώς φαίνεται να προδιαθέτει σε αρκετά αλλά όχι όλα τα αυτοάνοσα νοσήματα συμπεριλαμβανομένου του ΣΔ1 και του ΣΕΛ αλλά όχι της ΣΚΠ. Το γονίδιο του *PTPN22* εκφράζει μια λεμφική τυροσυλο-φωσφατάση (lymphoid tyrosine phosphatase, Lyp) που εμπλέκεται στην μετάδοση του σήματος στα κύτταρα T. Η Lyp θεωρείται ισχυρός αναστολέας της ενεργοποίησης των κυττάρων T και φαίνεται να εμπλέκεται στον σηματοδοτικό καταρράκτη που σχετίζεται με διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων B [145]. Έχει υπονοηθεί ότι η λειτουργία δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν υψηλά επίπεδα της συγκεκριμένης φωσφατάσης είναι σημαντική στην αντιγονοπαρουσίαση και ενεργοποίηση των βοηθητικών T ή στην μειωμένη λειτουργικότητα αυτοαντιδραστικών Τρυθμ και στην δημιουργία αυτοδραστικών Τδραστ κυττάρων. Το συγκεκριμένο γονίδιο επίσης έχει σχετιστεί με μειωμένη λειτουργία των κυττάρων B στην έναρξη του ΣΔ1, υποστηρίζοντας έτσι την υπόθεση ότι μπορεί να ενισχύει την καταστροφή των νησιδιοκυττάρων β [115]. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το αλληλόμορφο *PTPN22*W* αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TCR, οδηγώντας σε μειωμένη ικανότητα μετάδοσης σήματος σε άτομα που φέρουν το γονίδιο δεν είναι ακόμη γνωστοί. Τέλος, να σημειωθεί ότι ενώ στις έρευνες DPT-1, BABYDIAB και DAISY δεν βρέθηκαν επιπτώσεις των διαφορετικών γονοτύπων του *PTPN22* που να σχετίζονται με τη νόσο, στην φιλανδική μελέτη DIPP, που φέρει και τον μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων συγκριτικά με τις υπόλοιπες, η παρουσία του αλληλόμορφου σχετίστηκε με την αυτοάνοση καταστροφή των κυττάρων β [115].

7. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η τρέχουσα άποψη όσον αφορά την αιτιολογία και την παθογένεση του ΣΔ1 στα παιδιά είναι ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες εκκινούν μια αυτοάνοση διεργασία στο πάγκρεας σε ένα γενετικά προδιατεθειμένο άτομο, που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των ινσουλινοεκκριτικών κυττάρων β .

Οι διαφορές στη συχνότητα της νόσου μεταξύ διαφορετικών εθνικών ομάδων μπορεί να αποδοθούν εν μέρει σε διαφορετικό γονιδιακό περιβάλλον. Ωστόσο οι μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα και σε πληθυσμούς μεταναστών υποδηλώνουν ότι και περιβαλλοντικοί παράγοντες εμπλέκονται στην εκδήλωση της νόσου.

Ενισχυτικό της άποψης ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με τους γενετικούς είναι η πρόσφατη αύξηση της συχνότητας της νόσου στην παιδική ηλικία. Η νόσος αυξάνεται παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια, τόσο σε πληθυσμούς με αυξημένο επιπολασμό όσο και σε πληθυσμούς με χαμηλό επιπολασμό. Συγκεκριμένα, από το 1960 έως το 1996, παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξης του 3% κάθε χρόνο [146]. Το ποσοστό των γονοτύπων υψηλού κινδύνου DRB1*03-DQB1*02/DRB1*04-DQB1*03:02 ανάμεσα στα νέα περιστατικά έχει μειωθεί ταυτόχρονα με την αύξηση της συχνότητάς τους. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις για πιο ειδικές αλληλεπιδράσεις όπως αυτή του γονιδίου *PTPN22* και της πρόωρης έναρξης σίτισης με γάλα αγελάδος κατά την βρεφική ηλικία καθώς και της επίδρασης του γονιδίου σε βρέφη που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό και όχι σε αυτά

που γεννιούνται με καισαρική. Αλληλεπιδράσεις που μένει ακόμη να διερευνηθούν περαιτέρω [115].

7.1 Ιογενείς λοιμώξεις

Το πλέον κλασσικό παράδειγμα συσχέτισης της νόσου με ιογενή λοίμωξη, είναι αυτό της συγγενούς ερυθράς. Έχει παρατηρηθεί αυξημένος επιπολασμός ΣΔ1 σε άτομα που προσβλήθηκαν κατά την ενδομήτριο ζωή τους από τον ιό αυτόν και κυρίως σε άτομα που φέρουν τον απλότυπο HLA-DR3/DQ2 που προδιαθέτει στην εμφάνιση της νόσου. Ωστόσο, το γεγονός ότι σήμερα τα κρούσματα έχουν μειωθεί σημαντικά λόγω εμβολιασμού ενώ ο επιπολασμός του ΣΔ1 έχει αυξηθεί, υποδηλώνει ότι η λοίμωξη αυτή δεν αποτελεί τον συνήθη παράγοντα που συμβάλλει στην εμφάνιση της νόσου [112].

Οι εντεροϊοί, είναι μικροί RNA ιοί που ανήκουν στην οικογένεια των ιών *picorna*. Οι λοιμώξεις από εντεροϊούς είναι συχνές μεταξύ παιδιών και εφήβων και συνήθως διαδράμουν υποκλινικά ή προκαλώντας ήπια γριπώδη συνδρομή. Στοιχεία που συνηγορούν υπέρ της συμβολής των εντεροϊών στην παθογένεια της νόσου είναι το γεγονός ότι η κατανομή των νέων περιστατικών ΣΔ ακολουθεί την εποχιακή κατανομή των εντεροϊών, η αυξημένη ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του ιού *Coxsackie B* στους διαβητικούς έναντι του φυσιολογικού πληθυσμού και η ανίχνευση του RNA των εντεροϊών σε αυξημένη ποσότητα στο αίμα νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών (27-64 %) έναντι φυσιολογικών μαρτύρων (0-4 %). Τέλος, σε μελέτη στη Φιλανδία σε υγιή αδέρφια διαβητικών, κατά την παρακολούθηση με αιμοληψία ανά 6-μηνο, οι λοιμώξεις από εντεροϊούς ήταν πιο συχνές σε αδέρφια που εμφάνισαν τη νόσο, ενώ η χρονική περίοδος εμφάνισης της λοίμωξης συνέπιπτε με την περίοδο εμφάνισης αυτοαντισωμάτων [147]. Ενδιαφέρον θα έχει η δημοσίευση των αποτελεσμάτων της μελέτης TEDDY η οποία παρακολουθεί άτομα υψηλού κινδύνου στην Σκανδιναβία, Γερμανία και ΗΠΑ (σύμφωνα με τον προδιαθετικό για τη νόσο απλότυπο ιστοσυμβατότητας) από την ημέρα γέννησής τους μέχρι την εμφάνιση ΣΔ1 ή την ηλικία 12 ετών [148].

7.2 Διαιτητικοί παράγοντες

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η διαταραχή της ομοιοστασίας του ανοσοποιητικού συστήματος του εντέρου, θα μπορούσε να σχετίζεται με επιρρέπεια στην εμφάνιση του ΣΔ1, υποδηλώνοντας ένα πιθανό ρόλο της χλωρίδας του εντέρου. Υπάρχουν πολλές ουσίες που μπορεί να διαταράσσουν τη φυσιολογική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του βλεννογόνου του εντέρου, μερικές από τις οποίες διερευνώνται ως αιτιολογικοί παράγοντες για την εμφάνιση της νόσου.

Τα πειράματα σε επίμυες BB (*BioBreeding rat*) και ποντικούς NOD (*Non-obese diabetic mouse*) δείχνουν καθοριστικό ρόλο του *γάλακτος αγελάδος* στην διεργασία της νόσου. Στον άνθρωπο, ενδείξεις προέρχονται από την αντίστροφη σχέση μεταξύ της διάρκειας θηλασμού και τη συχνότητα του ΣΔ1 στην παιδική ηλικία. Η διάρκεια θηλασμού που είναι μικρότερη από 3-4 μήνες ή η έκθεση σε γάλα αγελάδος πριν την ηλικία των 2-3 μηνών σχετίζεται με σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου [146].

Πειράματα σε ζωικά μοντέλα βρίσκουν συσχέτιση της νόσου με αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων έναντι *γλουτένης* στο αίμα. Στον άνθρωπο βρέθηκε ανοσολογική απόκριση έναντι της γλουτένης σε νεοδιαγνωσθέντες αλλά όχι σε μακράς διάρκειας διαβητικούς [146]. Η συνύπαρξη της κοιλιοκάκης και του ΣΔ1 άλλωστε, είναι γνωστή από ετών, ενώ είναι γνωστό ότι και οι δύο νόσοι σχετίζονται με τα ίδια αλληλόμορφα HLA-DQ. Ειδικότερα, το HLA-DQ2 ανευρίσκεται σχεδόν στο 90 % των ατόμων με κοιλιοκάκη, ενώ το HLA-DQ8 στο 10%, ενώ στο ΣΔ1 υπάρχει ανισοκατανομή, ανάλογα με τη χώρα (πιο υψηλή έκφραση

DQ2 στις μεσογειακές χώρες και λιγότερο στη βόρεια Ευρώπη) [149]. Η απομάκρυνση της γλουτένης από τη διατροφή σε άτομα με κοιλιοκάκη, σχετίζεται με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης ΣΔ1, κάτι που δε συμβαίνει ωστόσο όταν προϋπάρχουν νησιδιακά αυτοαντισώματα [150]. Επίσης, έχει φανεί να υπάρχει ανοσολογική ενεργοποίηση στους βλεννογόνους του λεπτού εντέρου σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΣΔ1 [151], υποστηρίζοντας μια συσχέτιση του ανοσολογικού συστήματος του εντέρου με τη νόσο. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της εισαγωγής των στερεών, της διακοπής του μητρικού θηλασμού, της διαταραχής της χλωρίδας του εντέρου και των ιογενών λοιμώξεων, συμβάλλουν στην ταυτόχρονη έκδηλωση των νόσων. Αντίστοιχα με το γάλα αγελάδος, η ανοσολογική απόκριση έναντι γλουτένης στους διαβητικούς μπορεί να είναι συνέπεια ενός διαταραγμένου ανοσοποιητικού συστήματος του εντέρου, παρά η αιτία της αυτοάνοσης καταστροφής των νησιδίων.

Η έλλειψη βιταμίνης D προτάθηκε αρχικά ότι μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔ1 σε παιδική ηλικία. Η πρόδρομη μορφή της βιταμίνης D προσλαμβάνεται μέσω της τροφής, αλλά ενεργοποιείται μέσω της έκθεσης του ατόμου στον ήλιο. Τα οφέλη της βιταμίνης D φαίνεται να σχετίζονται με τη ρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των δράσεων της στα μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα καθώς και στα λεμφοκύτταρα. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός εμπλέκει τη συμμετοχή της στην έκκριση και το μεταβολισμό της ινσουλίνης και στις διαταραχές της γλυκόζης [152].

Αρκετές μελέτες παρατήρησης έχουν περιγράψει συσχέτιση με το γεωγραφικό πλάτος [153] και τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την εποχιακή κατανομή της νόσου υποδεικνύουν αντίστροφη συσχέτιση με την έκθεση στον ήλιο.

Πρόσφατες μελέτες, ξεκινώντας με την ευρωπαϊκή μελέτη του 1999, υποδεικνύουν μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔ1 μετά τη χορήγηση βιταμίνης D, τον πρώτο χρόνο της ζωής [154]. Ωστόσο, μετέπειτα μελέτες δεν επιβεβαίωσαν στο σύνολό τους τα παραπάνω δεδομένα [155]. Η αξιολόγηση των επιπέδων της βιταμίνης κατά την εμφάνιση της νόσου, τα οποία βρέθηκαν χαμηλά, αμφισβητήθηκε αρχικά λόγω της συνυπάρχουσας κετοξέωσης [156]. Ωστόσο, η μη επάνοδος στο φυσιολογικό μετά την αποκατάσταση των οξεοβασικών διαταραχών υποδεικνύει μόνιμη έλλειψη στους νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς [157].

Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η καταστροφή των κυττάρων β θα μπορούσε να ξεκινάει στη μήτρα, ενισχύοντας την αντίληψη ότι θα πρέπει να χορηγείται βιταμίνη D στις εγκυμονούσες κατά την κύηση, στα πλαίσια της πρόληψης της εμφάνισης ΣΔ1 στους απογόνους [158]. Με βάση, ωστόσο, την μετα-ανάλυση των Jia-Yi Dong et al, η πρόσληψη βιταμίνης D κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ1, χωρίς όμως να υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η μητρική πρόσληψη της βιταμίνης μειώνει τον κίνδυνο στους απογόνους [159].

Επίσης, έχει περιγραφεί συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ στην παιδική ηλικία με την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων IA-2 και την έναρξη της νόσου. Η ηλικία της μητέρας μεγαλύτερη από 35 ετών, η ασυμβατότητα αίματος μητέρας-παιδιού, η αυξημένη πρόσληψη βάρους κατά την εγκυμοσύνη καθώς και η διενέργεια αμνιοκέντησης κατά την κύηση είναι μερικοί προ- και περιγεννητικοί παράγοντες που έχουν μελετηθεί για τη συσχέτισή τους με τη νόσο [146],[160],[161]. Προοπτικές μελέτες που παρακολουθούν άτομα υψηλού κινδύνου για ΣΔ1 υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των ψυχολογικών παραγόντων και ιδιαίτερα του stress στην εμφάνιση της νόσου [146].

7.3 Τρέχουσες θεωρίες σχετικά με τη συσχέτιση γενετικών/ περιβαλλοντικών παραγόντων στην παθογένεση της νόσου

Η «υπόθεση βελτιωμένων συνθηκών υγιεινής» θεωρεί ότι οι βελτιωμένες συνθήκες υγιεινής στον ανεπτυγμένο κόσμο έχουν μειώσει τη συχνότητα των παιδικών λοιμώξεων, οδηγώντας σε αυξημένη αυτοανοσία και ατοπία [162]. Αυτή η θεωρία συμπεριλαμβάνει την άποψη ότι η μεταβολή στην έκθεση σε αντιγόνα στο αναπτυσσόμενο ανοσολογικό σύστημα (ιοί, βακτήρια, έλμινθες που σχετίζονται συχνά με υποκλινικές λοιμώξεις), είναι ο κύριος παράγοντας που σχετίζεται με την αύξηση της συχνότητας του ΣΔ1. Παράλληλα με αυτή την άποψη, οι μελέτες έδειξαν χαμηλότερο επιπολασμό της νόσου σε οικογένειες με χαμηλότερο οικονομικό και κοινωνικό επίπεδο [163].

Εκτός των ανωτέρω τα τελευταία χρόνια, δυο νέες θεωρίες έχουν αναδειχθεί που μπορεί να αλλάξουν την άποψή μας σχετικά με την παθογένεια της νόσου:

Η «υπόθεση του επιταχυντή» (accelerator hypothesis) ισχυρίζεται ότι ο τύπου 1 και τύπου 2 διαβήτης οφείλονται στην ίδια διαταραχή, στην αντίσταση έναντι της ινσουλίνης που επιδρά σε διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο.

Η βασική διαφορά των δύο τύπων της νόσου βασίζεται σε διαφορετικό ρυθμό καταστροφής των κυττάρων β , με τον γρηγορότερο ρυθμό να βασίζεται σε πιο επιρρεπή γονότυπο και να οδηγεί στη νωρίτερη εκδήλωση της νόσου. Το κεντρικό συστατικό στην υπόθεση αυτή είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία σχετίζεται κυρίως με την αύξηση του βάρους και την παχυσαρκία, δικαιολογώντας επομένως την αυξημένη επίπτωση της νόσου στις ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες [164].

Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν εν μέρει μόνο την ανωτέρω θεωρία, δείχνοντας μικτά αποτελέσματα σχετικά με τη δυνατότητα να συσχετιστεί το αυξημένο σωματικό βάρος με την αυξημένη συχνότητα και τη νεαρότερη ηλικία εμφάνισης του ΣΔ1 [165],[166].

Η «υπόθεση της υπερφόρτωσης» (overload hypothesis) μελετά εάν οι μητρικοί και νεογνικοί δείκτες παχυσαρκίας και ανοχής στην ινσουλίνη αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες της εξέλιξης σε διαβήτη. Ειδικότερα, η μητρική παχυσαρκία και η απόκτηση βάρους κατά την εγκυμοσύνη σχετίστηκαν με την ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων σε άτομα με προδιάθετικό γονότυπο για ΣΔ1 [22].

Πρέπει ωστόσο να επισημάνουμε ότι η υιοθέτηση μιας γενικά αποδεκτής θεωρίας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει μια λογική εξήγηση για το πως τα τόσο διαφορετικά γονίδια που προδιαθέτουν για ΣΔ1 (γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την αυτοανοσία) και ΣΔ2 (γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία των κυττάρων β) θα μπορούσαν να σχετίζονται.

8. Σημαντικές μελέτες στα θέματα που άπτονται της παρούσας διατριβής

8.1 Μελέτες Τρυθμ σε διαβητικούς τύπου 1

Αρχικά, μελέτες στις οποίες τα Τρυθμ χαρακτηρίζονται ως $CD4^+CD25^+$ ανέφεραν μειωμένο αριθμό Τρυθμ [106], γεγονός που δεν επιβεβαίωσαν οι μελέτες που ακολούθησαν, κάποιες από τις οποίες χρησιμοποίησαν το διαχωρισμό των κυττάρων σε $CD25^+$ και $CD25^{high}$ [167],[168],[169]. Στις μελέτες όμως αυτές επισημάνθηκε μειωμένη λειτουργικότητα των Τρυθμ.

Οι διαφοροποιήσεις αποδόθηκαν σε έλλειψη ειδικών δεικτών για τον προσδιορισμό των Τρυθμ και στη χρήση ανομοιογενούς πληθυσμού όσον αφορά την ηλικία και τον χρόνο που νοσούσαν οι ασθενείς καθώς και έλλειψη ηλικιακής αντιστοίχισης ασθενών- μαρτύρων. Ειδικότερα, μια μετα ανάλυση επισημαίνοντας τις διαφοροποιήσεις των εως τότε μελετών ανέδειξε την ανάγκη περαιτέρω μελέτης πάνω στο πεδίο [170].

Η χρήση νέων δεικτών, όπως η έκφραση FoxP3 και ταυτόχρονα η χαμηλή έκφραση CD127 [171], η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Helios και η απομεθυλίωση TSDR [172], ο διαχωρισμός σε υποπληθυσμούς Τρυθμ με βάση την έκφραση CD45RA [173] δεν ανέδειξε διαφοροποιήσεις στον αριθμό των Τρυθμ στον ΣΔ1, αν και μια παροδική μείωση φαίνεται να υπάρχει στους νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς. Σύμφωνα με άλλες μελέτες, βρέθηκε αυξημένη τάση για απόπτωση και μειωμένη λειτουργικότητα στα Τρυθμ νεοδιαγνωσθέντων και συγγενών 1^{ου} βαθμού διαβητικών [174]. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα Τδραστ των ασθενών με ΣΔ1 είναι ανθεκτικά στην κατασταλτική δράση των Τ ρυθμ [48],[175] καθώς και το ότι η αυξημένη έκκριση IL-2 από τα κύτταρα αυτά συμβάλει στη μειωμένη έκφραση FOXP3 [176].

Παρόλο που όλα τα ανωτέρω δεδομένα υποδεικνύουν κάποια διαταραχή στη λειτουργία των Τρυθμ στους διαβητικούς τύπου 1, πρέπει να επισημάνουμε το γεγονός ότι στις περισσότερες μελέτες ο προσδιορισμός αφορά τα Τρυθμ στο περιφερικό αίμα, μακριά δηλαδή από το πάγκρεας, το σημείο της αυτοάνοσης φλεγμονής.

Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στη μελέτη των Ferraro και συν, οι οποίοι εργάστηκαν εκτός από το περιφερικό αίμα και σε λεμφαδένες παγκρέατος διαβητικών τύπου 1 (οι οποίοι ελήφθησαν κατά τη μεταμόσχευση) όπου και δείχθηκε αύξηση των Th17 κυττάρων και απώλεια της έκφρασης Foxp3 και της ρυθμιστικής ικανότητας των Τρυθμ στους τοπικούς λεμφαδένες (παρά τη διατήρηση της απομεθυλίωσης TSDR). Το γεγονός αυτό, δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχα στο περιφερικό αίμα των ίδιων ατόμων [177].

Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Μελέτες συσχέτισης Τρυθμ και ΣΔ1. (T1D = διαβητικοί τύπου 1, T2D = διαβητικοί τύπου 2)

Έτος δημ.	Αριθμός ασθενών (ηλικία, έτη)	Προσδιορισμός Τρυθμ	Ευρήματα
2002	31 νεοδιαγνωσθέντες T1D (9,4 ± 22,16) 23 T1D (45,2 ± 9,70) 12 ICA+ συγγενείς (15,8 ± 11,4) 15 T2D ενήλικες (35,4 ± 19,6) 26 μάρτυρες (37,0 ± 5,66) <i>Περιφερικό αίμα</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Μειωμένη συχνότητα Μειωμένη παραγωγή IFNγ [106]
2005	21 T1D (32,3 ± 6,80) 26 μάρτυρες (αντίστοιχης ηλικίας και φύλου) <i>Περιφερικό αίμα</i>	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Φυσιολογική συχνότητα Μειωμένη κατασταλτική ικανότητα Αυξημένη παραγωγή IFNγ και λιγότερη IL-10 σε συγκαλλιέργειες [168]
2005	17 T1D (ηλικία >5 / 25–56, MO 31)	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Φυσιολογική συχνότητα Φυσιολογική κατασταλτική ικανότητα Φυσιολογικά επίπεδα κυτταροκινών [169]

2005	61 T1D (18,94 ± 7,26) 37 μάρτυρες (24,78 ± 11,46)	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Φυσιολογική συχνότητα- συσχέτιση με την ηλικία Μειωμένη κατασταλτική ικανότητα [167]
2007	12 T1D (16,4 ± 2,4) 17 νεοδιαγνωσθέντες T1D (10,8 ± 1,4) 28 μάρτυρες (26,9 ± 12,6) 17 συγγενείς 1ου βαθμού	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Μειωμένη λειτουργικότητα /αυξημένη τάση για απόπτωση των Τρυθμ σε νεοδιαγνωσθέντες και συγγενείς διαβητικών 1ου βαθμού. [174]
2007	14 νεοδιαγνωσθέντες T1D (14,1 ± 4,1) 17 T1D (18,1 ± 10,2) 46 συγγενείς 1ου βαθμού (27,7 ± 17,5) 33 μάρτυρες (23,4 ± 10,1) <i>Περιφερικό αίμα</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CD127 ^{low/-}	Φυσιολογική συχνότητα Εξαρτώμενη από την ηλικία μείωση των CD45RA ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ κυττάρων και αύξηση των CD45RO ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ [171]
2008	13 T1D 3 T2D 18 μάρτυρες <i>Περιφερικό αίμα</i>	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Φυσιολογική κατασταλτική ικανότητα Τρυθμ Αυξημένη αντοχή Τδραστ έναντι Τρυθμ [175]
2010	64 T1D νεοδιαγνωσθέντες < 6 μήνες (9,6 ± 0,6) 53 μάρτυρες	CD45RA ⁺ CD25 ⁺ (naive Treg) CD45RA ⁻ CD25 ^{int} FOXP3 ^{lo} Κύτταρα που εκκρίνουν IL-17 (Th17)	Φυσιολογική συχνότητα naive Treg Αυξημένη συχνότητα Th17 [173]
2011	10 T1D (29 ± 5,2) 16 μάρτυρες (11,6 ± 4) 20 ασθενείς με κοιλιοκάκη (7,9 ± 5,2)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	Μειωμένη συχνότητα [107]

2011	<p>19 T1D δωρητές (ηλικίας 24–56, MO 41) 63 φυσιολογικοί δωρητές (ηλικίας 24–56, MO 41) <i>Κύτταρα παγκρεατικών λεμφαδένων</i></p> <p>18 T1D (ηλικίας 30–56, MO 40) 11 μάρτυρες (ηλικίας 27-39, MO 34) <i>Περιφερικό αίμα</i></p>	<p>Treg: CD4⁺CD25^{high} CD127⁻ TSDR^{απομεθυλίωση}</p> <p>Th1: CD4⁺CD45RO⁺ CCR5⁺CCR6⁺</p> <p>Th17: CD4⁺CD45RO⁺ CCR4⁺CCR6⁺CD161⁺</p>	<p>Μειωμένη συχνότητα Foxp3⁺CD127⁻ Τρυθμ στους παγκρεατικούς λεμφαδένες διαβητικών χωρίς αντίστοιχη μείωση στο περιφερικό αίμα Μείωση της συχνότητας των κυττάρων T που εκφράζουν FoxP3 στους παγκρεατικούς λεμφαδένες διαβητικών παρόλο που με βάση την απομεθυλίωση TSDR δεν υπάρχει διαφοροποίηση. Th1 αυξημένα με βάση το φαινότυπο και όχι τις κυτοκίνες Αυξημένα Th17 με αυξημένη έκκριση IL-17 Μειωμένο ποσοστό Treg/Th17 [177]</p>
2011	<p><i>Ποσοτικοποίηση των Foxp3⁺IFN-γ⁺:</i> 9 T1D διαγνωσθέντες σε διάστημα < 12 (27,1 ± 9,6) 2 T1D (25,7 ± 3,6) 11 μάρτυρες (29,2 ± 4,7)</p> <p><i>Προσδιορισμός μεθυλίωσης FOXP3 TSDR</i> 12 νεοδιαγνωσθέντες T1D (16,4 ± 10,1) 28 T1D (22,3 ± 11,1) 11 μάρτυρες (24,1 ± 12,9)</p>	<p>iTreg: CD4⁺CD25⁺ CD127^{lo/-}Foxp3⁺ IFN-g⁺, Helios⁺, TSDR^{μεθυλίωση}</p> <p>nTreg: CD4⁺ CD25⁺ CD127^{lo/-} Foxp3⁺Helios⁺, TSDR^{απομεθυλίωση}</p>	<p>Αυξημένη συχνότητα iTreg Φυσιολογική συχνότητα και λειτουργία των Τρυθμ τύπου Th1 που διαφοροποιούνται από τα nTreg [172]</p>

Είναι σημαντικό τέλος, να αναφερθούν οι δύο διαφορετικές μελέτες που διεξήχθησαν σε διαβητικούς και περιελάμβαναν τη χορήγηση αντισωμάτων έναντι του CD3, ως θεραπείες παρέμβασης στην T μεσολαβούμενη αυτοάνοση διαταραχή στα πλαίσια του ΣΔ1.

Στην Αμερική, η χορήγηση του αντισώματος (hOKT3 (Ala–Ala), Teplizumab) σε νεοδιαγνωσθέντα παιδιά και νέους ενήλικες για διάστημα 2 εβδομάδων στην αρχή της νόσου, φαίνεται σύμφωνα με τους Herold και συν. να είχε θετικό αποτέλεσμα στην καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου για αρκετούς μήνες [178],[179].

Στην Ευρώπη η αντίστοιχη μελέτη με τη χρήση ωστόσο διαφορετικού αντισώματος (ChAglyCD3, oteplizumab), αφορούσε ένα σύνολο 80 νεοδιαγνωσθέντων ασθενών (ενήλικες μόνο), οι μισοί εκ των οποίων έλαβαν για 6 μέρες το αντίσωμα (και οι άλλοι μισοί έλαβαν placebo). Το αντίσωμα σχετίστηκε με τη διατήρηση της λειτουργίας των κυττάρων β, και τη διατήρηση υψηλότερων επιπέδων ενδογενούς ινσουλίνης (και επομένως μικρότερες ανάγκες εξωγενούς χορήγησης) έως και 18 μήνες μετά την εμφάνιση της νόσου [180]. Η

μελέτη αυτή επεκτάθηκε με παρακολούθηση μετά από τέσσερα χρόνια και ανέδειξε σημαντική διατήρηση στις μειωμένες ανάγκες ινσουλίνης, η οποία εμφάνισε συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών και το επίπεδο λειτουργικότητας των κυττάρων β του παγκρέατος κατά την εμφάνιση της νόσου [181]. Αξιοσημείωτο το γεγονός ότι παρά τις προσπάθειες για το αντίθετο, η μόνη σημαντική εργαστηριακή παρατήρηση που συνόδευε τα αποτελέσματα αυτά ήταν η δραστική μείωση των κυττάρων T, ανεξάρτητα από την υποκατηγορία της [182],[183]

8.2 Μελέτες σε συγγενείς ατόμων με ΣΔ1

Οι συγγενείς ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη αποτελούν μια ομάδα ανθρώπων με αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν τη νόσο. Όπως έχει αναφερθεί ήδη, αυτός ο κίνδυνος σχετίζεται ισχυρά με την έκφραση αυτοαντισωμάτων, τα οποία σχετίζονται με την έναρξη της αυτοάνοσης διεργασίας, χωρίς ωστόσο να την προκαλούν. Ο αριθμός αυτοαντισωμάτων στον ορό των ατόμων, είναι ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για την εμφάνιση της νόσου [94]. Πρέπει ωστόσο να επισημάνουμε πως υπάρχουν άτομα θετικά ως προς τα αυταντισώματα που δεν εκδηλώνουν τη νόσο, ενώ επίσης υπάρχουν νεοδιαγνωσθέντες διαβητικοί που δε φέρουν θετικά αυτοαντισώματα στον ορό τους. Ιδιαίτερα όμως όσον αφορά τους συγγενείς διαβητικών η προγνωστική αξία των αυτοαντισωμάτων είναι πολύ μεγαλύτερη, καθώς το 35% των οροθετικών συγγενών θα εκδηλώσουν τη νόσο εντός της πενταετίας ενώ το 60-70% εντός της δεκαετίας [184].

Δεδομένου ότι η νόσος έχει ισχυρό γενετικό υπόβαθρο, η μελέτη των ύποπτων γονιδίων στα άτομα υψηλού κινδύνου, όπως οι συγγενείς πρώτου βαθμού αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης σε πλήθος ερευνών. Ιδιαίτερα η περιοχή HLA αποτέλεσε αντικείμενο ενδελεχούς μελέτης με στόχο την ανάδειξη ενός τρόπου πρόβλεψης της νόσου. Πολλές έρευνες εστίασαν στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ανάλογα με την παρουσία ανοσολογικών και γενετικών παραγόντων.

Ειδικότερα, στον πίνακα 9 φαίνονται αναλυτικά ένα μεγάλο μέρος προοπτικών και αναδρομικών μελετών που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια ανά τον κόσμο και περιλαμβάνουν συγγενείς διαβητικών.

Πίνακας 9. Μελέτες που αφορούν συγγενείς ατόμων με ΣΔ1

Έτος Δημοσίευσης	Συμμετέχοντες	Συσχέτιση μεταξύ :	Αυτοαντισώματα	Περιοχή μελέτης
1981	582 γονείς και αδέρφια	της κλινικής εξέλιξης με τον απλότυπο HLA και τα αυτοαντισώματα	ICA	Λονδίνο [63]
1984	107 διαβητικοί 247 συγγενείς	της κλινικής εξέλιξης με τον απλότυπο HLA και τα αυτοαντισώματα	ICA	Παρίσι [185]
1988	719 συγγενείς πρώτου βαθμού	της κλινικής εξέλιξης με τον απλότυπο HLA και τα αυτοαντισώματα	ICA	Λονδίνο [96]
1991	374 γονείς 308 αδέρφια	της κλινικής εξέλιξης με τον απλότυπο HLA και τα αυτοαντισώματα	ICA	Λυόν [186]

1992	536 αδέρφια	της κλινικής εξέλιξης με τον απλότυπο HLA και τα αυτοαντισώματα	ICA	Παρίσι [187]
1994	770 αδέρφια	της κλινικής εξέλιξης με το HLA DQB1 και με τα αυτοαντισώματα	ICA, IAA	Φιλανδία [184]
1995	81 μη διαβητικά αδέρφια (ICA θετικά)	της ενδοφλέβιας δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης με τα HLA DQB1*0302/0201, DQB1*0602, DQB1*0603 και με τα αυτοαντισώματα	ICA, GAD65, IAA	Φιλανδία [188]
1996	121 άτομα με οικογενειακό περιστατικό ΣΔ1 574 μάρτυρες	των HLA DQB1*0302/0201, DQB1*0302/x (μετρίου κινδύνου), ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι οικογενειακού περιστατικού		Φιλανδία [189]
1997	482 μάρτυρες 481 συγγενείς	της κλινικής εξέλιξης με τα αυτοαντισώματα	IAA, IA-2, GADA	Βέλγιο [190]
2001	186 μη διαβητικά αδέρφια 22 παιδιά	των HLA-DQB1, -DQA1 και DRB1*04, -DQB1*0302 με τα αυτοαντισώματα	GAD65, IA-2, IAA	Τσεχία [191],[192]
2002	1724 αδέρφια	της κλινικής εξέλιξης με τα αυτοαντισώματα	ICA, IA-2, IAA	Βέλγιο [193]
2002	631 νεοδιαγνωσθέντες διαβητικοί, 710 αδέρφια διαβητικών	της κλινικής εξέλιξης με τα HLA DQB1*02/*0302, DQB1*0302 με τα αυτοαντισώματα	ICA, IAA, GADA, IA-2A	Φιλανδία [194]
2002	74 αδέρφια διαβητικών 426 μάρτυρες	των HLA DQA1*0501-DQB1*0201, DQA1*0301-DQB1*0302 με τα αυτοαντισώματα	IAA, GAD65, IA-2, ICA	ΗΠΑ (Πενσυλβανία) [195]
2003	1584 αδέρφια	του HLA DQB1 με τα αυτοαντισώματα	GADA, IA-2A, ICA, IAA	Φιλανδία [196]
2005	1727 αδέρφια 2379 παιδιά 483 γονείς	της κλινικής εξέλιξης με τον απλότυπο HLA και με τα αυτοαντισώματα	ICA, IAA, GADA, IA-2A	Βέλγιο [197]
2005	85 συγγενείς (με γονότυπο DR3-DQ8 DR4-DQ2)	της κλινικής εξέλιξης με το γονότυπο και με πολυμορφισμού του γονιδίου της ινσουλίνης και της περιοχής PTPN22		Κολοράντο, Denver [198]

2006	141 συγγενείς	της κλινικής εξέλιξης και των αυτοαντισωμάτων	ICA, IA-2A, GADA	Γερμανία, Μόναχο [199]
2006	1058 συγγενείς 1422 μάρτυρες	της κλινικής εξέλιξης με το γονότυπο DR3/4-DQ8		Κολοράντο, Denver [118]
2007	258 συγγενείς (με θετικά αυτοαντισώματα αλλά IA-2A αρνητικά)	της κλινικής εξέλιξης με το γονότυπο HLA DQ και τα αυτοαντισώματα	GADA, IA-2A, ICA, IAA	Βέλγιο [200]
2007	495 διαβητικοί 419 αδέρφια 376 μάρτυρες	των HLA DQA1*03-DQB1*0303, DQA1*05-DQB1*0201 DQA1*03-DQB1*0401 και DQA1*0102-DQB1*0602 με τα αυτοαντισώματα	GADA, IA-2A, IAA	Κίνα [201]
2013	288 συγγενείς (με θετικά αυτοαντισώματα)	της κλινικής εξέλιξης με το HLA-A*24, HLA-B*18, HLA-B*39 και τα αυτοαντισώματα	GADA, IA-2A, ZnT8A	Βέλγιο [121]

Πρέπει να επισημάνουμε ότι στις περισσότερες μελέτες γίνεται ταυτοποίηση του ανοσολογικού και γενετικού προφίλ των ατόμων και στη συνέχεια παρακολούθηση της κλινικής εξέλιξης και συσχέτιση των ανωτέρω με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

9. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των Τρυθμιστικών λεμφοκυττάρων σε συγγενείς ασθενών με ΣΔ1 σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές. Στόχος είναι η προσέγγιση των ανοσολογικών διαταραχών που συμβαίνουν κατά την εκδήλωση του ΣΔ1, δεδομένου ότι οι συγγενείς πρώτου βαθμού αποτελούν μια ομάδα υψηλού κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά θεωρούμε σημαντικό τον ακριβή καθορισμό του υποπληθυσμού των Τρυθμ. Όπως προκύπτει από την προαναφερθείσα βιβλιογραφία, η έλλειψη δεικτών που να επιτρέπουν τον καθορισμό με σαφήνεια του υποπληθυσμού των Τρυθμ, οδήγησε αρχικά σε αντιφατικές μελέτες ως προς τη διαφοροποίηση του υποπληθυσμού κατά τη σύγκριση μεταξύ διαβητικών και υγιών μαρτύρων. Ωστόσο βασιζόμενοι στη χρήση των δεικτών CD127 και FoxP3, στόχος μας είναι η ανάδειξη μιας μεθόδου για τον προσδιορισμό των Τρυθμ που θα παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού ενός καθαρού και ομοιογενούς πληθυσμού με αντικειμενικό και οικονομικό (ως προς τη χρήση αντισωμάτων) τρόπο.

Στη συνέχεια, σκοπός μας είναι η αναζήτηση ποσοτικών διαφορών κατά τη μελέτη του ποσοστού εμφάνισης των Τρυθμ (ως ποσοστό των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων) σε πρώτου βαθμού συγγενείς ατόμων με ΣΔ1 σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Επιπλέον, με τη χρήση του δείκτη CD45RO δίνεται η δυνατότητα

καθορισμού των υποπληθυσμών των Τρυθμ με βάση την τεχνική Miyara και συν. 2009, με στόχο την ανίχνευση ποσοτικών διαφορών μεταξύ των συγγενών και των μαρτύρων.

Πέρα όμως από τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των Τρυθμ θα μελετήσουμε και ποιοτικές συνιστώσες του φαινοτύπου τους. Θα συμπεριλάβουμε στις αναλύσεις μας δείκτες που έχουν συνδεθεί με τη ρυθμιστική τους λειτουργία (CD122-CD132, TGF- β / TGF- β RII), την αλληλεπίδρασή τους με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και το βαθμό ενεργοποίησής τους (HLA-DQ, HLA-DR, CerClip, CD74, CD44, CD28-FITC, CD152-PE, CD27-FITC) καθώς και την έκφραση δεικτών που σχετίζονται με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (CD178, CD95). Η μελέτη των δεικτών αυτών θα αφορά τη διαφοροποίηση των Τρυθμ σε σχέση με τα Τδραστ και Τπαρθ σε φυσιολογικούς μάρτυρες καθώς και την αναζήτηση διαφορών μεταξύ συγγενών διαβητικών και υγιών μαρτύρων.

Επίσης, με τον προσδιορισμό των διαφορετικών απλοτύπων HLA μεταξύ συγγενών και μαρτύρων θα προσπαθήσουμε να επιβεβαιώσουμε την επικράτηση προδιαθεσικών γονιδίων μεταξύ των ατόμων υψηλού κινδύνου όπως οι συγγενείς και να αναζητήσουμε τυχόν συσχέτισή τους με τα ποσοστά των Τρυθμ.

Τέλος, θα επεκτείνουμε τη νεοεισαχθείσα από τη βιβλιογραφία μέθοδο διαχωρισμού των Τρυθμ σε υποπληθυσμούς (aTregs, rTregs, nonTregs), αναζητώντας φαινοτυπικές μεταβολές των υποπληθυσμών αυτών κατά τη μελέτη μορίων επιφανείας όπως τα CD2, CD58, CD122, HLA-DR, HLA-DQ, CD81 και CD221.

Σκοπός είναι να αναδειχθεί αν καθ'οιονδήποτε τρόπο, κάποια από τα χαρακτηριστικά των Τρυθμ σε συγγενείς ατόμων με ΣΔ1, μπορούν να προδιαθέσουν για εκδήλωση της νόσου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ασθενείς και Μάρτυρες

Στη μελέτη συμμετείχαν 38 πρώτου βαθμού συγγενείς ατόμων με ΣΔ1 και 45 εθελοντές υγιείς μάρτυρες που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν ελληνικής καταγωγής και κάτοικοι της ευρύτερης περιοχής της Ηπείρου (νομοί Ιωαννίνων, Άρτας, Πρέβεζας, Θεσπρωτίας). Η μελέτη έχει εγκριθεί από την επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και καθ' όλη τη διάρκειά της τηρήθηκαν οι όροι της συνθήκης του Helsinki.

Στους πρώτου βαθμού συγγενείς περιλαμβάνονταν 17 αδέρφια, 5 παιδιά, 9 μητέρες και 7 πατέρες, των οποίων οι πρώτου βαθμού συγγενείς διαβητικοί ήταν είτε νεοδιαγνωσθέντες διαβητικοί που νοσηλεύονταν στην παιδιατρική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, είτε μακράς διάρκειας διαβητικοί που παρακολουθούνταν στα εξωτερικά ιατρεία της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Τα αδέρφια (10 άρρενες και 7 θήλεις) ήταν μέσης ηλικίας 22.7 ± 10.4 έτη, τα παιδιά (1 άρρεν και 4 θήλεις) ήταν 28.2 ± 2 έτη, οι μητέρες 36.4 ± 7.8 και οι πατέρες 46 ± 7.8 έτη. Κατά την περίοδο της συμμετοχής τους στην έρευνα δεν έπασχαν από κάποια λοίμωξη και δεν ελάμβαναν χρόνια φαρμακευτική αγωγή με εξαίρεση ένα άτομο που ελάμβανε χρονίως στατίνη.

Οι φυσιολογικοί μάρτυρες (25 άρρενες και 20 θήλεις) που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν υγιείς εθελοντές με μέση ηλικία τα 31.6 ± 14 έτη. Τα άτομα αυτά δεν ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή, δεν έπασχαν τα ίδια από οποιοδήποτε αυτοάνοσο νόσημα, ούτε είχαν κανένα πρώτου ή δεύτερου βαθμού συγγενή με αυτοάνοσο νόσημα. Επίσης, άτομα με υποψία λοίμωξης ή όποιας μορφής φλεγμονή αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Η λήψη φλεβικού αίματος γινόταν το πρωί (από τις 9.00 έως τις 10.00 π.μ.) από νηστικούς ασθενείς και μάρτυρες μετά από φυσιολογικό ύπνο. Τα δείγματα αποθηκεύονταν σε σωληνάρια γενικής αίματος στα οποία υπάρχει επίστρωση αντιπηκτικού K3 EDTA. Η επεξεργασία κυττάρων για κυτταρομετρία ροής ξεκινούσε το αργότερο μέσα σε 10 λεπτά από τη λήψη του αίματος. Επίσης, επαρκής ποσότητα αίματος τοποθετούνταν σε άλλα σωληνάρια γενικής αίματος τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Ο υπερκείμενος ορός αποθηκεύτηκε σε σωληνάρια Eppendorf των 2ml στους -20°C , ούτως ώστε να υπάρχει η δυνατότητα περαιτέρω προσδιορισμού αυτοαντισωμάτων εφόσον κριθεί απαραίτητο. Επιπλέον, η στιβάδα μονοκυττάρων που σχηματίστηκε ως ένα λεπτό υμένιο μεταξύ του ορού και των ερυθρών και των πολυμορφωπύρηνων που καταβυθίστηκαν, απομονώθηκε και αποθηκεύτηκε σε σωληνάρια Eppendorf των 2ml στους -20°C , έως ότου να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του HLA των συμμετεχόντων.

2. Κυτταρομετρία Ροής [202]

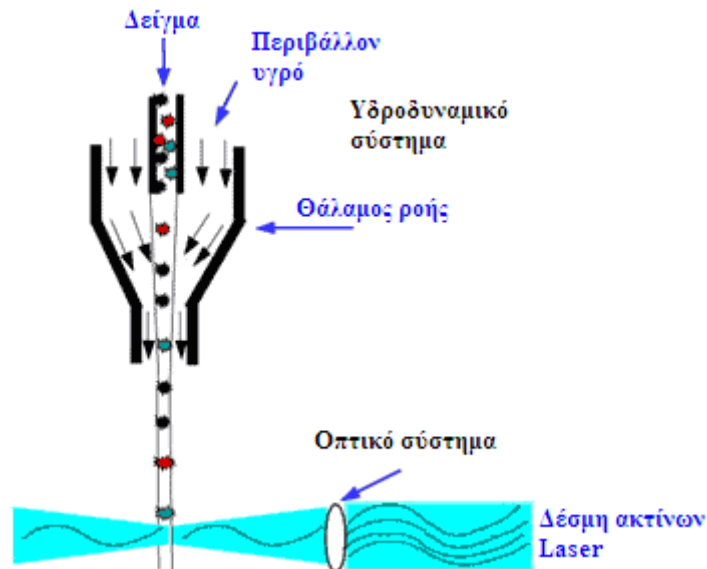
2.1 Μέθοδος

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κυττάρων και σωματιδίων, με βάση τη σκέδαση και το φθορισμό και με την προϋπόθεση το υπό έλεγχο δείγμα να βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος.

Ο πρώτος αυτοματοποιημένος αναλυτής των έμμορφων στοιχείων του αίματος (κυτταρομετρητής ροής) κατασκευάστηκε το 1956 από τον *Wallace H. Coulter* αλλά το 1960 ο *Louis Kamensky* κατασκεύασε το πρώτο μηχάνημα με ικανότητα διαχωρισμού κυτταρικών πληθυσμών και στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων που θεωρήθηκε ο πρώτος ολοκληρωμένος κυτταρομετρητής. Απαραίτητη προϋπόθεση για να αναλυθεί οποιοδήποτε δείγμα είναι τα προς ανάλυση κύτταρα να έχουν προ-επωασθεί με ειδικά

αντισώματα, το κάθε ένα από τα οποία είναι συζευγμένο με διαφορετική φθορίζουσα ουσία (φθοριοχρώματα).

Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία βασικά συστήματα, το υδροδυναμικό σύστημα ροής, το οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων (Εικόνα 19).

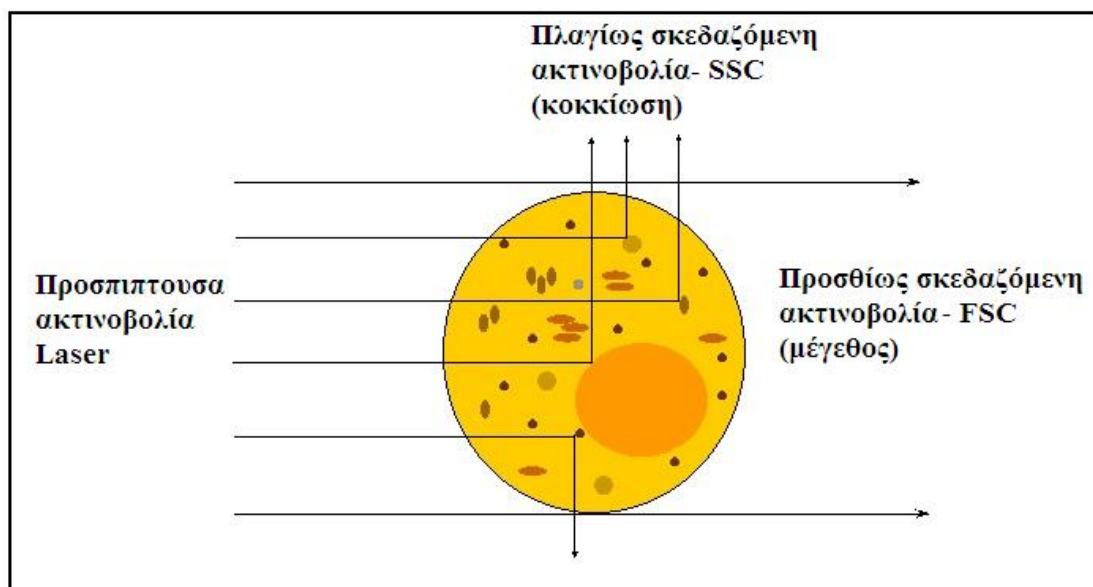


Εικόνα 19. Βασικά συστήματα κυτταρομετρητή ροής (υδροδυναμικό, οπτικό σύστημα)(*Current Protocols In Cytometry, Unit 1.2 , p1.2.2 , [202]*)

Το υδροδυναμικό σύστημα ροής είναι ένα υδραυλικό σύστημα που εξαναγκάζει τα κύτταρα ή τα σωματίδια να ρέουν το ένα μετά από το άλλο, μπροστά από την ακτίνα laser. Το δείγμα εισάγεται στο κέντρο ενός καναλιού από το οποίο ρέει διαφανές υγρό (sheath fluid, αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα). Το κανάλι είναι έτσι σχεδιασμένο ώστε να μην αναμειγνύεται το δείγμα με το υγρό και να μοιάζει έτσι με θήκη (sheath). Το κανάλι τοποθετείται μέσα στο *θάλαμο ροής* (flow chamber) και με την εφαρμογή της θεωρίας της υδροδυναμικής εστίασης επιτυγχάνεται η ροή των κυττάρων εφ' ενός ζυγού (single file). Κάθε κύτταρο ή σωματίδιο έρχεται σε επαφή με τη δέσμη ακτίνων laser με προσέγγιση $\pm 1 \mu\text{m}$, με αποτέλεσμα τη σκέδαση της δέσμης αυτής.

Το οπτικό σύστημα ροής συλλέγει το φως που προέρχεται από τα κύτταρα, αφού πέσει επάνω τους η δέσμη φωτός των ακτίνων laser. Στη συνέχεια γίνεται ανάλυση της συλλεγόμενης ακτινοβολίας η οποία αντιστοιχεί στη *σκέδαση* του φωτός και στον εκπεμπόμενο *φθορισμό* καθορισμένης έντασης με βάση το φθοριόχρωμα.

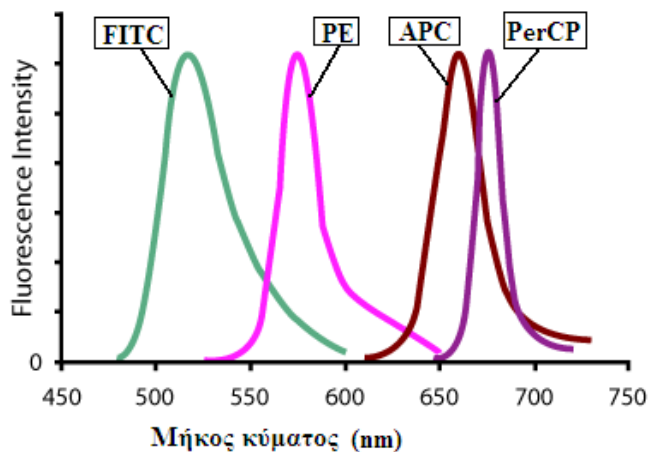
Όταν το κύτταρο δέχεται τη δέσμη ακτίνων laser κάθετα προς τη κατεύθυνση ροής, ένα μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας απορροφάται και το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ένταση της ακτινοβολίας που σκεδάζεται στην κατεύθυνση της προέκτασης της προσπίπτουσας (1° - 20°) είναι ανάλογη προς το μέγεθος του κυττάρου ή του σωματιδίου και ονομάζεται προσθίως σκεδαζόμενη ακτινοβολία (**Forward Scatter Light - FSC**), ενώ η ένταση της ακτινοβολίας που σκεδάζεται με κατεύθυνση κάθετη προς την προσπίπτουσα είναι ανάλογη προς την κοκκίωση του κυτταροπλάσματος του κυττάρου ή του σωματιδίου και ονομάζεται καθέτως ή πλαγίως σκεδαζόμενη ακτινοβολία (**Right Angle Scatter ή Side Scatter, SSC**) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Σχηματική ανάλυση του κυττάρου ως προς το μέγεθος FSC) και την κοκκίωση (SSC), (τροποποιημένη από [202]).

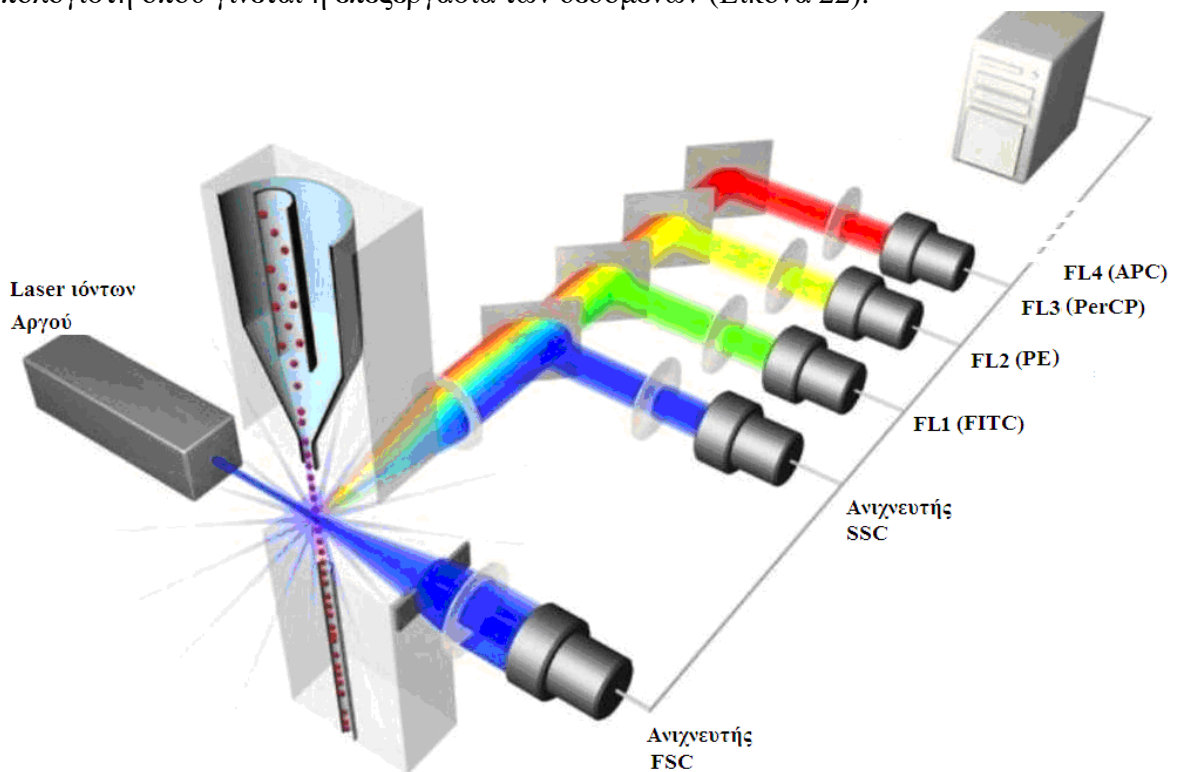
Όταν κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του δείγματος γίνει σήμανση των κυττάρων ή των σωματιδίων με φθορίζουσες ουσίες, τα φθοριοχρώματα (φθορίζουσες ουσίες ή χρωστικές) διεγείρονται από την προσπίπτουσα ακτινοβολία και στη συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία μήκους κύματος μεγαλύτερου από αυτό της προσπίπτουσας και χαρακτηριστικού για το κάθε φθοριοχρώμα. Στις συχνότερα χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες ουσίες περιλαμβάνονται η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), η φυκοερυθρίνη (PE), η περιδινούχος χλωροφύλλη-α-πρωτεΐνη (PerCP) και η αλλοφυκοκυανίνη (APC) (Εικόνα 21). Για τους περισσότερους κυτταρομετρητές η ακτινοβολία Laser που χρησιμοποιείται είναι αυτή που προκύπτει από laser αργού μήκους κύματος 488 nm και χρώματος μπλε, η οποία διεγείρει τα φθοριοχρώματα και έχει ως συνέπεια την μέγιστη εκπομπή φθορισμού για το FITC στα 520 nm (πράσινο), για το PE στα 575 nm (κίτρινο), για το PerCP στα 675 nm (κόκκινο). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα τελευταία χρόνια στους σύγχρονους κυτταρομετρητές ροής εφαρμόζεται και δεύτερη πηγή ακτίνας Laser στα 635 nm και χρώματος κόκκινου, ενώ προβλέπεται και η χρήση έως και τρίτης. Το APC διεγείρεται σε αυτό το μήκος κύματος και εκπέμπει στα 661 nm (κόκκινο). Η χρήση περισσότερων της μίας πηγής ακτίνων laser δίνει τη δυνατότητα για χρήση πολλών διαφορετικών φθορίζουσών ουσιών, οι οποίες θα μπορούν να διεγείρονται και να εκπέμπουν σήματα σε διαφορετικές συχνότητες. Θα πρέπει όμως να αναπτυχθεί και αντίστοιχης ποιότητας πρόγραμμα αλληλοαποκλεισμού αδόκιμου φθορισμού.

Οι διαφορετικοί φθορισμοί, συλλέγονται, αναλύονται και μετρούνται με κατάλληλα συστήματα διχροϊκών κατόπτρων και φίλτρων. Οι χρωστικές που αναφέραμε μπορούν να συνδεθούν η κάθε μία με διαφορετικό κατάλληλο μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει αντιγόνα στην κυτταρική μεμβράνη ή ενδοκυττάρια. Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα της ανίχνευσης των αντιγόνων έτσι ώστε καθίσταται δυνατός ο χαρακτηρισμός και η ταξινόμηση του κάθε είδους κυττάρου σε διακριτούς υποπληθυσμούς.



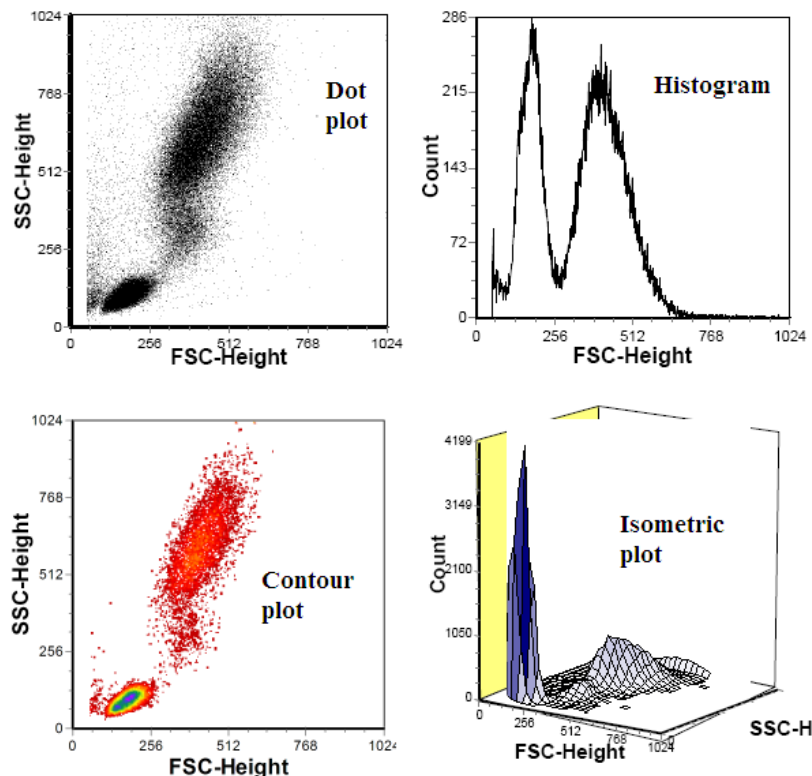
Εικόνα 21. Τα φάσματα εκπομπής των φθοριοχρωμάτων FITC, PE, APC και PerCP (τροποποιημένη από [202]).

Ένα πολύπλοκο σύστημα φακών, φωτοανιχνευτών, φωτοδιόδων και φωτοπολλαπλασιαστών συλλέγουν τα δεδομένα που προέρχονται από τη σκέδαση και το φθορισμό και τα διοχετεύουν στο ηλεκτρονικό σύστημα του κυτταρομετρητή ροής. Με χρήση κατάλληλων ενισχυτών τα ασθενή σήματα ενισχύονται και τα ισχυρά περιορίζονται, έτσι ώστε όλες οι τιμές να λαμβάνονται στην ίδια κλίμακα πριν μεταβιβαστούν σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου γίνεται η επεξεργασία των δεδομένων (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση της φωτεινής πηγής Laser και του συστήματος φωτοανιχνευτών, φωτοδιόδων και φωτοπολλαπλασιαστών που διοχετεύουν τα δεδομένα στο ηλεκτρονικό σύστημα του κυτταρομετρητή ροής (αντιγραφή από Life Technologies Corporation).

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων, όπως τα κυτταρογράμματα (dot plot) τα οποία σχετίζουν δύο παραμέτρους, το ιστόγραμμα όπου φαίνεται η ένταση φθορισμού ως συνάρτηση του αριθμού των συμβάντων, το έγχρωμο διάγραμμα απεικόνισης ισοψών καμπυλών (contour plot) και το διάγραμμα ισομετρικών καμπυλών (isometric plot) (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Διαγράμματα απεικόνισης δεδομένων (στο συγκεκριμένο παράδειγμα FSC- SSC)

Τα διαγράμματα αυτά προσφέρουν στον ερευνητή τη δυνατότητα εντοπισμού και ανάλυσης ακόμη και του μικρότερου παθολογικού ή μη πληθυσμού. Στη συνέχεια ο ερευνητής χρησιμοποιώντας τα προγράμματα στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και τη δυνατότητα οριοθέτησης ορισμένων περιοχών (gates-παράθυρα, πύλες) στα κυτταρογράμματα έχει την ευκαιρία να αναλύσει και να εξάγει σημαντικές παρατηρήσεις από την οριοθετημένη περιοχή.

2.2 Ορολογία

Μονοκλωνικά αντισώματα- Clusters of differentiation (CD): Ονομασία που προτάθηκε το 1982 στο πρώτο διεθνές συνέδριο αναφορικά με τα «αντιγόνα που διαφοροποιούν τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα» και αφορά ένα σύστημα ταξινόμησης για μονοκλωνικά αντισώματα που παράγονται σε εργαστήρια έναντι επιφανειακών μορίων στα λευκοκύτταρα αρχικά, αλλά πλέον και για άλλα κύτταρα. Χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία, στην κυτταρομετρία ροής, και σε ορισμένες περιπτώσεις στην ογκοδιαγνωστική. Πολύ πιο σπάνια, κάποιο μονοκλωνικό, συζευγμένο ή ασύζευκτο, μπορεί να έχει θεραπευτικές ιδιότητες για συγκεκριμένα νοσήματα (π.χ. natalizumab στη σκλήρυνση κατά πλάκας, infliximab στην PA κλπ.)

Μέση ένταση φθορισμού –mean fluorescence intensity (MFI): Η ένταση φθορισμού ανά κύτταρο της χρησιμοποιούμενης χρωστικής αποδίδει την πυκνότητα του αντιγόνου πάνω στο κύτταρο/ σωματίδιο που μελετάται.

Ισοτυπικός μάρτυρας: Ο ισοτυπικός μάρτυρας είναι ένα αντίσωμα με τον ίδιο ισότυπο (υποτάξη) με το μονοκλωνικό αντίσωμα που δεν έχει καμία εξειδίκευση έναντι του αντιγόνου-στόχου. Οι ισοτυπικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται ως αρνητικό όριο για να βοηθήσουν στην διαφοροποίηση της έκφρασης του αντισώματος από τον μη ειδικό θόρυβο. Ο μη ειδικός θόρυβος οφείλεται κυρίως στην μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων σε υποδοχείς Fc των κυττάρων στόχων, στην μη ειδική αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με τις κυτταρικές πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες και με τον κυτταρικό αυτοφθορισμό. Σαν συνέπεια, ο ισοτυπικός μάρτυρας πρέπει να αντιστοιχεί με τον μονοκλωνικό αντίσωμα ως προς τον υπότυπο και τον κλώνο, έτσι ώστε να καθοριστεί με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια ο ειδικό φθορισμός του αντισώματος.

2.3 Υλικά

- Κυτταρομετρητής ροής Becton Dickinson FACS Calibur
- Φυγόκεντρος (Hettich ROTINA 38/38R , και Heraeus Labofuge GL)
- Συσκευή ανάδευσης Vortex (Snijders Press-to-Mix)
- Σιφόνια των 10 και 200 μ L
- Υγρό Sheath για τον κυτταρομετρητή (BD Cat. No.342003)
- Σωλήνες συλλογής αίματος με K3 EDTA VACUTAINER 13x75 mm (BD Cat. No. 6457)
- Σωλήνες συλλογής αίματος με ηπαρίνη 16 x 100 mm (BD Cat. No. 368480)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυστυρολίου μιας χρήσης 12x75 mm με πώμα (BD Cat. No. 2058)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες κωνικοί των 15 mL (BD Cat. No. 2099)
- PBS phosphate buffered saline : 0.23 g NaH_2PO_4 (άνυδρο, 1.9 mm), 1.15 g NaH_2PO_4 (άνυδρο, 8.1 mm), 9.00 g NaCl (154mM).
Ακολουθεί προσθήκη νερού σε όγκο 900 ml και στη συνέχεια ρύθμιση του pH στις επιθυμητές τιμές 7.2 έως 7.4, εφόσον χρειάζεται, με προσθήκη 1M NaOH ή 1M HCl. Τέλος ακολουθεί προσθήκη νερού μέχρι τελικού όγκου 1 L. (Η BD προτείνει τροποποιημένο διάλυμα DPBS (Dulbecco's PBS χωρίς ασβέστιο, μαγνήσιο και pH 7.2 ± 0.2). Συνίσταται φιλτράρισμα μέσω ενός φίλτρου 0.2 μ m πριν τη χρήση, και αποθήκευση στους 2° με 8°C).
- FBS (ορός εμβρύου μόσχου (fetal bovine serum, FBS).
- FACS Lysing Solution (10X) (BD Cat. No. 349202)
- FACS Permeabilizing Solution 2(10X) (BD Cat. No. 340973)
- Ficoll (SIGMA Histopaque Cat. No 10771)
- Σετ ρυθμιστικών διαλυμάτων για το αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου FoxP3 (BD Cat. No. 560098)
- Μονοκλωνικά Αντισώματα
- 1. Μάρτυρες ισοτόπου $\gamma 1/\gamma 2a$ -IgG1 FITC/ IgG2a PE (BD Cat. No. 342409- Κλώνοι X40 X39)
- 2. Μάρτυρες ισοτόπου $\gamma 2a/\gamma 1$ -IgG2a FITC/ IgG1 PE (BD Cat. No. 340394- Κλώνοι X39 X40)
- 3. Μάρτυρες ισοτόπου IgG1 PE (BD Cat. No. 345816- Κλώνος X40)
- 4. Μάρτυρες ισοτόπου IgG1 FITC (BD Cat. No. 345815- Κλώνος X40)

5. Μάρτυρες ισοτόπου IgG2a PE (BD Cat. No. 349053- Κλώνος X39)
6. Μάρτυρες ισοτόπου IgG2a FITC (BD Cat. No. 349051- Κλώνος X39)
7. CD2 FITC (BD Cat. No 347593 – Κλώνος S5.2)
8. CD4 PERCP (BD Cat. No 345770- Κλώνος SK3)
9. CD11a FITC (BD Cat. No 347983 - Κλώνος G-25.2)
10. CD25 APC (BD Cat. No. 555434- Κλώνος M-A251)
11. CD27 FITC (DAKO Cat. No F 7178- Κλώνος M-T271)
12. CD28 FITC (BD Cat. No 555728 - Κλώνος CD28.2)
13. CD44 FITC (BD Cat. No 347943 - Κλώνος L178)
14. CD45RO FITC (BD Cat. No 555492- Κλώνος UCHL1)
15. CD45RO PE (EXBIO Cat. No 1P-498-T100 - Κλώνος UCHL1)
16. CD54 PE (BD Cat. No 347977 – Κλώνος LB-2)
17. CD58 PE (BD Cat. No 649454 – Κλώνος L306.4)
18. CD74 PE (ANCELL Cat. No 226-050- Κλώνος BM-B741)
19. CD81 (BD Cat. No 551108 - Κλώνος JS-81)
20. CD95 PE (BD Cat. No 340480- Κλώνος DX2)
21. CD122 PE (BD Cat. No 340254- Κλώνος TU27)
22. CD122 FITC (BECKMAN COULTER Cat. No 6604931- Κλώνος 2RB)
23. CD127 PE (BD Cat. No 557938- Κλώνος Clone HIL-7R-M21)
24. CD132 PE (BD Cat. No 555898- Κλώνος TUGh4)
25. CD152 PE (BD Cat. No 550405- Κλώνος BNI3)
26. CD178 PE (ANCELL Cat. No 399-040 – Κλώνος Alf-2.1a)
27. CD221 PE (BD Cat. No 555999- Κλώνος 1H7)
28. Alexa Fluor488 FoxP3 (BD Cat. No 560047- Κλώνος 259D/C7)
29. CLIP PE (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Cat. No sc-12725- Κλώνος cerCLIP.1)
30. HLA-DR FITC (BD Cat. No 347400- Κλώνος L243)
31. HLA-DR PE (BD Cat. No 347401- Κλώνος L243)
32. HLA-DQ FITC (BD Cat. No 347453- Κλώνος SK10)
33. TCR α/β FITC (BD Cat. No 347773- Κλώνος WT31)
34. TGF- β PE (IQ Products Cat. No IQP-169R - Κλώνος TB21)
35. TGF- β RII (R&D Systems Cat. FAB241 F- Κλώνος 25508)

Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω αντισώματα δημιουργήθηκαν συνδυασμοί τετραπλού φθορισμού που αποθηκεύτηκαν στο λογισμικό BD CellQuest™ Pro Software, ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό FCS Express V3.

Οι συνδυασμοί αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στη συνέχεια.

CD4-PerCP/ CD25-APC/ IgG1FITC/ Mouse IgG2a PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ Mouse IgG2aFITC/ Mouse IgG1 PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ Mouse IgG1FITC (ic)/ Mouse IgG2aPE (ic)

CD4-PerCP/ CD25-APC/ Alexa Fluor488 FoxP3 (IN)/ CD127-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD45RO-FITC/ CD127-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD122 FITC/ CD132 PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ TGF- β RII- FITC/ TGF- β -PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ HLA-DQ-FITC/ HLA-DR-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ HLA-DR-FITC/ CerClip-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD44-FITC/ CD74-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD28-FITC/ CD152-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD152-PE(ic)

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD178 FITC/ CD95 PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD11a FITC/ CD54 PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD2 FITC/ CD58 PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD2 FITC/ CD45RO-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD45RO-FITC/ HLA-DR-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD45RO-FITC/ CD122 PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD81 FITC/ CD45RO-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD45RO-FITC/ CD221-PE

2.4 Πρωτόκολλο εκτέλεσης

Δεδομένου ότι το βιολογικό υλικό που περιέχει τα προς ανάλυση κύτταρα, πρέπει να αποθηκεύεται σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό και να υπόκειται σε επεξεργασία εντός 24 ωρών από τη λήψη του, διενεργήθηκε κυτταρομετρία ροής σε περιφερικό αίμα άμεσα μετά τη λήψη του δείγματος ακολουθώντας κάθε φορά το ίδιο πρωτόκολλο. Το δείγμα πριν την ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής είναι απαραίτητο να βρίσκεται στη μορφή εναιωρήματος και στη συνέχεια θα περιγραφεί αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την επώαση με τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα συγκεκριμένης εξειδίκευσης ως προς CD, τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και το τρέξιμο και ανάλυση στον κυτταρομετρητή.

2.4.1 Εργαστηριακή προετοιμασία δείγματος για τα επιφανειακά αντισώματα

Με τη χρήση μικροσιφωνίου μεταβλητού όγκου και με βάση τους συνδυασμούς αντισωμάτων που περιγράφηκαν ανωτέρω, τοποθετήθηκε η απαιτούμενη ποσότητα μονοκλωνικού αντισώματος εντός του κάθε σωληναρίου (BD Falcon 12x75 mm) σύμφωνα με το φύλλο οδηγιών ή κατόπιν προηγούμενης τιτλοδότησης. Ακολουθώντας, προστέθηκαν 100 μ L φλεβικού αίματος (που είχε αποθηκευτεί σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA/ BD K3 EDTA vacutainer) στον πυθμένα κάθε σωληναρίου και κατόπιν ανάδευσης έγινε επώαση σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL λυτικού διαλύματος (BD Facs Lysing Solution-10X) αραιωμένου με απιοντισμένο νερό σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, και κατόπιν ανάδευσης επώαση σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, με στόχο τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Το διάλυμα αυτό φυγοκεντρήθηκε σε φυγόκεντρο Hettich ROTINA 38/38R στις 3000 στροφές/ λεπτό για 10 λεπτά και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Έπειτα, προστέθηκαν 2-3 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS –Phosphate buffered saline, pH = 7,4) έγινε εκ νέου ανάδευση, φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές/ λεπτό για 10 λεπτά και απόρριψη του νέου υπερκείμενου. Στο ίζημα προστέθηκαν 0,5 mL PBS έγινε ανάδευση και αποθήκευση σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία 2° -8°C έως ότου γίνει ανάλυση στον κυτταρομετρητή εντός του επόμενου διώρου.

2.4.2 Εργαστηριακή προετοιμασία δείγματος για τα ενδοκυττάρια αντισώματα

Για τα ενδοκυττάρια αντισώματα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτή των αντίστοιχων εξωκυττάρων, δηλαδή με σήμανση με τα μονοκλωνικά αντισώματα επιφανείας, λύση των ερυθρών και πλύση όπως περιγράφηκε προηγουμένως, εκτός από το τελικό βήμα της προσθήκης PBS, το οποίο αντικαταστάθηκε από προσθήκη 0,5 mL διαλύματος διαπερατοποίησης (BD FACS Permeabilizing Solution 2) αραιωμένου με απιοντισμένο νερό σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά από ανάδευση το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και ακολούθησε πλύση με 2 mL PBS, φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/ λεπτό για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου. Στη συνέχεια προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα ενδοκυττάρων αντισώματος και έγινε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από μία ακόμη πλύση με PBS με τον τρόπο που περιγράφηκε ανωτέρω, ακολούθησε επαναιώρηση σε 0,5 mL PBS και ανάλυση στο κυτταρόμετρο.

2.4.3 Εργαστηριακή προετοιμασία δείγματος για το ενδοπυρηνικό αντίσωμα κατά FoxP3

Για τη σήμανση με το αντίσωμα του FoxP3 έγινε χρήση των ειδικών διαλυμάτων της BD Pharmingen (Human FoxP3 Buffer Set) τα οποία εφαρμόζονται σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs).

Για την απομόνωση των PBMCs ακολουθήθηκε η κάτωθι διαδικασία :

Σε 5 mL περιφερικού αίματος το οποίο μετά την αιμοληψία τοποθετήθηκε σε σωληνάριο με αντιπηκτικό ηπαρίνης, προστέθηκε ίση ποσότητα ισότονου διαλύματος PBS. Σε ένα άλλο σωλήνα των 50 mL προσθέσαμε 10 mL διαλύματος φικόλης (ficoll) πάνω στην οποία εναποθέσαμε προσεκτικά ίσο όγκο αραιωμένου αίματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, στις 2200 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στη φυγόκεντρο Heraeus Labofuge GL, χωρίς φρένο. Με τη φυγοκέντρηση σχηματίστηκε μια βαθμίδωση πυκνότητας (φικόλη κάτω, PBS επάνω) που έχει ως συνέπεια την καταβύθιση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των πολυμορφοπύρηνων ενώ τα μονοπύρηννα κύτταρα του αίματος (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα) σχηματίζουν ένα λεπτό υμένιο επάνω στη φικόλη (μεσόφαση).

Στη συνέχεια ακολούθησε αναρρόφηση του υπερκείμενου και απόρριψη στα απόβλητα, και κατόπιν έγινε συλλογή της μεσόφασης. Μεταφέραμε τα κύτταρα σε άλλο σωλήνα που περιέχει 50 mL PBS, αναδεύσαμε και φυγοκεντρήσαμε στις 1500 στροφές για 10 λεπτά. Απορρίψαμε το υπερκείμενο και κάναμε εκ νέου πλύση με 50 mL PBS και επαναιωρήσαμε το ίζημα σε 1 mL PBS στο οποίο έχει προστεθεί ορός εμβρύου μόσχου σε τελική συγκέντρωση 1% (fetal bovine serum, FBS).

Ακολούθησε μέτρηση των κυττάρων και αραιώση με FBS με στόχο να περιέχονται 10^7 μονοπύρηννα κύτταρα/ mL, έτσι ώστε με την προσθήκη 100 μ L σε κάθε σωληνάριο να σημαίνονται με το αντίστοιχο αντίσωμα 10^6 κύτταρα. Έτσι στα σωληνάρια 12x75 mm τοποθετήθηκαν 100 μ L από το διάλυμα των PBMC και 10 μ L από τα επιφανειακά αντισώματα σύμφωνα με τους συνδυασμούς αντισωμάτων που περιγράφηκαν ανωτέρω, τα οποία αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Ακολούθησε πλύση με 2 mL FBS, με φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές/ λεπτό για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου και στη συνέχεια μονιμοποίηση των κυττάρων με χρήση 2 mL του διαλύματος Human Foxp3 Buffer A x1, ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στις 2115 στροφές/ λεπτό για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου, και στη συνέχεια έγινε πλύση με FBS στις 2115 στροφές/ λεπτό για 5 λεπτά όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

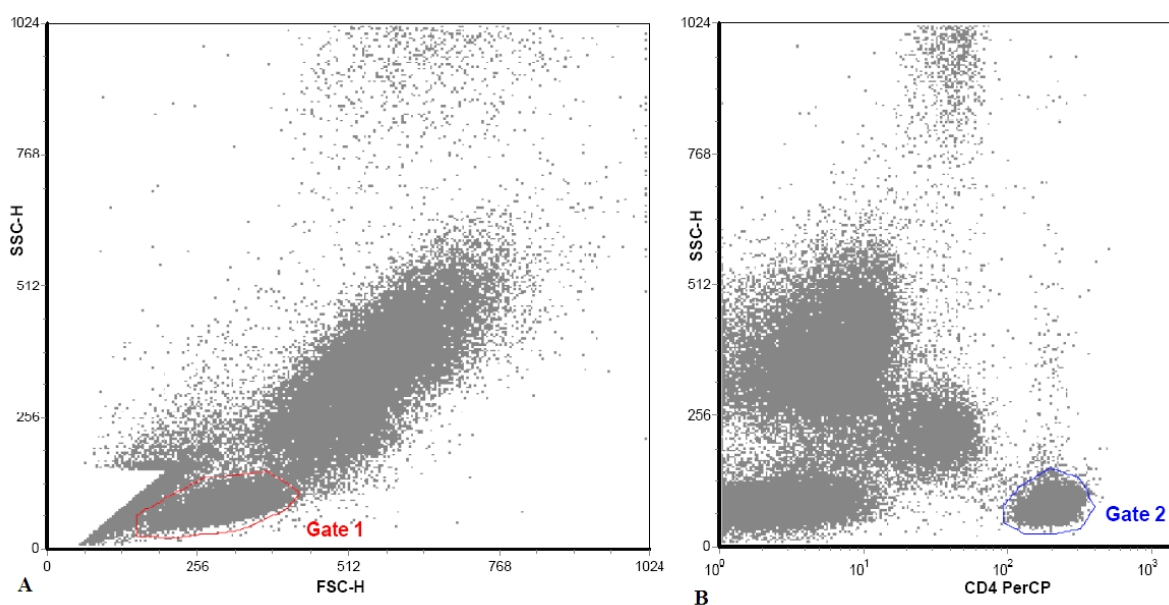
Για τη διαπερατοποίηση των κυττάρων προστέθηκαν 0,5 mL του Human Foxp3 Buffer B x1, έγινε ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από μία ακόμη πλύση με 2 mL FBS προστέθηκαν 20 μ L αντισώματος (συνιστώμενη ποσότητα από τον παραγωγό) κατά Foxp3 (BD Pharmingen) και μετά από ανάδευση το διάλυμα επώαστηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά. Ακολούθησε πλύση με FBS όπως περιγράφηκε προηγουμένως και τελικώς επαναιώρηση σε 0,5 mL FBS και ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής.

2.4.4 Διαδικασία κυτταρομετρίας ροής

Πριν από κάθε χρήση του κυτταρομέτρου προηγήθηκε πλύση και βαθμονόμηση (calibration), για να ληφθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης Cell Quest (Becton Dickinson) έγινε ανάλυση του τελικού εναιωρήματος στον κυτταρομετρητή ροής έως ότου καταμετρηθούν τουλάχιστον 10.000 CD4 λεμφοκύτταρα (G2) με τη στρατηγική επιλογής συγκεκριμένων πληθυσμών κυττάρων (gating) που περιγράφεται παρακάτω.

Στο αρχικό κυτταρόγραμμα (dot plot) έντασης πρόσθιου σκεδασμού (FSC) και πλάγιου σκεδασμού (SSC) με βάση τις ιδιότητες μεγέθους και κοκκίωσης χρειάστηκε μία πύλη στα λεμφοκύτταρα που ονομάστηκε Gate 1 (Εικόνα 24.A). Στο δεύτερο διάγραμμα (Εικόνα 24.B) έγινε απεικόνιση των κυττάρων ως προς SSC και CD4 και μια δεύτερη πύλη που ονομάστηκε Gate 2 στα κύτταρα με χαμηλή κοκκίωση και υψηλή έκφραση CD4.



Εικόνα 24. Α. Διαχωρισμός των λεμφοκυττάρων (Gate 1) από τα άλλα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος με βάση το κυτταρόγραμμα FSC-SSC. Β. Διαχωρισμός των $CD4^{++}$ (Gate 2) κυττάρων με βάση το κυτταρόγραμμα CD4-SSC.

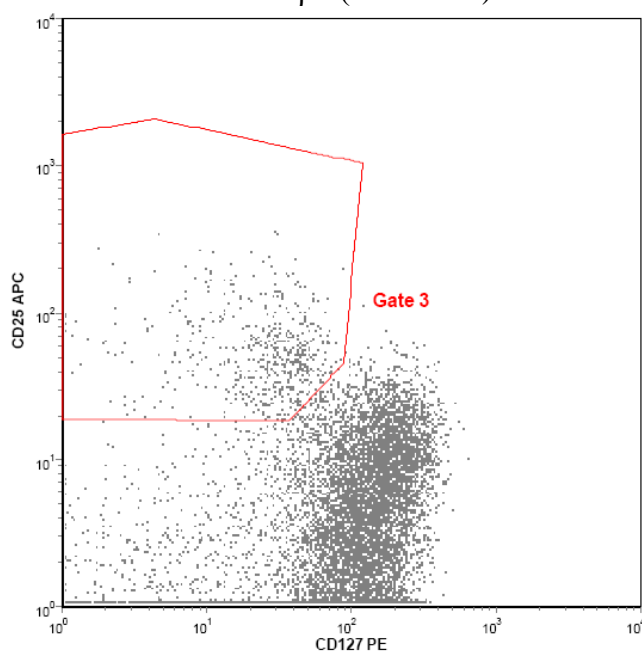
Η δημιουργία μιας πύλης που ονομάστηκε G2 και βλέπει ταυτόχρονα και στα δύο προηγούμενα αντιστοιχεί με τη μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα στον πληθυσμό των $CD4^{+}$ λεμφοκυττάρων T.

2.4.5 Ανάλυση στο κυτταρόμετρο

2.4.5.1 Διαχωρισμός Τρυθμ με βάση την έκφραση του CD127

Μετά τον αρχικό διαχωρισμό των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων όπως περιγράφηκε παραπάνω έγινε διαχωρισμός των Τρυθμ με βάση την έκφραση του CD127 (IL-7R α).

Στο κυτταρόγραμμα CD127-CD25 για την ανάλυση κυττάρων από την G2 ($CD4^+$ λεμφοκύτταρα T), κατασκευάστηκε μια πύλη (Gate 3) στην οποία περιλαμβάνονται όλα τα $CD25^+CD127^{low}$ κύτταρα (Εικόνα 25)



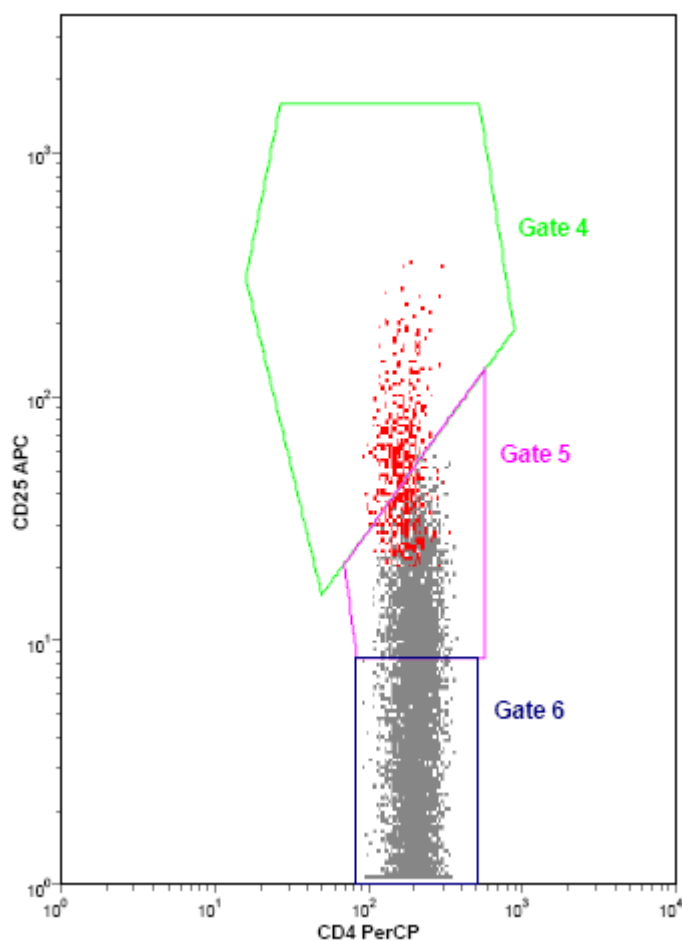
Εικόνα 25. Διαχωρισμός των $CD25^+CD127^{low}$ (Gate 3) από τα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα με κυτταρόγραμμα CD25-CD127

Στη συνέχεια δημιουργήσαμε μια σύνθετη πύλη που επιλέγει τα κύτταρα που ταυτόχρονα ικανοποιούν τις συνθήκες της G2 και της Gate 3 και την ονομάσαμε G3.

Τα κύτταρα της G3 απεικονίζονται ως κόκκινα στο κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση CD4-CD25 όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 26.

Με βάση το δεδομένο ότι θέλουμε να επιλέξουμε κατά το δυνατόν έναν ομοιογενή πληθυσμό $CD127^{low}$ (κόκκινα κύτταρα) που να έχει ταυτόχρονα υψηλή έκφραση ως προς CD25 και χαμηλότερη ως προς CD4 σχηματίζουμε μια σύνθετη πύλη όπως φαίνεται στο κυτταρόγραμμα της Εικόνας 26, η οποία ονομάζεται Gate 4 και αντιστοιχεί στα Τρυθμ. Συμπληρωματικό προς αυτό το παράθυρο και με βάση το δεδομένο ότι τα κύτταρα είναι $CD25^+$ καθορίζεται το παράθυρο των T δραστικών λεμφοκυττάρων (Teffector-Teff) όπως φαίνεται στην εικόνα (Gate 5). Στην Gate 6 περιλαμβάνονται τα T παρθένα λεμφοκύτταρα (Tnaive).

Με βάση τις πύλες Gate 4, Gate 5 και Gate 6 δημιουργήθηκαν οι πύλες G4, G5 και G6 αντίστοιχα, οι οποίες βλέπουν ταυτόχρονα στις προηγούμενες πύλες και την G2. Έτσι έχουμε τη δυνατότητα να μελετήσουμε κατά το δυνατόν πιο καθαρούς πληθυσμούς κυττάρων με ομοιογενή χαρακτηριστικά.



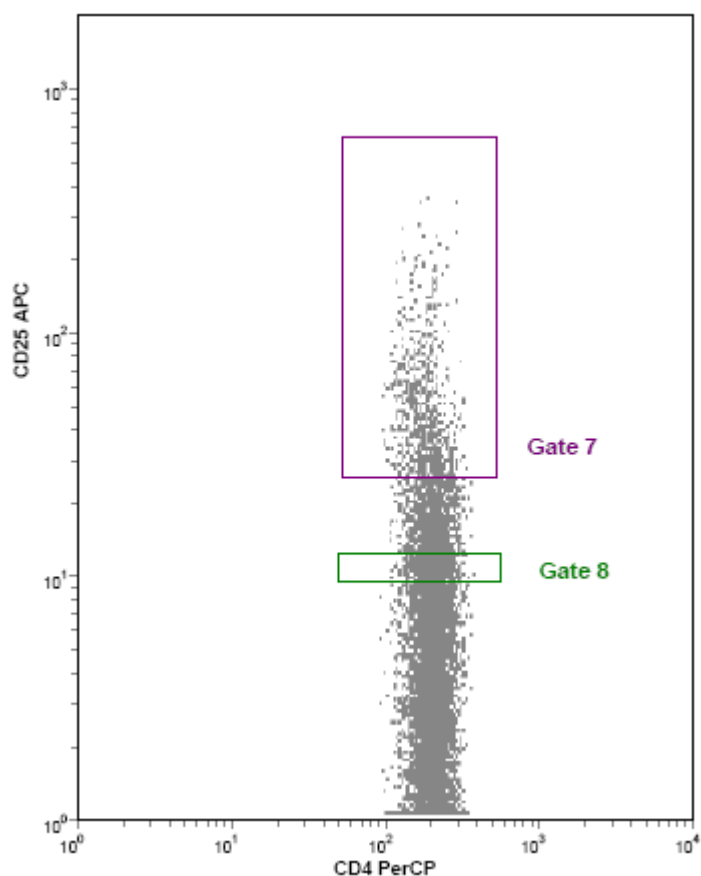
Εικόνα 26. Διαχωρισμός των Τρυθμ $CD4^+ CD25^{high}$ (Gate 4) από τα $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα με κυτταρόγραμμα $CD4-CD25$, με βάση τον πληθυσμό $CD25^+ CD127^{-low}$ $CD4^+$ λεμφοκύτταρα Τ που απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα. Επιπλέον, διαχωρίζονται τα Τδραστ (Gate 5), και τα Τ αδρανή (Gate 6).

2.4.5.2 Επιβεβαίωση του διαχωρισμού με χρήση του κορυφαίου 7%

Δεδομένου ότι ο καθορισμός των Τρυθμ με βάση την έκφραση του $CD127$ και του $CD25$, όπως περιγράφηκε παραπάνω περιέχει ένα βαθμό υποκειμενισμού (ακόμη και με μια μικρή απόκλιση) προσπαθήσαμε με τη μέθοδο που περιγράφεται στη συνέχεια να δείξουμε ότι το γεγονός ότι οι αναλύσεις έγιναν από ένα και μόνο χειριστή έχει μειώσει στο ελάχιστο το υποκειμενικό στοιχείο στις εκτιμήσεις μας.

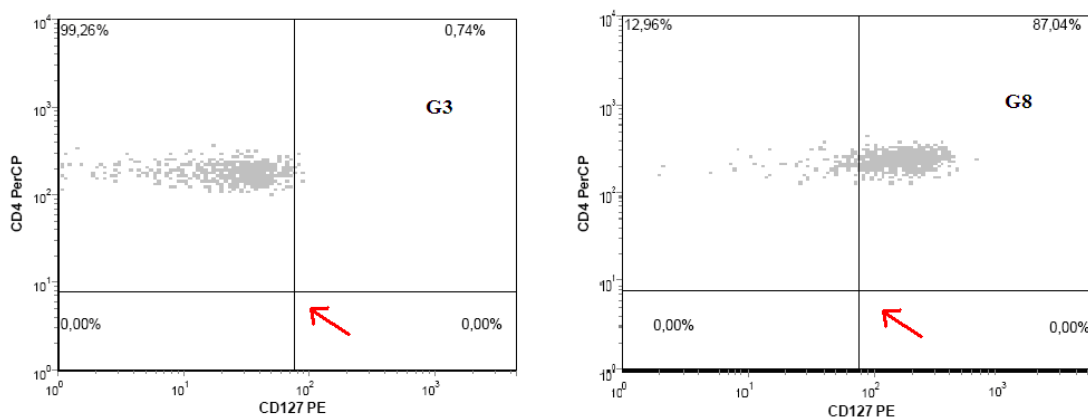
Στο κυτταρόγραμμα $CD4-CD25$ που βλέπει στην G2 και περιλαμβάνει τα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα Τ, επιλέγουμε μία πύλη με σχήμα ορθογωνίου παραλληλογράμμου (Gate7), η οποία περιλαμβάνει το κορυφαίο 7% των κυττάρων ως προς την έκφραση $CD25$ και μία παρόμοια πύλη (Gate8) που περιλαμβάνει το ίδιο ποσοστό κυττάρων στο μέσο του πληθυσμού των Τδραστικών (Εικόνα 27). Στην συνέχεια δημιουργούμε τις πύλες G7 και G8 οι οποίες «βλέπουν» ταυτόχρονα στις Gate7 και G2 καθώς και Gate8 και G2, αντίστοιχα.

Η επιλογή του κορυφαίου 7% βασίζεται στο γεγονός ότι αυτό καλύπτει και με το παραπάνω το ποσοστό των Τρυθμ σε φυσιολογικούς μάρτυρες και διαβητικούς όπως έχει περιγραφεί μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία.



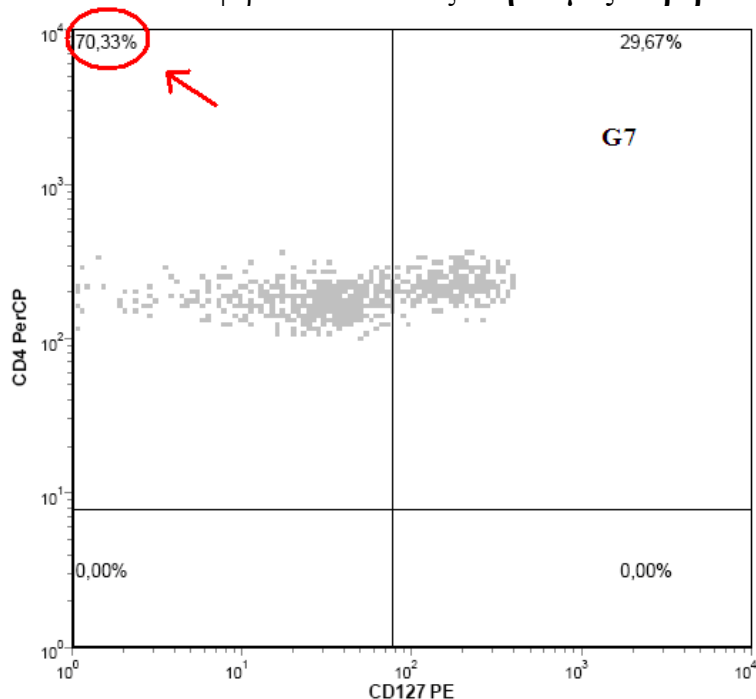
Εικόνα 27. Διαχωρισμός του κορυφαιού 7% των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων T (Gate 7) και του ίδιου ποσοστού κυττάρων με χαράκτηρα Τδραστ (Gate 8), σε κυτταρογράμμα $CD4$ - $CD25$.

Στη συνέχεια δημιουργούμε τρία κυτταρογράμματα με βάση την έκφραση $CD4CD127$ τα οποία «βλέπουν» στις πύλες G3, G8 και G7 αντίστοιχα με βάση τη σειρά που χρησιμοποιούνται. Με βάση το γεγονός ότι στην πρώτη πύλη τα περισσότερα κύτταρα είναι εξ ορισμού $CD127^{low}$ και ότι στην G8 περιέχονται ελάχιστα από αυτά τα κύτταρα, και οι δύο υποπληθυσμοί διαχωρίζονται σαφώς βρίσκουμε το όριο με τη μορφή σταυρονήματος μεταξύ των $CD127^{low}$ και $CD127^+$ (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Καθορισμός του ορίου μεταξύ $CD127^{low}$ και $CD127^+$ με τη μορφή σταυρονήματος, με βάση τα κυτταρογράμματα $CD4$ - $CD127$ που βλέπουν στα Τρυθμ (G3) και στο 7% των Τδραστ (G8).

Με βάση το όριο αυτό αξιολογούμε το ποσοστό των κυττάρων που είναι $CD127^{-/low}$ στο τρίτο κυτταρόγραμμα που βλέπει στην G7 (Εικόνα 29). Τα κύτταρα αυτά, και το αντίστοιχο ποσοστό θα αναφέρονται πλέον ως **πληθυσμός επιβεβαίωσης**.



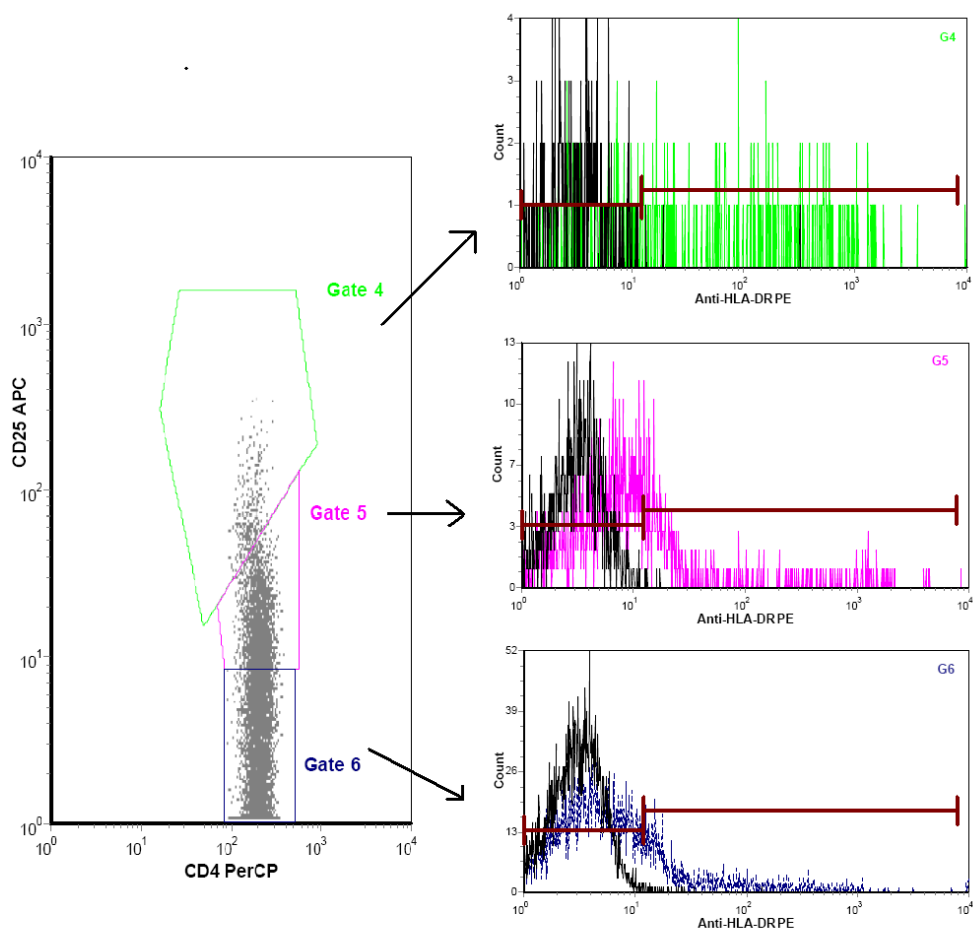
Εικόνα 29. Καθορισμός του ποσοστού των $CD127^{-/low}$ κυττάρων σε κυτταρόγραμμα $CD127$ - $CD4$ που βλέπει στο κορυφαίο 7% των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων (G7) και καθορίζεται ως πληθυσμός επιβεβαίωσης.

Για να επιβεβαιώσουμε τον τρόπο ορισμού των Τρυθμ με τον τρόπο που περιγράψαμε αρχικά (2.4.5.1), θα πρέπει να μελετήσουμε τη συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των Τρυθμ και του ποσοστού των $CD127^{-/low}$ στο κορυφαίο 7% (πληθυσμός επιβεβαίωσης), και πως αυτό κυμαίνεται στους φυσιολογικούς μάρτυρες και στους συγγενείς διαβητικών τους οποίους μελετήσαμε.

2.4.5.3 Μελέτη της έκφρασης διαφόρων μορίων στα Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ

Με βάση τα ιστογράμματα έκφρασης διαφόρων μορίων που θεωρήθηκαν σημαντικά για την ποιοτική ανάλυση των Τρυθμ, μελετήσαμε την έκφρασή τους στους τρεις υποπληθυσμούς των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων T: τα Τρυθμ, τα Τδραστ και τα Τπαρθ. Τα ιστογράμματα αυτά βλέπουν στις πύλες G4, G5, G6 αντίστοιχα. Τα όρια θετικότητας ορίστηκαν με βάση τον αρνητικό μάρτυρα δηλαδή IgG_1/IgG_{2a} ποντικού. Ειδικότερα θεωρήθηκε θετικό οτιδήποτε βρίσκεται πάνω από το 99,5% του ισοτυπικού μάρτυρα.

Στην Εικόνα 30 βλέπουμε για παράδειγμα την έκφραση του μορίου ιστοσυμβατότητας τάξης II, HLA-DR, στους 3 υποπληθυσμούς των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων. Τα όρια της θετικότητας καθορίζονται όπως αναφέραμε ήδη με βάση το 99,5% του ισοτυπικού μάρτυρα που φαίνεται με μαύρο χρώμα στα ιστογράμματα. Αντίστοιχα η έκφραση του HLA-DR PE φαίνεται με το αντίστοιχο χρώμα για κάθε υποπληθυσμό (Τρυθμ- πράσινο, Τδραστ-πορφυρό, Τπαρθ- μπλε). Με βάση τα όρια εκτιμάμε το ποσοστό των θετικών κυττάρων καθώς και τη μέση ένταση φθορισμού.



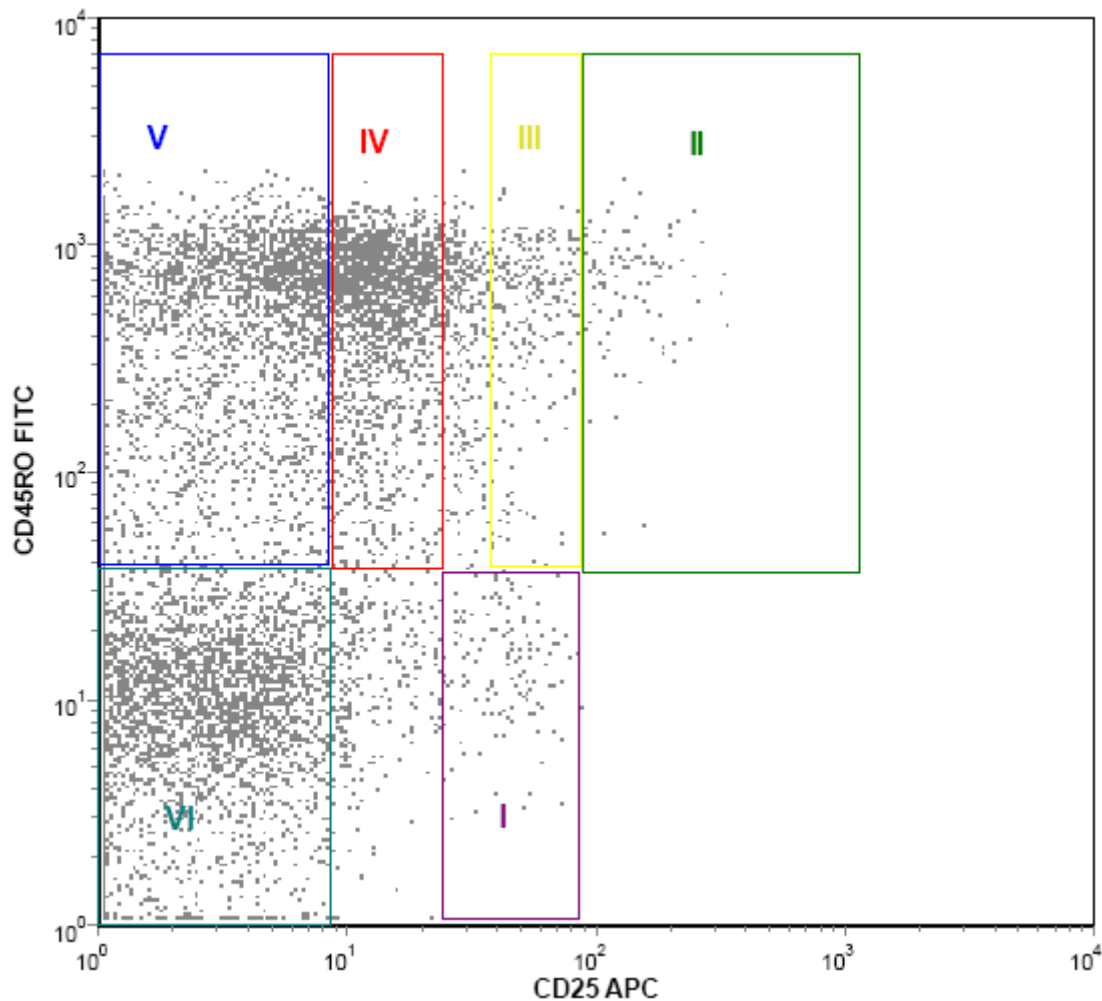
Εικόνα 30. Ιστογράμματα έκφρασης του ποσοστού των θετικών κυττάρων καθώς και τη μέση ένταση φθορισμού του HLA-DR PE κατ' αντιστοιχία στα Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ.

Με παρόμοιο τρόπο έχει γίνει η ανάλυση για τους συγκεκριμένους υποπληθυσμούς όλων των μορίων που μελετήθηκαν. Η μελέτη αφορά τόσο τους συγγενείς των διαβητικών όσο και τους φυσιολογικούς μάρτυρες.

2.4.5.4 Διαχωρισμός των υποπληθυσμών των Τρυθμ με βάση την έκφραση CD45RO

Με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009, όπως την περιγράψαμε προηγουμένως, διαχωρίσαμε τα $CD4^+ CD25^{high}$ λεμφοκύτταρα T ως προς την έκφραση CD25- CD45RO σε ενεργοποιημένα (aTregs), μη ενεργοποιημένα (rTregs) και μη κατασταλτικά (non-Tregs) Τρυθμ.

Όπως φαίνεται στο κυτταρόγραμμα στην Εικόνα 31, όπου με βάση την έκφραση CD25- CD45RO κατανέμονται τα κύτταρα από την G2, τα κύτταρα αυτά διακρίνονται σε $CD25^{+++}CD45RO^+$ (Gate II- aTregs), $CD25^{++}CD45RO^-$ (Gate I/ rTregs), $CD25^{++}CD45RO^+$ (Gate III/ non-Tregs). Τα $FoxP3^-$ (σύμφωνα με τη βιβλιογραφία) κύτταρα διακρίνονται σε $CD25^+CD45RO^+$ (Gate IV), $CD25^-CD45RO^+$ (Gate V), $CD25^- CD45RO^-$ (Gate VI).



Εικόνα 31. Διαχωρισμός των υποπληθυσμών των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων I-VI σύμφωνα με την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009, όπως φαίνεται στο κυτταρόγραμμα CD25-CD45RO

Με βάση τις πύλες I, II, III, IV, V και VI δημιουργήθηκαν οι πύλες I', II', III', IV', V' και VI' αντίστοιχα οι οποίες «βλέπουν» ταυτόχρονα στις προηγούμενες πύλες και την G2. Έτσι έχουμε τη δυνατότητα να μελετήσουμε επιπλέον χαρακτηριστικά των υποπληθυσμών αυτών ως προς την έκφραση επιπλέον δεικτών. Να επισημάνουμε ότι στο εξής, με βάση το χρώμα του περιγράμματος της κάθε πύλης όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, θα απεικονίζεται ο αντίστοιχος πληθυσμός στα κοκκιογράμματα. Ειδικότερα, θα απεικονίζεται ο πληθυσμός της πύλης I με πορφυρό, της II με πράσινο, της III με κίτρινο, της IV με κόκκινο, της V με μπλε, και της VI με γαλαζοπράσινο.

3. Έλεγχος για απλότυπο ιστοσυμβατότητας HLA-DQ/DR.

Οι δοκιμασίες για τον προσδιορισμό των μορίων ιστοσυμβατότητας HLA-DR/DQ στους φυσιολογικούς μάρτυρες και τον υπό μελέτη πληθυσμό συγγενών ατόμων με ΣΔ1 έγινε από το Εργαστήριο Ανοσογενετικής και τα Ερευνητικά Εργαστήρια Medicity του Πανεπιστημίου Τούρκου της Φιλανδίας (Διευθυντής ο Καθηγητής Jorma Ilonen), σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις εργασίες των Minna Kiviniemi και συν. [203],[204]. Οι διεργασίες αυτές είχαν στόχο να ταυτοποιήσουν με ακρίβεια τα αλληλόμορφα που έχουν γενικά καταγραφεί ως σχετιζόμενα (προδιαθετικώς ή προστατευτικώς) με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Η τυποποίηση ξεκίνησε ανιχνεύοντας τα κύρια αλληλόμορφα HLA-DQB1

χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια ώστε να επιτευχθεί πλήρης διακριτική ικανότητα (μέχρι τέταρτο ψηφίο ταυτοποίησης αλληλόμορφου). Ο προσδιορισμός του γονότυπου συνεχίστηκε με προσδιορισμό των τριών συναφών αλληλόμορφων HLA-DQA (DQA1/02:01, DQA1/03, DQB1/05) ώστε να γίνει η διάκριση μεταξύ των κύριων απλοτύπων που περιείχαν τα αλληλόμορφα HLA-DQB1/02, -DQB1/03:01 και -DQB1/03:03. Στα δείγματα που ήταν θετικά για το αλληλόμορφο HLA-DQB1/03:02 (προδιαθετικό για ΣΔ1) έγινε περαιτέρω ταυτοποίηση για τη διακρίβωση του συγκεκριμένου αλληλόμορφου HLA-DR στον υπότυπο HLA-DRB1/04.

4. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Statistical Package for Social Sciences Version 17.0 for windows (SPSS v. 17.0). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (mean) \pm σταθερά απόκλιση (standard deviation, SD). Για σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ των διαφόρων ομάδων ατόμων ή κυττάρων, έγινε χρήση του two-tailed Student's t test. Οι συσχετίσεις μεταξύ διαφορετικών παραμέτρων ελέγχθηκαν με το Pearson's test. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με τιμή $p < 0,05$, ενώ στην περίπτωση του Pearson's test παρουσιάζεται και ο συντελεστής συσχέτισης r (correlation coefficient) και ο συντελεστής r^2 (coefficient of determination).

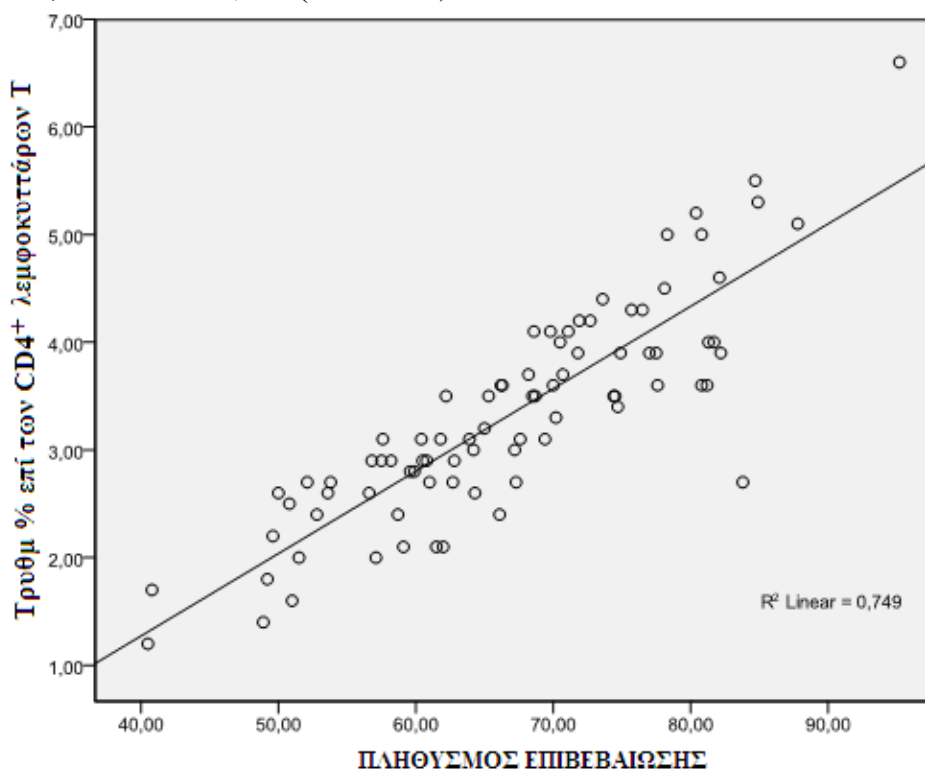
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αξιολόγηση του τρόπου μελέτης των Τρυθμ

1.1 Συσχέτιση του ποσοστού των Τρυθμ με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά η μελέτη του ποσοστού των Τρυθμ έγινε με τη μεθοδολογία που περιγράψαμε παραπάνω και με βάση το φαινότυπο $CD4^{low}CD25^{high}CD127^{-/low}$. Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια να αξιολογηθεί η αντικειμενικότητα του τρόπου εκτίμησης, με βάση τη συσχέτιση του ποσοστού των $CD127^{-/low}$ στο κορυφαίο 7%, που ονομάστηκε πληθυσμός επιβεβαίωσης (verifying population). Το ποσοστό 7% θεωρήθηκε με βάση τη βιβλιογραφία το ανώτερο δυνατό ποσοστό Τρυθμ που μπορεί να μετρηθεί σε φυσιολογικούς μάρτυρες.

Με χρήση του λογισμικού SPSS v.17.0 ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Pearson's η συσχέτιση για τη διακύμανση των δύο ποσοστών στους φυσιολογικούς μάρτυρες και στους συγγενείς διαβητικών. Η συσχέτιση αυτή βρέθηκε στατιστικά πολύ σημαντική στο επίπεδο $p = 0,01$ με $r = 0,865$ και $r^2 = 0,749$ (Εικόνα 32).



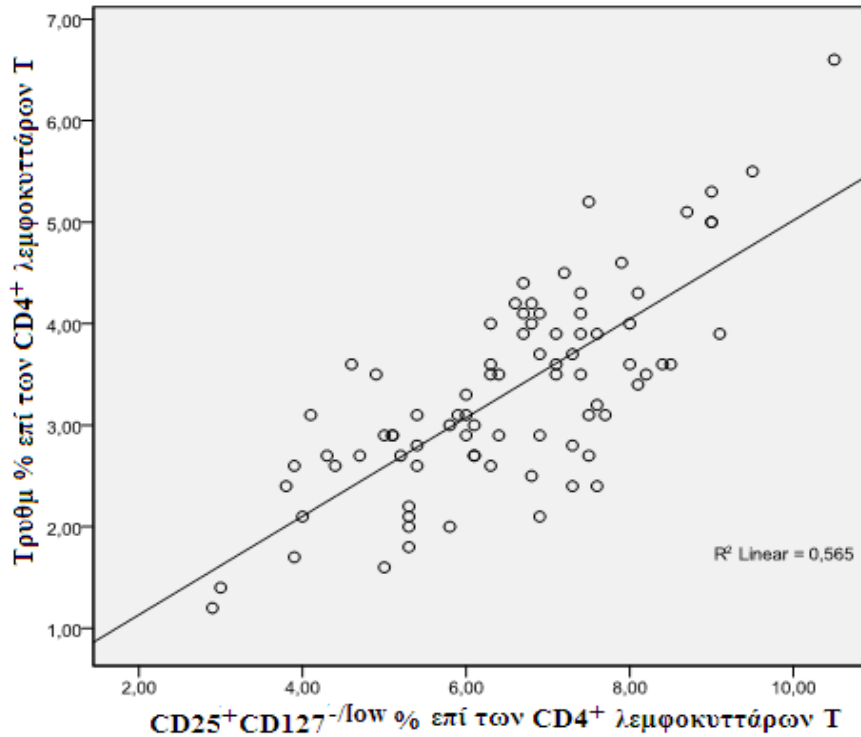
Εικόνα 32. Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού των Τρυθμ με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης

Η πολύ ισχυρή αυτή συσχέτιση υποδεικνύει ότι ο τρόπος υπολογισμού του ποσοστού των Τρυθμ έχει ισχυρή συσχέτιση με τον αντικειμενικό τρόπο υπολογισμού με τη χρήση του πληθυσμού επιβεβαίωσης και επομένως η σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών δεν εμπεριέχει μεταβολές οφειλόμενες σε λάθος εκτίμηση.

1.2 Συσχέτιση του ποσοστού των των $CD25^{+}CD127^{-/low}$ με τα Τρυθμ και τον πληθυσμό επιβεβαίωσης.

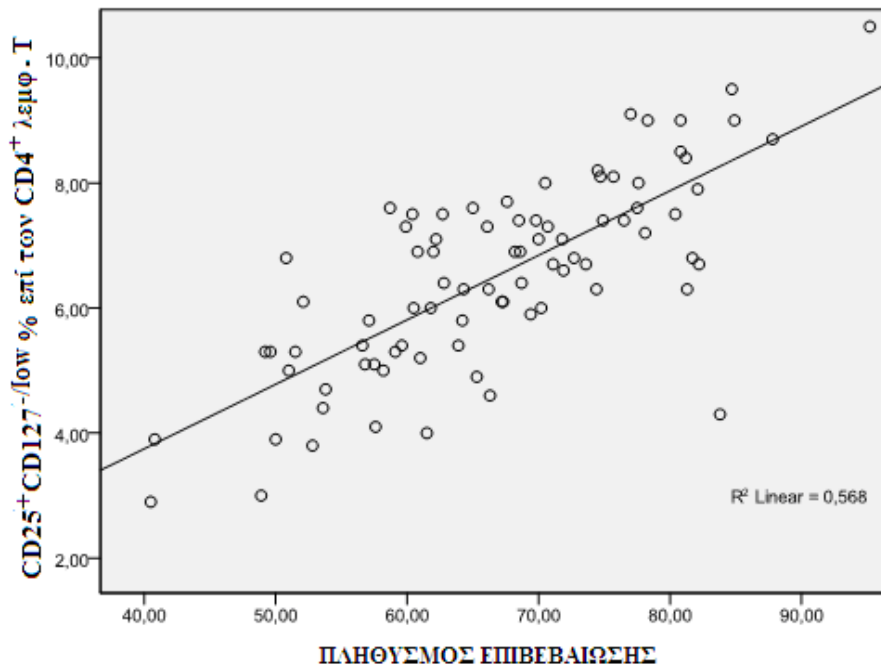
Όπως είδαμε από τη βιβλιογραφία κάποιες ομάδες εκτιμούν το ποσοστό των Τρυθμ με βάση κυρίως την έκφραση του $CD127$ δεδομένης της ισχυρής αρνητικής συσχέτισης του επιφανειακού αυτού δείκτη με την έκφραση του FoxP3. Με τη χρήση του λογισμικού SPSS v17.0 ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Pearson's η συσχέτιση του ποσοστού των $CD25^{+}CD127^{-/low}$

^{low} (Gate 3) με τον πληθυσμό των Τρυθμ καθώς και με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης. Και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση στο επίπεδο $p = 0,01$. Το ποσοστό του πληθυσμού των $CD25^+CD127^{low}$ σχετίζεται με το ποσοστό των Τρυθμ με $r = 0,752$ και $r^2 = 0,565$ (Εικόνα 33).



Εικόνα 33. Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού των Τρυθμ με το ποσοστό των $CD25^+CD127^{low}$.

Επίσης το ποσοστό των $CD25^+CD127^{low}$ σχετίζεται με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης με $r=0,754$ και $r^2=0,568$ (Εικόνα 34).



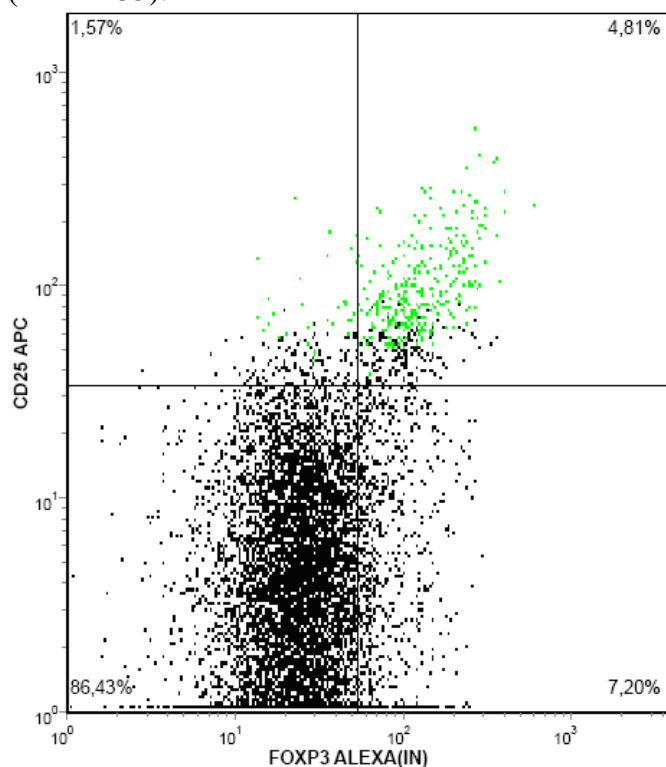
Εικόνα 34. Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού των $CD25^+CD127^{low}$ με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης

Η μικρότερη συσχέτιση του πληθυσμού επιβεβαίωσης σε σύγκριση με τον πληθυσμό των $CD25^+CD127^{-low}$ ως προς τη συσχέτισή του με τα το ποσοστό των Τρυθμ όπως αυτά διαχωρίζονται με βάση τον φαινότυπο $CD4^{int}CD25^{high}CD127^{-low}$, υποδεικνύει ότι η έκφραση του $CD25$ επηρεάζει το ποσοστό των Τρυθμ που εκτιμούμε. Ειδικότερα, το ποσοστό των $CD25^{high}$ εντός αυτού του πληθυσμού κυμαίνεται από δείγμα σε δείγμα πράγμα που ενδεχομένως επηρεάζεται από το ποσοστό των α Tregs και το οποίο θα μελετήσουμε στη συνέχεια με τη βοήθεια της χρήσης της τεχνικής Miyara και συνεργατών 2009.

1.3 Μελέτη έκφρασης Foxp3 στα Τρυθμ, $CD25^+CD127^{-low}$ και στον πληθυσμό επιβεβαίωσης

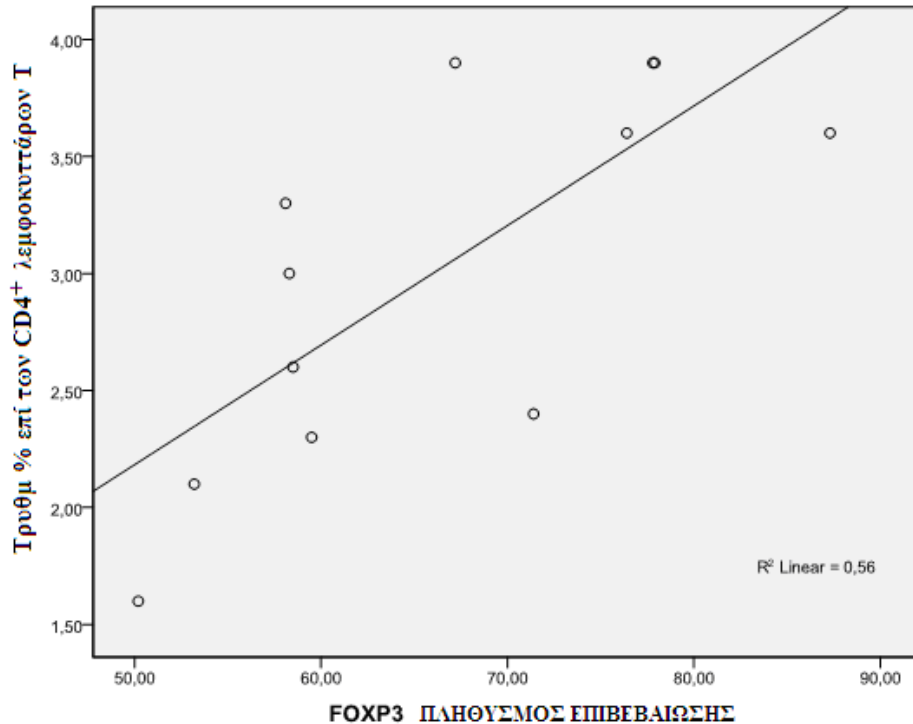
Όπως ήδη αναφέρθηκε με βάση τη βιβλιογραφία, ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3 επηρεάζει γονίδια που αφορούν την ανάπτυξη, τον αριθμό και την ρυθμιστική ικανότητα των Τρυθμ και η μελέτη της έκφρασής του έχει πρωτεύοντα ρόλο στον καθορισμό των κυττάρων αυτών.

Έγινε μελέτη μετά από απομόνωση με ficoll σε 15 δείγματα φυσιολογικών μαρτύρων της έκφρασης του *FoxP3* και βρέθηκε ότι τα Τρυθμ που διαχωρίστηκαν όπως περιγράψαμε παραπάνω και αντιστοιχούν στην πύλη Gate 4 εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα σε ποσοστό $89,9 \pm 5,4\%$ ενώ αντίστοιχα τα $CD25^+CD127^{-low}$ κύτταρα T σε ποσοστό $88,4 \pm 4,5\%$ (Εικόνα 35).



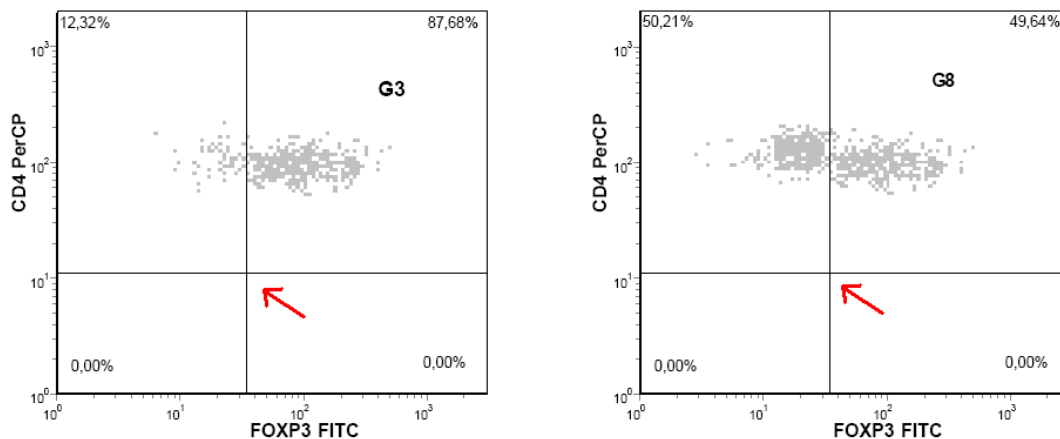
Εικόνα 35. Στην εικόνα βλέπουμε τα θετικά ως προς *FoxP3* $CD4^+$ λεμφοκύτταρα T και με πράσινο χρώμα τα Τρυθμ, τα οποία εκφράζουν όπως αναφέραμε στην πλειοψηφία τους το μεταγραφικό παράγοντα.

Εάν προσπαθήσουμε να κάνουμε χρήση ενός αντίστοιχου ποσοστού με αυτό του πληθυσμού επιβεβαίωσης με βάση την έκφραση του FoxP3 στο κορυφαίο 7 % ως προς το $CD25$ των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων T (Gate 7 στο κυτταρόγραμμα $CD4$ - $CD25$), θα δούμε ότι η διακύμανση του ποσοστού των Τρυθμ συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά στο επίπεδο $p = 0,01$ με $r = 0,749$ και $r^2 = 0,56$ (Εικόνα 36).

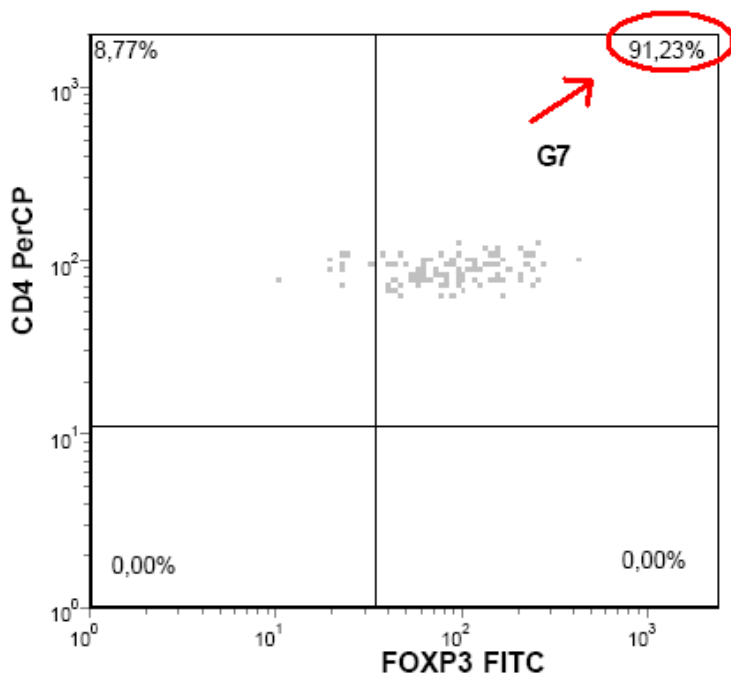


Εικόνα 36. Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού των Τρυθμ με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης με βάση την έκφραση του FOXP3.

Ειδικότερα, η διαδικασία καθορισμού του FoxP3 πληθυσμού επιβεβαίωσης φαίνεται στις εικόνες 37 και 38. Αρχικά γίνεται καθορισμός του σταυρονήματος με βάση την έκφραση του FoxP3 στις πύλες G3, G8 και εκτίμηση του ποσοστού των θετικών ως προς FoxP3 κυττάρων στο G7 (FoxP3 πληθυσμός επιβεβαίωσης).

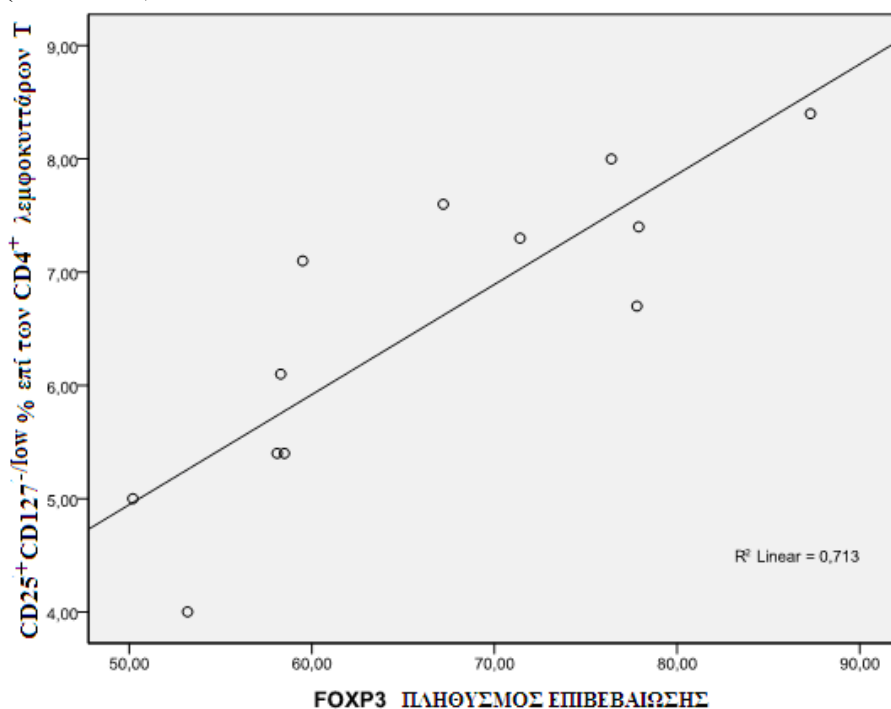


Εικόνα 37. Καθορισμός του ορίου μεταξύ FoxP3⁻ και FoxP3⁺ με τη μορφή σταυρονήματος, με βάση τα κυτταρογράμματα FoxP3-CD4 που βλέπουν στα CD127^{-low} (G3) και στο 7% των Τδρασ (G8)



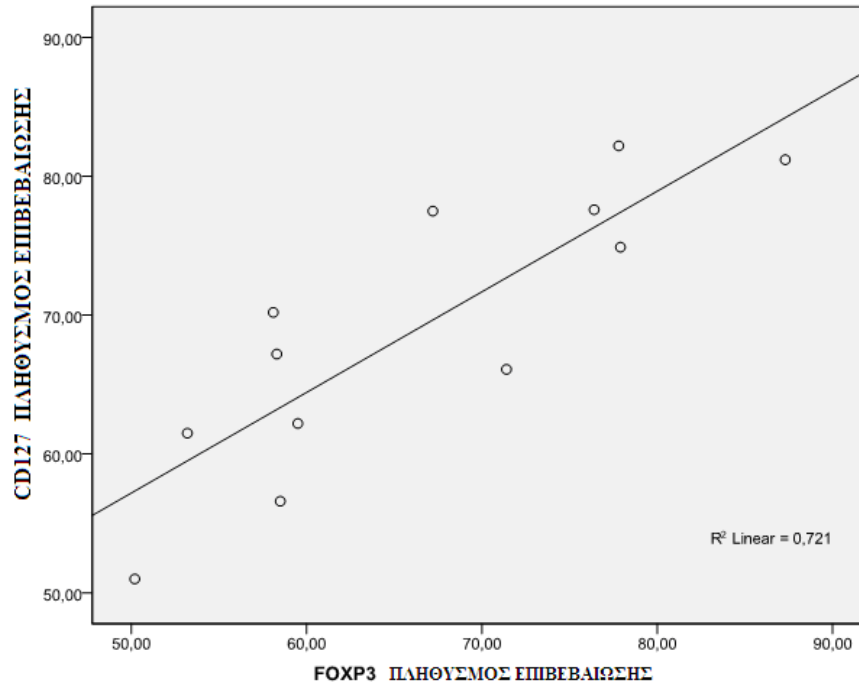
Εικόνα 38. Καθορισμός του ποσοστού των $FoxP3^+$ κυττάρων σε κυτταρόγραμμα $FoxP3-CD4$ που βλέπει στο κορυφαίο 7% των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων (G7) και καθορίζεται ως $FoxP3$ πληθυσμός επιβεβαίωσης

Ισχυρή συσχέτιση υπάρχει επίσης μεταξύ του πληθυσμού επιβεβαίωσης με βάση το FOXP3 και του ποσοστού των $CD25^+CD127^{-low}$ με $r = 0,844$ και $r^2 = 0,713$ στο επίπεδο $p = 0,01$ (Εικόνα 39).



Εικόνα 39.. Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού των $CD25^+CD127^{-low}$ με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης με βάση την έκφραση του FOXP3

Τέλος, επιβεβαιώνοντας την ήδη γνωστή από τη βιβλιογραφία σχέση μεταξύ του FoxP3 και του CD127 βλέπουμε ότι στο κορυφαίο 7% το ποσοστό των CD127^{-low} (CD127 πληθυσμός επιβεβαίωσης) και FoxP3⁺ κυττάρων (FoxP3 πληθυσμός επιβεβαίωσης), εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p = 0.01$) με $r = 0,849$ και $r^2 = 0,721$ (Εικόνα 40).

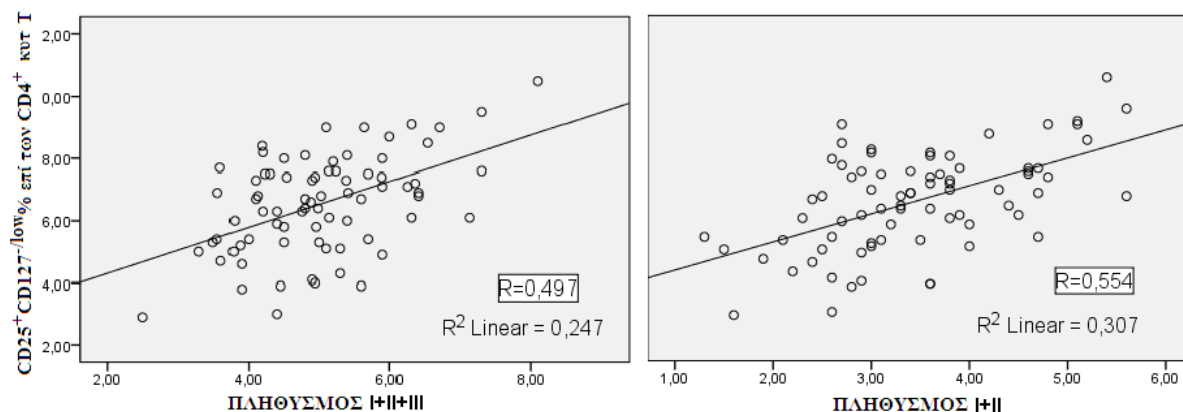


Εικόνα 40. Διάγραμμα συσχέτισης του πληθυσμού επιβεβαίωσης με βάση την έκφραση του CD127 με τον πληθυσμό επιβεβαίωσης με βάση την έκφραση του FOXP3

1.4 Συσχέτιση του ποσοστού των CD25⁺CD127^{-low} και των Τρυθμ με τους υποπληθυσμούς βάσει της τεχνικής Miyaga και συνεργατών 2009.

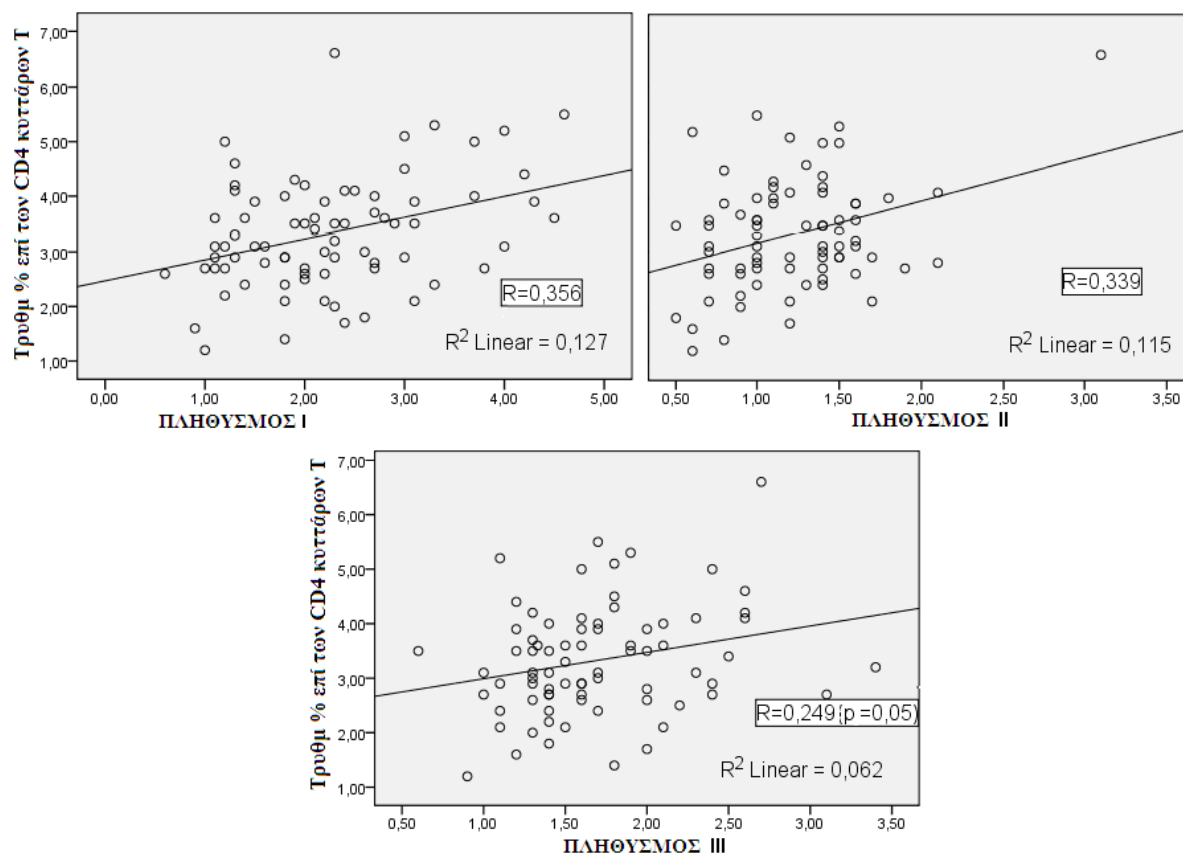
Όπως θα δούμε αναλυτικά στη συνέχεια, τόσο σε φυσιολογικούς μάρτυρες όσο και σε συγγενείς μελετήσαμε τους υποπληθυσμών των Τρυθμ τόσο ως προς τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όσο και ως προς το ποσοστό τους. Ακολούθως, βλέπουμε τις συσχετίσεις που προκύπτουν μεταξύ των Τρυθμ και του ποσοστού των CD25⁺CD127^{-low} με τα ποσοστά των υποπληθυσμών των Τρυθμ με βάση την έκφραση του CD45RO.

Το ποσοστό των CD25⁺CD127^{-low} συσχετίζεται με το ποσοστό των μη ενεργοποιημένων Τρυθμ (rTregs-I) με τρόπο στατιστικά σημαντικό ($p = 0,01$) και $r = 0,39$ και $r^2 = 0,152$, με το ποσοστό των ενεργοποιημένων (aTregs-II) $r = 0,397$ και $r^2 = 0,157$ ενώ η συσχέτιση με τα μη κατασταλτικά (non-Tregs-III) είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο $p = 0,05$ με $r = 0,235$ και $r^2 = 0,055$. Ωστόσο, πιο ισχυρή είναι η συσχέτιση του ποσοστού των CD25⁺CD127^{-low} με το άθροισμα των ποσοστών των ανωτέρω πληθυσμών και ακόμη ισχυρότερη με το άθροισμα των πληθυσμών I και II. Οι τιμές για το r και r^2 φαίνονται στην Εικόνα 41.

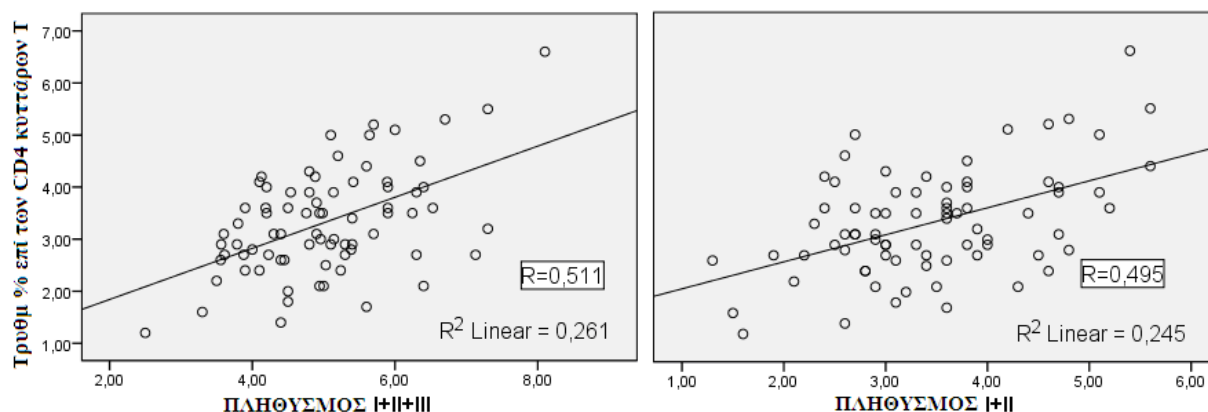


Εικόνα 41. Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού των $CD25^+CD127^{low}$ με το άθροισμα του ποσοστού των πληθυσμών I, II και III καθώς και με το αθροισμα του ποσοστού των πληθυσμών I και II. (Η συσχέτιση αφορά ένα δείγμα από 83 μάρτυρες και συγγενείς διαβητικών και είναι σημαντική σε επίπεδο $p = 0,01$)

Παρόμοιες συσχετίσεις εμφανίζονται και με το ποσοστό των Τρυθμ με βάση το φαινότυπο $CD4^{int}CD25^{high}CD127^{low}$. Οι συσχετίσεις φαίνονται με λεπτομέρεια στις εικόνες 42 και 43.



Εικόνα 42. Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού των Τρυθμ με το ποσοστό των των πληθυσμών I, II και III καθώς και τα αντίστοιχα r και r^2 . (Η συσχέτιση αφορά ένα δείγμα από 86 μάρτυρες και συγγενείς διαβητικών και είναι σημαντική σε επίπεδο $p = 0,01$ και είναι σημαντική σε επίπεδο $p = 0,01$ εκτός από τις περιπτώσεις που σημειώνεται διαφορετικά)



Εικόνα 43. Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού των Τρυθμ με το άθροισμα του ποσοστού των πληθυσμών I, II και III καθώς και με το άθροισμα του ποσοστού των πληθυσμών I και II. (Η συσχέτιση αφορά ένα δείγμα από 86 μάρτυρες και συγγενείς διαβητικών και είναι σημαντική σε επίπεδο $p = 0,01$)

2. Ποσοτικές διαφορές των Τρυθμ μεταξύ πρώτου βαθμού συγγενών διαβητικών και φυσιολογικών μαρτύρων

2.1 Ποσοτικές διαφορές των Τρυθμ, $CD25^+CD127^{-low}$ και του πληθυσμού επιβεβαίωσης
 Όπως φαίνεται και στον πίνακα 10 καμιά στατιστικά σημαντική ποσοτική διαφορά ως προς το ποσοστό των Τρυθμ δε φάνηκε σε κανένα από τους συγγενείς. Το ίδιο ισχύει εάν γίνουν οι συγκρίσεις με βάση το ποσοστό των $CD25^+CD127^{-low}$ κυττάρων καθώς και με τη χρήση του πληθυσμού επιβεβαίωσης.

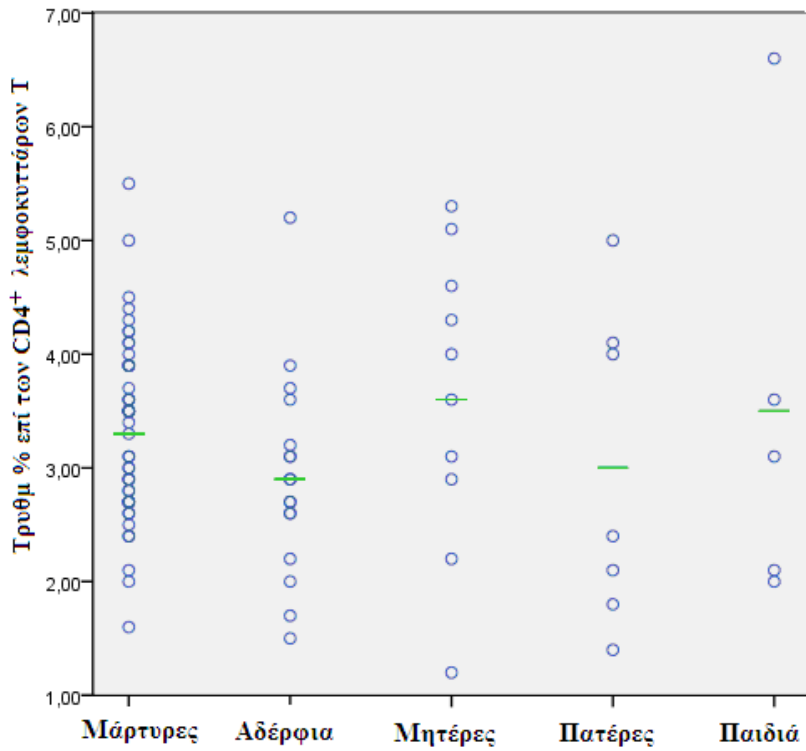
Πίνακας 10. Σύγκριση των ποσοστών των Τρυθμ στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων. Επιβεβαίωση των ευρημάτων με τη χρήση του ποσοστού των $CD25^+CD127^{-low}$ και του πληθυσμού επιβεβαίωσης.

ΟΜΑΔΑ	% Τρυθμ των $CD4^+$ λεμφ. Τ	p^1	$CD25^+CD127^{-low}$	p^1	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ	p^1
Μάρτυρες (48)	$3,3 \pm 0,8$		$6,5 \pm 1,3$		$67,6 \pm 9,3$	
Αδέρφια (17)	$2,9 \pm 0,9$	ns ²	$6,5 \pm 1,4$	ns	$62,7 \pm 10,4$	ns
Μητέρες (9)	$3,6 \pm 1,3$	ns	$6,5 \pm 2,1$	ns	$67,8 \pm 15,6$	ns
Πατέρες (7)	$3 \pm 1,4$	ns	$5,7 \pm 2$	ns	$63,4 \pm 14,4$	ns
Παιδιά (5)	$3,5 \pm 1,9$	ns	$7,5 \pm 2$	ns	$72,9 \pm 15,3$	ns

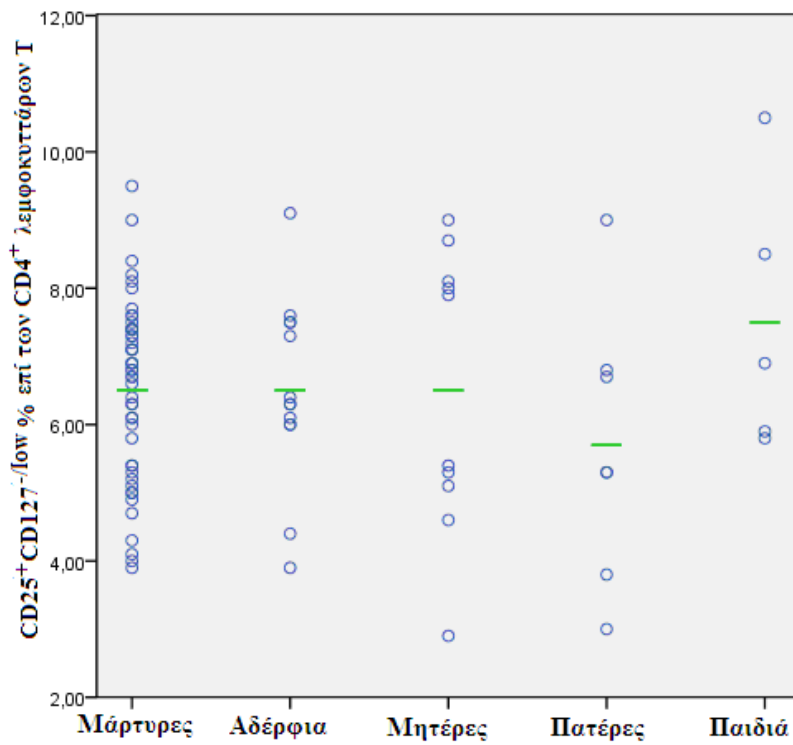
¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

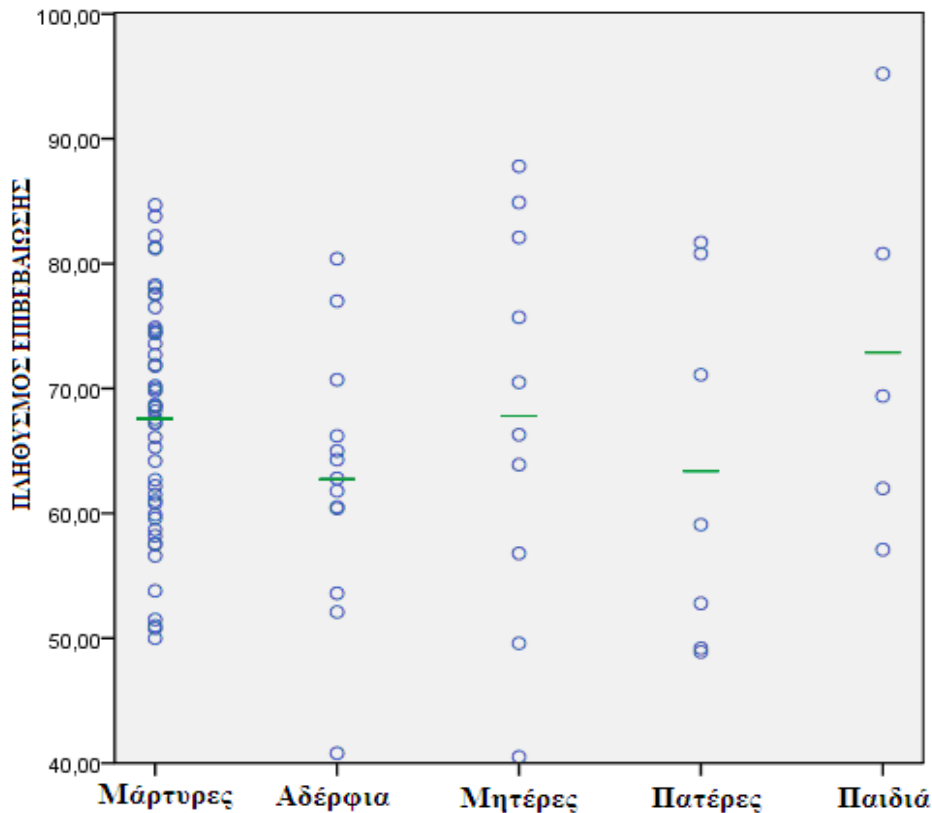
Στις Εικόνες 44, 45 και 46 φαίνεται η διασπορά και ο μέσος όρος για όλους τους συγγενείς και με τους τρεις τρόπους υπολογισμού.



Εικόνα 44. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά του ποσοστού των Τρυθμ και ο μέσος όρος (πράσινη παύλα) στους φυσιολογικούς μάρτυρες και σε κάθε υποπληθυσμό των συγγενών.



Εικόνα 45. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά του ποσοστού των $CD25^+ CD127^{low}$ κυττάρων και ο μέσος όρος (πράσινη παύλα), στους φυσιολογικούς μάρτυρες και σε κάθε υποπληθυσμό των συγγενών.



Εικόνα 46. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά του ποσοστού του πληθυσμού επιβεβαίωσης και ο μέσος όρος (πράσινη παύλα) στους φυσιολογικούς μάρτυρες και σε κάθε υποπληθυσμό των συγγενών.

Η απουσία διαφοράς ως προς το ποσοστό των Τρυθμ απομακρύνει το ενδεχόμενο το ποσοστό των Τρυθμ να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός παράγοντας για την εμφάνιση του ΣΔ1. Ωστόσο, αυτό δε μειώνει τη σημασία του πληθυσμού αυτού στην παθογένεια της νόσου. Σύμφωνα με τα ευρήματα της ερευνητικής μας ομάδας η μείωση του ποσοστού των Τρυθμ είναι περισσότερο εμφανής στα αρχικά στάδια της νόσου, ενώ στους μακράς διάρκειας διαβητικούς εμφανίζεται μερική αντιρρόπηση ([LIna publication...?](#)). Επομένως ακόμη και εάν πολύ κοντά χρονικά πριν την εμφάνιση της νόσου το ποσοστό των Τρυθμ στους συγγενείς μεταβάλλεται, δεν μπορέσαμε να το διαπιστώσουμε καθώς σε κανένα από τα άτομα που μελετήσαμε δεν εμφανίστηκε, τουλάχιστον για το επόμενο εξάμηνο, η νόσος. Ακολουθεί στη συνέχεια φαινοτυπική ανάλυση των Τρυθμ με στόχο την ανίχνευση ποιοτικών διαφορών που μπορούν να συσχετιστούν με την παθογένεια της νόσου.

2.2 Ποσοτικές διαφορές των υποπληθυσμών των Τρυθμ

Στον πίνακα 11 βλέπουμε τις διαφοροποιήσεις των ποσοστών των τριών υποπληθυσμών με βάση την τεχνική Miyaga και συνεργατών 2009, μεταξύ συγγενών και φυσιολογικών μαρτύρων.

Πίνακας 11. Σύγκριση των ποσοστών των υποπληθυσμών των Τρυθμ (I- rTregs, II- aTregs και III- non-Tregs) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

ΟΜΑΔΑ	I	p ¹	II	p ¹	III	p ¹
Μάρτυρες (44)	2,1 ± 0,9		1,3 ± 0,4		1,7 ± 0,5	
Αδέρφια (10)	2,6 ± 0,9	ns ²	1,2 ± 0,3	ns	1,7 ± 0,7	ns
Μητέρες (10)	2,3 ± 1	ns	1 ± 0,3	ns	1,6 ± 0,5	ns
Πατέρες (7)	2 ± 0,9	ns	1,1 ± 0,4	ns	1,6 ± 0,2	ns
Παιδιά (3)	2,7 ± 1,3	ns	1,5 ± 1	ns	1,8 ± 0,6	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

Για κανένα από τους υποπληθυσμούς και σε κανένα από τους συγγενείς δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το ποσοστό των ενεργοποιημένων (aTregs-πληθυσμός II), των μη ενεργοποιημένων (rTregs-πληθυσμός I), και των μη κατασταλτικών (non-Tregs-πληθυσμός III) FoxP3⁺ κυττάρων T. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι αν και έχει γίνει μελέτη των διαφορών των υποπληθυσμών σε άτομα με ΣΕΛ [21] λίγες μελέτες έχουν γίνει σχετικά με το ΣΔ1. Ιδιαίτερης αναφοράς χρήζει η μελέτη των Ferrara και συν. η οποία αφορούσε μελέτη των υποπληθυσμών σε παγκρεατικούς λεμφαδένες διαβητικών σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες και δεν ανέδειξε κάποια ποσοτική μεταβολή [177].

3. Μελέτη έκφρασης σημαντικών μορίων στους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T και μελέτη των διαφορών έκφρασης μεταξύ πρώτου βαθμού συγγενών διαβητικών και φυσιολογικών μαρτύρων.

3.1 CD122/ CD132

3.1.2 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

Μελετήσαμε τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του CD122 (IL-2R β) μεταξύ των διαφόρων υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T. Όπως ήταν αναμενόμενο τα Τρυθμ εκφράζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό την αλυσίδα β σε σχέση τόσο με τα Τδραστ όσο και με τα Τπαρθ και με μεγαλύτερη ένταση φθορισμού. Η μελέτη έγινε με τη χρήση και των δύο φθοριοχρωμάτων PE και FITC (Πίνακας 12, Εικόνα 47).

Πίνακας 12. Σύγκριση της έκφρασης των CD122 FITC και CD122 PE στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

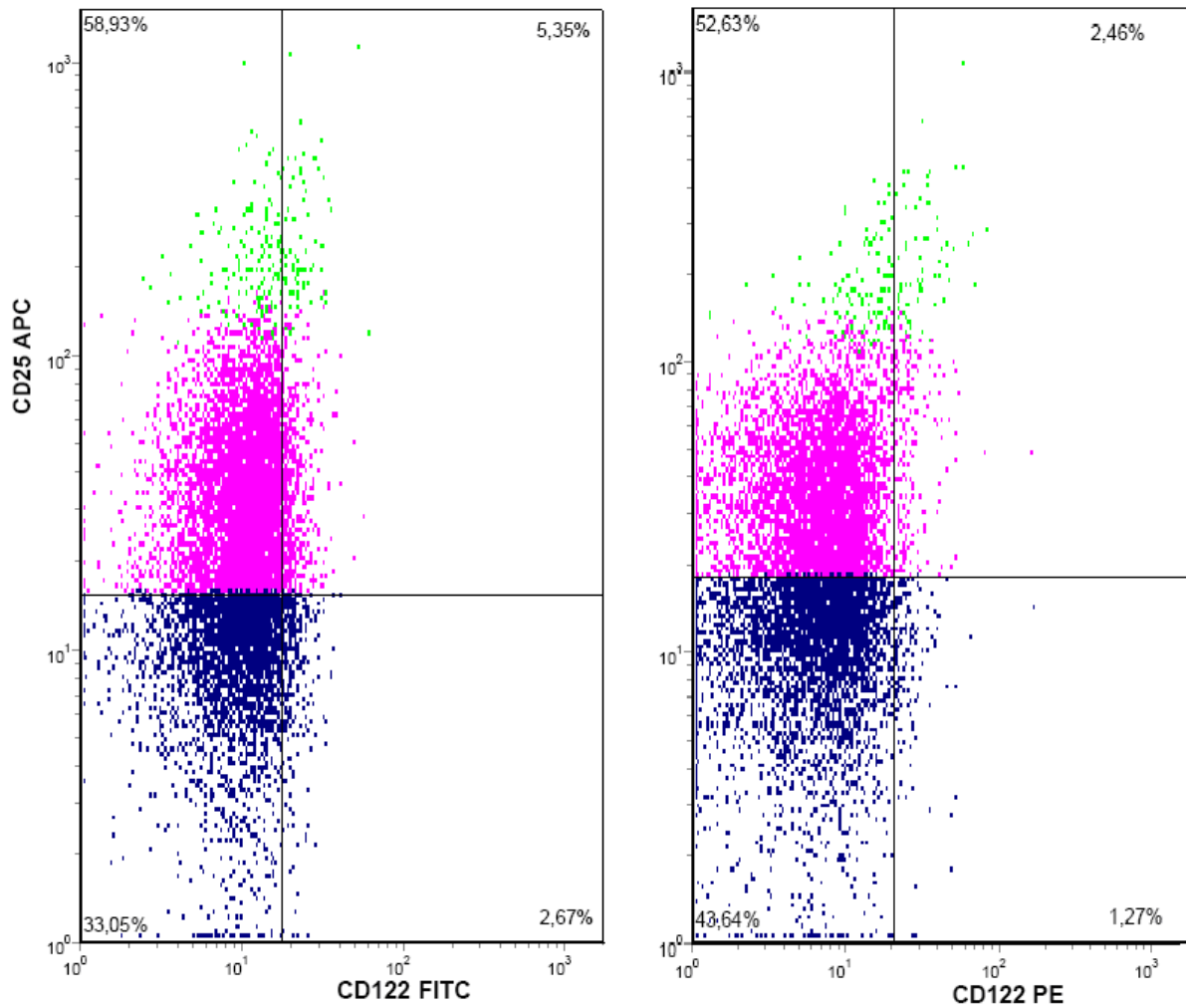
	% Θετικά CD122 FITC	p ¹	MFI ³ CD122 FITC	p ¹	% Θετικά CD122 PE	p ¹	MFI CD122 PE	p ¹
Τρυθμ	19,7 ± 14,1		33,8 ± 11,3		54,4 ± 25		36,7 ± 46,6	
Τδραστ	11,4 ± 13,3	<0,001	36,5 ± 14,1	ns ²	29,8 ± 22,6	<0,001	32,5 ± 45,7	0,001
Τπαρθ	9,8 ± 18	<0,001	39,5 ± 14,6	<0,05	16,2 ± 12,2	<0,001	32,3 ± 40,9	0,002

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

Ανεξάρτητα από το αντίσωμα, η καταστολή των CD122⁺ κυττάρων είναι παρόμοια.



Εικόνα 47. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση του CD122 (σε PE και FITC αντίστοιχα) στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε –Τπαρθ (G6))

Στο μεγαλύτερο ποσοστό τους τα Τρυθμ όπως και τα υπόλοιπα CD4⁺ κύτταρα T εκφράζουν την αλυσίδα γ του υποδοχέα της IL-2 (CD132) και η μέση ένταση φθορισμού είναι μεγαλύτερη σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο σε σχέση με τα Τπαρθ (Πίνακας 13, Εικόνα 48).

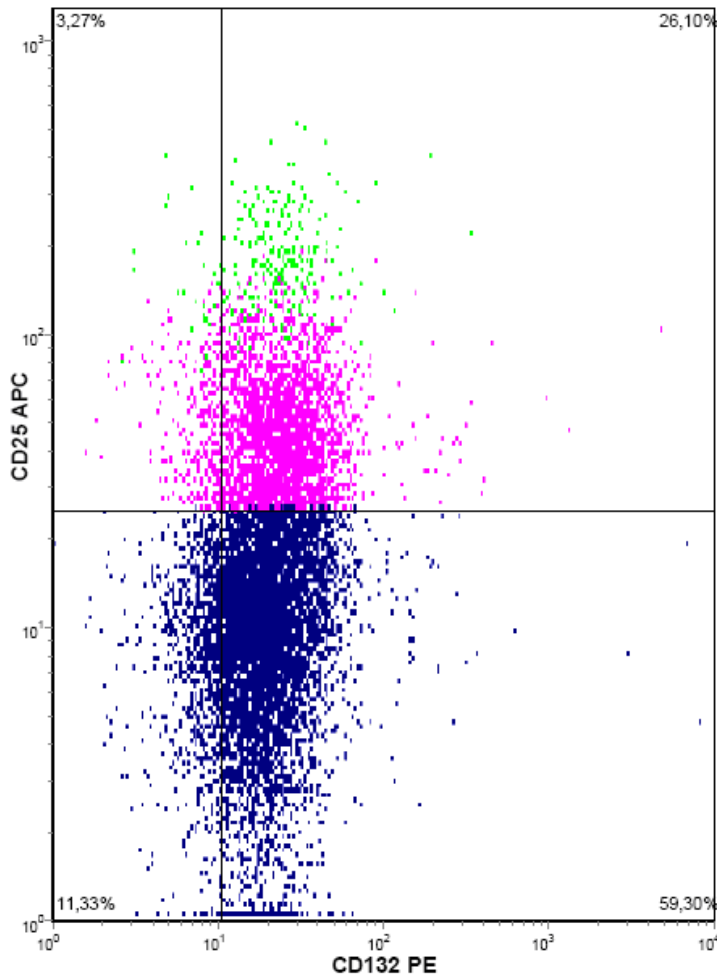
Πίνακας 13. Σύγκριση της έκφρασης του CD132 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

	% θετικά CD132	p ¹	MFI ³ CD132	p ¹
Τρυθμ	85 ± 14,3		35,4 ± 16,3	
Τδραστ	90 ± 10	<0,001	33,8 ± 14	ns
Τπαρθ	84,1 ± 14,1	ns ²	28,6 ± 11,5	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού



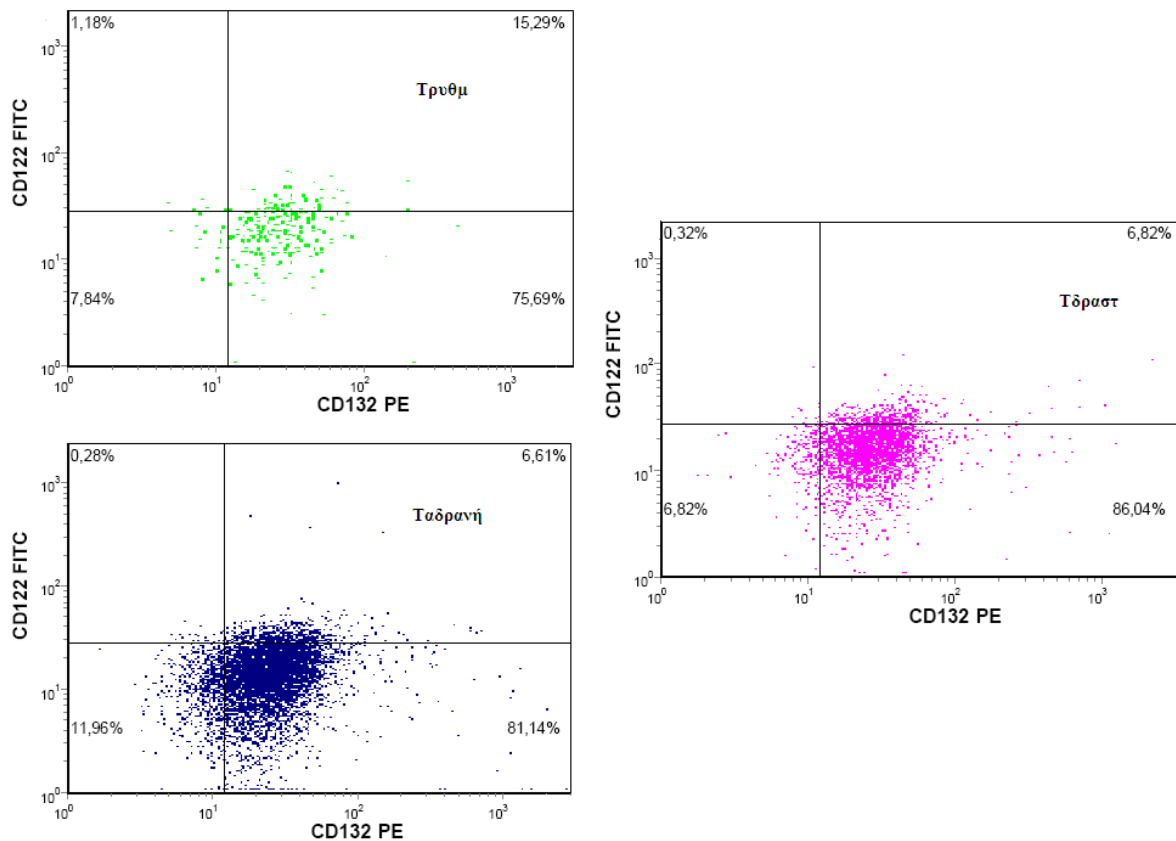
Εικόνα 48. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση του CD132 στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε-Τπαρθ (G6))

Όσον αφορά τη συνέκφραση των αλυσίδων β και γ (CD122CD132) βλέπουμε ότι αφορά σε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό τα Τρυθμ σε σχέση με τα υπόλοιπα CD4⁺ λεμφοκύτταρα T (Πίνακας 14, Εικόνα 49).

Πίνακας 14. Σύγκριση της συνέκφρασης των CD122- CD132 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

	% θετικά CD122CD132	p ¹
Τρυθμ	16,7±9	
Τδραστ	7,8±5,4	<0,001
Τπαρθ	5,2±4,1	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ



Εικόνα 49. Κυτταρογράμματα με βάση την συνέκφραση των CD122 - CD132 στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς $CD4^+$ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό-Τδραστ (G5), μπλε -Τπαρθ (G6))

Επομένως, εκτός από την υψηλή έκφραση της αλυσίδας α του υποδοχέα της IL-2 που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό των Τρυθμ η αυξημένη έκφραση των αλυσίδων β και γ είναι συμβατή με τη γνωστή από τη βιβλιογραφία αυξημένη έκφραση του υποδοχέα της IL-2 στα Τρυθμ. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τους μηχανισμούς δράσης των Τρυθμ καθώς η αυξημένη πρόσδεση της IL-2 είναι απαραίτητη για την έκφραση του βασικού μεταγραφικού παράγοντα FoxP3.

3.1.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

Στα πλαίσια της αναζήτησης φαινοτυπικών μεταβολών των Τρυθμ στους συγγενείς ατόμων με ΣΔ1 έγινε μελέτη της έκφρασης του CD122 (FITC και PE) και CD132 στα άτομα αυτά και σύγκρισή τους με φυσιολογικούς μάρτυρες (Πίνακας 15, 16 και 17 αντίστοιχα). Στους πίνακες βλέπουμε και τις αντίστοιχες συγκρίσεις για τα υπόλοιπα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα T καθώς οποιαδήποτε μεταβολή θα μπορούσε να εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου.

Καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή δεν παρατηρείται κατά την μελέτη της έκφρασης του CD122 και με τα δύο φθοριοχρώματα. Η παρατηρούμενη μείωση της μέσης έντασης φθορισμού στα Τπαρθ των παιδιών, πιθανότατα οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων.

Πίνακας 15. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD122 FITC των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD122 ⁺ FITC Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD122 ⁺ FITC Τρυθμ	p ¹	% CD122 ⁺ FITC Τδραστ	p ¹	MFI CD122 ⁺ FITC Τδραστ	p ¹	% CD122 ⁺ FITC Τπαρθ	p ¹	MFI CD122 ⁺ FITC Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (28) ⁴	19,7 ± 14,1		33,8 ± 11,3		11,4 ± 13,3		36,5 ± 14,1		9,8 ± 18		39,5 ± 14,6	
Αδέρφια (8)	13,7 ± 5,2	ns ²	34,3 ± 10,4	ns	9,3 ± 6,6	ns	53,4 ± 52,2	ns	5,2 ± 4,5	ns	74,8 ± 78,8	ns
Μητέρες (9)	12,4 ± 9,7	ns	24,9 ± 7	ns	5,2 ± 3,7	ns	35 ± 24,6	ns	3,5 ± 2,7	ns	31,2 ± 10,9	ns
Πατέρες (7)	20,4 ± 7,0	ns	29 ± 6,9	ns	6,6 ± 3,4	ns	40,9 ± 23,3	ns	5,3 ± 3,1	ns	37,3 ± 17	ns
Παιδιά (3)	16 ± 3	ns	20,5 ± 0,7	ns	6,6 ± 1,2	ns	20	ns	2,5 ± 0,7	ns	20,5 ± 0,7	<0,001

Πίνακας 16. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD122 PE των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD122 ⁺ PE Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD122 ⁺ PE Τρυθμ	p ¹	% CD122 ⁺ PE Τδραστ	p ¹	MFI CD122 ⁺ PE Τδραστ	p ¹	% CD122 ⁺ PE Τπαρθ	p ¹	MFI CD122 ⁺ PE Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (28) ⁴	54,4 ± 25		36,7 ± 46,6		29,8 ± 22,6		32,5 ± 45,7		16,2 ± 12,2		32,3 ± 40,9	
Αδέρφια (6)	46,8 ± 30,5	ns ²	46,7 ± 23,4	ns	30 ± 35,7	ns	32,5 ± 12	ns	10,6 ± 11,4	ns	37,7 ± 20	ns
Μητέρες (4)	71,8 ± 12,6	ns	30,5 ± 17,6	ns	41,1 ± 23,2	ns	25 ± 15,5	ns	22,2 ± 13	ns	26,3 ± 17,3	ns
Πατέρες (4)	45 ± 20,7	ns	30,3 ± 7,7	ns	10,2 ± 7,1	0,02	26 ± 6,5	ns	9,1 ± 8	ns	25,3 ± 6,8	ns
Παιδιά (3)	51,1 ± 10,4	ns	21,7 ± 9,9	ns	31,2 ± 15,4	ns	13,3 ± 2,1	ns	13,2 ± 7,1	ns	13,7 ± 2,3	ns

Πίνακας 17. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD132 PE των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD132 ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD132 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD132 ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI CD132 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD132 ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI CD132 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (28) ⁴	85 ± 14,3		35,4 ± 16,3		90 ± 10		33,8 ± 14		84,1 ± 14,1		28,6 ± 11,5	
Αδέρφια (6)	80,9 ± 18	ns ²	41,5 ± 6,4	ns	88,3 ± 13,5	ns	44,7 ± 3,9	<0,05	79,3 ± 21,2	ns	39,3 ± 7,7	ns
Μητέρες (10)	91,1 ± 14,1	ns	45,7 ± 16,2	ns	92,3 ± 13,6	ns	42,7 ± 17	ns	88,2 ± 18,6	ns	35,4 ± 13	ns
Πατέρες (7)	95,4 ± 3,8	0,002	44,8 ± 15,1	ns	96,8 ± 3,8	ns	46,3 ± 14,2	0,043	94,2 ± 6,4	ns	39,4 ± 11,9	0,033
Παιδιά (3)	83 ± 2,3	ns	16,5 ± 0,7	<0,001	91,7 ± 0,3	ns	19 ± 1,4	ns	84,1 ± 1,8	ns	15 ± 1,4	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες, ²: ns = στατιστικά μη σημαντικό, ³: MFI= μέση ένταση φθορισμού, ⁴: Αριθμός δειγμάτων

Όσον αφορά την έκφραση του CD132 παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική μεταβολή στο ποσοστό του στα Τρυθμ και μια μείωση στη μέση ένταση φθορισμού στα παιδιά. Επίσης παρατηρείται αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού του δείκτη στα Τδραστ τόσο στα αδέρφια όσο και στους πατέρες ενώ στους τελευταίους παρατηρείται μια αντίστοιχη αύξηση και στα Τπαρθ. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 18, καμία μεταβολή δεν παρατηρείται σε κανέναν από τους συγγενείς, όσον αφορά τα ποσοστά συνέκφρασης των δύο αλυσίδων που πιθανώς αντιστοιχούν στο λειτουργικό υποδοχέα.

Πίνακας 18. Σύγκριση του ποσοστού συνέκφρασης των CD122CD132 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD122CD132 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD122CD132 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD122CD132 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (28)³	16,7 ± 9		7,8 ± 5,4		5,2 ± 4,1	
Αδέρφια (5)	15,1 ± 4,6	ns ²	8,8 ± 7,4	ns	4,5 ± 3,6	ns
Μητέρες (10)	11,3 ± 9,8	ns	4,5 ± 3,9	ns	3,1 ± 2,7	ns
Πατέρες (7)	20,7 ± 7,8	ns	7 ± 3,8	ns	5,6 ± 3,4	ns
Παιδιά (3)	10,3 ± 8,4	ns	4,8 ± 3,2	ns	1,9 ± 1,3	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες

²: ns = στατιστικά μη σημαντικό

³: Αριθμός δειγμάτων

3.2 TGF-β/ TGF-βRII

3.2.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

Συγκρίνοντας σε φυσιολογικούς μάρτυρες τη διαφορά της έκφρασης του TGF-β στις υποομάδες των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού στα Τπαρθ, εύρημα που πιθανώς σχετίζεται με τη διαφορά δράσης καθώς τα Τπαρθ θεωρούνται ανενεργά (Πίνακας 19).

Πίνακας 19. Σύγκριση της έκφρασης του TGF-β στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

(33) ⁴	% θετικά TGF-β	p ¹	MFI ³ TGF-β	p ¹
Τρυθμ	7,9 ± 5,4		63,5 ± 72,1	
Τδραστ	7,6 ± 7,3	ns ²	34 ± 17,1	ns
Τπαρθ	6,2 ± 5,4	0,013	28,6 ± 11,5	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

⁴: Αριθμός δειγμάτων

Όπως φαίνεται στον πίνακα 20 το ποσοστό των Τρυθμ που εκφράζουν τον υποδοχέα TGF-βRII είναι χαμηλότερο σε σχέση με τα Τδραστ, ένα γεγονός που ενδέχεται να σχετίζεται με

το γεγονός ότι μέσω πρόσδεσης του TGF-β στον υποδοχέα τα Τρυθμ έχουν στόχο να ασκήσουν την κατασταλτική τους δράση.

Πίνακας 20. Σύγκριση της έκφρασης του TGF-βRII στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

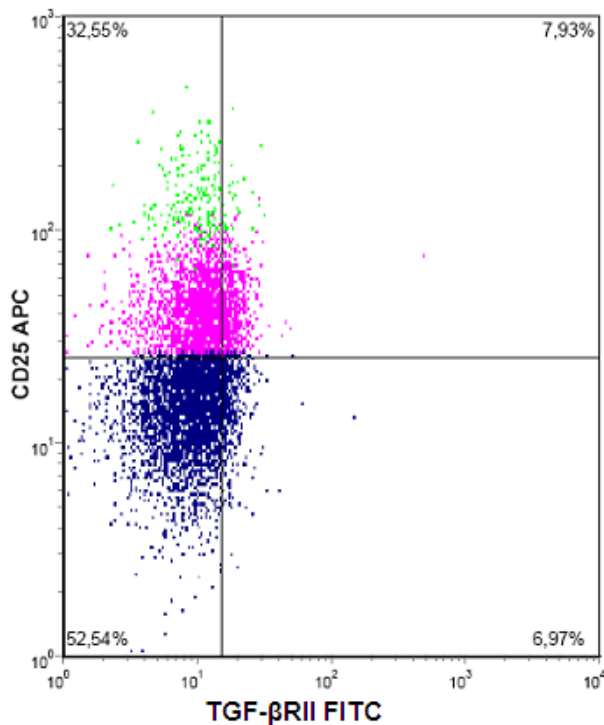
(38) ⁴	% θετικά TGF-βRII	p ¹	MFI ³ TGF-βRII	p ¹
Τρυθμ	8,4 ± 8,9		43,8 ± 43	
Τδραστ	13,4 ± 13	<0,001	33,3 ± 18,2	ns
Τπαρθ	12,1 ± 17,2	ns ²	32,6 ± 13,4	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

⁴: Αριθμός δειγμάτων



Εικόνα 50. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση του TGF-βRII στους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφ. Τ (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε –Τπαρθ (G6))

Ωστόσο, καμιά διαφοροποίηση ως προς το ποσοστό συνέκφρασης των δύο μορίων δεν παρατηρείται μεταξύ των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων Τ (Πίνακας 21). Πρέπει να επισημάνουμε ότι τα ποσοστά αυτό είναι ιδιαίτερα χαμηλά, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα μόρια του TGF-β που ανιχνεύουμε στην κυτταρική μεμβράνη στο μεγαλύτερό τους ποσοστό δεν είναι προσδεδεμένα με τον υποδοχέα.

3.2.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

Κατά τη σύγκριση της έκφρασης του TGF-β μεταξύ φυσιολογικών μαρτύρων και συγγενών πρώτου βαθμού βλέπουμε μια στατιστικά σημαντική μείωση τόσο στο ποσοστό όσο και στη μέση ένταση φθορισμού στα Τρυθμ των αδερφών και των μητέρων. Στα αδέρφια παρατηρείται επίσης μείωση της μέσης έντασης φθορισμού στα Τδραστ και μείωση του

ποσοστού των Τπαρθ περίπου στο μισό. Στις μητέρες παρατηρείται επίσης μείωση του ποσοστού των Τπαρθ που εκφράζουν TGF-β. Τόσο στους πατέρες όσο και στα παιδιά δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές. Με λεπτομέρεια τα στοιχεία φαίνονται στον πίνακα 23.

Πίνακας 21. Σύγκριση της συνέκφρασης των CD122- CD132 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(26) ³	% θετικά TGF-β TGF-β RII	p ¹
Τρυθμ	1,4±1,8	
Τδραστ	1,6±1,9	ns ²
Τπαρθ	1,1±1,3	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

³: Αριθμός δειγμάτων

Όσον αφορά τον υποδοχέα TGF-βRII δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή σε κανέναν από τους συγγενείς με εξαίρεση τη μέση ένταση φθορισμού στα Τπαρθ των αδερφών (Πίνακας 24). Τέλος, καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε κατά τη μελέτη της συνέκφρασης των δεικτών (Πίνακας 22).

Πίνακας 22. Σύγκριση του ποσοστού συνέκφρασης των TGF-βTGF-βRII των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% TGF-βTGF-βRII ⁺ Τρυθμ	p ¹	% TGF-βTGF-βRII ⁺ Τδραστ	p ¹	% TGF-βTGF-βRII ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (26)⁴	1,4 ± 1,8		1,6 ± 1,9		1,1 ± 1,3	
Αδέρφια (6)	1,8 ± 2,4	ns ²	1,9 ± 1,8	ns	1,1 ± 1,1	ns
Μητέρες (10)	1,6 ± 1,3	ns	1,7 ± 1,2	ns	1,2 ± 0,8	ns
Πατέρες (7)	1,3 ± 0,8	ns	1 ± 0,4	ns	0,7 ± 0,3	ns
Παιδιά (3)	1,4 ± 0,9	ns	1,4 ± 0,7	ns	0,8 ± 0,3	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες

²: ns = στατιστικά μη σημαντικό

⁴: Αριθμός δειγμάτων

Από τα παραπάνω ευρήματα ιδιαίτερης σημασίας φαίνεται να είναι η μειωμένη έκφραση του TGF-β τόσο στα αδέρφια όσο και στις μητέρες, ιδιαίτερα εάν συνδυαστεί με το γεγονός ότι έχουν βρεθεί μόλις ανιχνεύσιμα ποσοστά στους μακράς διάρκειας διαβητικούς και μειωμένη ένταση φθορισμού στους νεοδιαγνωσθέντες. Δεδομένου ότι ο παράγοντας αυτός αποτελεί ένα από τα μόρια μέσω του οποίου τα Τρυθμ ασκούν την ρυθμιστική τους δράση, η μειωμένη έκφρασή του θα πρέπει να αξιολογηθεί ως ενδεχόμενος προδιαθεσικός παράγοντας για την εμφάνιση της νόσου.

Πίνακας 23. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς TGF-β των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% TGF-β ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ TGF-β ⁺ Τρυθμ	p ¹	% TGF-β ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ TGF-β ⁺ Τδραστ	p ¹	% TGF-β ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ TGF-β ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (33)⁴	7,9 ± 5,4		63,5 ± 72,1		7,6 ± 7,3		34 ± 17,1		6,2 ± 5,4		28,6 ± 11,5	
Αδέρφια (14)	3,5 ± 2,9	0,001	25 ± 13,1	0,005	4,4 ± 4,3	ns	27,4 ± 11,1	0,004	3 ± 3	0,014	31,4 ± 19,2	ns
Μητέρες (10)	4,8 ± 2,3	0,013	29,5 ± 13,8	0,015	4,4 ± 2,4	ns	32,5 ± 16,3	ns	3,5 ± 2,2	0,031	32,2 ± 16	ns
Πατέρες (7)	5,5 ± 3,3	ns ²	43,4 ± 20	ns	5,2 ± 3,2	ns	40,3 ± 14,3	ns	4,6 ± 3,1	ns	33,8 ± 12,8	ns
Παιδιά (5)	8,1 ± 5	ns	31 ± 12,9	ns	8 ± 4,3	ns	45,6 ± 31,7	ns	6,1 ± 3,3	ns	32 ± 12,8	ns

Πίνακας 24. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς TGF-βRII των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% TGF-βRII ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ TGF-βRII ⁺ Τρυθμ	p ¹	% TGF-βRII ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ TGF-βRII ⁺ Τδραστ	p ¹	% TGF-βRII ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ TGF-βRII ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (38)⁴	8,4 ± 8,9		43,8 ± 43		13,4 ± 13		33,3 ± 18,2		12,1 ± 17,2		32,6 ± 13,4	
Αδέρφια (14)	9,5 ± 10,2	ns ²	53,7 ± 111	ns	12,6 ± 13,5	ns	25,4 ± 10,6	ns	9,2 ± 12,2	ns	23,2 ± 13,6	0,029
Μητέρες (10)	8,1 ± 5,3	ns	37,5 ± 27,3	ns	9,7 ± 8	ns	29,9 ± 11,3	ns	7,6 ± 6,1	ns	29,2 ± 8,1	ns
Πατέρες (7)	5,8 ± 6,7	ns	26,6 ± 8	ns	7,9 ± 8,8	ns	38,2 ± 26,5	ns	6,3 ± 7,5	ns	33,4 ± 18,6	ns
Παιδιά (5)	17,6 ± 21,2	ns	43,4 ± 37,3	ns	13,6 ± 12,9	ns	30 ± 14,8	ns	13 ± 14,9	ns	47,6 ± 37,5	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

⁴: Αριθμός δειγμάτων

3.3 HLA-DR/ HLA-DQ/ CD74/ CLIP

3.3.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

Στη συνέχεια μελετήσαμε την έκφραση των μορίων HLA-DR, HLA-DQ, CD74 και CLIP στους υποπληθυσμούς των CD4 λεμφοκυττάρων T.

Η μελέτη για το HLA-DR έγινε με τη χρήση και των δύο φθοριοχρωμάτων, τόσο του PE όσο και του FITC (Πίνακας 25). Όπως είναι ήδη γνωστό τα Τρυθμ εκφράζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό και με μεγαλύτερη ένταση φθορισμού το HLA-DR (Εικόνα 51).

Πίνακας 25. Σύγκριση της έκφρασης των HLA-DR FITC και HLA-DR PE στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

(37) ³ (27) ⁴	% Θετικά HLA-DR FITC	p ¹	MFI ² HLA-DR FITC	p ¹	% Θετικά HLA-DR PE	p ¹	MFI HLA-DR PE	p ¹
Τρυθμ	40,3 ± 13,4		359,1 ± 171,9		47,5 ± 13,9		457,4 ± 160,9	
Τδραστ	9,6 ± 5,8	<0,001	223,5 ± 97,6	<0,001	10,6 ± 6,5	<0,001	310,6 ± 128,5	<0,001
Τπαρθ	9,5 ± 13	<0,001	219,3 ± 129,3	<0,001	9,2 ± 5,7	<0,001	278,4 ± 177,4	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων του HLA-DR FITC

⁴: Αριθμός δειγμάτων του HLA-DR PE

Το ίδιο βλέπουμε να ισχύει και με την έκφραση του HLA-DQ (Πίνακας 26, Εικόνα 51).

Πίνακας 26. Σύγκριση της έκφρασης του HLA-DQ στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(42) ³	% θετικά HLA-DQ	p ¹	MFI ² HLA-DQ	p ¹
Τρυθμ	10,2 ± 10,1		114 ± 121,2	
Τδραστ	6 ± 9,6	<0,001	74,5 ± 63	0,002
Τπαρθ	6 ± 15	0,004	179,9 ± 240,6	0,067

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

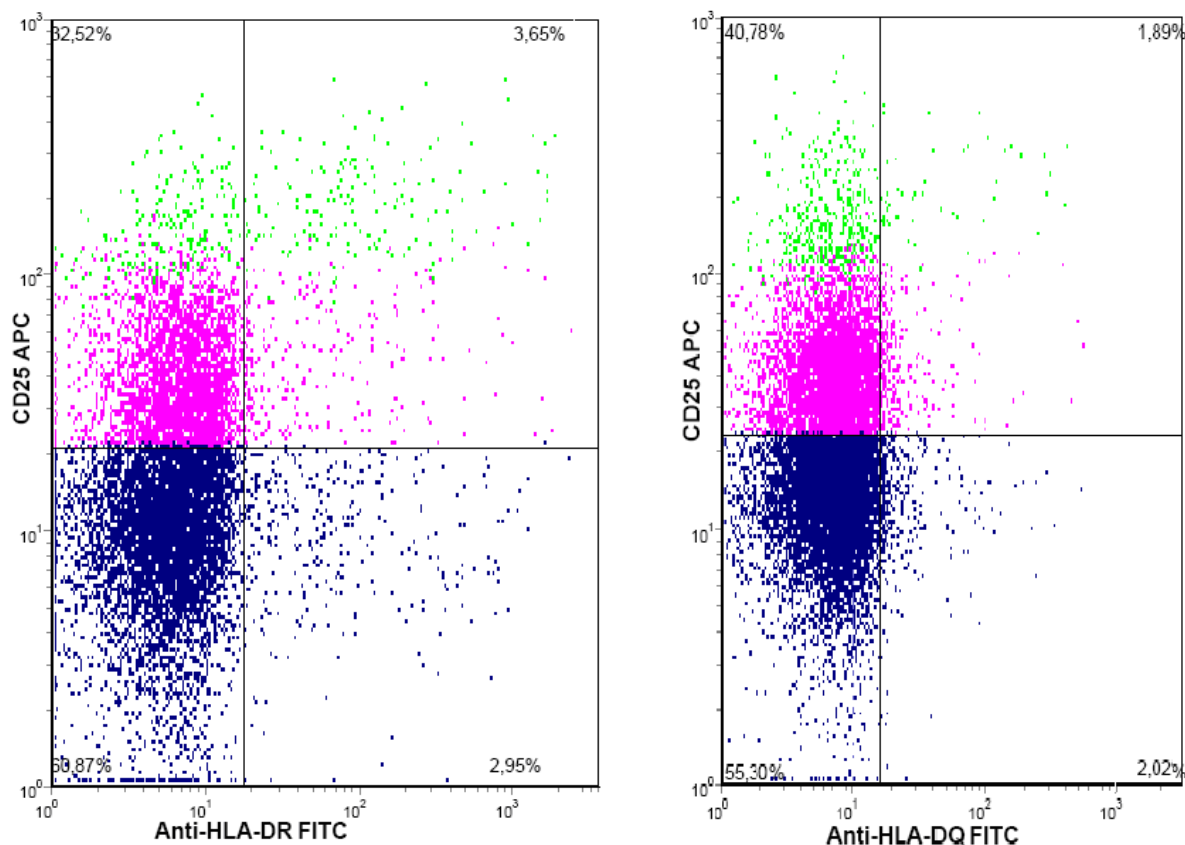
Πίνακας 27. Σύγκριση της συνέκφρασης των HLA-DR HLA-DQ στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

(25) ²	% θετικά HLA-DR HLA-DQ	p ¹
Τρυθμ	5,4 ± 4,3	
Τδραστ	1,1 ± 0,9	<0,001
Τπαρθ	1 ± 0,6	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: Αριθμός δειγμάτων

Παρομοίως, και η συνέκφραση των δύο μορίων είναι υψηλότερη στα Τρυθμ, όπως φαίνεται στον Πίνακα 27, αλλά τα επίπεδα συνέκφρασης των μορίων είναι ιδιαίτερα χαμηλά και ιδιαίτερα στα Τδραστ και στα Τπαρθ μη αξιολογήσιμα .



Εικόνα 51. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση του HLA-DR και HLA-DQ στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε –Τπαρθ (G6))

Σε υψηλότερο ποσοστό και με μεγαλύτερη ένταση φθορισμού εκφράζουν επίσης τα Τρυθμ το CD74 σε σχέση με τα Τδραστ και τα Τπαρθ (Πίνακας 28) και το ίδιο ισχύει και για τον παράγοντα CLIP (Πίνακας 29, Εικόνα 52) και τη συνέκφραση HLA-DRCLIP (Πίνακας 30, Εικόνα 53).

Πίνακας 28. Σύγκριση της έκφρασης του CD74 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(22) ³	% θετικά CD74	p ¹	MFI ² CD74	p ¹
Τρυθμ	9,4±10,3		142,7±223,8	
Τδραστ	6,3±8,6	<0,001	40,6±32,4	0,043
Τπαρθ	5,5±7,4	<0,002	40,5±35,8	0,049

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

Πίνακας 29. Σύγκριση της έκφρασης του CLIP στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

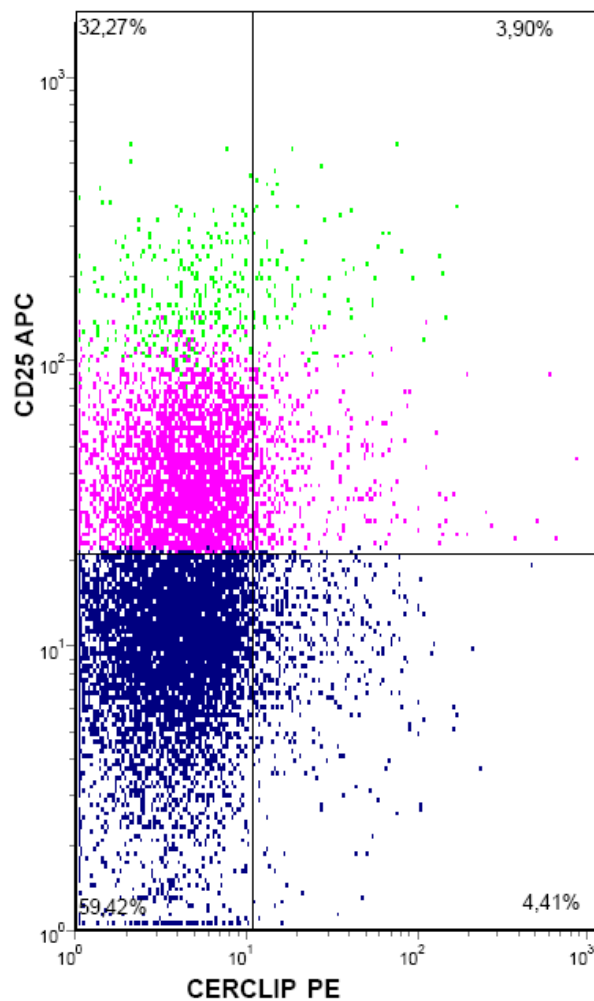
(29) ³	% θετικά CLIP	p ¹	MFI ² CLIP	p ¹
Τρυθμ	17,5±9,5		103,3±19,2	
Τδραστ	7,6±4,5	<0,001	64±56,1	ns ⁴
Τπαρθ	6,1±3,7	<0,001	45,5±35,7	0,029

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

⁴: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό



Εικόνα 52. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση του CLIP στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε -Τπαρθ (G6))

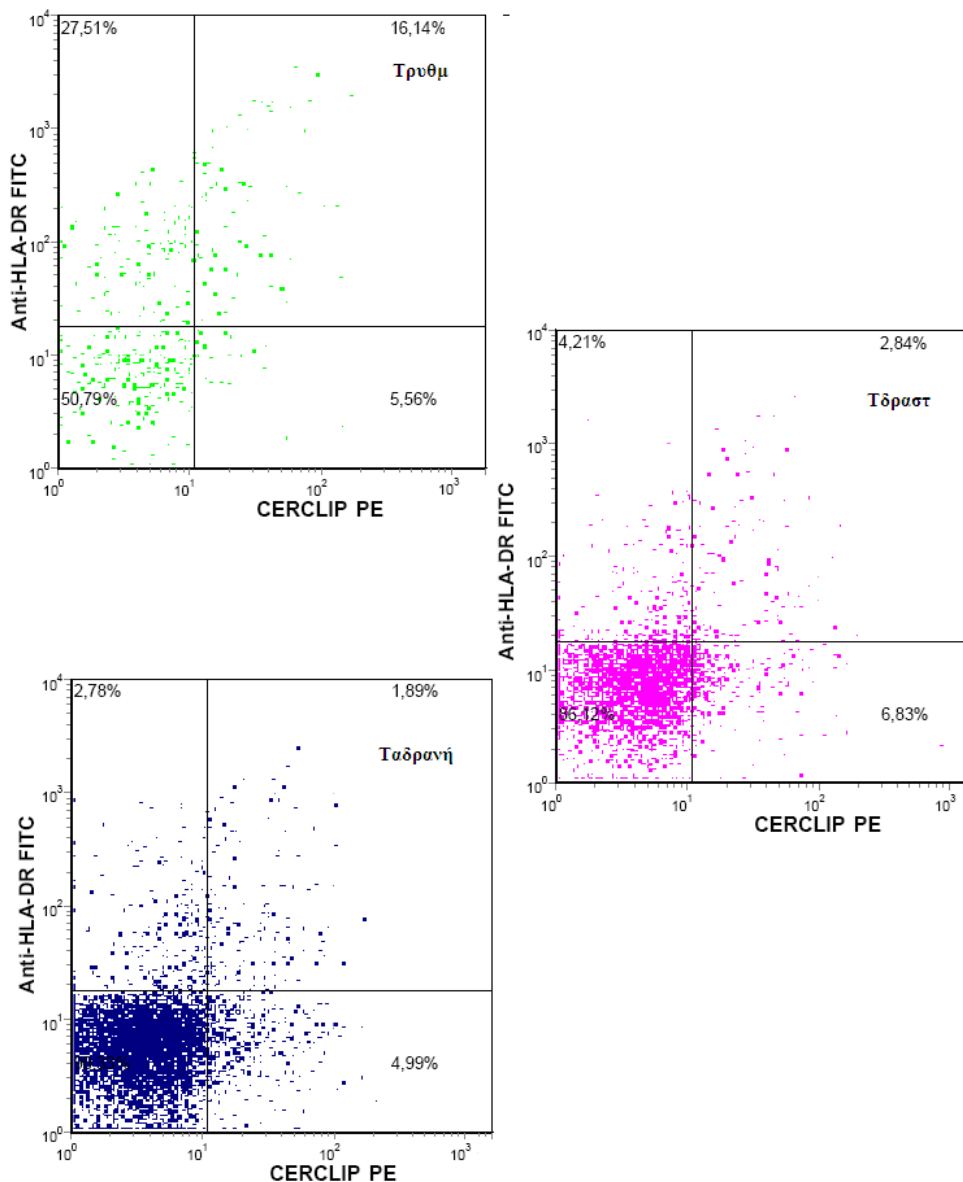
Εάν η αυξημένη έκφραση των μορίων αυτών υποδεικνύει σχέση των Τρυθμ με την αντιγονοπαρουσίαση ή σχετίζεται με το βαθμό ενεργοποίησης ή με την κατασταλτική λειτουργία τους, είναι κάτι που δεν είναι γνωστό και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Πίνακας 30. Σύγκριση της συνέκφρασης των HLA-DR CLIP στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Παρθ.

(25) ²	% θετικά HLA-DR CLIP	p ¹
Τρυθμ	12±7,2	
Τδραστ	2,6±2	<0,001
Παρθ	1,7±0,8	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: Αριθμός δειγμάτων



Εικόνα 53. Κυτταρογράμματα με βάση την συνέκφραση των HLA-DR - CLIP στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε -Τπαρθ (G6))

3.3.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

Κατά τη σύγκριση της έκφρασης του HLA-DR μεταξύ φυσιολογικών μαρτύρων και συγγενών βρέθηκε στα αδέρφια στατιστικά σημαντική μείωση στην MFI των Τρυθμ και των Τπαρθ καθώς και στο ποσοστό των Τδραστ που είναι HLA-DR⁺ (Πίνακας 33). Η MFI του HLA-DQ βρέθηκε μειωμένη στα Τδραστ των αδερφών και στα Τπαρθ των μητέρων (Πίνακας 34), αλλά δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχες μεταβολές όσον αφορά την έκφραση του CD74 (Πίνακας 35) και του CLIP (Πίνακας 36).

Τα ανωτέρω υποδεικνύουν ότι η διαφορά στην έκφραση του HLA-DR των Τρυθμ πιθανώς, δεν έχουν σχέση με τη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης καθώς όλοι οι άλλοι δείκτες που σχετίζονται με την παρουσίαση του πεπτιδίου στην επιφάνεια του κυττάρου δεν εμφανίζουν διαφοροποίηση. Ωστόσο, φαίνεται ότι τα αδέρφια εμφανίζουν διαφορά στο ποσοστό των Τ ρυθμιστικών κυττάρων που είναι ενεργοποιημένα και ενδεχομένως ασκούν την κατασταλτική τους δράση με διαφορετικό τρόπο, όπως περιγράψαμε παραπάνω. Πρέπει να σημειωθεί ότι από αντίστοιχη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας παρατηρήθηκε μείωση στο αντίστοιχο ποσοστό των νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών η οποία όμως αντirroπήθηκε στη συνέχεια στους διαβητικούς μακράς διάρκειας. Περαιτέρω μελέτη της επίδρασης του HLA-DR στην κατασταλτική δράση των Τρυθμ πρέπει να γίνει, ώστε να συσχετίσουμε το ποσοστό έκφρασής του με την προδιάθεση εμφάνισης ΣΔ1.

Η μειωμένη έκφραση στα αδέρφια του HLA-DR εμφανίζεται και στη συνέκφραση του HLA-DR/ HLA-DQ αλλά δεν επηρεάζει την έκφραση του HLA-DR/ CLIP, όπως βλέπουμε στους Πίνακες 31 και 32 αντίστοιχα. Οι διαφορές που παρατηρούμε στη συνέκφραση του HLA-DR/CLIP στα παιδιά θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Πίνακας 31. Σύγκριση του ποσοστού συνέκφρασης των HLA-DR/HLA-DQ⁺ των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων

	% HLA-DR/ HLA-DQ ⁺ Τρυθμ	p ¹	% HLA-DR/ HLA-DQ ⁺ Τδραστ	p ¹	% HLA-DR/ HLA-DQ ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (26) ³	5,4 ± 4,3		1,1 ± 0,9		1 ± 0,6	
Αδέρφια (6)	1,6 ± 0,7	<0,001	0,9 ± 0,8	ns	1,4 ± 0,7	ns
Μητέρες (10)	4,1 ± 3,9	ns	0,8 ± 0,5	ns	1 ± 0,6	ns
Πατέρες (7)	10,6 ± 9,6	ns	1 ± 0,8	ns	1,1 ± 0,6	ns
Παιδιά (3)	2,2 ± 1,6	ns	0,2 ± 0,2	ns	0,4 ± 0,3	ns

Πίνακας 32. Σύγκριση του ποσοστού συνέκφρασης των HLA-DR/CLIP των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων

	% HLA-DR/ CLIP ⁺ Τρυθμ	p ¹	% HLA-DR/ CLIP ⁺ Τδραστ	p ¹	% HLA-DR/ CLIP ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (26) ³	12 ± 7,2		2,6 ± 2		1,7 ± 0,8	
Αδέρφια (6)	15,8 ± 9,6	ns	4,3 ± 2,7	ns	2,2 ± 1,6	ns
Μητέρες (9)	10,7 ± 6,5	ns	2,1 ± 1,7	ns	1,7 ± 1,3	ns
Πατέρες (7)	23,9 ± 22,7	ns	11 ± 22,6	ns	9,4 ± 17,9	ns
Παιδιά (3)	4,8 ± 1,1	<0,001	1,1 ± 0,6	ns	0,7 ± 0,1	<0,01

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες ²: ns = στατιστικά μη σημαντικό

³: Αριθμός δειγμάτων

Πίνακας 33. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς HLA-DR των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% HLA-DR ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ HLA-DR ⁺ Τρυθμ	p ¹	% HLA-DR ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ HLA-DR ⁺ Τδραστ	p ¹	% HLA-DR ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ HLA-DR ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (37)⁴	40,3 ± 13,4		359,1 ± 171,9		9,6 ± 5,8		223,5 ± 97,6		9,5 ± 13		219,3 ± 129,3	
Αδέρφια (15)	29,8 ± 9,2	0,08	279,7 ± 97,6	0,042	6,2 ± 2,3	0,032	196 ± 34,2	ns	4,3 ± 3,9	ns	164,9 ± 60,5	0,045
Μητέρες (9)	47 ± 15,1	ns ²	287,7 ± 82,5	0,081	7,8 ± 4,6	ns	234,7 ± 44	ns	7 ± 3,9	ns	187,3 ± 51,9	ns
Πατέρες (7)	48,3 ± 14,5	ns	277,4 ± 152,3	ns	14,7 ± 21,7	ns	195,9 ± 138,7	ns	14,4 ± 16,6	ns	183,7 ± 133,6	ns
Παιδιά (5)	31,5 ± 13	ns	411,4 ± 295,5	ns	5,6 ± 2,1	ns	177,4 ± 37,7	ns	4,4 ± 3,1	ns	179 ± 69,9	ns

Πίνακας 34. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς HLA-DQ των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% HLA-DQ ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ HLA-DQ ⁺ Τρυθμ	p ¹	% HLA-DQ ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ HLA-DQ ⁺ Τδραστ	p ¹	% HLA-DQ ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ HLA-DQ ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (38)⁴	10,2 ± 10,1		114 ± 121,2		6 ± 9,6		74,5 ± 63		6 ± 15		179,9 ± 240,6	
Αδέρφια (15)	6,1 ± 5	ns ²	136,2 ± 65,7	ns	3,1 ± 3,2	ns	142,5 ± 103,9	0,028	3,8 ± 8,9	ns	186,8 ± 178	ns
Μητέρες (9)	6 ± 4,6	ns	86,6 ± 60,9	ns	3,4 ± 2,7	ns	95,7 ± 72,1	ns	2,6 ± 1,7	ns	398,3 ± 301	0,018
Πατέρες (7)	9,6 ± 9,7	ns	91,8 ± 61,5	ns	3,3 ± 2,8	ns	54,5 ± 28,9	ns	2,6 ± 2	ns	266,1 ± 254,1	ns
Παιδιά (5)	6 ± 5,6	ns	156,2 ± 81	ns	1,7 ± 1,3	ns	49,6 ± 47,4	ns	1,1 ± 0,7	ns	128 ± 57	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες

²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό

³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

⁴: Αριθμός δειγμάτων

Πίνακας 35. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD74 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD74 ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD74 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD74 ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ CD74 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD74 ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ CD74 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (38)⁴	9,4 ± 10,3		142,7 ± 223,8		6,3 ± 8,6		40,6 ± 32,4		5,5 ± 7,4		40,5 ± 35,8	
Αδέρφια (15)	2,9 ± 2,8	ns ²	1423 ± 1399	ns	1,6 ± 1,7	ns	32 ± 20,1	ns	17,4 ± 39,9	ns	26,8 ± 7,8	ns
Μητέρες (9)	4,4 ± 1,7	ns	770,4 ± 1126,5	ns	1,9 ± 2,2	ns	43,2 ± 30,7	ns	1,8 ± 2	ns	33,7 ± 19,1	ns
Πατέρες (7)	5,6 ± 3,4	ns	1473,5 ± 1525,1	0,043	1,4 ± 0,8	ns	42,8 ± 24,7	ns	2,3 ± 1,9	ns	33 ± 16,4	ns
Παιδιά (5)	8,3 ± 2,4	ns	32,7 ± 17,2	ns	6,3 ± 1,3	ns	23,7 ± 13,6	ns	4,2 ± 1,3	ns	17,3 ± 6	ns

Πίνακας 36. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CLIP των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CLIP ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CLIP ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CLIP ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ CLIP ⁺ Τδραστ	p ¹	% CLIP ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ CLIP ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (29)⁴	17,5 ± 9,5		103,3 ± 19,2		7,6 ± 4,5		64 ± 56,1		6,1 ± 3,7		45,5 ± 35,7	
Αδέρφια (6)	37,7 ± 32,6	ns ²	55,2 ± 24,4	ns	36,9 ± 41,5	ns	68,5 ± 52,6	ns	29,1 ± 36	ns	45,7 ± 17,4	ns
Μητέρες (10)	14,5 ± 5,6	ns	51,9 ± 23,9	ns	6,6 ± 2,7	ns	50,6 ± 21,5	ns	5,8 ± 2,7	ns	46,5 ± 22,4	ns
Πατέρες (8)	28,8 ± 28,7	ns	63,6 ± 23,7	ns	18,4 ± 31,8	ns	72,1 ± 27,6	ns	18 ± 31,9	ns	62,5 ± 24,8	ns
Παιδιά (3)	10,3 ± 2,3	ns	59 ± 71,9	ns	5,2 ± 1,1	ns	19 ± 5,6	ns	3,5 ± 0,4	ns	18,3 ± 4,2	ns

Πίνακας 37. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD44 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD44 ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD44 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD44 ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ CD44 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD44 ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ CD44 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (21)⁴	99,3 ± 1,6		143,1 ± 226,7		99,2 ± 2,2		161,9 ± 228,7		99,1 ± 2,3		133,2 ± 199,4	
Αδέρφια (6)	98,4 ± 1,7	ns ²	73,3 ± 26	ns	99 ± 1,1	ns	87,2 ± 27,5	ns	97,7 ± 4	ns	61,2 ± 18,3	ns
Μητέρες (10)	98,8 ± 3	ns	82,7 ± 25,5	ns	99,4 ± 1,2	ns	94,1 ± 36,2	ns	98,8 ± 2,9	ns	69,8 ± 27	ns
Πατέρες (7)	99,3 ± 1,1	ns	88,8 ± 21,9	ns	99,8 ± 0,2	ns	92 ± 22,2	ns	99,7 ± 0,4	ns	76,3 ± 15,2	ns
Παιδιά (3)	76,5 ± 40,1	ns	46 ± 21,7	ns	81,5 ± 31,3	ns	55 ± 26,9	ns	78 ± 37,8	ns	46,3 ± 22,3	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες ²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό ³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού ⁴: Αριθμός δειγμάτων

3.4 CD44

3.4.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

Μελετώντας τη έκφραση του CD44 στους διάφορους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T δεν παρατηρούμε καμία διαφοροποίηση καθώς σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα φαίνεται ότι εκφράζουν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους το δείκτη αυτό. Να σημειωθεί ότι τα Τδραστ εκφράζουν το CD44 με υψηλότερη MFI σε σχέση τα Τρυθμ (Πίνακας 38).

Πίνακας 38. Σύγκριση της έκφρασης του CD44 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(21) ³	% θετικά CD44	p ¹	MFI ² CD44	p ¹
Τρυθμ	99,3 ± 1,6		143,1 ± 226,7	
Τδραστ	99,2 ± 2,2	ns ²	161,9 ± 228,7	<0,001
Τπαρθ	99,1 ± 2,3	ns	133,2 ± 199,4	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

3.4.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

Παρομοίως δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή τόσο στο ποσοστό έκφρασης όσο και στη μέση ένταση φθορισμού σε κανένα από τους συγγενείς (Πίνακας 37).

3.5 CD28/ CD152/ CD27

3.5.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

Μελετήθηκε αρχικά η έκφραση του CD28, του CD152 και CD27 στην επιφάνεια των CD4⁺ κυττάρων T.

Όπως βλέπουμε και στον Πίνακα 39 στην πλειοψηφία τους τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα T εκφράζουν το CD28 με ένα πολύ μικρό ποσοστό στα Τπαρθ να μην το εκφράζει και την μέση ένταση φθορισμού να είναι μεγαλύτερη στα Τδραστ και μικρότερη στα Τπαρθ (Εικόνα 54).

Πίνακας 39. Σύγκριση της έκφρασης του CD28 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

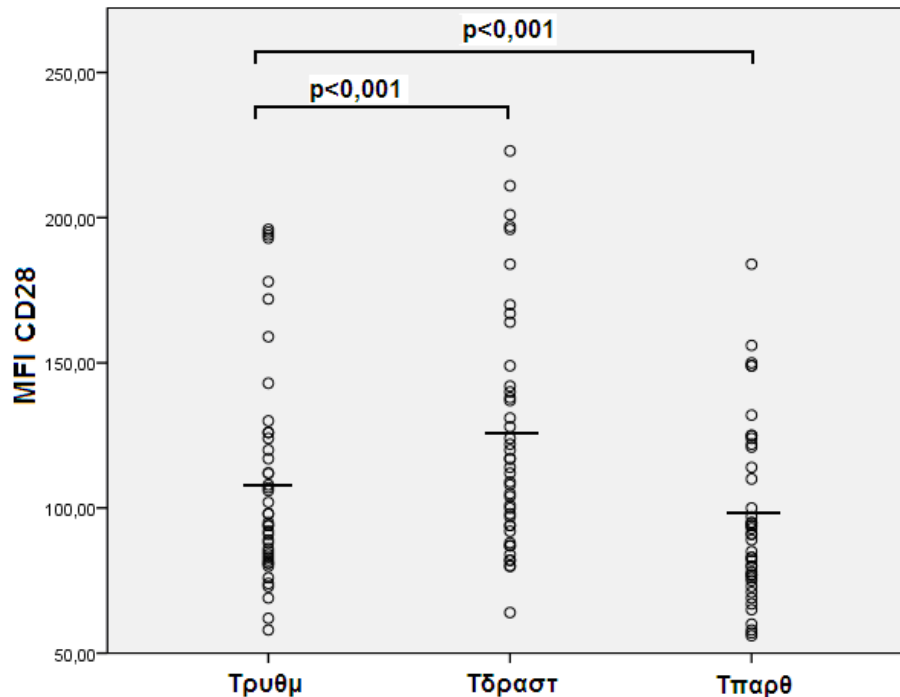
(43) ³	% θετικά CD28	p ¹	MFI ² CD28	p ¹
Τρυθμ	99,7 ± 1		110,1 ± 38,1	
Τδραστ	99,7 ± 0,7	ns ²	124,2 ± 40,3	<0,001
Τπαρθ	97 ± 4,9	<0,001	96,6 ± 30,2	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

Το CD27 όπως γνωρίζουμε ήδη από τη βιβλιογραφία εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα Τρυθμ και στα Τπαρθ σε σχέση με τα Τδραστ (Πίνακας 40, Εικόνα 56A).



Εικόνα 54. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) του CD28 και ο μέσος όρος (παύλα) στα Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ.

Πίνακας 40. Σύγκριση της έκφρασης του CD27 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(38) ³	% θετικά CD27	p ¹	MFI ² CD27	p ¹
Τρυθμ	87,8 ± 25,9		149,9 ± 114,7	
Τδραστ	79 ± 23,2	<0,001	121,3 ± 62	ns ²
Τπαρθ	85 ± 25,6	0,017	136,6 ± 70,2	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

Επίσης, τα Τρυθμ εκφράζουν σε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό και με μεγαλύτερη ένταση φθορισμού το CD152 (Πίνακας 41, Εικόνα 55, Εικόνα 56B). Ωστόσο πρέπει να επισημάνουμε ότι τα επίπεδα έκφρασης είναι αρκετά χαμηλά σε σχέση με αυτά που αναμέναμε με βάση τη βιβλιογραφία.

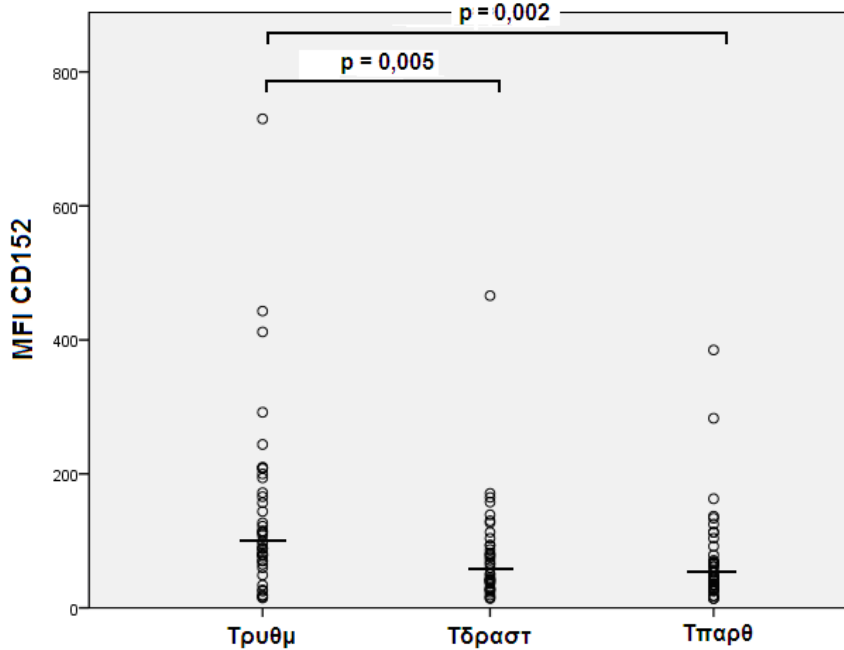
Πίνακας 41. Σύγκριση της έκφρασης του CD152 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(44) ³	% θετικά CD152	p ¹	MFI ² CD152	p ¹
Τρυθμ	9,8 ± 8		134,8 ± 131,7	
Τδραστ	7,3 ± 6,9	<0,001	75,3 ± 73,6	0,005
Τπαρθ	5 ± 5,5	<0,001	71,2 ± 69,1	0,002

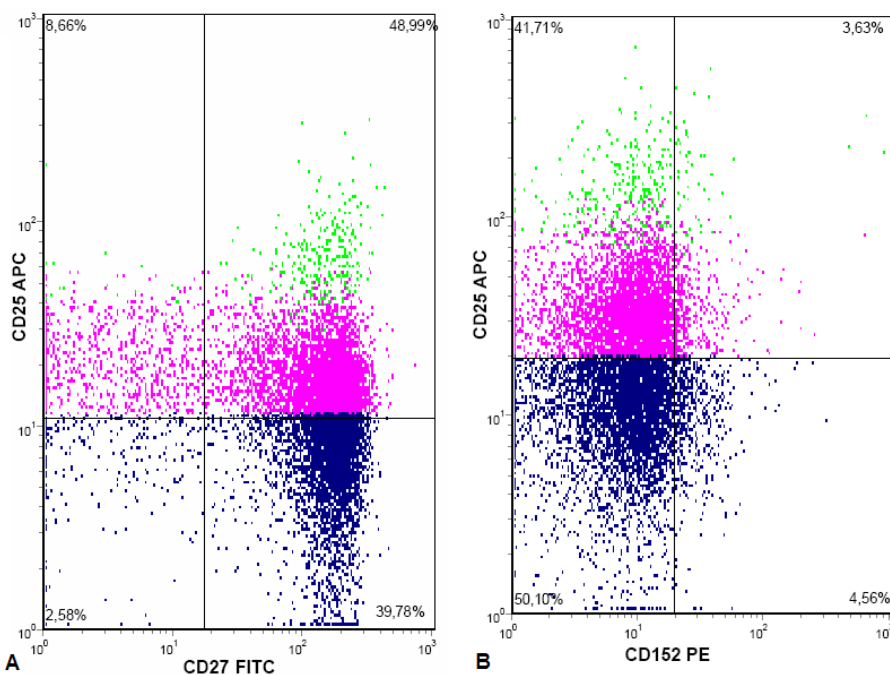
¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων



Εικόνα 55. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) του CD152 και ο μέσος όρος (παύλα) στα Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ.



Εικόνα 56. Α. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση του CD27 στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T. Β. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση του CD152 στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε -Τπαρθ (G6))

Λόγω αυτής της διαφοροποίησης έγινε μελέτη και της ενδοκυττάριας έκφρασης του CD152, όπου όπως φαίνεται από τον Πίνακα 42 τα ποσοστά έκφρασης είναι μεγαλύτερα (Εικόνα 57) και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα ποσοστά και τη μέση ένταση φθορισμού αντίστοιχα στα Τδραστ και Τπαρθ, εξακολουθούν να υπάρχουν (Εικόνα 58).

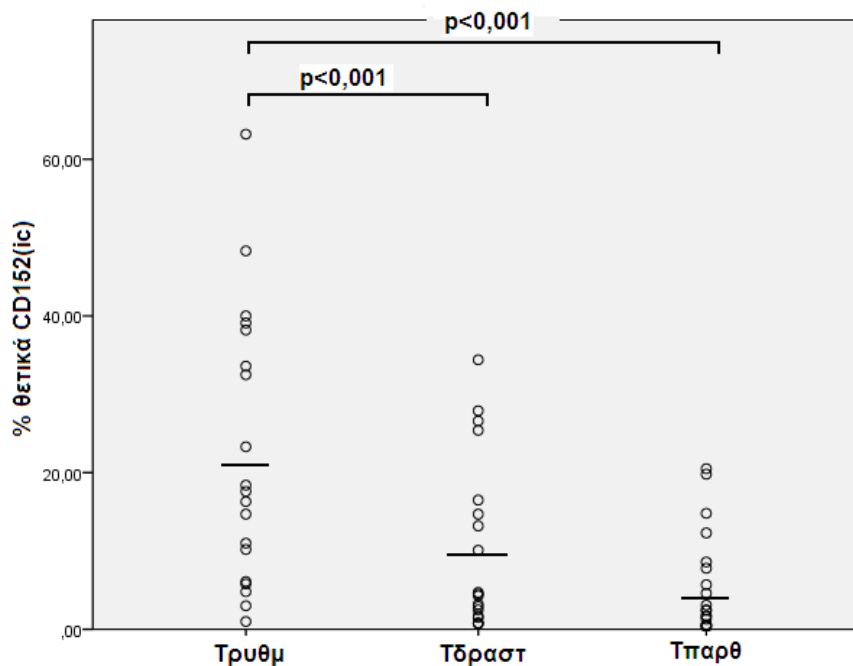
Πίνακας 42. Σύγκριση της έκφρασης του CD152(ic) στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(20) ³	% θετικά CD152 (ic)	p ¹	MFI ² CD152 (ic)	p ¹
Τρυθμ	21,8 ± 17,3		238,3 ± 198	
Τδραστ	10 ± 10,7	<0,001	218,7 ± 179	0,034
Τπαρθ	5,5 ± 6,5	<0,001	218,9 ± 193,9	0,015

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

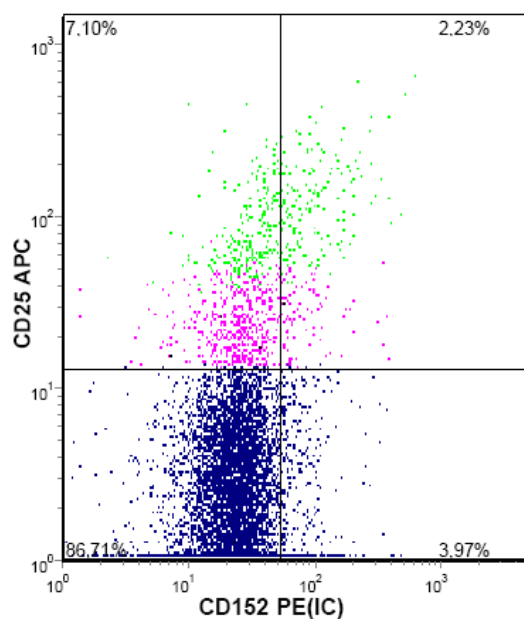
²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Δοσίμους δειγμάτων



Εικόνα 57. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά του ποσοστού των CD152(ic)⁺ και ο μέσος όρος (παύλα) στα Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ.

Δεδομένου ότι τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν το CD28 η συνέκφραση των μορίων CD28,CD152 εμφανίζεται στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα Τρυθμ, ακολουθώντας την έκφραση του CD152 (Πίνακας 43).



Εικόνα 58. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση CD152ic στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε-Τπαρθ (G6))

Πίνακας 43. Σύγκριση της συνέκφρασης των CD28CD152 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

(27) ²	% θετικά CD28CD152	p ¹
Τρυθμ	6,8 ± 4,6	
Τδραστ	5,4 ± 4,3	0,005
Τπαρθ	3,7 ± 3,3	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: Αριθμός δειγμάτων

3.5.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

Με δεδομένο ότι με βάση τη βιβλιογραφία τα συνδιεγερτικά σήματα είναι απαραίτητα για τη λειτουργικότητα των Τρυθμ και ότι τα Τρυθμ ασκούν την κατασταλτική τους δράση μέσω του CTLA-4, μελετήθηκαν σε συγγενείς πρώτου βαθμού πιθανές διαφοροποιήσεις στην έκφραση των μορίων CD28, CD27 και CD152 που θα μπορούσαν να προδιαθέτουν στην εμφάνιση της νόσου.

Όσον αφορά το ποσοστό έκφρασης των δεικτών στα Τρυθμ καμιά διαφοροποίηση δεν παρατηρήθηκε για κανέναν από τους υποπληθυσμούς των συγγενών.

Στα αδέρφια παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση της MFI του CD28 τόσο στα Τρυθμ όσο και στα Τπαρθ (Πίνακας 45).

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 46 δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στην έκφραση του CD27 με εξαίρεση μια στατιστικά σημαντική μείωση της MFI τόσο στα Τδραστ όσο και στα Τπαρθ που παρατηρείται και πάλι στα αδέρφια.

Σε αντιστοιχία με τη έκφραση του CD27, η έκφραση του CD152 δεν διαφοροποιήθηκε σε κανένα από τους πληθυσμούς των συγγενών με εξαίρεση μια παρατηρούμενη στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού στα Τδραστ και στα Τπαρθ, των αδερφών (Πίνακας 47).

Καμιά διαφοροποίηση δεν παρατηρήθηκε κατά τη σύγκριση της συνέκφρασης του CD28 και του CD152, όπως βλέπουμε στον πίνακα (Πίνακας 44).

Πίνακας 44. Σύγκριση του ποσοστού συνέκφρασης των CD152CD28 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων

	% CD152CD28 ⁺		% CD152CD28 ⁺		% CD152CD28 ⁺	
	Τρυθμ	p ¹	Τδραστ	p ¹	Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (26)³	6,8 ± 4,6		5,4 ± 4,3		3,7 ± 3,3	
Αδέρφια (6)	14 ± 14,2	ns ²	17,8 ± 21,5	ns	10,9 ± 12,7	ns
Μητέρες (9)	6,3 ± 3,2	ns	5,5 ± 2,8	ns	3,8 ± 1,9	ns
Πατέρες (7)	6,1 ± 5,3	ns	4,8 ± 4,1	ns	4,1 ± 3,7	ns
Παιδιά (3)	5,6 ± 4,3	ns	5,2 ± 2,3	ns	3,6 ± 1,6	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες

²: ns = στατιστικά μη σημαντικό

³: Αριθμός δειγμάτων

Πίνακας 45. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD28 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD28 ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD28 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD28 ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ CD28 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD28 ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ CD28 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (38)⁴	99,7 ± 1		110,1 ± 38,1		99,7 ± 0,7		124,2 ± 40,3		97 ± 4,9		96,6 ± 30,2	
Αδέρφια (14)	92,9 ± 25,7	ns ²	83,1 ± 34,4	0,019	93 ± 25,7	ns	104,4 ± 42	ns	85,4 ± 33,3	ns	77,6 ± 31,7	0,043
Μητέρες (10)	98,9 ± 1,4	ns	91,2 ± 28	ns	99,5 ± 0,4	ns	98,7 ± 29,9	ns	97,7 ± 2,9	ns	76,7 ± 21,4	ns
Πατέρες (7)	98,4 ± 4	ns	104,9 ± 23,8	ns	98,2 ± 4,7	ns	109,8 ± 27	ns	96 ± 7	ns	89,6 ± 23,2	ns
Παιδιά (5)	94,8 ± 5,2	ns	82 ± 25,9	ns	97,9 ± 2,4	ns	88,4 ± 27,2	ns	96,5 ± 4,5	ns	76 ± 31,9	ns
Παιδιά (5)	94,5 ± 2,9	ns	114,8 ± 15	ns	87,4 ± 3,4	ns	103,4 ± 20,7	ns	91,7 ± 8,9	ns	117,4 ± 27,6	ns

Πίνακας 46. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD27 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD27 ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD27 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD27 ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ CD27 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD27 ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ CD27 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (38)⁴	87,8 ± 25,9		149,9 ± 114,7		79 ± 23,2		121,3 ± 62		85 ± 25,6		136,6 ± 70,2	
Αδέρφια (13)	78,4 ± 34,6	ns ²	85,2 ± 45	ns	72,1 ± 31,7	ns	66,2 ± 30,3	0,004	79,8 ± 35,3	ns	79,7 ± 38,8	0,008
Μητέρες (10)	94,6 ± 2	ns	103,5 ± 36,2	ns	84,7 ± 8,2	ns	95,8 ± 34,9	ns	91,8 ± 5,9	ns	111,1 ± 42,9	ns
Πατέρες (8)	92,8 ± 6,1	ns	119,2 ± 17,6	ns	85,9 ± 6,4	ns	104,4 ± 15,8	ns	91,3 ± 5,7	ns	119,5 ± 23,5	ns

Πίνακας 47. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD152 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD152 ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD152 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD152 ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ CD152 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD152 ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ CD152 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (44)⁴	9,8 ± 8		134,8 ± 131,7		7,3 ± 6,9		75,3 ± 73,6		5 ± 5,5		71,2 ± 69,1	
Αδέρφια (15)	13,1 ± 10,8	ns ²	206,8 ± 246	ns	12,8 ± 14,5	ns	148,7 ± 114,7	0,032	9,1 ± 9,2	ns	126,7 ± 87,5	0,015
Μητέρες (10)	6,4 ± 3,5	ns	144,1 ± 145,9	ns	5,2 ± 2,8	ns	58,7 ± 40,1	ns	3,8 ± 1,9	ns	58,8 ± 41	ns
Πατέρες (7)	7,2 ± 5,3	ns	98,7 ± 53,6	ns	5,6 ± 4,1	ns	79,9 ± 36,3	ns	5 ± 3,8	ns	89,7 ± 62,6	ns
Παιδιά (5)	6,5 ± 3,7	ns	183 ± 151	ns	5 ± 1,8	ns	111,2 ± 150,4	ns	3,6 ± 1,2	ns	103,2 ± 144,6	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες ²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό ³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού ⁴: Αριθμός δειγμάτων

3.6 CD95-CD178

3.6.1 Σύγκριση μεταξύ Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ

Κατά τη σύγκριση της έκφρασης του CD95 στην επιφάνεια των Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ βλέπουμε ότι τα Τρυθμ εκφράζουν το δείκτη αυτόν σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με τα Τπαρθ και με μεγαλύτερη ένταση φθορισμού (Πίνακας 48, Εικόνα 59, Εικόνα 60). Η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη με βάση το γεγονός ότι τα περισσότερα Τρυθμ με τον τρόπο που τα επιλέγουμε είναι CD45RO θετικά.

Πίνακας 48. Σύγκριση της έκφρασης του CD95 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

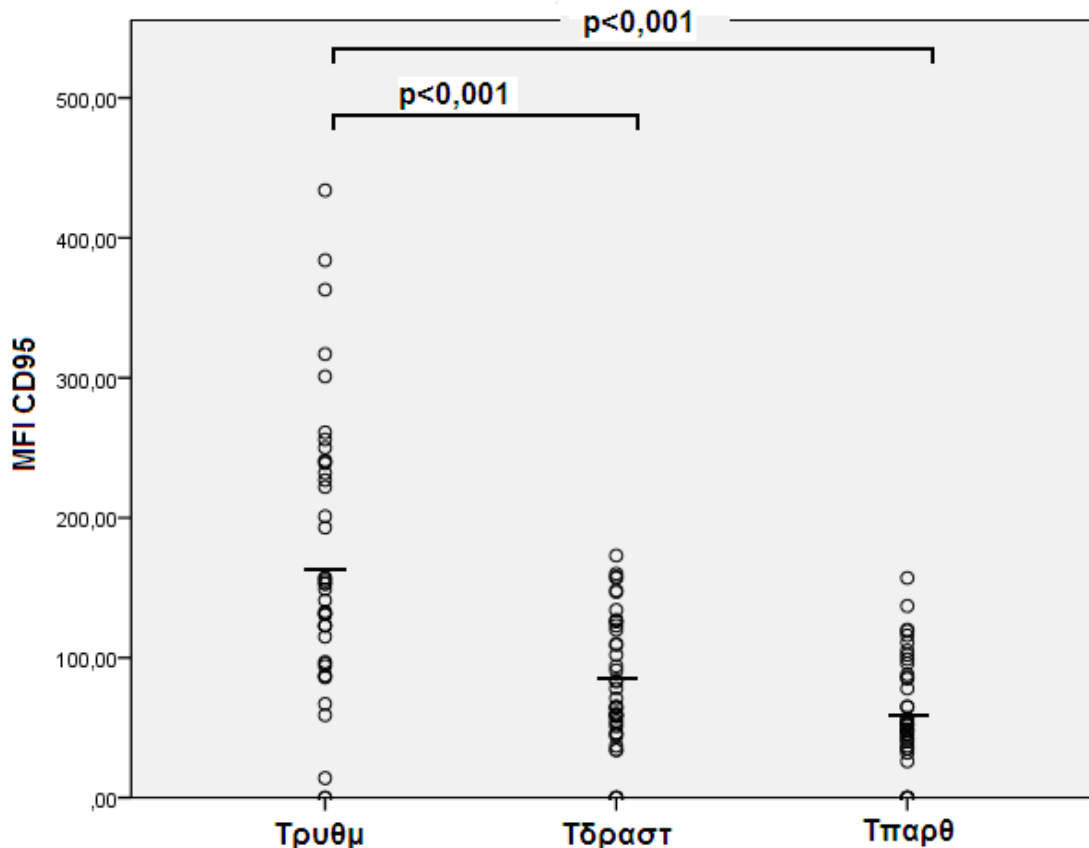
(42) ⁴	% θετικά CD95	p ¹	MFI ³ CD95	p ¹
Τρυθμ	77 ± 29,5		169,6 ± 98,8	
Τδραστ	73,3 ± 30,8	ns ²	81,2 ± 47,4	<0,001
Τπαρθ	44 ± 20,4	<0,001	61,4 ± 38,7	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

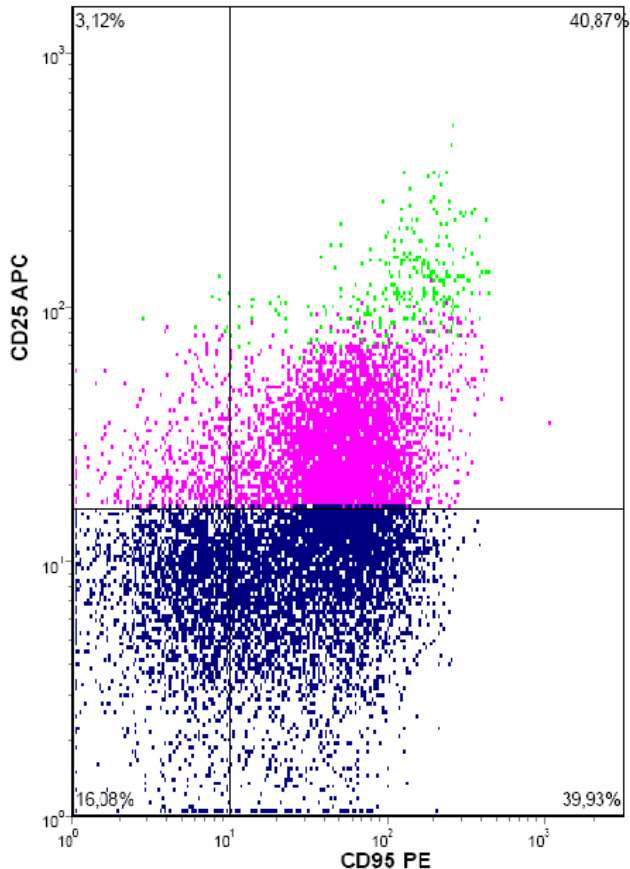
²: ns = στατιστικά μη σημαντικό

³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

⁴: Αριθμός δειγμάτων



Εικόνα 59. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) του CD95 και ο μέσος όρος (παύλα) στα Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ.



Εικόνα 60. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση CD95 στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε –Τπαρθ (G6))

Επίσης παρατηρούμε στον Πίνακα 49 ότι τα Τρυθμ εκφράζουν σε μικρότερο ποσοστό το CD178 σε σχέση με τα Τδραστ και τα Τπαρθ (Εικόνα 61).

Πίνακας 49. Σύγκριση της έκφρασης του CD178 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

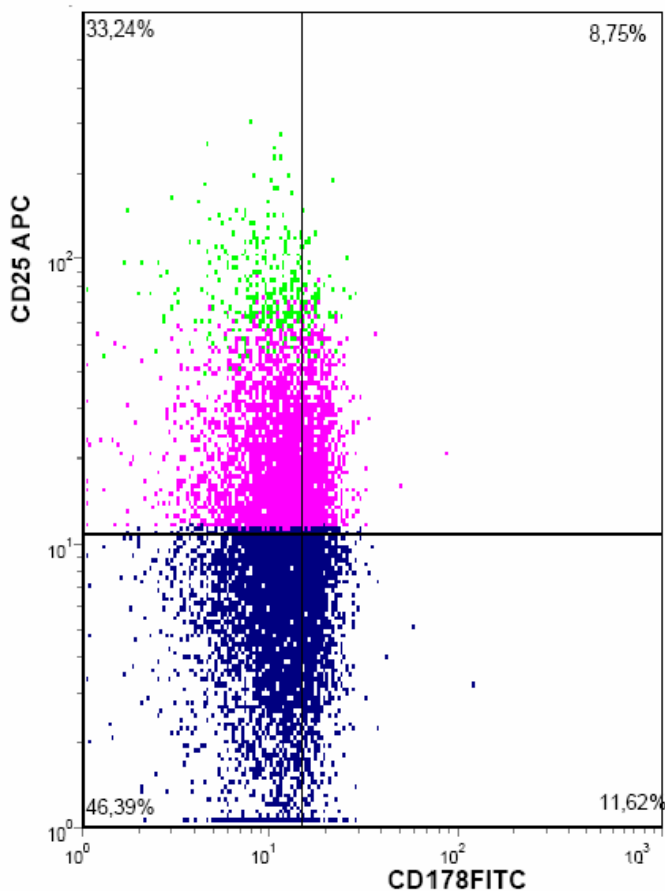
(23) ⁴	% θετικά CD178	p ¹	MFI ³ CD178	p ¹
Τρυθμ	11,4 ± 12,1		33,1 ± 29,5	
Τδραστ	15,8 ± 16,1	<0,001	58,3 ± 100,5	ns ²
Τπαρθ	16,4 ± 17,1	<0,001	44,5 ± 66,3	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: ns = στατιστικά μη σημαντικό

³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

⁴: Αριθμός δειγμάτων



Εικόνα 61. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση του CD178 στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε -Τπαρθ (G6))

Το ίδιο ισχύει και με τη συνέκφραση των δύο δεικτών που είναι μειωμένη στα Τρυθμ σε σχέση με τα Τδραστ (Πίνακας 50).

Πίνακας 50. Σύγκριση της συνέκφρασης των CD95CD178 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ.

(23) ³	% θετικά CD95CD178	p ¹
Τρυθμ	8,6 ± 8,6	
Τδραστ	13 ± 13	0,001
Τπαρθ	8,1 ± 9	ns ²

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: ns = στατιστικά μη σημαντικό

³: Αριθμός δειγμάτων

3.6.2 Σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών

Κατά τη σύγκριση της έκφρασης των δεικτών σε συγγενείς πρώτου βαθμού δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όπως φαίνεται στους πίνακες 51, 52 και 53.

Πίνακας 51. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD95 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD95 ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD95 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD95 ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ CD95 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD95 ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ CD95 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (42)⁴	77 ± 29,5		169,6 ± 98,8		73,3 ± 30,8		81,2 ± 47,4		44 ± 20,4		61,4 ± 38,7	
Αδέρφια (15)	59,5 ± 34,7	ns ²	153,7 ± 102	ns	60,4 ± 39	ns	80,9 ± 52,2	ns	28,2 ± 25,1	0,019	70 ± 44,3	ns
Μητέρες (10)	82,9 ± 29,3	ns	206 ± 119	ns	79,1 ± 28,3	ns	88,3 ± 50,6	ns	43,9 ± 16,6	ns	74,8 ± 43,3	ns
Πατέρες (8)	81,8 ± 33,3	ns	216,5 ± 121,8	ns	77,3 ± 32,4	ns	85,8 ± 47,6	ns	53,2 ± 27	ns	79,3 ± 49,4	ns
Παιδιά (5)	58,4 ± 39,5	ns	162 ± 44,4	ns	56,5 ± 38,7	ns	66,3 ± 11,3	ns	33 ± 22,1	ns	102,5 ± 89,9	ns

Πίνακας 52. Σύγκριση του ποσοστού έκφρασης και της μέσης έντασης φθορισμού ως προς CD178 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων.

	% CD178 ⁺ Τρυθμ	p ¹	MFI ³ CD178 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD178 ⁺ Τδραστ	p ¹	MFI ³ CD178 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD178 ⁺ Τπαρθ	p ¹	MFI ³ CD178 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (38)⁴	11,4 ± 12,1		33,1 ± 29,5		15,8 ± 16,1		58,3 ± 100,5		16,4 ± 17,1		44,5 ± 66,3	
Αδέρφια (14)	13,8 ± 22	ns ²	29,8 ± 20,5	ns	20,3 ± 26	ns	61,4 ± 49,6	ns	16,7 ± 23,5	ns	123,4 ± 169,4	ns
Μητέρες (10)	9,3 ± 17,4	ns	11,6 ± 13,9	ns	12,6 ± 21,8	ns	29,3 ± 40,8	ns	15,2 ± 26,9	ns	18,9 ± 20,4	ns
Πατέρες (7)	7,5 ± 13,8	ns	219 ± 378	ns	10,6 ± 20,8	ns	90 ± 125	ns	10,7 ± 20,4	ns	153,4 ± 258	ns
Παιδιά (3)	13,3 ± 10,8	ns	20,3 ± 1,5	ns	16,3 ± 10,1	ns	19	ns	20,3 ± 13,3	ns	19,7 ± 0,6	ns

Πίνακας 53. Σύγκριση του ποσοστού συνέκφρασης των CD95CD178 των υποπληθυσμών των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T (Τρυθμ, Τδραστ, Τπαρθ) στους υποπληθυσμούς των συγγενών έναντι φυσιολογικών μαρτύρων

	% CD95CD178 ⁺ Τρυθμ	p ¹	% CD95CD178 ⁺ Τδραστ	p ¹	% CD95CD178 ⁺ Τπαρθ	p ¹
Μάρτυρες (26)⁴	8,6 ± 8,6		13 ± 13		8,1 ± 9	
Αδέρφια (6)	10,7 ± 19	ns ²	16,4 ± 20,7	ns	5 ± 6,2	ns
Μητέρες (9)	8,3 ± 15,4	ns	10,8 ± 20	ns	7 ± 12,6	ns
Πατέρες (7)	9,1 ± 14,3	ns	12,2 ± 21,1	ns	8,6 ± 15,2	ns
Παιδιά (3)	7,5 ± 4,6	ns	11,5 ± 6	ns	7,4 ± 4,4	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες ²: ns = non significant/ στατιστικά μη σημαντικό ³: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού ⁴: Αριθμός δειγμάτων

4. Μελέτη HLA

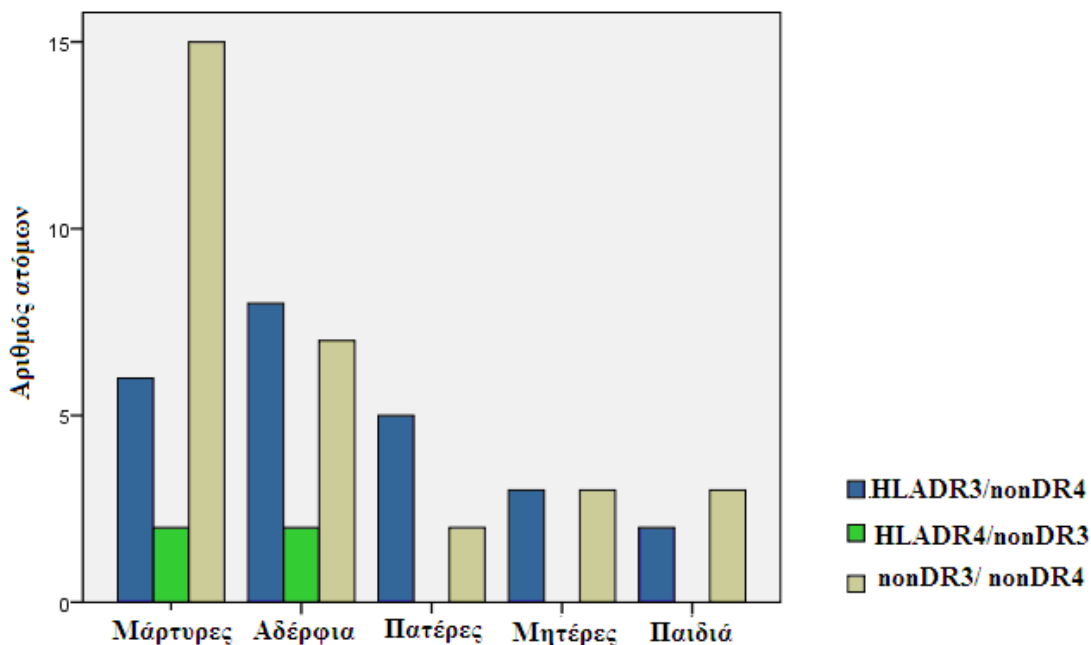
4.1 Κατανομή των γονοτύπων HLA-DR και HLA-DQ στους συγγενείς ατόμων με ΣΔ1

Μετά την ταυτοποίηση των αλληλόμορφων HLA-DR και HLA-DQB καθώς και τον καθορισμό του HLA-DQA εάν συνυπάρχει το αλληλόμορφο HLA-DQB1*0301, HLA-DQB1*02, έγινε ταξινόμηση του ποσοστού εμφάνισής τους ανάλογα με τον βαθμό που προδιαθέτουν στην εμφάνιση της νόσου μεταξύ συγγενών και φυσιολογικών μαρτύρων.

Ειδικότερα, βλέπουμε ότι κανένα άτομο από το δείγμα μας (μάρτυρες και συγγενείς), δεν εμφανίζει τον πολύ υψηλού κινδύνου συνδυασμό HLA-DR3/ HLA-DR4, αλλά η παρουσία του και η παρουσία ενός μόνο αλληλόμορφου (και ειδικότερα του HLA-DR3) που αποτελεί παράγοντα κινδύνου είναι αυξημένη στους συγγενείς και ειδικότερα στους πατέρες σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (Πίνακας 54, Εικόνα 62).

Πίνακας 54. Πίνακας των ποσοστών % που εμφανίζεται ο κάθε συνδυασμός HLA-DR στους φυσιολογικούς μάρτυρες και στους υποπληθυσμούς των συγγενών.

%	DR3/nonDR4	nonDR3/DR4	nonDR3/nonDR4
Μάρτυρες	26,1	8,7	65,2
Αδέρφια	47,1	11,8	41,2
Πατέρες	71,4		28,6
Μητέρες	50		50
Παιδιά	40		60

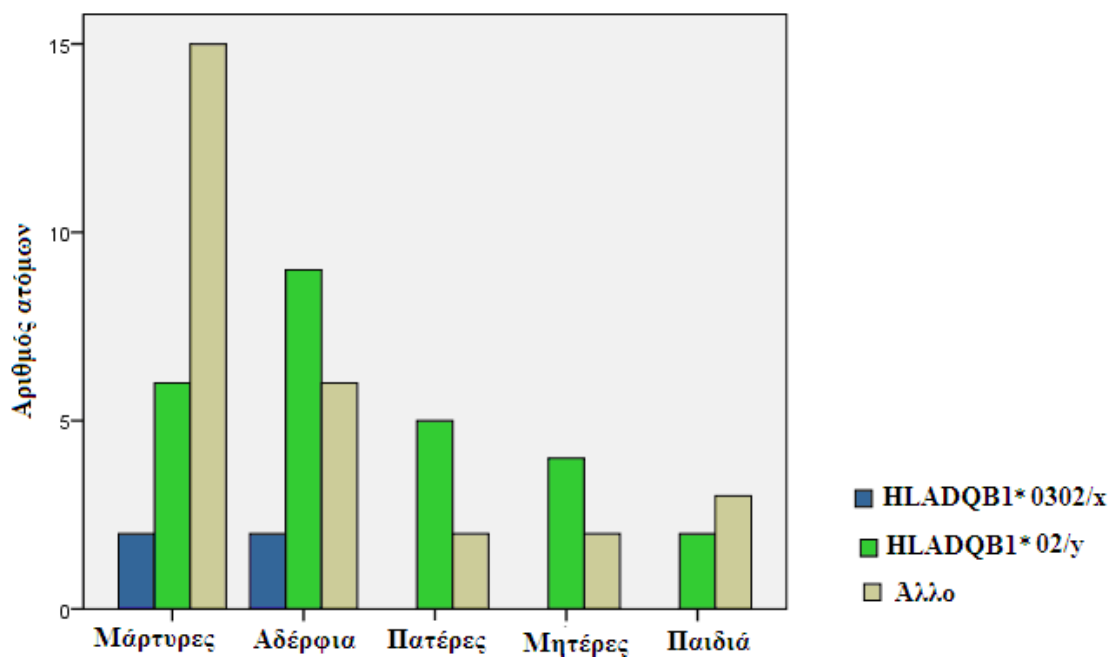


Εικόνα 62. Γράφημα της κατανομής των αλληλόμορφων HLA-DR που φέρουν οι φυσιολογικοί μάρτυρες και οι υποπληθυσμοί των συγγενών.

Αντίστοιχα, κανένα άτομο από το δείγμα μας (μάρτυρες και συγγενείς), δεν εμφανίζει τον πολύ υψηλού κινδύνου γονότυπο HLA-DQB1*02 / DQB1*0302, αλλά ο σχετικά χαμηλού κινδύνου, αλλά αυξημένος σε σχέση με τους άλλους συνδυασμούς, γονότυπος HLA-DQB1*02/ y βρέθηκε συχνότερα στους συγγενείς σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (Πίνακας 55, Εικόνα 63).

Πίνακας 54. Πίνακας των ποσοστών % που εμφανίζεται ο κάθε συνδυασμός HLA-DQ στους φυσιολογικούς μάρτυρες και στους υποπληθυσμούς των συγγενών.

%	DQB1*0302/x	DQB1*02/y	Άλλο
Μάρτυρες	8,7	26,1	65,2
Αδέρφια	11,8	52,9	35,3
Πατέρες		71,4	28,6
Μητέρες		66,7	33,3
Παιδιά		40	60



Εικόνα 63. Γράφημα της κατανομής των αλληλόμορφων HLA- DR που φέρουν οι φυσιολογικοί μάρτυρες και οι υποπληθυσμοί των συγγενών.

4.2 Συσχέτιση μεταξύ γονότυπου και ποσοστού Τρυθμ

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ανεύρεσης συσχέτισης μεταξύ του ποσοστού των Τρυθμ και του αντίστοιχου γονότυπου.

Έτσι, στον Πίνακα 55 βλέπουμε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις του ποσοστού των Τρυθμ ανάλογα με τον γονότυπο HLA-DR, με εξαίρεση μια στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού των Τρυθμ στα άτομα που φέρουν τον γονότυπο nonDR3/nonDR4, σε σχέση με τα άτομα που φέρουν μόνο το προδιαθετικό αλληλόμορφο HLA-DR3 (Εικόνα 64).

Πίνακας 55. Σύγκριση του ποσοστού των Τρυθμ ανάμεσα στους υποπληθυσμούς που μπορεί να χωριστεί το δείγμα μας (μάρτυρες και συγγενείς) με βάση τον γονότυπο HLA-DR και την προδιάθεση στο ΣΔ1.

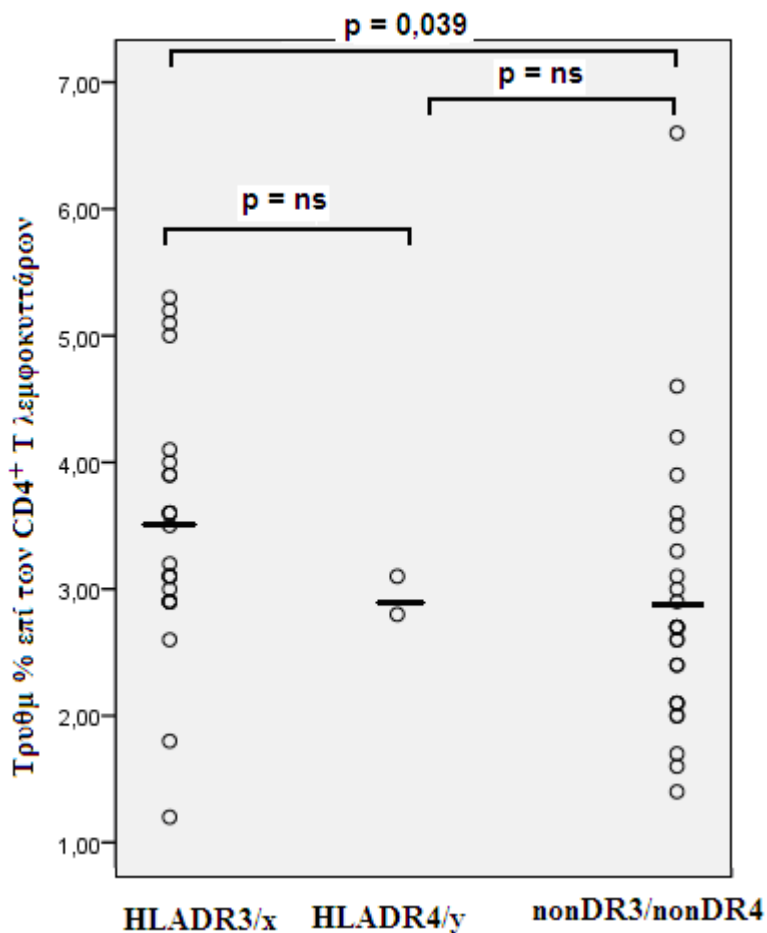
	Τρυθμ % των CD4 ⁺ λεμφοκυττάρων T	p
DR3/ nonDR4	3,48 ± 1	¹ : ns ⁴
nonDR3/ DR4	2,95 ± 0,21	² : ns
nonDR3/ nonDR4	2,86 ± 1,1	³ : 0,039

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον γονότυπο nonDR3/DR4

²: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον γονότυπο nonDR3/nonDR4

³: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον γονότυπο DR3/non DR4

⁴: ns = στατιστικά μη σημαντικό



Εικόνα 64. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά και η μέση τιμή του ποσοστού των Τρυθμ, ανάλογα με τον γονότυπο HLA-DR.

Αντίστοιχα, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές του ποσοστού των Τρυθμ ανάλογα με το γονότυπο HLA-DQ (Πίνακας 56, Εικόνα 65).

Πίνακας 55. Σύγκριση του ποσοστού των Τρυθμ ανάμεσα στους υποπληθυσμούς που μπορεί να χωριστεί το δείγμα μας (μάρτυρες και συγγενείς) με βάση τον γονότυπο HLA-DQ και την προδιάθεση στο ΣΔ1.

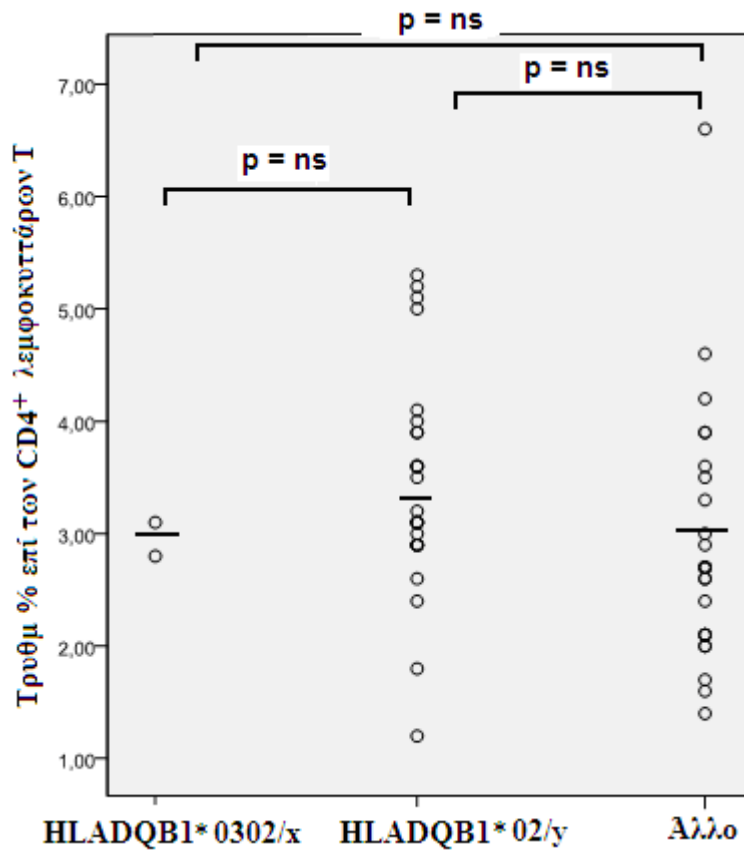
	Τρυθμ % των CD4 ⁺ λεμφοκυττάρων T	p
DQB1*0302/x	2,95 ± 0,21	¹ : ns ⁴
DQB1*02/y	3,42 ± 0,99	² : ns
Άλλο	2,86 ± 1,1	³ : ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το γονότυπο DQB1*02/y.

²: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με άλλο γονότυπο.

³: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το γονότυπο DQB1*0302/x.

⁴: ns = στατιστικά μη σημαντικό



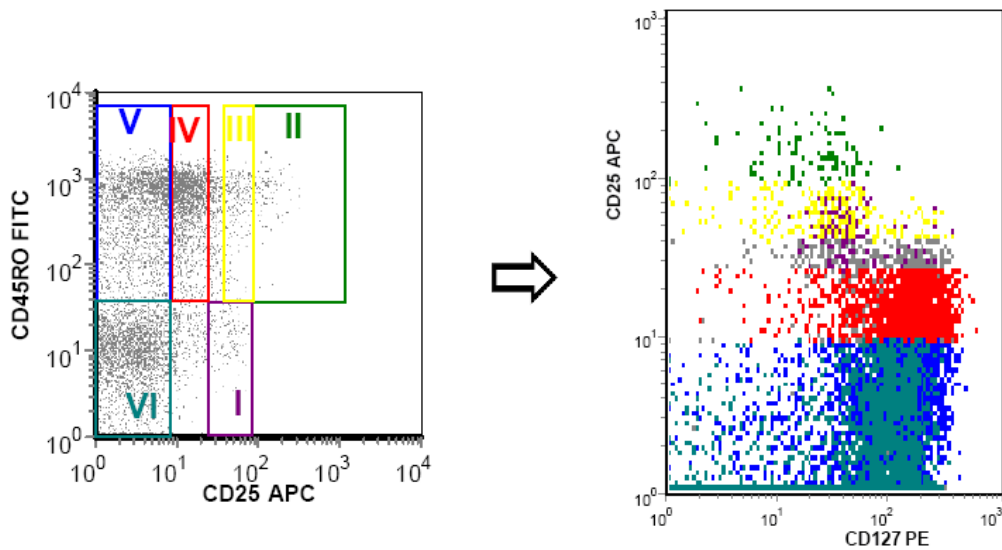
Εικόνα 65. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά και η μέση τιμή του ποσοστού των Τρυθμ, ανάλογα με τον γονότυπο HLA-DQ.

5. Μελέτη επιπλέον χαρακτηριστικών των υποπληθυσμών των Τρυθμ σε φυσιολογικούς μάρτυρες

5.1 CD127, FoxP3

Με βάση το διαχωρισμό κατά Miyara και συν. 2009, έγινε περαιτέρω μελέτη των χαρακτηριστικών των υποπληθυσμών των Τρυθμ.

Για την κατανομή των πυλών που αντιστοιχούν στους υποπληθυσμούς I-VI, εκτός από την έκφραση των CD25-CD45RO, λαμβάνουμε υπόψιν ότι τα κύτταρα των πληθυσμών I, II και III πρέπει να είναι CD127^{-low} γιατί εξ ορισμού ανήκουν στον έως τώρα θεωρούμενο ως ενιαίο πληθυσμό των Τρυθμ που είναι FoxP3⁺. Με βάση την αντιστοίχιση των χρωμάτων σε κάθε πύλη (I-πορφυρό, II- πράσινο, III-κίτρινο, IV-κόκκινο, V-μπλε, VI-γαλαζοπράσινο), βλέπουμε την απεικόνισή τους στο κυτταρόγραμμα της Εικόνας 66 (Πίνακας 57).



Εικόνα 66. Η κατανομή ως προς την έκφραση CD127 των υποπληθυσμών I-VI των CD4⁺T λεμφοκυττάρων, όπως φαίνονται στο κυτταρόγραμμα CD127-CD25 με βάση το χρώμα του περιγράμματος της αντίστοιχης πύλης

Επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα προηγούμενων ερευνητικών ομάδων βλέπουμε ότι τα Τρυθμ έχουν χαμηλή έως καθόλου έκφραση CD127. Η έκφραση του δείκτη αυτού, έδειξε αξιοσημείωτη διακύμανση μεταξύ των υποπληθυσμών των Τρυθμ. Τα ενεργοποιημένα Τρυθμ είναι CD127^{low/-} ενώ τα rTregs είναι CD127^{low/high} και τα μη κατασταλτικά Τρυθμ (πληθυσμός III) είναι CD127^{high/low} (Πίνακας 56).

Πίνακας 56. Σύγκριση της μέσης έντασης φθορισμού του CD127 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ

(19) ¹	MFI ² CD127	p
I	65,9 ± 11,1	=0,007 ²
II	37,7 ± 19,6	<0,001 ³
III	154,6 ± 47,8	=ns ⁴

¹: Αριθμός δειγμάτων

²: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό II

³: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό III

⁴: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό I

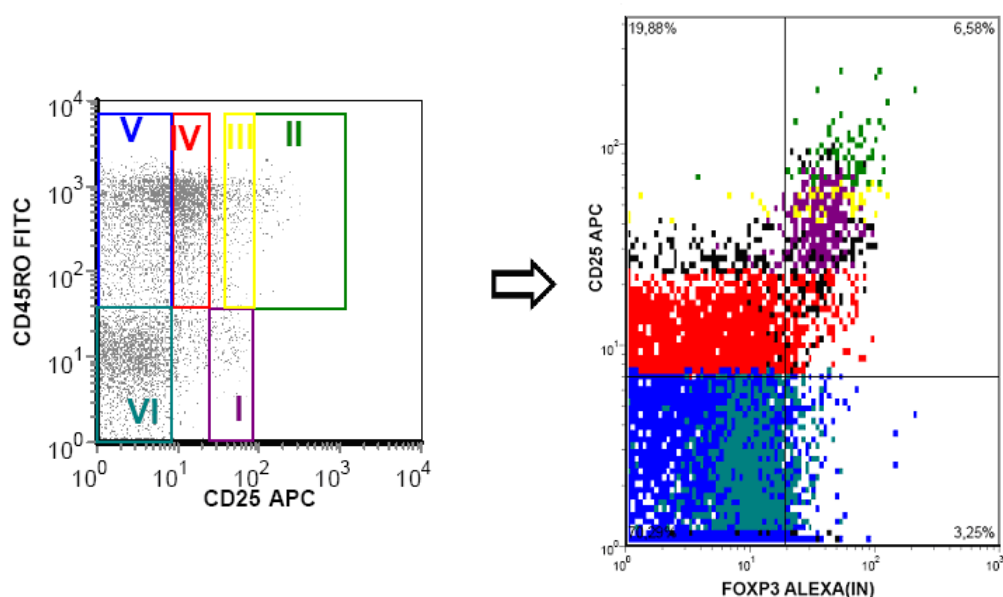
Πίνακας 57. Ποσοστό θετικών ως προς CD127 και μέση ένταση φθορισμού στους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009 και στα μονοκύτταρα

	I	II	III	IV	V	VI	Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα
CD127, %	99,7	81,2	88,3	98,9	95,8	99,9	0,06
MFI CD127	82,2	41,4	100 ¹	265,5	199	174	²

¹ Η MFI του υποπληθυσμού III λαμβάνεται ως το 100 ως προς την ένταση φθορισμού της έκφρασης των δεικτών

² Στις περιπτώσεις που κάποιος δείκτης εκφράζεται σε λιγότερο από το 2 % των κυττάρων δεν εκτιμήθηκε η MFI

Όσον αφορά την κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 στους διάφορους υποπληθυσμούς, τα ευρήματα επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα της ομάδας των Miyara και συν. 2009. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 67 τα aTregs έχουν την υψηλότερη έκφραση του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα, ακολουθούν τα μη κατασταλτικά Tregs και τα rTregs, ενώ οι υποπληθυσμοί IV-VI δεν τον εκφράζουν καθόλου.



Εικόνα 67. Η κατανομή της έκφρασης του FoxP3 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ και στους υπόλοιπους πληθυσμούς στους οποίους χωρίζονται τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα T με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009. Σύμβαση χρωμάτων: πορφυρό-I (rTregs), πράσινο-II (aTregs), κίτρινο-III (non Tregs), κόκκινο-IV, μπλε-V, γαλαζοπράσινο-VI.

5.2 CD54, CD11a, CD58, CD2, CD4

Στα πλαίσια μελέτης των επιφανειακών μορίων πρόσδεσης των λεμφοκυττάρων T και των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, έγινε μελέτη των μορίων CD54, CD11a και CD58 στην επιφάνεια των Τρυθμ και των μορίων CD4 και CD2 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ.

Όσον αφορά την έκφραση των μορίων CD54 και CD11a στα Τρυθμ, όπως φαίνεται και στους Πίνακες 58 και 59, είναι χαμηλότερη τόσο ως προς το ποσοστό των μορίων όσο και

ως προς τη μέση ένταση φθορισμού σε σχέση με τα Τδραστ και Τπαρθ, με εξαίρεση το ποσοστό των CD54⁺ Τπαρθ που είναι μικρότερο (Πίνακας 58, Πίνακας 59, Εικόνα 68).

Πίνακας 58. Σύγκριση της έκφρασης του CD54 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(12) ³	% θετικά CD54	p ¹	MFI ² CD54	p ¹
Τρυθμ	34,1 ± 18,1		21,3 ± 5	
Τδραστ	41,1 ± 19	<0,001	25,7 ± 13	0,026
Τπαρθ	15,4 ± 10,8	<0,001	27,5 ± 21,9	0,015

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

Πίνακας 59. Σύγκριση της έκφρασης του CD11a στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(12) ³	% θετικά CD11a	p ¹	MFI ² CD11a	p ¹
Τρυθμ	9,5 ± 4,7		28,7 ± 5,5	
Τδραστ	31,9 ± 13,3	<0,001	30,5 ± 5,9	0,026
Τπαρθ	24,5 ± 9,4	<0,001	31,8 ± 7,2	0,015

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

Η μειωμένη έκφραση των μορίων πρόσδεσης σε σχέση με τα Τδραστ υποδεικνύει ότι τα Τρυθμ υστερούν σε σχέση με τα κύτταρα αυτά, ως προς τους τρόπους σύνδεσης μέσω αυτών των υποδοχέων. Ενδεχομένως τα Τρυθμ δρουν κυρίως μέσω άλλων μορίων που ευνοούν πιο ειδικές συνδέσεις με τα κύτταρα στόχους τους.

Κατά τη μελέτη της έκφρασης των δεικτών CD2 και CD58 βλέπουμε ότι ενώ το CD2 εκφράζεται σχεδόν καθ' ολοκληρίαν στα CD4⁺ λεμφοκύτταρα T, τα Τρυθμ έχουν μειωμένη ένταση φθορισμού σε σχέση τόσο με τα Τδραστ όσο και με τα Τπαρθ (Πίνακας 60, Εικόνα 69). Επίσης το CD58 εκφράζεται σε μειωμένο ποσοστό στα Τρυθμ σε σχέση με τα Τδραστ χωρίς διαφοροποιήσεις ως προς τη μέση ένταση φθορισμού (Πίνακας 61).

Πίνακας 60. Σύγκριση της έκφρασης του CD2 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

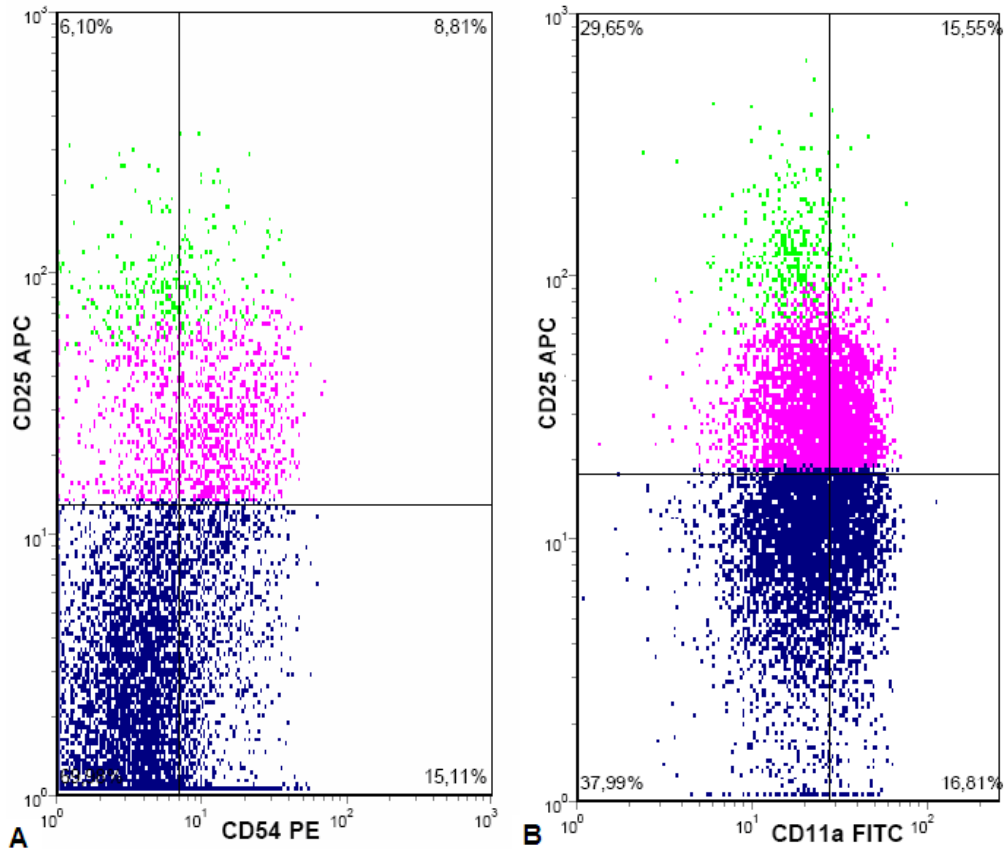
(14) ³	% θετικά CD2	p ¹	MFI ² CD2	p ¹
Τρυθμ	99,6 ± 0,5		312,9 ± 96,6	
Τδραστ	99,3 ± 0,7	ns ⁴	479,4 ± 158,7	<0,001
Τπαρθ	99,9 ± 0,1	ns	351,6 ± 114	<0,001

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

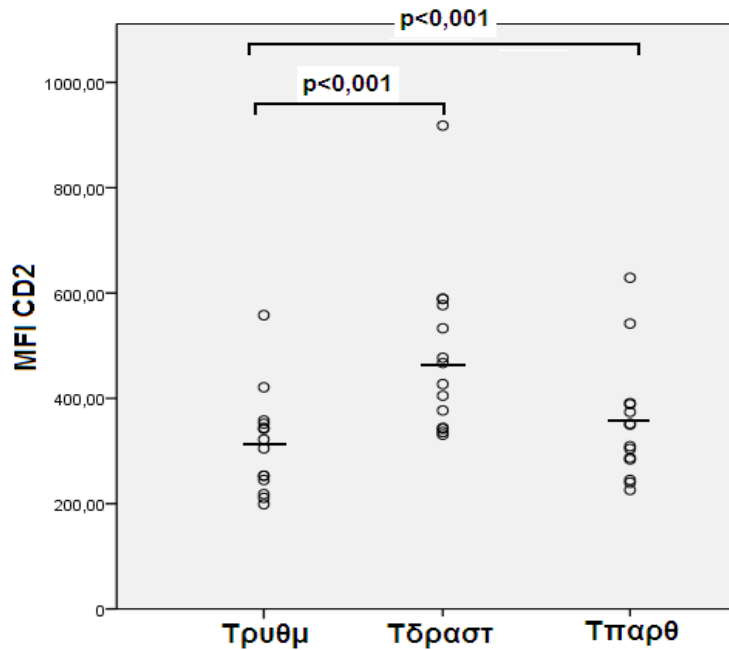
²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

⁴: ns= not significant



Εικόνα 68. Κυτταρόγραμμα με βάση την έκφραση των CD54 (A) και CD11a (B) στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς $CD4^+$ λεμφοκυττάρων T (πράσινο- Τρυθμ (G4), πορφυρό- Τδραστ (G5), μπλε -Τπαρθ (G6))



Εικόνα 69. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) του CD2 και ο μέσος όρος (παύλα) στα Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ.

Πίνακας 61. Σύγκριση της έκφρασης του CD58 στα Τρυθμ με τα Τδραστ και τα Τπαρθ

(14) ³	% θετικά CD58	p ¹	MFI ² CD58	p ¹
Τρυθμ	31 ± 23,5		20,4 ± 6,2	
Τδραστ	41,5 ± 28,3	0,001	21,9 ± 8,5	ns
Τπαρθ	32,6 ± 27,1	ns ⁴	20,2 ± 7,1	ns

¹: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τα Τρυθμ

²: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

³: Αριθμός δειγμάτων

⁴: ns = στατιστικά μη σημαντικό

Η μειωμένη ένταση φθορισμού του CD2 μελετήθηκε στη συνέχεια στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ (Πίνακας 62, Εικόνα 70).

Πίνακας 62. Σύγκριση της μέσης έντασης φθορισμού του CD2 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ

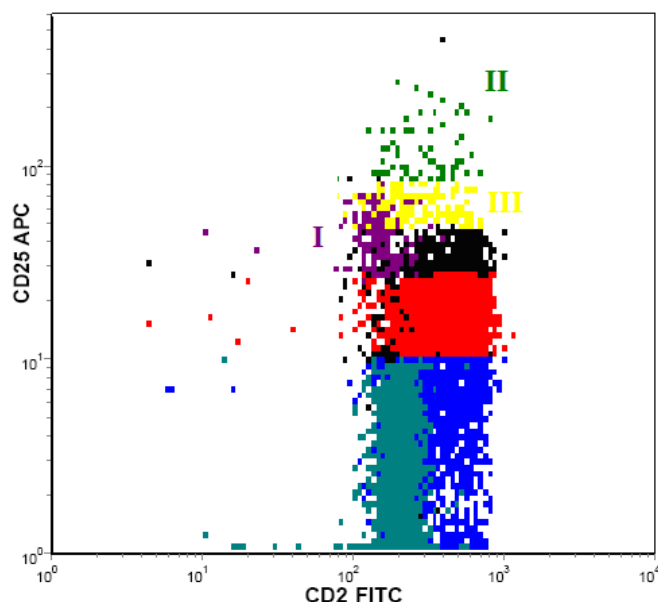
(6) ¹	MFI ² CD2	p
I	110 ± 62,3	0,013 ²
II	226,7 ± 137	0,081 ³
III	216,5 ± 130,4	0,013 ⁴

¹: Αριθμός δειγμάτων

²: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό II

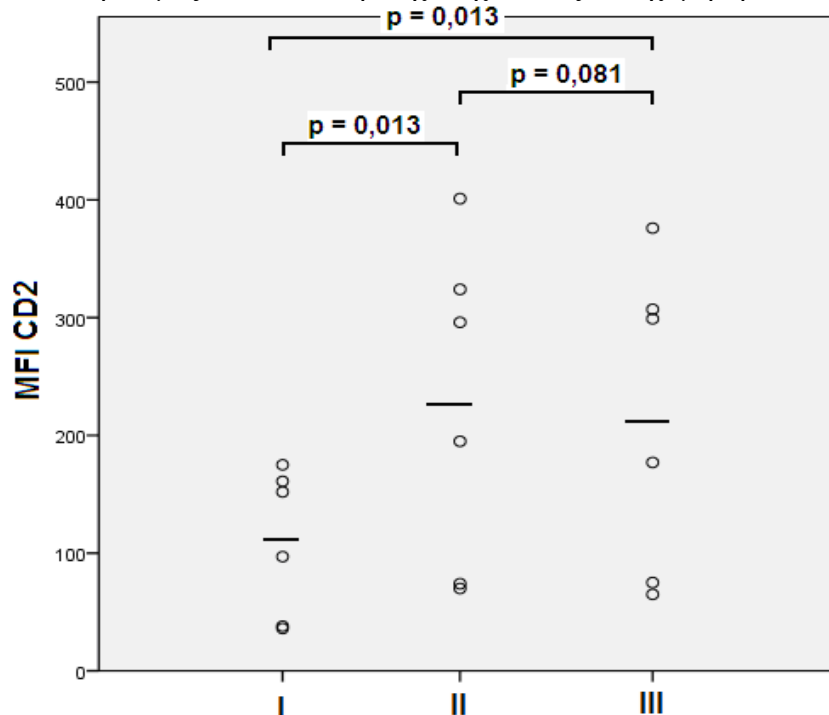
³: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό III

⁴: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό I



Εικόνα 70. Η κατανομή της έκφρασης του CD2 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ και στους υπόλοιπους πληθυσμούς στους οποίους χωρίζονται τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα T με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009. Σύμβαση χρωμάτων: πορφυρό- I (rTregs), πράσινο- II (aTregs), κίτρινο-III (non Tregs), κόκκινο-IV, μπλε -V, γαλαζοπράσινο- VI.

Παρατηρούμε ότι παρόλο που όλοι οι υποπληθυσμοί εκφράζουν το CD2, τα rTregs (πληθυσμός I) έχουν σχεδόν τη μισή μέση ένταση φθορισμού σε σχέση με τους άλλους 2 υποπληθυσμούς (Εικόνα 71). Μπορούμε επομένως να τα χαρακτηρίσουμε ως CD2^{low}, ενώ βλέποντας την MFI των πληθυσμών III, IV, V και VI στον πίνακα 63 παρατηρούμε ότι ο υποπληθυσμός VI των Tparθ έχει σχεδόν εξίσου χαμηλή ένταση φθορισμού με τα rTregs.



Εικόνα 71. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) του CD2 και ο μέσος όρος (παύλα) στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ.

Πίνακας 63. Ποσοστό θετικών ως προς CD2 και μέση ένταση φθορισμού στους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκύτταρων T με βάση την τεχνική Miyaga και συνεργατών 2009 και στα μονοκύτταρα.

	I	II	III	IV	V	VI	Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα
CD2, %	98,1	100	98,6	99,4	99,8	100	12,5
MFI ¹ CD2	51,8	104,6	100 ²	139,6	123,7	69,3	78,7

¹: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

² Η MFI του υποπληθυσμού III λαμβάνεται ως το 100 ως προς την ένταση φθορισμου της έκφρασης του CD2.

Γνωρίζοντας ότι το CD2 είναι ισχυρότερο μόριο σε σχέση με το CD28 ως συνδιεγέρτης μετά την ενεργοποίηση του TCR, η χαμηλότερη έκφρασή του στα rTregs υποδεικνύει ότι μόνο ένα πολύ ισχυρό σήμα από το μόριο-προσδέτη του μπορεί να διεγείρει τα κύτταρα αυτά.

Μια ακόμη παρατήρηση που αφορά τα Τρυθμ είναι η χαμηλότερη ως προς την ένταση φθορισμού έκφραση του CD4 (CD4^{int}), χωρίς όμως να έχει μελετηθεί με βάση την τεχνική Miyaga και συνεργατών 2009. Ειδικότερα, όπως φαίνεται στον πίνακα 64 αυτό ισχύει για τους πληθυσμούς I και II χωρίς να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ aTregs και σε rTregs.

Πίνακας 64. Ποσοστό θετικών ως προς CD4 και μέση ένταση φθορισμού στους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκύτταρων T με βάση την τεχνική Miyaga και συνεργατών 2009 και στα μονοκύτταρα.

	I	II	III	IV	V	VI	Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα
CD4, %	100	100	100	100	100	100	100
MFI¹ CD4	88,6	86,7	93,6	106,6	100,9	100²	18,8

¹: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

²Η MFI του υποπληθυσμού VI λαμβάνεται ως το 100 ως προς την ένταση φθορισμού της έκφρασης του CD4.

5.3 HLA-DR, CD122

Σε προηγούμενη μελέτη των Baecher-Allan και συν. 2006 είχε συσχετιστεί η έκφραση του HLA-DR στα Τρυθμ με μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα. Κατά τη μελέτη των υποπληθυσμών των Τρυθμ σε φυσιολογικούς μάρτυρες, βρίσκουμε ότι τα aTregs είναι στην πλειοψηφία τους HLA-DR⁺ (από 62-94 %), ενώ τα rTregs είναι κυρίως HLA-DR⁻ (93,3-98,2%)(Πίνακας 65, Εικόνα 72, 73). Το ίδιο ισχύει και με τη μέση ένταση φθορισμού που στα aTregs είναι η υψηλότερη σε σχέση με όλα τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα T και εκφράζει το 25-40 % της έντασης φθορισμού των μονοκυττάρων του αντίστοιχου ατόμου (Πίνακας 67).

Πίνακας 65. Σύγκριση της έκφρασης του HLADR στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ

(6) ¹	% θετικά HLA-DR	p	MFI HLA- DR	p
I	4 ± 1,81	<0,001 ²	101,8 ± 98,1	0,005 ²
II	75,6 ± 12,9	<0,001 ³	356 ± 45,3	0,018 ³
III	45,5 ± 17,5	0,016 ⁴	251 ± 103	0,054 ⁴

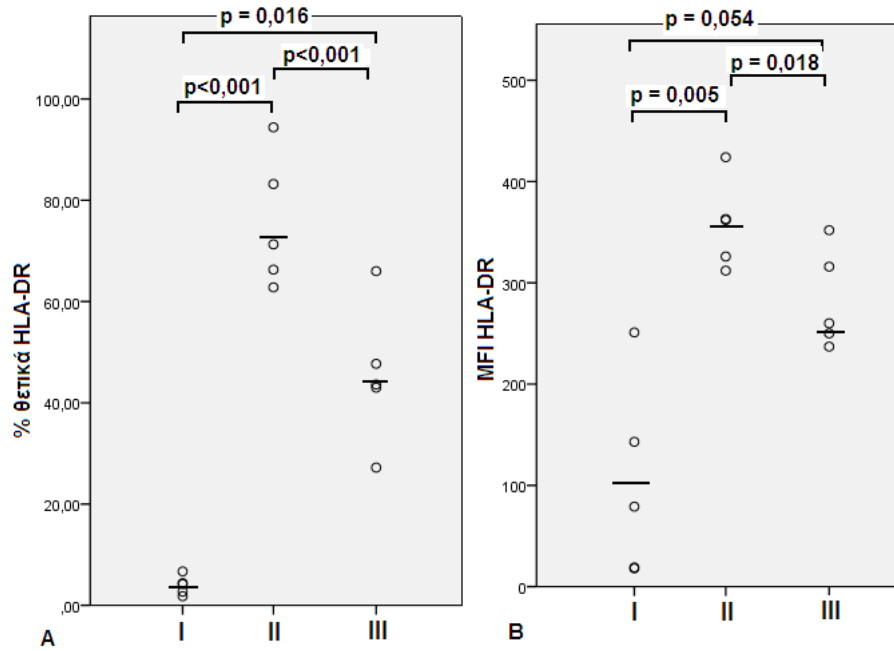
¹: Αριθμός δειγμάτων

²: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό II

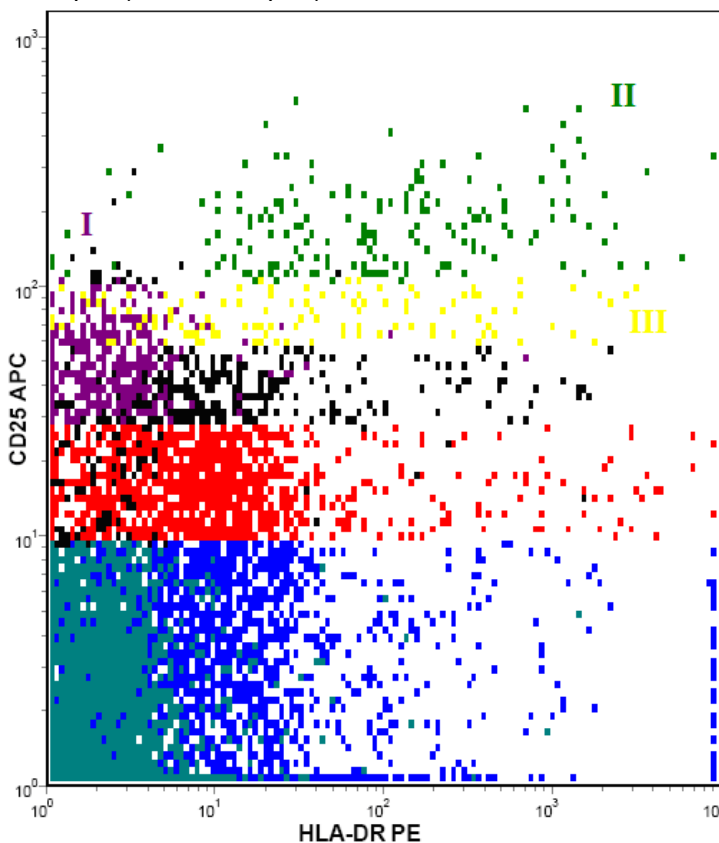
³: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό III

⁴: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό I

Από τους υπόλοιπους υποπληθυσμούς των CD4⁺ κυττάρων T, οι υποπληθυσμοί III και IV έχουν το υψηλότερο ποσοστό και την υψηλότερη MFI των HLA-DR⁺ κυττάρων (Πίνακας 67).



Εικόνα 72. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά και ο μέσος όρος (παύλα) του ποσοστού των θετικών (A) και της μέσης έντασης φθορισμού – MFI (B) του HLA-DR στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ.



Εικόνα 73. Η κατανομή της έκφρασης του HLA-DR στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ και στους υπόλοιπους πληθυσμούς στους οποίους χωρίζονται τα CD4 T λεμφοκύτταρα με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009. Σύμβαση χρωμάτων: πορφυρό-I (rTregs), πράσινο-II (aTregs), κίτρινο-III (non Tregs), κόκκινο-IV, μπλε-V, γαλαζοπράσινο-VI.

Παρόμοια διακύμανση έχει και η έκφραση του CD122 στους τρεις υποπληθυσμούς των Τρυθμ κυττάρων με τα aTregs να έχουν και εδώ την υψηλότερη έκφραση αυτού του δείκτη (Πίνακας 66, Εικόνα 74, 75).

Στον Πίνακα 67 βλέπουμε την έκφραση του HLA-DR και του CD122 στους έξι υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκυττάρων Τ με βάση την τεχνική Μίγαρα και συνεργατών 2009 και παρατηρούμε την ομοιότητα στη διακύμανση των δεικτών.

Πίνακας 66. Σύγκριση της έκφρασης του CD122 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ

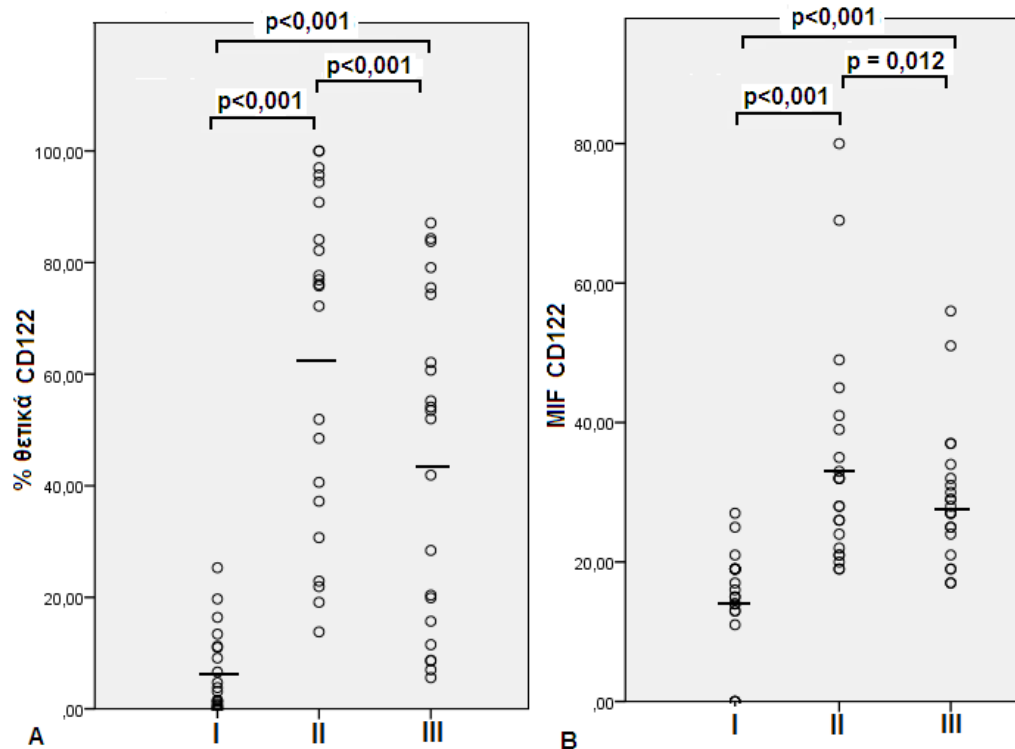
(22) ¹	% θετικά CD122	p	MFI CD122	p
I	6 ± 7,3	<0,001 ²	14,3 ± 7,9	<0,001 ²
II	64,1 ± 29,7	<0,001 ³	33,7 ± 15,7	= 0,012 ³
III	45 ± 29,1	<0,001 ⁴	28,2 ± 9,8	<0,001 ⁴

¹: Αριθμός δειγμάτων

²: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό II

³: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό III

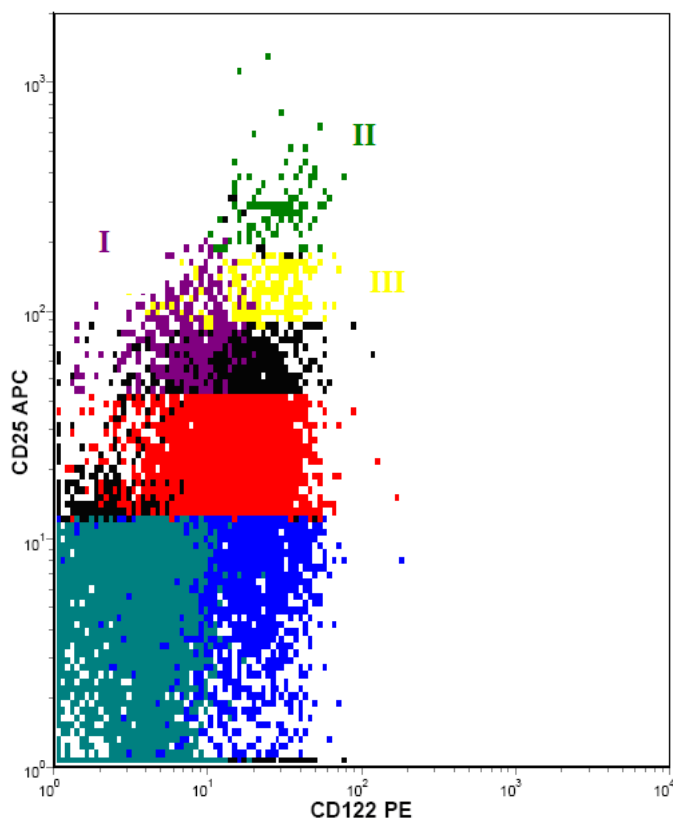
⁴: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό I



Εικόνα 74. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά και ο μέσος όρος (παύλα) του ποσοστού των θετικών (Α) και της μέσης έντασης φθορισμού – MFI (Β) του CD122 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ

Πρέπει να επισημάνουμε ότι και οι δύο προηγούμενοι δείκτες έχουν παρόμοια έκφραση με το FoxP3 και φαίνεται να είναι δείκτες ρυθμιστικής ικανότητας, με το HLA-DR και το CD122 να μην εκφράζονται σχεδόν καθόλου στα rTregs. Επομένως, τα aTregs είναι έτοιμα

να αποκριθούν στη διαθέσιμη IL-2, κατόπιν της ενεργοποίησης του υποδοχέα TCR, ωστόσο ο μηχανισμός μέσω του οποίου το HLA-DR ασκεί τη ρυθμιστική του δράση δεν είναι γνωστός.



Εικόνα 75. Η κατανομή της έκφρασης του CD122 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ και στους υπόλοιπους πληθυσμούς στους οποίους χωρίζονται τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα T με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009. Σύμβαση χρωμάτων: πορφυρό-I (rTregs), πράσινο-II (aTregs), κίτρινο-III (non Tregs), κόκκινο-IV, μπλε-V, γαλαζοπράσινο-VI.

Πίνακας 67. Ποσοστό θετικών και μέση ένταση φθορισμού ως προς HLA-DR και CD122, στους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009 και στα μονοκύτταρα

	I	II	III	IV	V	VI	Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα
HLA-DR, %	4	75,6	45,5	24,4	27,8	3,2	82,8
MFI¹ HLA-DR	37,2	127,5	100 ²	88,6	29,5	19,1	304,7
CD122, %	6	64,1	45	36,7	36,6	0,6	0,2
MFI¹ CD122	51,1	113,2	100 ²	93,7	97,4	³	³

¹: MFI= mean fluorescence intensity / μέση ένταση φθορισμού

²: Η MFI του υποπληθυσμού III λαμβάνεται ως το 100 ως προς την ένταση φθορισμού της έκφρασης των δεικτών

³ Στις περιπτώσεις που κάποιος δείκτης εκφράζεται σε λιγότερο από το 2 % των κυττάρων δεν εκτιμήθηκε η MFI

5.4 CD81

Κατά τη μελέτη της έκφρασης του CD81 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ, παρατηρούμε ότι ενώ ο δείκτης εκφράζεται από όλα τα Τρυθμ, υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην ένταση φθορισμού. Τα aTregs εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη μέση ένταση φθορισμού σε σχέση με τα υπόλοιπα Τρυθμ (Πίνακας 68, Εικόνα 76).

Πίνακας 68. Σύγκριση της μέσης έντασης φθορισμού του CD81 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ

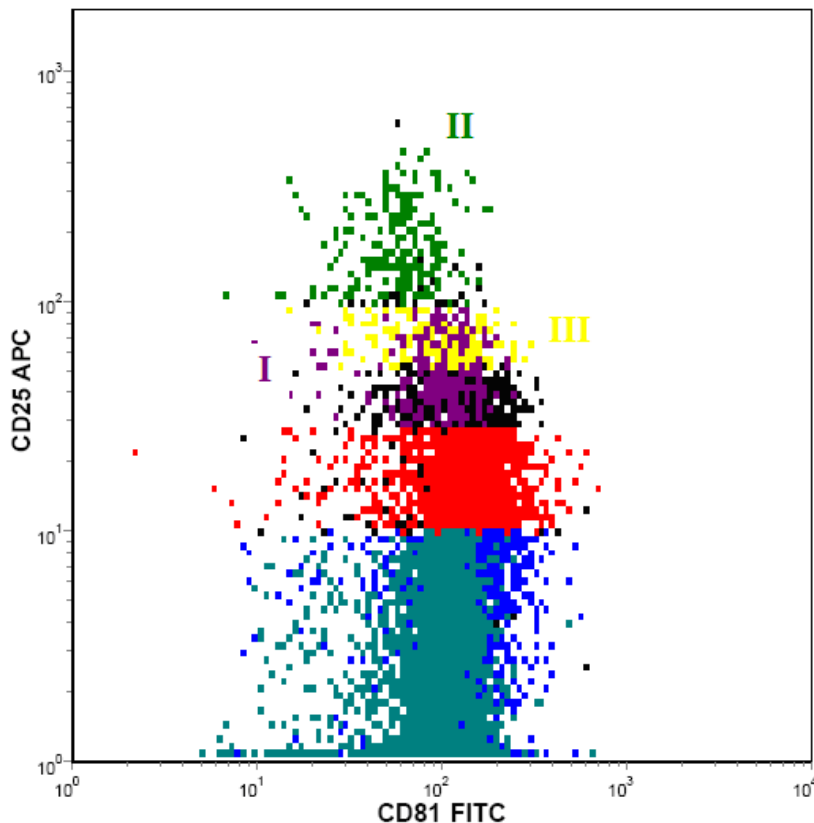
(5) ¹	MFI CD81	p
I	158,8 ± 52,5	0,014 ²
II	121,6 ± 47,5	= 0,006 ³
III	144,8 ± 45,4	= 0,038 ⁴

¹: Αριθμός δειγμάτων

²: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό II

³: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό III

⁴: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό I



Εικόνα 76. Η κατανομή της έκφρασης του CD81 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ και στους υπόλοιπους πληθυσμούς στους οποίους χωρίζονται τα CD4 T λεμφοκύτταρα με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009. Σύμβαση χρωμάτων: πορφυρό-I (rTregs), πράσινο-II (aTregs), κίτρινο-III (non Tregs), κόκκινο-IV, μπλε-V, γαλαζοπράσινο-VI.

Βλέπουμε ότι το CD81 εκφράζεται και στους έξι υποπληθυσμούς των CD4 T λεμφοκυττάρων, ωστόσο τα επίπεδα της MFI ποικίλουν από χαμηλότερα στα aTregs, έως υψηλότερα στους πληθυσμούς IV και V. Ο ακριβής ρόλος του μορίου αυτού και λόγος της χαμηλότερης έκφρασης του στα ενεργοποιημένα Τρυθμ είναι κάτι που μένει να διερευνηθεί.

Πίνακας 69. Ποσοστό θετικών ως προς C81 και μέση ένταση φθορισμού στους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκύτταρων T με βάση την τεχνική Miyaga και συνεργατών 2009 και στα μονοκύτταρα.

	I	II	III	IV	V	VI	Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα
CD81, %	99,7	99,1	98,9	99,8	99,9	99,8	60,2
MFI CD81	109,5	82,4	100¹	160,6	165,6	105,7	68,5

¹: Η MFI του υποπληθυσμού III λαμβάνεται ως το 100 ως προς την ένταση φθορισμού της έκφρασης των δεικτών

5.5 CD221

Κατά τη μελέτη του CD221 βλέπουμε ότι εκφράζεται στην επιφάνεια του τουλάχιστον 42 % των Τρυθμ και με διαφορετική ένταση φθορισμού σε κάθε υποπληθυσμό. Τα aTregs έχουν χαμηλή ένταση φθορισμού στο 42% των κυττάρων που εκφράζουν το δείκτη και ενδιάμεση ένταση στο 85 % των rTregs. Ο τελευταίος υποπληθυσμός έχει το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν το CD221 και με τη μέγιστη συχνότητα (Πίνακας 70, Εικόνα 77). Η διακύμανση της έκφρασης του CD221 στους υποπληθυσμούς των CD4 λεμφοκυττάρων φαίνεται στον Πίνακα 71.

Πίνακας 70. Σύγκριση της έκφρασης του CD221 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ

(10) ¹	% θετικά CD221	p	MFI CD221	p
I	84,7 ± 9	<0,001 ²	21,7 ± 5,3	=0,002 ²
II	42,1 ± 26,1	= 0,02 ³	14 ± 4,5	= 0,002 ³
III	49,7 ± 23,3	<0,001 ⁴	16,2 ± 4,3	=0,003 ⁴

¹: Αριθμός δειγμάτων

²: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό II

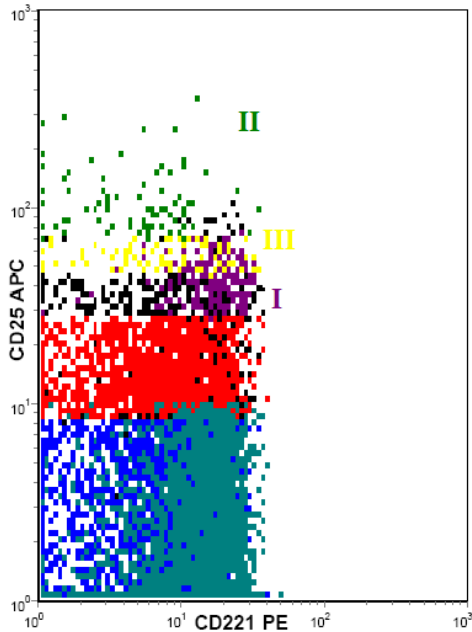
³: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό III

⁴: στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τον υποπληθυσμό I

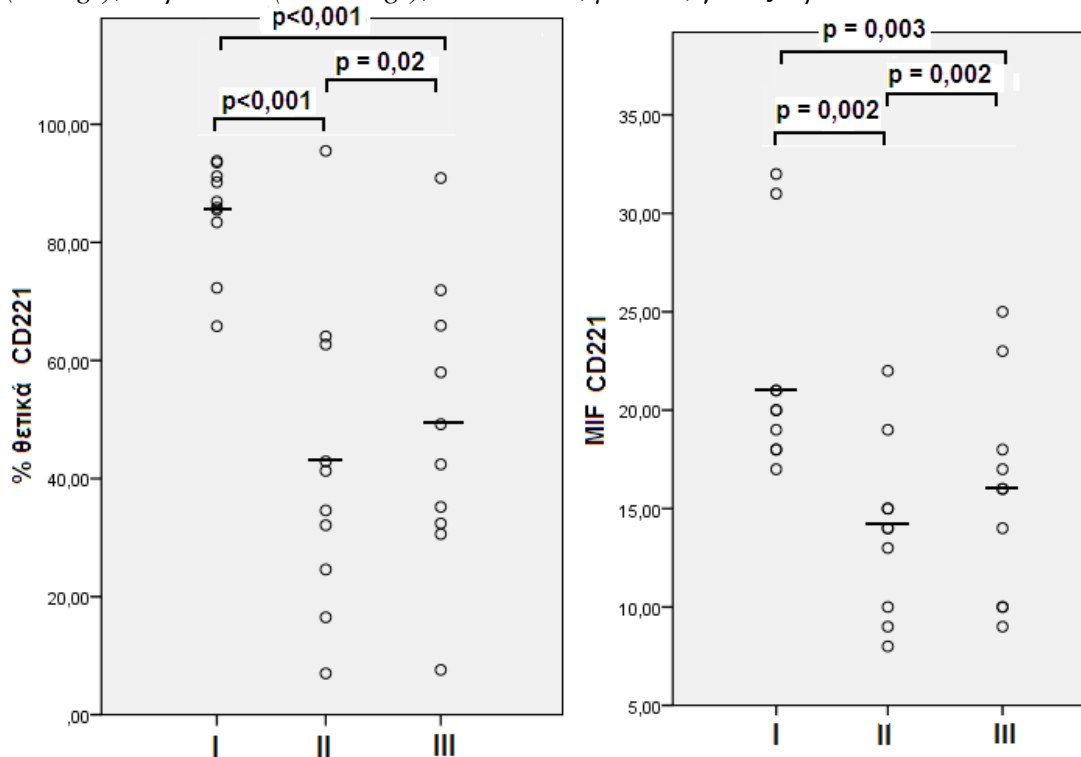
Πίνακας 71. Ποσοστό θετικών ως προς CD221 και μέση ένταση φθορισμού στους υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκύτταρων T με βάση την τεχνική Miyaga και συνεργατών 2009 και στα μονοκύτταρα.

	I	II	III	IV	V	VI	Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα
CD221, %	84,9	42,1	48,4	52,8	51,7	81,2	7,6
MFI CD221	147,2	89,1	100¹	105,3	102,3	129	259,9

¹: Η MFI του υποπληθυσμού III λαμβάνεται ως το 100 ως προς την ένταση φθορισμού της έκφρασης των δεικτών



Εικόνα 77. Η κατανομή της έκφρασης του CD221 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ και στους υπόλοιπους πληθυσμούς στους οποίους χωρίζονται τα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα T με βάση την τεχνική Miyara και συνεργατών 2009. Σύμβαση χρωμάτων: πορφυρό-I (rTregs), πράσινο-II (aTregs), κίτρινο-III (non Tregs), κόκκινο-IV, μπλε-V, γαλαζοπράσινο-VI.



Εικόνα 78. Γράφημα στο οποίο αναδεικνύονται η διασπορά και ο μέσος όρος (παύλα) του ποσοστού των θετικών (Α) και της μέσης έντασης φθορισμού – MFI (Β) του CD221 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ

Ο φαινότυπος $CD127^{-/low}CD221^{-/low}$ που εκφράζουν τα aTregs φαίνεται να σχετίζεται με την έλλειψη πολλαπλασιασμού, ακόμη και παρουσία IL-7 και IGF1, που είναι δύο αυξητικοί παράγοντες που φαίνεται να εκφράζονται σε μεγάλο ποσοστό στους λεμφαδένες. Αντίθετα, η ενδιάμεση κατανομή του CD127 και του IGF1R από τα rTregs, μπορεί να υποδεικνύει μια μεγαλύτερη ετοιμότητα αυτών των κυττάρων για να αποκριθούν σε συγκεκριμένους παράγοντες αλλά σε συνθήκες που δεν είναι άμεσα προφανείς.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη παρούσα μελέτη αντιμετωπίσαμε τόσο μεθοδολογικά όσο και επιστημονικά ζητήματα τα οποία έπρεπε να λυθούν προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα της κατάστασης των κυττάρων Τρυθμ σε συγγενείς ατόμων με ΣΔ1. Κατ' αρχήν ετέθη ζήτημα πιστοποίησης της μεθόδου την οποία είχαμε επιλέξει (τρίχρωμος φθορισμός χωρίς πυρηνική χρώση για τον παράγοντα FoxP3, λόγω μη ειδικότητας του πρώτου αντισώματος που κυκλοφόρησε, κλώνος PCH101 από eBioscience). Αυτό επιτεύχθηκε με την τριπλή σήμανση CD4/CD25/CD127, και με γνώμονες το γεγονός ότι τα Τρυθμ είναι κύτταρα με την μεγαλύτερη έκφραση του μορίου CD25 (CD25^{high}), έχουν ελαφρώς (αλλά διακριτή και στατιστικώς σημαντική) μειωμένη έκφραση του μορίου CD4 (CD4^{low}) και παράλληλα με πολύ μικρή έως καθόλου κυτταρομεμβρανική έκφραση του μορίου CD127 (IL-7Rα), δηλ. χαρακτηρίζονται ως CD127^{-/low}. Εστιαστήκαμε στο 7 % του πληθυσμού κυττάρων CD4⁺ με την υψηλότερη έκφραση CD25, ώστε να είμαστε σε θέση να περιλάβουμε όλα τα πιθανά κύτταρα που ήταν Τρυθμ. Αποδείξαμε ότι με αυτό τον τρόπο είχαμε πάρα πολύ καλό συσχετισμό ($r = 0,865$) της διακύμανσης του ποσοστού των Τρυθμ όπως τα ξεχωρίζαμε μέχρι τότε (CD25^{high}CD4^{low}CD127^{-/low}) και του αντίστοιχου ποσοστού των κυττάρων που ήταν CD127^{-/low} μέσα στο κορυφαίο 7 % ως προς έκφραση CD25 του κυτταρικού πληθυσμού. Η επιβεβαίωση αυτή της επιλογής φάνηκε με την μεγάλη διαφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης FoxP3 στα Τρυθμ και τα Τδραστ (π.χ. $89,9 \pm 5,4$ % προς $28,8 \pm 16$ % αντίστοιχα), καθώς και με τον πολύ καλό συσχετισμό της διακύμανσης του ποσοστού έκφρασης του FoxP3 στο κορυφαίο 7 % και του ποσοστού των Τρυθμ εκφραζόμενων ως κυττάρων CD25^{high}CD4^{low}CD127^{-/low} σε κλάσμα των κυττάρων CD4⁺ ($r = 0,749$, $r^2 = 0,56$ σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,01$). Η περαιτέρω διερεύνηση με το προκύψαν εν τω μεταξύ σύστημα ταυτοποίησης ανθρώπινων Τρυθμ με τριπλό φθορισμό [21] έδειξε και σε δικά μας πειράματα, ότι η κατανομή αυτή διαχωρίζει με βέλτιστο τρόπο τα ενεργοποιημένα Τρυθμ (aTregs, πληθυσμός II) από τα αδρανή Τρυθμ (rTregs, Πληθυσμός I) και τα ενεργοποιημένα FoxP3⁺ κύτταρα T. Παράλληλα, αποδείξαμε ότι ο πληθυσμός II έχει πράγματι από μηδενική έως πολύ χαμηλή ένταση μεμβρανικής έκφρασης CD127 ενώ ο πληθυσμός I έχει κάπως μεγαλύτερη έκφραση κι ο πληθυσμός III ακόμη μεγαλύτερη έκφραση αυτού του υποδοχέα ανά κύτταρο. Οι δε πληθυσμοί II και III έχουν αντίστοιχα περί τα 18 % και 12 % των κυττάρων τους χωρίς καθόλου ανιχνεύσιμη έκφραση CD127. Συνεπώς, κατά τον συνήθη τρόπο διαχωρισμού των Τρυθμ με το φαινότυπο CD4^{low}CD25^{high}, είτε με τη βοήθεια του δείκτη CD127 είτε του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 υπεισέρχονται εξ ορισμού στον πληθυσμό των Τρυθμ και κύτταρα του πληθυσμού III, γεγονός που συνεπάγεται μια σχετική αλλοίωση. Ο συσχετισμός όμως με τα κύτταρα που αντιστοιχούν στον πραγματικό πληθυσμό Τρυθμ, και αφορούν τους υποπληθυσμούς I και II, είναι μεγάλος και ικανοποιητικός. Αυτή δε η ανακάλυψη των Τρυθμ ως κυττάρων με έκφραση CD4^{low} ενδεχόμενα να εμπεριέχει και κάποιο φυσιολογικό ρόλο, τον οποίο και εξερευνήσαμε περαιτέρω.

Η μελέτη των Τρυθμ σε συγγενείς ατόμων με ΣΔ1 (αδέλφια, μητέρες, πατέρες και παιδιά) δεν έδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορετική κατανομή αυτού του πληθυσμού σε κάποια από τις πιο πάνω κατηγορίες. Η μελέτη έγινε τόσο με τον τρόπο προσδιορισμού που αναλύσαμε ανωτέρω χρησιμοποιώντας την προσέγγιση τριπλού φθορισμού CD25^{high}CD4^{low}CD127^{-/low} όσο και με την προσέγγιση τριπλού φθορισμού που χρησιμοποιούν οι Liu και συν. δηλαδή CD25⁺CD127^{-/low} [24]. Επιπλέον έγινε σύγκριση των τριών υποπληθυσμών των Τρυθμ που εκφράζουν την πρωτεΐνη FoxP3, όπως διαχωρίζονται με βάση την τεχνική Miyaga και συν. 2009, χωρίς επίσης να αναδείξει καμιά διαφορά. Αυτό αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σημασία αν αναλογιστούμε ότι περισσότεροι από τους μισούς συγγενείς των

ατόμων με ΣΔ1 είχαν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο HLA-DR/DQ το οποίο να προδιαθέτει για ΣΔ1 όπως θα αναλύσουμε διεξοδικότερα παρακάτω.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της έκφρασης διαφόρων δεικτών κυτταρικής επιφάνειας σε Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ σε φυσιολογικά άτομα και τους συγγενείς ατόμων με ΣΔ1. Ιδιαίτερα μελετήσαμε τους δείκτες CD122 (IL-2R β), CD132 (IL-2R γ_c), TGF- β , TGF- β RII, HLA-DR, HLA-DQ, CD74 (HLA-Ii), CLIP, CD27, CD28, CD152, CD95, CD178 (CD95Ligand, CD95L) κατά μόνος και σε ζεύγη, συγκεκριμένα CD122/ CD132, TGF- β / TGF- β RII, HLA-DR/ HLA-DQ, HLA-DR/ CLIP, CD28/ CD152 και CD95/ CD178. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν δύο αντισώματα (που αναγνώριζαν διαφορετικούς επίτοπους) για τον ίδιο στόχο. Για μεν τους φυσιολογικούς μάρτυρες βρέθηκε ότι τα CD4⁺ Τρυθμ εκφράζουν σε πολύ μεγάλη έκταση (~ 50 % των κυττάρων) CD122, κάτι που συμβαίνει σε σημαντικά λιγότερα Τδραστ και λίγα Τπαρθ, με ελαφρά (αν και στατιστικά σημαντική) μειωμένη MFI. Αντίθετα, η κοινή αλυσίδα CD132 εκφράζεται από τη πολύ μεγάλη πλειοψηφία Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ (84-90 % των κυττάρων) με μικρή μείωση της MFI στα Τπαρθ. Συνεπώς έκφραση και των δύο αλυσίδων μαζί (IL-2R $\beta\gamma_c$), που είναι ο μέσης συγγένειας υποδοχέας της IL-2, θα υπάρχει περίπου στη συχνότητα που εκφράζεται η αλυσίδα β (CD122) επειδή αυτή εκφράζεται στη μειοψηφία των κυττάρων. Ο TGF- β , ανοσοκατασταλτικός παράγων και πολύ σημαντικό μόριο στη διαφοροποίηση των Τρυθμ, εκφράζεται σε πολύ μικρή μειοψηφία (6,2 -7,9 %) των Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ, χωρίς καθόλου διαφοροποιήσεις μεταξύ τους, ενώ ο υποδοχέας τύπου II του παράγοντα αυτού (TGF- β RII) εκφράζεται σε περισσότερα κύτταρα Τδραστ παρά Τρυθμ ή Τπαρθ, που είναι όμως μια μικρή μειοψηφία (8,4 -13,5 % των κυττάρων) χωρίς καθόλου διαφοροποιήσεις στην MFI. Κάτι λιγότερο από το 2 % των κυττάρων εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς.

Τα μόρια ιστοσυμβατότητας HLA-DR εκφράζονται στο 47,5 % των Τρυθμ, ενώ μόνο στο 10,6 % των Τδραστ και 9,2 % των Τπαρθ. Αυτό αποτελεί μια μεγάλη έκπληξη διότι το συγκεκριμένο μόριο είχε καταγραφεί εδώ και 40 σχεδόν χρόνια (μέσω μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού) ως δείκτης ενεργοποίησης των κυττάρων CD4⁺ T. Επίσης, η MFI της συγκεκριμένης έκφρασης είναι μεγάλη, με σειρά Τρυθμ > Τδραστ > Τπαρθ, και στατιστικώς σημαντική. Αντίθετα η έκφραση του άλλου τύπου ιστοσυμβατότητας τάξης II, των μορίων HLA-DQ, περιορίζεται στο 10,2 % των Τρυθμ και 6 % των Τδραστ και Τπαρθ, με αρκετά μεγαλύτερη και στατιστικώς σημαντική την MFI στα πρώτα σε σχέση με τα δεύτερα. Η δε συχνότητα συνέκφρασης HLA-DR/ HLA-DQ περιορίζεται στο 5 % των Τρυθμ και 1 % των Τδραστ ή Τπαρθ, όση θα περίμενε κανείς από την τυχαία και όχι συντονισμένη μεταξύ των έκφραση ανά κύτταρο (δηλ. ίση με το γινόμενο του ποσοστού έκφρασης HLA-DR και HLA-DQ στον κάθε πληθυσμό ξεχωριστά). Πέρα από την έκφραση HLA-DR εξερευνήθηκε ο ρόλος της αμετάβλητης αλυσίδας Ii (CD74) και του συμπλόκου το οποίο σχηματίζεται από HLA-DR και το πεπτίδιο CLIP. Βρέθηκε ότι το CD74 εκφράζεται σε περ. 9,4 % των Τρυθμ και κάπως λιγότερο των Τδραστ και Τπαρθ. Συγκριτικά με τους άλλους υποπληθυσμούς, σε μεγαλύτερο ποσοστό εκφράζουν CLIP (όπως αναγνωρίζονται από το αντίσωμα CERCLIP) τα Τρυθμ κύτταρα, συγκεκριμένα 17,5 % Τρυθμ και λιγότερα από τα μισά αυτών Τδραστ και Τπαρθ. Όταν τα κύτταρα εξετάζονται με τετραπλό φθορισμό (CD4, CD25, HLA-DR, CLIP) τα Τρυθμ σε μέσο ποσοστό 12 % συνεκφράζουν HLA-DR και CLIP ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε Τδραστ και Τπαρθ είναι 2,4 και 1,7 %. Αυτό δείχνει ισχυρή συνέκφραση και των δύο μορίων, ενδεχόμενα υπό κάποιο έλεγχο. Είναι αξιοσημείωτο ότι και στους τρεις υποπληθυσμούς κυττάρων υπάρχει ένα μικρό ποσοστό (περ. 5 %) το οποίο εκφράζει μόνο CLIP στη κυτταρική μεμβράνη και καθόλου HLA-DR. Μάλιστα στα Τδραστ και Τπαρθ τυχαίνει να είναι σχεδόν διπλάσιο από το ποσοστό κυττάρων που εκφράζουν μόνο HLA-DR, κάτι που αντιστρέφεται πλήρως στη περίπτωση των Τρυθμ. Το ζήτημα της εμφάνισης των

συμπλόκων HLA-DR—CLIP και της σημασίας τους στην ανοσοανοχή είναι κάτι που πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, ιδιαίτερα, δεδομένης της σχετικής αντίστασης στην αντικατάσταση του πεπτιδίου CLIP από άλλα πεπτίδια (ξένα και του εαυτού) στα αλληλόμορφα HLA-DQ2, -DQ8, -DQ2-8 και -DQ8-2, τα οποία είναι όλα προδιαθετικά για εμφάνιση ΣΔ1 [205].

Πέρα από την έκφραση του CD74, έγινε έλεγχος και για την έκφραση CD44 επειδή οι δύο πρωτεΐνες σχετίζονται με την χημειοτακτική ουσία MIF: η πρώτη ως υποδοχέας του MIF και η δεύτερη ως απαραίτητος συνυποδοχέας για την επακόλουθη μεταγωγή σήματος [38]. Το μόριο CD44 εκφράζεται ουσιαστικά σε όλα τα κύτταρα T, ανεξαρτήτως ιδιότητας, συνεπώς μπορούμε να πούμε ότι όσα Τρυθμ εκφράζουν CD74 (που δεν ξεπερνούν το 10 % σε καμιά κατηγορία) θα πρέπει να είναι σε θέση να ανταποκριθούν σε ερέθισμα από τον MIF.

Στη συνέχεια εξετάστηκε ο ρόλος των μορίων CD27, CD28, CD152, CD95 και CD178. Το μόριο CD27 εκφράζεται στη πλειοψηφία των κυττάρων T (κατά μέσο όρο στο 79-88 %) με ελαφρά αλλά σημαντική υπεροχή στα Τρυθμ σε σχέση με τα Τδραστ. Το CD28 υπάρχει ουσιαστικά σε όλα τα κύτταρα T και φαίνεται ότι τα Τρυθμ και ακόμη περισσότερο τα Τπαρθ έχουν MFI η οποία είναι σαφώς κατώτερη της αντίστοιχης στα Τδραστ ($p < 0,001$ και των δύο σε σχέση με τα Τδραστ). Η κατασταλτική πρωτεΐνη CTLA-4 (CD152) επίσης εκφράζεται επιλεκτικά στα κύτταρα Τρυθμ, και σε επίπεδο ποσοστού αλλά και MFI, αν και όλες οι μεταγενέστερες έρευνες ανεξαιρέτως βρίσκουν πολύ μικρότερο ποσοστό θετικών κυττάρων σε σχέση με τις πρώτες. Ερευνήσαμε επίσης την ενδοκυτταρική έκφραση του CTLA-4 στους τρεις πληθυσμούς κυττάρων και τα Τρυθμ υπερέχουν σημαντικά των Τδραστ και Τπαρθ σε ποσοστά έκφρασης και λιγότερο σημαντικά σε MFI. Ελαφρώς υπερέχουν τα Τρυθμ και σε ποσοστό διπλώς θετικών ($CD28^+CD152^+$) κυττάρων πράγμα που δεν μπορεί προς το παρόν να αξιολογηθεί. Το σύστημα CD95-CD178 (Fas-FasL) είναι από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα συστήματα ανοσοτοξικότητας που γνωρίζουμε. Παρ' όλο που Τρυθμ και Τδραστ εκφράζουν περίπου το ίδιο ποσοστό CD95 (77 έναντι 73,3 %) και σημαντικά ανώτερο των Τπαρθ, τα πρώτα έχουν κάτι περισσότερο από διπλάσια MFI σε σχέση με τα δεύτερα και ακόμη μεγαλύτερη σε σχέση με τα Τπαρθ ($p < 0,001$). Η έκφραση του υποδοχέα του CD95, δηλ. του μορίου CD178, στα κύτταρα T, παρ' ότι περιορισμένη, είναι σημαντικώς πιο έντονη στα Τδραστ και τα Τπαρθ. Η δε MFI είναι ανώτερη, αλλά όχι σημαντικά, στα Τδραστ και τα Τπαρθ. Η μεμβρανική αυτή πρωτεΐνη σπείρει τον θάνατο σε κύτταρα-στόχους τα οποία εκφράζουν το CD95 εφ' όσον συντρέχουν και άλλες προϋποθέσεις. Η μεγάλη σε έκταση έκφραση του μορίου CD95 από τα Τρυθμ δείχνει ότι αυτά τα κύτταρα ενδεχόμενα να είναι επιρρεπή σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ο οποίος να επιτελείται μέσω των συγκεκριμένων μορίων.

Σε όλες τις ανωτέρω περιπτώσεις η σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και συγγενών ατόμων με ΣΔ1 έδειξε πολύ λίγες περιπτώσεις στατιστικώς σημαντικών διαφορών. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες αποκλίσεις αφορούσαν τα αδέρφια διαβητικών ατόμων όπου παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές μειώσεις (με πολύ λίγες εξαιρέσεις σημαντικών αυξήσεων) στα ακόλουθα: του ποσοστού μεμβρανικής έκφρασης TGF- β στα Τρυθμ και Τπαρθ και της MFI στα Τρυθμ και Τδραστ, του ποσοστού έκφρασης HLA-DR στα Τρυθμ και Τδραστ και της MFI στα Τπαρθ, της MFI του μορίου CD28 στα Τρυθμ και τα Τπαρθ, της MFI του μορίου CD27 στα Τδραστ και Τπαρθ καθώς και του ποσοστού $CD95^+$ Τπαρθ κυττάρων. Αντίθετα, υπήρξε αύξηση στην MFI του μορίου CD152 στα Τδραστ και τα Τπαρθ. Οι μητέρες είχαν χαμηλό ποσοστό έκφρασης TGF- β στα Τρυθμ και Τπαρθ, καθώς και χαμηλή MFI στα Τπαρθ. Οι πατέρες παιδιών με ΣΔ1 εμφάνισαν χαμηλό ποσοστό έκφρασης CD122 στα κύτταρα Τδραστ, ενώ εμφάνισαν υψηλό ποσοστό έκφρασης CD132 στα Τρυθμ, καθώς και υψηλή MFI του μορίου αυτού σε Τδραστ και Τπαρθ, και υψηλή MFI του μορίου CD74 στα

Τρυθμ. Τέλος, τα παιδιά διαβητικών που ήταν και το μικρότερο δείγμα, εμφάνισαν μειωμένη MFI του μορίου CD122 στα Τπαρθ και του μορίου CD132 στα Τρυθμ.

Η κατανομή των αλληλόμορφων ιστοσυμβατότητας τάξης II δείχνει μερικά αξιοσημείωτα συμπεράσματα. Υπάρχει πρώτον μεγάλη συχνότητα του HLA-DR3 στο γενικό πληθυσμό και αρκετά μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική στους πληθυσμούς των συγγενών διαβητικών ατόμων. Το τελευταίο αναμένεται, αφού ο Ελληνικός πληθυσμός με ΣΔ1 είναι κυρίως HLA-DR3⁺-DQB1*02, πολύ δευτερευόντως HLA-DR4⁺-DQB1*0302 ενώ είναι αξιοσημείωτα σημαντική η παρουσία του συνδυασμού HLA-DR3⁺-DQB1*02/DR4⁺-DQB1*0302. Αντίστοιχη κατανομή υπάρχει και για τα HLA-DQB1*02 -DQB1*0302, τα οποία είναι και στον Ελληνικό πληθυσμό σε ανισορροπία σύνδεσης με τα -DR3 και -DR4, αντίστοιχα. Μεγάλη έκπληξη προκάλεσε το εύρημα της αξιοσημείωτης συχνότητας του προστατευτικού αλληλόμορφου -DQB1*0602 στο γενικό πληθυσμό της Ηπείρου, σαφώς μεγαλύτερης συχνότητας, έστω και σε αυτό το περιορισμένο δείγμα, από ό,τι στον γενικό Ελληνικό πληθυσμό. Ελέγχοντας το ποσοστό των Τρυθμ ως συνάρτηση του αλληλόμορφου ιστοσυμβατότητας τάξης II βρίσκουμε μια μικρή στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών φορέων HLA-DR3⁺/μη DR4 και όσων δε φέρουν DR3 ή DR4, κάτι το οποίο μόλις και δεν επεκτείνεται αν εξεταστούν τα αντίστοιχα αλληλόμορφα HLA-DQ. Μια μικρή διαφορά στην ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ HLA-DR και HLA-DQ κάνει μεγάλη διαφορά έτσι ώστε ειδομένα τα δεδομένα από τη σκοπιά του τελευταίου τύπου ιστοσυμβατότητας δε μας δίνουν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα. Ο σχετικά μικρός αριθμός δειγμάτων, με πολύ λίγους ομοζυγώτες για τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα περιορίζει την ισχύ της ανάλυσης αυτής.

Δυστυχώς αυτή είναι από τις λίγες μελέτες που έχει αποπειραθεί να συσχετίσει τη συχνότητα Τρυθμ με συγκεκριμένα αλληλόμορφα ιστοσυμβατότητας. Σημειώνουμε ότι αυτά τα αλληλόμορφα είναι οι παράγοντες επιλογής των Τρυθμ στον θύμο αδέντα (και κατ' επέκταση στη περιφέρεια), και κατά τη κρατούσα άποψη η μέτρια έως ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ pMHCII και αντίστοιχου TCR στο συγκεκριμένο ιστό οδηγεί σε επιλογή Τρυθμ, ενώ η αντίστοιχη ισχυρή έως πολύ ισχυρή αλληλεπίδραση οδηγεί σε απάλειψη του λεμφοκυτταρικού T κλώνου [206]. Παρ' ότι πιο παλιές μελέτες [207] συνηγορούσαν υπέρ ενός επιτακτικού-ρυθμιστικού ρόλου των μορίων HLA-DQ επί των μορίων HLA-DR δεν έχει γίνει καμία μελέτη (είτε στον άνθρωπο είτε σε κάποιο ζώο) η οποία να καταγράφει τον περιορισμό των Τρυθμ ως προς τον κάθε έναν από τους τρεις γονιδιακούς τύπους MHCII (HLA-DP/-DQ/-DR).

Η μελέτη των Miyaga και συν. η οποία εμφανίστηκε τον Ιούνιο του 2009 μας υποχρέωσε να μελετήσουμε ορισμένα χαρακτηριστικά των Τρυθμ και σύμφωνα με τον συγκεκριμένο τρόπο ανάλυσης, ο οποίος καθιερώνεται αργά μεν αλλά σταθερά. Όπως εξηγήθηκε στην Εισαγωγή και στα αποτελέσματα, η συγκεκριμένη προσέγγιση απαιτεί την χρήση τριών δεικτών (CD4, CD25, CD45RA ή CD45RO) για χαρακτηρισμό των Τρυθμ, αντί των μέχρι τότε συνηθισμένων δύο (CD4, CD25) ή τριών (CD4, CD25, CD127). Στην τελευταία περίπτωση οι Miyaga και συν. έδειξαν, όπως άλλωστε και εμείς εδώ, την ασάφεια η οποία υπάρχει, και το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος τρόπος διαχωρισμού είναι ο μόνος ο οποίος διαχωρίζει τον πληθυσμό CD4⁺CD25^{int}CD127^{high}CD45RO⁺FoxP3^{int} (πληθυσμός III) ο οποίος δεν έχει ρυθμιστική δράση, από τα κύτταρα CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RO⁺FoxP3^{high} (πληθυσμός I, μεγάλη ρυθμιστική δράση) και CD4⁺CD25^{int}CD127^{int}CD45RO⁻FoxP3^{low} (πληθυσμός I, μικρή ρυθμιστική δράση).

Δείξαμε αρχικά ότι όντως μπορούμε να πετύχουμε και εμείς τον διαχωρισμό των 6 διαφορετικών πληθυσμών με τα δεδομένα χαρακτηριστικά. Μάλιστα, για του λόγου το αληθές, αναλύσαμε την ένταση του μορίου CD127 στους τρεις αυτούς πληθυσμούς και η

κατανομή που βρήκαμε είναι πολύ παρόμοια με αυτήν των Miyara και συν. 2009 (βλέπε Εικόνα 66 και Πίνακα 56). Θεωρούμε μάλιστα αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ενώ υπάρχει τόση μεγάλη διαφορά στη μεμβρανική έκφραση του μορίου CD127 τα επίπεδα mRNA του μορίου κατά τους Miyara και συν. είναι χαμηλότατα στον πληθυσμό II, είναι μόλις ελαφρώς πιο ψηλά στους πληθυσμούς I και III, σε αντίθεση με τα επίπεδα μεμβρανικής πρωτεΐνης τα οποία τεκμηριώνονται και από την αναφερθείσα αλλά και την παρούσα εργασία. Αυτό το εύρημα δεν είναι πρωτόγνωρο, αντίθετα έχει καταγραφεί πολλές φορές για πολλές και διάφορες πρωτεΐνες, μεμβρανικές, κυτταροπλασματικές ή πυρηνικές, και δείχνει πόσο μικρός συσχετισμός μπορεί να υπάρχει σε πολλά κύτταρα, μεταξύ επιπέδων mRNA και αντίστοιχων επιπέδων της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Το ίδιο παρατηρείται και για το μόριο CD25, και το μόριο CD122, ελάχιστο δείγμα της προσοχής που απαιτείται για να τεκμηριωθεί η παρουσία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε μια δεδομένη κατάσταση.

Η προκύψασα μελέτη του Miyara και συν. 2009 μας υποχρέωσε να μελετήσουμε και τις ιδιότητες των Τρυθμ κατά τον χαρακτηρισμό τους μέσω των συγκεκριμένων τρόπων σήμανσης των πληθυσμών με μονοκλωνικά αντισώματα. Αφ' ενός δείξαμε ότι όντως προκύπτει ο ίδιος τύπου διαχωρισμός, και το ίδιο σχήμα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3. Αφ' ετέρου στο λεπτομερές κοκκιόγραμμα CD25 προς CD127 κυττάρων τα οποία είχαν αναλυθεί με βάση την τεχνική Miyara και συν. 2009, φάνηκε ότι ο πληθυσμός I έχει κύτταρα CD127^{high} καθώς και περισσότερα κύτταρα CD127^{-low}, ενώ ο πληθυσμός II έχει μόνο κύτταρα CD127^{-low} και ο πληθυσμός III διαθέτει κυρίως CD127^{-low} καθώς και αρκετά CD127^{high}. Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι ο πληθυσμός III βρέθηκε να μην διαθέτει καθόλου ρυθμιστικές ικανότητες, κατανοούμε το σφάλμα του διαχωρισμού των κυττάρων σε Τρυθμ και Τδραστ με βάση την υψηλή έκφραση CD25 και την χαμηλή έως καθόλου έκφραση CD127 (Bluestone, JEM2006), καθώς με αυτό τον τρόπο συμπεριλαμβάνονται και κύτταρα CD127^{-low} ως Τρυθμ, ενώ δεν έχουν τη παραμικρή ρυθμιστική ικανότητα. Σε μικρότερη έκταση το ίδιο σφάλμα προκύπτει και με τη συμπερίληψη κυττάρων του πληθυσμού I (rTregs), τα οποία έχουν περίπου τη μισής έκτασης ρυθμιστική ικανότητα σε σύγκριση με αυτά του πληθυσμού II (aTregs) [21].

Προτιμήσαμε στη συνέχεια να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω τα CD4⁺ κύτταρα T διαχωρισμένα κατά τη τεχνική Miyara και συν. 2009 ώστε να διευκρινήσουμε ορισμένες από τις ιδιότητές τους και προσπαθήσαμε να τις συσχετίσουμε με τη παρουσία συγκεκριμένων μορίων. Κατ' αρχήν, διαπιστώνουμε ότι η έκφραση σε επίπεδο mRNA δεν αντανακλά την έκφραση σε επίπεδο πρωτεϊνών, με παραδείγματα τα μόρια CD25, CD122, CD127. Τα αντίστοιχα mRNA των δύο πρώτων βρέθηκαν από τους Miyara και συν. να εκφράζονται σε μεγάλη έκταση στους πληθυσμούς I, II και III, και κάπως μικρότερη για τους IV/V, κάτι που δεν αντανακλάται σε επίπεδο μεμβρανικής έκφρασης ιδιαίτερα για τους δύο τελευταίους πληθυσμούς, όπως το έχουμε διαπιστώσει. Ακριβώς η αντίθετη κατάσταση παρατηρείται με την έκφραση CD127, η οποία δείχνει πολύ χαμηλό (πληθυσμοί I-III) και χαμηλό (πληθυσμοί IV/V) επίπεδο mRNA, ενώ το αντίστοιχο πρωτεϊνικό επίπεδο ιδιαίτερα στο τελευταίο μείγμα πληθυσμών είναι υψηλό. Η τεχνική ευκολία ελέγχου των επιπέδων mRNA για πάρα πολλά γονίδια είναι όντως μεγάλη, σε αντίθεση με τη πολύ δαπανηρή και με μεγάλη δυσκολία τεχνική ελέγχου των γονιδιακών προϊόντων, δηλ. των πρωτεϊνών, όμως παρά το ότι η πρώτη σίγουρα σημαίνει κάτι αναφορικά με τον τρόπο ρύθμισης, δεν αντανακλά πάντα τα αντίστοιχα επίπεδα παρουσίας, πόσο μάλλον και της δραστηριότητας των συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Ο έλεγχος της έκφρασης του υποδοχέα IL-2Rβ (CD122) στους πληθυσμούς I, II και III των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων κατά Miyara και συν. 2009 ουσιαστικά δείχνει απουσία μεμβρανικής έκφρασης του CD122 στα rTregs (I), πολύ σημαντική παρουσία στα aTregs (II)

με σαφώς μεγαλύτερη MFI, και σημαντική παρουσία στον πληθυσμό III των μη ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων T με μέση έκφραση FoxP3 και μέση έκφραση (όσο και ο πληθυσμός I) CD25. Με δεδομένη την σχεδόν καθολική έκφραση της κοινής αλυσίδας CD132 σε όλα τα CD4⁺ κύτταρα T, το συγκεκριμένο εύρημα δηλώνει την ετοιμότητα της πλειοψηφίας των κυττάρων του πληθυσμού II να ανταποκριθούν σε ποσότητα IL-2 συγκέντρωσης pM, κάτι που επίσης μπορούν να κάνουν και τα κύτταρα του πληθυσμού III, τα οποία και είναι από τα κύτταρα που μπορούν να παράγουν IL-2. Αντίθετα, αυτή η δυνατότητα απόκρισης σε IL-2 είναι ουσιαστικά ανύπαρκτη στα rTregs, κάτι που επιβεβαιώνει τη μειωμένη ρυθμιστική τους δράση. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι οι πληθυσμοί IV και V εκφράζουν αξιοσημείωτα υψηλά επίπεδα CD122, κάτι που για μεν τον πρώτο συνάδει με το γεγονός ότι εκφράζει επίσης CD25, αλλά όχι και για τον δεύτερο ο οποίος είναι αρνητικός για το CD25 και θετικός για CD45RO και HLA-DR (βλ. παρακάτω). Στον αντίποδα βρίσκεται η κατανομή και η έκφραση του μορίου CD221 (IGF-1R), το οποίο εκφράζεται σε λιγότερο από τον μισό πληθυσμό των ενεργών Τρυθμ (πληθυσμός II), και του πληθυσμού III και με μικρή σχετικά ένταση. Αντίθετα, εκφράζεται στη πολύ μεγάλη πλειοψηφία των κυττάρων των πληθυσμών I, IV, και VI και με αξιοσημείωτα μεγαλύτερη MFI. Η αντίθετη δράση των δύο κυτταροκινών, IL-2 και IGF-1, στη περίπτωση των Τρυθμ γίνεται προφανής από τη κατανομή των αντίστοιχων υποδοχέων. Και οι δύο κυτταροκίνες αποτελούν αυξητικούς παράγοντες για λεμφοκύτταρα T στους λεμφαδένες. Φαίνεται όμως ότι τα ενεργά Τρυθμ είναι έτοιμα να ανταποκριθούν στην IL-2 (όταν την τελευταία δεν τη χρειάζονται τα Τδραστ επειδή έχουν ήδη πολλαπλασιαστεί ανταποκρινόμενα στο αρχικό ερέθισμα), αλλά όχι να ανταποκριθούν στον IGF-1. Ακριβώς η αντίθετη κατάσταση επικρατεί με τα ηρεμούντα Τρυθμ τα οποία ελάχιστα εκφράζουν τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα της IL-2 (CD25/CD122/CD132) ενώ εκφράζουν σε υψηλή συχνότητα και αξιοσημείωτη ένταση τον υποδοχέα του IGF-1. Σημειωτέον, ότι στους ανθρώπινους λεμφαδένες εκφράζεται IGF-1 τόσο από λεμφοκύτταρα όσο και από μονοκύτταρα/μακροφάγα/δενδριτικά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνεπώς στη συνήθη θέση περιφερειακής ανοσοαπόκρισης ο ρόλος της κυτταροκίνης αυτής πρέπει να θεωρείται δεδομένος. Μάλιστα, πρόσφατη μελέτη με διαρκή χορήγηση IGF-1 σε διαβητικούς ποντικούς (μέσω πολλαπλών δόσεων στρεπτοζωτοσίνης) και σε ποντικούς με πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα, έδειξε ότι η συγκεκριμένη κυτταροκίνη ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των Τρυθμ και αναιρεί πολλά από τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μορφών αυτοανοσίας στα πειραματόζωα [208].

Εξ ίσου ενδιαφέρουσα είναι και η κατανομή των μορίων ιστοσυμβατότητας HLA-DR στους τρεις πληθυσμούς με υψηλότερη έκφραση CD25: ο πληθυσμός των ανενεργών Τρυθμ εκφράζει πολύ λίγο έως καθόλου το μόριο HLA-DR στην επιφάνειά του, σε αντίθεση με την μεγάλης έκτασης έκφραση στον πληθυσμό των ενεργών Τρυθμ και την αρκετά εκτεταμένη και μικρότερης έντασης έκφραση στον πληθυσμό III των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων T. Ο τελευταίος είναι σε αντίθεση με το τι αναφέρουν οι Miyaga και συν. στη σχετική εργασία [21], όπου καταγράφουν καθόλου έκφραση των HLA-DR στον πληθυσμό III, και μικρής έντασης έκφραση στους πληθυσμούς IV και V (Συμπληρωματικός Πίνακας 1 της ως άνω εργασίας). Δεν διευκρινίζεται καθόλου από τους συγγραφείς το ποσοστό των θετικών κυττάρων σε κάθε περίπτωση. Το γεγονός ότι η έκφραση IL-2Rαβγ_c και HLA-DR είναι σχεδόν παράλληλη στα λεμφοκύτταρα T εγείρει υποψίες για εν πολλοίς συνέκφραση στους πληθυσμούς όπου αυτή η έκφραση αφορά τη πλειοψηφία των κυττάρων (π.χ. πληθυσμοί II και III). Η έκφραση CD74 καθώς και CD74-Ii στη κυτταρική μεμβράνη Τρυθμ φυσιολογικών ατόμων είναι ισχυρό πειστήριο ότι τα μόρια HLA-DR εκφράζονται de novo από τα συγκεκριμένα κύτταρα και δεν αποτελούν προϊόν μεταφοράς από δενδριτικά κύτταρα/μακροφάγα όπως φαίνεται στους ποντικούς και σε διάφορες κατηγορίες

ανθρώπινων κυττάρων [209], αλλά όχι επιβεβαιωμένα Τρυθμ με την μέθοδο Miyara και συν. 2009.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε στη διερεύνηση της παρατήρησης, τόσο από άλλα εργαστήρια όσο και από εμάς, του γεγονότος ότι τα Τρυθμ κύτταρα, ως κύτταρα CD25^{high} είναι ταυτόχρονα και CD4^{int} σε σύγκριση πάντα με τις υπόλοιπες κατηγορίες CD4⁺ λεμφοκυττάρων Τ. Πράγματι, σε σχέση με τα κύτταρα του πληθυσμού VI, στα οποία αυθαίρετα αποδώσαμε MFI = 100 καταγράφεται χαμηλότερη MFI στην έκφραση CD4, στους πληθυσμούς I, II και III (88,6, 86,7 και 93,6 αντίστοιχα) ενώ ίση στους πληθυσμούς V και VI και αυξημένη MFI στον πληθυσμό IV. Αυτή η MFI είναι περισσότερο από πέντε φορές εντονότερη από αυτή που καταγράφεται στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, τα οποία επίσης εκφράζουν CD4 σε χαμηλό βαθμό. Από μόνη της η παρατήρηση αυτή μπορεί να εγείρει υποψίες για διάφορους μηχανισμούς και ιδιότητες, απαιτεί όμως εκτεταμένη τεκμηρίωση. Ως πρώτο βήμα επιδιώξαμε να μελετήσουμε τη κατανομή και άλλων μορίων που ενέχονται στην ανοσολογική σύναψη δηλ. CD2, CD11a, CD54, CD58, CD81. Θυμίζουμε ότι τα ζεύγη CD2-CD58 και CD11a-CD54 αποτελούν ζεύγη υποδοχέα-προσδέματος.

Το μόριο CD2 εκφράζεται σε όλα τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα Τ, όμως έχει τη χαμηλότερη των εντάσεων στα ηρεμούντα Τρυθμ, πιο χαμηλή ακόμη και από αυτή του πληθυσμού VI που αφορά ώριμα κύτταρα, μη ενεργοποιηθέντα στη περιφέρεια από το αντίστοιχο αντιγόνο. Αντίθετα, τα ενεργά Τρυθμ, όπως και τα Τδραστ του πληθυσμού III εκφράζουν σε μεγάλη ένταση το μόριο CD2. Ακόμη μεγαλύτερη είναι η μέση ένταση του φθορισμού για τους πληθυσμούς IV και V. Τη πιθανή σημασία αυτής της διαφορικής μεμβρανικής έκφρασης θα την εξετάσουμε παρακάτω.

Το πρόσδεμα του μορίου CD2 είναι το μόριο CD58 (LFA-3). Υπάρχει αξιοσημείωτη έκφραση του μορίου CD58 στα Τρυθμ και Τπαρθ, και ακόμη περισσότερη στα Τδραστ, με ουσιαστικά καμία διαφορά στη MFI. Τα μακροφάγα εκφράζουν σε αξιοσημείωτο βαθμό και έκταση το ίδιο μόριο.

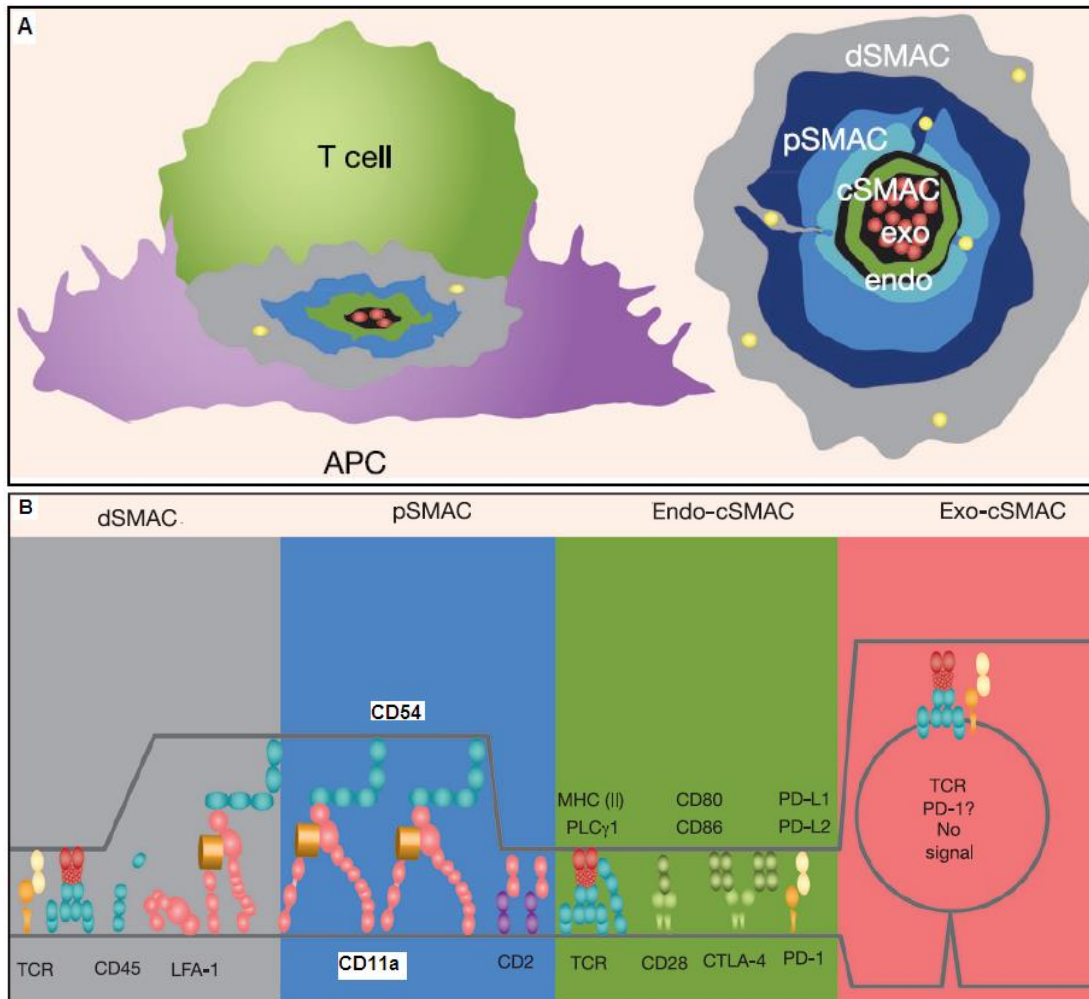
Το μόριο CD11a (LFA-1) επίσης έχει μεμβρανική έκφραση μικρής έκτασης και έντασης στα Τρυθμ, τριπλάσιας έκτασης και λίγο μεγαλύτερης έντασης έκφραση στα Τδραστ και υπερδιπλάσιας έκτασης και επίσης λίγο μεγαλύτερης έντασης έκφραση στα Τπαρθ. Από την άλλη, ο προσδέτης του μορίου αυτού, δηλ. το μόριο CD54 (ICAM-1) βρίσκεται σε αξιοσημείωτη έκταση και μικρή ένταση στα Τρυθμ και Τδραστ, αλλά με μικρή παρουσία στα Τπαρθ. Τέλος το μόριο CD81 μια τετραδιδυσδυτίνη, εκφράζεται ελάχιστα στον πληθυσμό II (λιγότερο και από ό,τι στον πληθυσμό VI) και αξιοσημείωτα στους πληθυσμούς I, III-VI με καθολική και μεγάλη έκφραση στον πληθυσμό V.

Πίνακας 72. Πίνακας που δείχνει πως μεταβάλλεται η πιθανότητα σχηματισμού Υπερμοριακού Συγκροτήματος ΑΣ στα Τρυθμ, όταν μειώνεται η έκφρασή της σε σχέση με τα Τδραστ, και συσχέτιση με τον αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ανοσολογική σύναψη.

I \ II	2	3	4
0,9	0,81	0,73	0,66
0,8	0,64	0,51	0,41
0,7	0,49	0,34	0,24

I : Λόγος έκφρασης μιας πρωτεΐνης σε Τρυθμ/Τδραστ

II : Αριθμός διαφορετικών πρωτεϊνών στο συγκρότημα ΑΣ



Εικόνα 79. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των Τρυθμ και αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων σύμφωνα με τους συγγραφείς [210] μπορεί να χωρισθεί σε τρία επίπεδα. Με βάση την αλληλεπίδραση των μορίων που χαρακτηρίζονται ως SMAC (supermolecular activation clusters), οι περιοχές αλληλεπίδρασης διακρίνονται στην κεντρική, στην περιφερειακή και στην απομακρυσμένη ή αλλιώς central - cSMAC, peripheral-pSMAC και distal - dSMAC. Επιπλέον, η κεντρική περιοχή αλληλεπίδρασης μπορεί να διακριθεί στην περιοχή στην οποία οι υποδοχείς TCR και CD28, εξακολουθούν να είναι ενεργοί και χαρακτηρίζονται ως endo-cSMAC, και στην περιοχή που αποτελείται από κυστίδια εξωκυττάρια πλούσια σε υποδοχείς TCR, με ισχυρή παρουσία του PD-1, που δε συνεπάγεται περαιτέρω ενεργοποίηση. Α. Εικόνα της ανοσολογικής σύναψης σε πλάγια και εγκάρσια διατομή Β. Λεπτομερέστερη απεικόνιση των μορίων που αλληλεπιδρούν στα τέσσερα επίπεδα. [210]

Συνολικά, η διαφορετική έκφραση ορισμένων πρωτεϊνικών μορίων τα οποία και συμμετέχουν στη συγκρότηση της ανοσολογικής σύναψης, καθώς και της μεταγωγής σήματος μετά από τον σχηματισμό της συγκεκριμένης σύναψης (δηλ. αναγνώριση του pMHCII από τον αντίστοιχο αντιγονικό υποδοχέα λεμφοκυττάρων T), παραπέμπει στην ανικανότητα άμεσου σχηματισμού ανοσολογικής σύναψης από τα Τρυθμ, λόγω μειωμένης έκφρασης πολλών από τα συντελούντα μόρια (CD4, CD28, CD11a, CD2) στα κύτταρα αυτά σε σχέση με τα Τδραστ. Το δε γεγονός ότι η ανοσολογική σύναψη είναι συγκρότημα αρκετών μεμβρανικών

πρωτεϊνών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μικρή συγκριτικά μείωση στη μεμβρανική πυκνότητα κάθε συναφούς πρωτεΐνης στα Τρυθμ σε σύγκριση με τα Τδραστ θα έχει πολλαπλάσια μεγαλύτερη δυσχέρεια στον σχηματισμό σύναψης (Πίνακας 72). Ενδεικτική της πολυπλοκότητας της ανοσολογικής σύναψης όπως προσεγγίζεται από τους σύγχρονους μελετητές είναι η Εικόνα 79.

Συνεπώς, η πιθανότητα σχηματισμού του υπερμοριακού συγκροτήματος της ανοσολογικής σύναψης μειώνεται στα Τρυθμ, μια και εκφράζουν μειωμένες συγκεντρώσεις στη κυτταρική τους μεμβράνη των σημαντικών μορίων για τον σχηματισμό της σύναψης. Αυτή η ιδιότητα έχει φυσιολογική σημασία γιατί αποτρέπει τον τυχόν αδόκιμο σχηματισμό ανοσολογικής σύναψης, σε περιπτώσεις που η συγγένεια TCR προς pMHCII θα ήταν ενδιάμεση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η διπλή έκφραση έχει μεγάλη φυσιολογική σημασία, όπως η συνέκφραση CD122/CD132 που δηλώνει έκφραση IL-2Rβ_c, ενώ η έκφραση HLA-DR—CLIP και η συνέκφραση HLA-DR/HLA-DR—CLIP είναι δηλωτικές ενδογενούς σύνθεσης HLA-DR από τα ίδια τα κύτταρα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η εργασία μας καθιερώνει τρόπο επιλογής των Τρυθμ βασισμένο σε τρίχρωμο φθορισμό και δείχνει πως η χρήση του CD127 ως τρίτου δείκτη μετά τα CD4/CD25 προσθέτει στην ακρίβεια υπολογισμού των Τρυθμ. Ωστόσο ο διαχωρισμός και η μελέτη με το πρωτόκολλο τρίχρωμου φθορισμού των Miyaga και συν. 2009 εγείρει υποψίες για την ομοιογένεια του πληθυσμού που καθορίζεται με τη χρήση των κλασσικών μορίων CD127/ FoxP3. Καταγράφηκαν σημαντικά χαρακτηριστικά των Τρυθμ σε φυσιολογικά άτομα όπως π.χ. η εκτεταμένη έκφραση CD122 και HLA-DR από τα ενεργά Τρυθμ, αλλά καθόλου από τα ηρεμούντα. Η εκτεταμένη ανάλυση των χαρακτηριστικών αυτών σε συγγενείς διαβητικών ατόμων έδειξε λίγες μόνο αποκλίσεις, η μεγάλη πλειοψηφία των οποίων αφορούσε σε αδέρφια ατόμων με ΣΔ1. Μια σειρά μορίων εκφράζονται σε χαμηλότερα ποσοστά κυττάρων ή MFI στα Τρυθμ ή/ και Τδραστ, αλλά οι δύο αυτές κατηγορίες κυττάρων έχουν υψηλή MFI του μορίου CD152 (CTLA-4).

Επιπλέον, η δουλειά μας επιβεβαιώνει παλαιότερες αναφορές που υποδεικνύουν ότι τα ανθρώπινα aTregs είναι HLA-DR⁺ και αποτελούν τον πιο ενεργό υποπληθυσμό των Τρυθμ καθώς η πλειοψηφία αυτών εκφράζουν εκτός από το HLA-DR⁺ και το IL-2Rαβγ_c⁺, ενώ τα rTregs είναι HLA-DR⁻ και IL-2Rβ⁻. Επομένως τα aTregs είναι λειτουργικά έτοιμα να χρησιμοποιήσουν προς οφέλος τους την IL-2 που παράγεται από τα ενεργοποιημένα CD4 Τδραστ. Η λειτουργία του HLA-DR στα aTregs μένει να διερευνηθεί. Επομένως τα aTregs είναι λειτουργικά έτοιμα να χρησιμοποιήσουν προς οφέλος τους την IL-2 που παράγεται από τα ενεργοποιημένα CD4⁺ Τδραστ. Η λειτουργία του HLA-DR στα aTregs μένει να διερευνηθεί, καθ' ότι φαίνεται να συντίθεται στα ενεργά Τρυθμ μάλιστα σε συνδυασμό με το πεπτιδίο CLIP της αμετάβλητης αλυσίδας Ii. Θα πρέπει, π.χ. να διασαφηνιστεί αν τα ενεργά Τρυθμ παρουσιάζουν μέσω των μορίων HLA-DR (και δευτερευόντως HLA-DQ) αυτοαντιγονικά πεπτιδία ή το πώς προκύπτει το πεπτιδικό φορτίο αυτών των μορίων στα συγκεκριμένα κύτταρα.

Η διαφορά μεταξύ aTregs και rTregs επεκτείνεται και σε χαρακτηριστικά που τα διαχωρίζουν από τα υπόλοιπα CD4⁺ κύτταρα T, όπως για παράδειγμα τη χαμηλότερη μεμβρανική έκφραση των μορίων CD2, CD4, CD11a, CD58, CD81, όλα τους εμπλεκόμενα στην ανοσολογική σύναψη, καθώς και των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων CD127 και CD221. Αυτοί οι δείκτες εκφράζονται σε υψηλότερο επίπεδο από τα κύτταρα μνήμης (πληθυσμοί III, IV και V) σε σχέση με τα Παρθ.

Η σταθερά μειωμένη έκφραση του CD4 στα Τρυθμ, ανεξάρτητα από το εάν είναι ενεργά ή ανενεργά, είναι ένδειξη ότι τα μόρια που σχετίζονται άμεσα με τον σχηματισμό ανοσολογικής σύναψης και με την επακόλουθη μετάδοση σήματος, εκφράζονται διαφορετικά στα Τρυθμ σε σχέση με τα υπόλοιπα T κύτταρα. Πρόσφατη μελέτη επιλεκτικής αντίδρασης μονοκλωνικού αντισώματος κατά CD4 μόνο με κύτταρα Τρυθμ συμβαδίζει με ειδική στερεοδιάταξη ή λιγότερο έντονη έκφραση του μορίου αυτού στα Τρυθμ [211]. Η μειωμένη έκφραση παρατηρείται, ανάλογα με τον τύπο των Τρυθμ και στα υπόλοιπα μόρια που περιγράψαμε παραπάνω. Το CD2, ένα ισχυρό στοιχείο της ανοσολογικής σύναψης εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα rTregs. Αντίθετα, οι υποδοχείς για τους αυξητικούς παράγοντες IL-7 και IGF-1 (CD127 και IGF-1R, αντίστοιχα) δεν εκφράζονται ή εκφράζονται σε χαμηλά μόνο επίπεδα στα aTregs, ενώ στα rTregs εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα, αν και ο πρώτος με ανομοιογενή κατανομή. Ο υποδοχέας του IGF-1, είναι αυξητικός παράγοντας των λεμφοκυττάρων και παράγεται κυρίως στους λεμφοαδένες. Αντίθετα, το μόριο CD81 που στα κύτταρα B είναι συνδιεγερτική πρωτεΐνη του HLA-DR εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό στα aTregs. Στα κύτταρα T η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δρα σε συντονισμό με το μόριο CD4 και είναι γεγονός ότι η ένταση έκφρασης και των δύο μορίων στους διαφόρους πληθυσμούς κυττάρων CD4⁺ T επιδεικνύουν παράλληλες

κατανομές. Η χαμηλότερης έντασης έκφραση του CD2, ακόμη και στο μισό σε μερικές περιπτώσεις αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι ο σχηματισμός της ΑΣ δεν μπορεί να γίνει τόσο εύκολα και οι πορείες μεταγωγής σήματος για τα Τρυθμ είναι διαφορετικές σε σχέση με τα υπόλοιπα CD4 κύτταρα Τ. Αυτό πιθανόν εκδηλώνεται με τον διαφορετικό τρόπο σχηματισμού της ανοσολογικής σύναψης από τα Τρυθμ. Περαιτέρω διερεύνηση πρέπει να γίνει για το πώς το σύνολο όλων αυτών των μορίων με την συγκριτικά μειωμένη παρουσία τους καθορίζουν τη ρυθμιστική λειτουργία των Τρυθμ και συμβάλουν στην ανοχή και πρόληψη της αυτοανοσίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Πρωτεύοντα ρόλο στη διατήρηση της ομοιοστασίας του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν τα Τρυθμ λεμφοκύτταρα που αποτελούν έναν από τους κύριους μεσολαβητές της «περιφερικής ανοχής». Μετά τον αρχικό ενθουσιασμό και την εγκατάλειψη της έννοιας των κατασταλατικών Τ κυττάρων (Tsuppressor), η χρήση του μορίου CD25 (αλυσίδα α του υποδοχέα της IL-2) σε συνδυασμό με τον υποδοχέα της IL-7 (CD127) συνέβαλαν σημαντικά στον προσδιορισμό του υποπληθυσμού των Τ ρυθμ. Ορόσημο στη μελέτη των Τρυθμ αποτέλεσε η ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 (forkhead box P3, winged helix transcription factor), του οποίου η μετάλλαξη σχετίζεται με απουσία Τρυθμ και κλινική εικόνα αυτοανοσίας στα ποντίκια και το σύνδρομο IPEX στους ανθρώπους, ενώ σημαντική είναι η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD127 και της παρουσίας του FoxP3.

Η παραγωγή και διαφοροποίηση των Τρυθμ επιτελείται όπως σε όλα τα κύτταρα Τ. Με βάση το σημείο διαφοροποίησής τους τα Τρυθμ διακρίνονται στα tTregs (thymus derived Tregs) και στα pTregs (peripherally derived Tregs). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των Τρυθμ δεν είναι ξεκάθαρος αλλά φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση με τα Τδραστ είναι αδιαμφισβήτητη. In vivo η ενεργοποίηση των Τδραστ συνεπάγεται την ενεργοποίηση των Τρυθμ, τα οποία οδηγούν σε συσσώρευση μορίων όπως το cAMP, το CTLA-4, τα HLA-DR/DQ, ο TGF-β, η IL-2 και η αδενοσίνη. Ο ρόλος των Τρυθμ είναι σημαντικός, καθώς φαίνεται η δράση του να είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ισορροπίας, σε μια ζυγαριά που από τη μια βρίσκονται τα αυτοάνοσα νοσήματα και από την άλλη οι λοιμώξεις και ο καρκίνος.

Μια νεότερη προσέγγιση στα ανθρώπινα Τρυθμ είναι αυτή που παρουσιάστηκε από την ομάδα του Shimon Sakaguchi το 2009. Οι Miyara και συνεργάτες απέδειξαν ότι από το συνδυασμό του CD25 και του CD45RA στα CD4⁺ κύτταρα Τ προκύπτουν έξι τουλάχιστον υποπληθυσμοί, εκ των οποίων οι τρεις εκφράζουν FoxP3 σε διαφορετικά επίπεδα [21]. Σύμφωνα με τους συγγραφείς τα FoxP3⁺ κύτταρα Τ δεν αποτελούν ένα λειτουργικά και φαινοτυπικά ενιαίο πληθυσμό και με βάση την έκφραση του CD25 και του CD45RA (ή CD45RO, του οποίου η έκφραση σε όλα τα κύτταρα Τ, συμπεριλαμβανομένων και των Τρυθμ είναι αλληλο- αποκλειόμενη με αυτή του CD45RA), μπορούν να διακριθούν σε 3 υποπληθυσμούς :

τα ενεργοποιημένα Τρυθμ (activated-, aTregs) που έχουν φαινότυπο CD45RA⁻FoxP3^{high}CD4⁺ (πληθυσμός II),

τα μη ενεργοποιημένα (resting-, rTregs) με φαινότυπο CD45RA⁺FoxP3^{low}CD4⁺ (πληθυσμός I),

και τα μη κατασταλατικά (non-Tregs) με φαινότυπο CD45RA⁻FoxP3^{int}CD4⁺ (πληθυσμός III, int = intermediate/ ενδιάμεση).

Κατ'έξοχήν κατασταλατική/ ρυθμιστική δράση ασκούν τα aTregs ενώ τα rTregs έχουν το ήμισυ τέτοιας δραστηριότητας, με τους υπόλοιπους πληθυσμούς (III-VI) να μην επιδεικνύουν καθόλου ρυθμιστική ή κατασταλατική δράση. Ο διαχωρισμός στους υποπληθυσμούς αυτούς, υποδεικνύει τις διαφορετικές πορείες διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών.

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια κλινική νόσος που χαρακτηρίζεται από σχετική ή απόλυτη ανεπάρκεια έκκρισης ινσουλίνης και συνακόλουθη έλλειψη ευαισθησίας ή αντίσταση στην μεταβολική δράση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους. Οι δύο μεγάλες κατηγορίες του ΣΔ καθορίζονται ως τύπος 1 και τύπος 2 και ειδικότερα οι ασθενείς με τύπου 1 σακχαρώδη διαβήτη έχουν λίγη ή καθόλου ενδογενή έκκριση ινσουλίνης. Δείκτες της αυτοάνοσης διεργασίας στον ΣΔ1 είναι τα νησιδιακά αυτοαντισώματα. Ο κατάλογος των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων είναι μεγάλος. Φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση των αυτοαντισωμάτων με την πρόβλεψη της νόσου σε υγιή άτομα και αυτό έχει να κάνει κυρίως

με τον αριθμό των αυτοαντισωμάτων. Γενικώς ο αριθμός των αυτοαντισωμάτων που εκφράζει ένα άτομο με προδιάθεση για ΣΔ1 είναι πιο σημαντικός από οποιονδήποτε συνδυασμό αυτοαντισωμάτων.

Όσον αφορά τους προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση ΣΔ1, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αναζήτηση γονιδίων που προδιαθέτουν στην εμφάνιση ΣΔ1 στην περιοχή HLA (στην οποία βρίσκονται αλληλόμορφα που ευθύνονται για το 40-50% του γενετικού κινδύνου εμφάνισης ΣΔ) καθώς και στην περιοχή του προαγωγέα της ινσουλίνης (*INS-VNTR*) και στο γονίδιο *CTLA-4*. Αν και παλαιότερα, τα HLA-DRB1*03 (DR3) και HLA-DRB1*04 (DR4) είχαν βρεθεί ως τα κύρια αλληλόμορφα που σχετίζονται με τη νόσο, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η περιοχή που σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης (αλλά και προστασία από) ΣΔ1 είναι η περιοχή *HLA-DQ*. Επιπλέον, θεωρείται ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες εκκινούν μια αυτοάνοση διεργασία στο πάγκρεας σε ένα γενετικά προδιατιθέμενο άτομο, που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των ινσουλινοεκκριτικών κυττάρων β . Ειδικότερα, ιογενείς λοιμώξεις (εντεροϊοί), διαιτητικοί παράγοντες (βιταμίνη D, γάλα αγελάδος), η ύπαρξη stress φαίνεται να συμβάλλουν σε διαταραχή της ομοιοστασίας του ανοσοποιητικού συστήματος που θα μπορούσε να σχετίζεται με επιρρέπεια στην εμφάνιση του ΣΔ1.

Αρχικά, μελέτες του ποσοστού των Τρυθμ σε διαβητικούς τύπου 1 ανέφεραν μείωση του αριθμού τους, γεγονός που δεν επιβεβαιώθηκε σε μελέτες που ακολούθησαν, γεγονός που αποδόθηκε σε έλλειψη ειδικών δεικτών για τον προσδιορισμό των Τρυθμ. Στις μελέτες όμως αυτές επισημάνθηκε μειωμένη λειτουργικότητα των Τρυθμ. Η χρήση νέων δεικτών, όπως η έκφραση FoxP3 και ταυτόχρονα η χαμηλή έκφραση CD127 [167], η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Helios και η απομεθυλίωση *TSDR* [172], καθώς και ο διαχωρισμός σε υποπληθυσμούς Τρυθμ με βάση την έκφραση CD45RA [173] δεν ανέδειξε διαφοροποιήσεις στον αριθμό/ποσοστό των Τρυθμ στον ΣΔ1, αν και μια παροδική μείωση φαίνεται να υπάρχει στους νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στη μελέτη των Ferraro και συν, οι οποίοι εργάστηκαν εκτός από το περιφερικό αίμα και σε λεμφαδένες παγκρέατος διαβητικών τύπου 1 όπου και αποδείχθηκε αύξηση των Th17 κυττάρων και απώλεια της έκφρασης Foxp3 και της ρυθμιστικής ικανότητας των Τρυθμ στους τοπικούς λεμφαδένες (παρά τη διατήρηση της απομεθυλίωσης *TSDR*). Το γεγονός αυτό, δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχα στο περιφερικό αίμα των ίδιων ατόμων [177].

Οι συγγενείς ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη αποτελούν μια ομάδα ανθρώπων με αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν τη νόσο. Αυτός ο κίνδυνος σχετίζεται ισχυρά με την έκφραση αυτοαντισωμάτων, τα οποία συνδέονται με την έναρξη της αυτοάνοσης διεργασίας, χωρίς ωστόσο να την προκαλούν. Δεδομένου ότι η νόσος έχει ισχυρό γενετικό υπόβαθρο, η μελέτη ύποπτων γονιδίων στα άτομα υψηλού κινδύνου, όπως οι συγγενείς πρώτου βαθμού αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης σε πλήθος ερευνών.

Σκοπός της μελέτης: Σκοπός της διατριβής ήταν η μελέτη των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων σε συγγενείς ασθενών με ΣΔ1 σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές. Σκοπός, επίσης ήταν να αναδειχθεί αν καθ'οιονδήποτε τρόπο, κάποια από τα χαρακτηριστικά των Τρυθμ σε συγγενείς ατόμων με ΣΔ1, μπορούν να προδιαθέσουν για εκδήλωση της νόσου.

Υλικά και Μέθοδοι: Στη μελέτη συμμετείχαν 38 πρώτου βαθμού συγγενείς ατόμων με ΣΔ1 και 45 εθελοντές υγιείς μάρτυρες (μέσης ηλικίας, 31.6 ± 14 έτη) χωρίς προβλήματα υγείας ή οικογενειακό ιστορικό αυτοανοσίας. Στους πρώτου βαθμού συγγενείς περιλαμβάνονταν 17 αδέρφια (ηλικίας 22.7 ± 10.4 έτη), 5 παιδιά (ηλικίας ήταν 28.2 ± 2 έτη), 9 μητέρες (μέσης ηλικίας 36.4 ± 7.8) και 7 πατέρες (μέσης ηλικίας 46 ± 7.8). Στα άτομα αυτά έγινε λήψη

περιφερικού αίματος με στόχο την ανάλυση δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής και τον προσδιορισμό HLA.

Η επεξεργασία των κυττάρων για κυτταρομετρία ροής εκτελούνταν άμεσα μετά την λήψη του δείγματος αίματος και χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα με στόχο τη διενέργεια κυτταρομετρίας ροής τετραπλού φθορισμού : CD2 FITC , CD4 PERCP, CD11a FITC, CD25 APC, CD27 FITC, CD28 FITC, CD44 FITC, CD45RO FITC/ PE, CD54 PE, CD58 PE, CD74 PE, CD81, CD95, CD122 PE/ FITC, CD127 PE, CD132 PE, CD152 PE, CD178 PE, CD221 PE, Alexa Fluor488 FoxP3, CLIP PE, HLA-DR PE/ FITC, HLA-DQ FITC, TCR α/β FITC, TGF- β PE, TGF- β RII.

Χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης Cell Quest (Becton Dickinson) έγινε ανάλυση του τελικού εναιωρήματος στον κυτταρομετρητή ροής έως ότου καταμετρηθούν τουλάχιστον 10.000 CD4⁺ λεμφοκύτταρα T. Ο καθορισμός των Τρυθμ βασίστηκε στην έκφραση των μορίων CD127 και CD25 με βάση τον ανοσοφαινότυπο CD4^{low}CD25^{high}CD127^{-/low}.

Με βάση τα ιστογράμματα έκφρασης διαφόρων μορίων που θεωρήθηκαν σημαντικά για την ποιοτική ανάλυση των Τρυθμ, μελετήσαμε την έκφρασή τους στους τρεις υποπληθυσμούς των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T: τα Τρυθμ, τα Τδραστ και τα Τπαρθ. Τα όρια θετικότητας ορίστηκαν με βάση τον αρνητικό μάρτυρα δηλαδή IgG₁/IgG_{2a} ποντικού. Ειδικότερα, θεωρήθηκε θετικό οτιδήποτε βρίσκεται πάνω από το 99,5% του ιστοτυπικού μάρτυρα και με βάση αυτά τα όρια εκτιμήθηκε το ποσοστό των θετικών κυττάρων καθώς και η μέση ένταση φθορισμού.

Επιπλέον έγινε προσδιορισμός των μορίων ιστοσυμβατότητας HLA-DR/DQ στους φυσιολογικούς μάρτυρες και τον υπό μελέτη πληθυσμό συγγενών ατόμων με ΣΔ1.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Statistical Package for Social Sciences Version 17.0 for windows (SPSS v. 17.0). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (mean) \pm σταθερά απόκλιση (standard deviation, SD). Για σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ των διαφόρων ομάδων ατόμων ή κυττάρων, έγινε χρήση του two-tailed Student's t test. Οι συσχετίσεις μεταξύ διαφορετικών παραμέτρων ελέγχθηκαν με το Pearson's test. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με τιμή $p < 0,05$, ενώ στην περίπτωση του Pearson's test παρουσιάζεται και ο συντελεστής συσχέτισης r (correlation coefficient) και ο συντελεστής r^2 (coefficient of determination).

Αποτελέσματα: Αρχικά, αντικείμενο της μελέτης, υπήρξε η τεκμηρίωση του τρόπου προσδιορισμού των Τρυθμ με βάση τον ανοσοφαινότυπο CD4^{low}CD25^{high}CD127^{-/low}. Τα Τρυθμ που διαχωρίσαμε βρέθηκε να εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα *FoxP3* σε ποσοστό $89,9 \pm 5,4\%$. Επιβεβαιωτική για την έλλειψη υποκειμενισμού στον τρόπο προσδιορισμού των Τρυθμ, είναι η υψηλή συσχέτιση ($r = 0,865$) του ποσοστού των Τρυθμ με αυτό που καθορίσαμε ως πληθυσμό επιβεβαίωσης και αντιστοιχεί στο ποσοστό των CD127^{-/low} στο κορυφαίο 7% των CD4⁺ λεμφοκυττάρων T ως προς την έκφραση του CD25, στο κυτταρόγραμμα CD4-CD25. Ακολούθως μελετήθηκε και βρέθηκε στατιστικά σημαντική η συσχέτιση του ποσοστού των Τρυθμ με τους υποπληθυσμούς βάσει της τεχνικής Miyaga και συνεργατών 2009.

Στη συνέχεια έγινε σύγκριση του ποσοστού των Τρυθμ μεταξύ των συγγενών πρώτου βαθμού διαβητικών τύπου 1 και φυσιολογικών μαρτύρων και καμιά στατιστικά σημαντική ποσοτική διαφορά δεν αναδείχθηκε. Ομοίως δε διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ως προς τα ποσοστά των τριών υποπληθυσμών των CD4⁺FoxP3⁺ κυττάρων T με βάση την τεχνική Miyaga και συνεργατών 2009, μεταξύ συγγενών και φυσιολογικών μαρτύρων, για κανένα από τους υποπληθυσμούς και σε καμιά από τις ομάδες των συγγενών. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν κατά την έκφραση δεικτών επιφανείας στα Τρυθμ σε σύγκριση με τα Τδραστ και τα Τπαρθ. Ειδικότερα, τα Τρυθμ εκφράζουν σε

μεγαλύτερο ποσοστό και με μεγαλύτερη MFI τους ακόλουθους δείκτες: CD122, HLA-DR, HLA-DQ, CD74, CLIP, CD95 και CD152 (επιφανειακή και ενδοκυττάρια έκφραση) καθώς και τις συνεκφράσεις CD122/CD132, HLA-DR/CLIP, HLA-DR/HLA-DQ και CD28/CD152 σε σχέση με τα Τδραστ και Τπαρθ. Επίσης, εκφράζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό το CD27 σε σύγκριση με τα Τδραστ ενώ εμφανίζουν υψηλότερη μέση ένταση φθορισμού για την αλυσίδα γ του υποδοχέα της IL-2 (CD132) σε σχέση με τα Τπαρθ. Τέλος παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση του TGF- β RII και του CD178 στα Τρυθμ σε σχέση με τα Τδραστ.

Στη συνέχεια έγινε μελέτη των διαφορών έκφρασης των δεικτών αυτών μεταξύ πρώτου βαθμού συγγενών διαβητικών και φυσιολογικών μαρτύρων. Σε όλες τις ανωτέρω περιπτώσεις οι συγκρίσεις απέδειξαν πολύ λίγες περιπτώσεις στατιστικώς σημαντικών διαφορών. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες αποκλίσεις αφορούσαν τα αδέρφια διαβητικών ατόμων όπου παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές μειώσεις (με πολύ λίγες εξαιρέσεις σημαντικών αυξήσεων) στα ακόλουθα: του ποσοστού μεμβρανικής έκφρασης TGF- β στα Τρυθμ και Τπαρθ και της MFI στα Τρυθμ και Τδραστ, του ποσοστού έκφρασης HLA-DR στα Τρυθμ και Τδραστ και της MFI στα Τπαρθ, της MFI του μορίου CD28 στα Τρυθμ και τα Τπαρθ, της MFI του μορίου CD27 στα Τδραστ και Τπαρθ καθώς και του ποσοστού CD95⁺ Τπαρθ κυττάρων. Αντίθετα, υπήρξε αύξηση στην MFI του μορίου CD152 στα Τδραστ και τα Τπαρθ. Οι μητέρες είχαν χαμηλό ποσοστό έκφρασης TGF- β στα Τρυθμ και Τπαρθ, καθώς και χαμηλή MFI στα Τπαρθ. Οι πατέρες παιδιών με ΣΔ1 εμφάνισαν χαμηλό ποσοστό έκφρασης CD122 στα κύτταρα Τδραστ, ενώ εμφάνισαν υψηλό ποσοστό έκφρασης CD132 στα Τρυθμ, καθώς και υψηλή MFI του μορίου αυτού σε Τδραστ και Τπαρθ, και υψηλή MFI του μορίου CD74 στα Τρυθμ. Τέλος, τα παιδιά διαβητικών που ήταν και το μικρότερο δείγμα, εμφάνισαν μειωμένη MFI του μορίου CD122 στα Τπαρθ και του μορίου CD132 στα Τρυθμ.

Όσον αφορά την κατανομή των γονοτύπων HLA-DR και HLA-DQ στους συγγενείς ατόμων με ΣΔ1, βλέπουμε ότι κανένα άτομο από το δείγμα μας (μάρτυρες και συγγενείς), δεν εμφανίζει τον πολύ υψηλού κινδύνου συνδυασμό HLA-DR3/HLA-DR4, αλλά η παρουσία ενός μόνο αλληλόμορφου (και ειδικότερα του HLA-DR3) που αποτελεί παράγοντα κινδύνου είναι αυξημένη στους συγγενείς και ειδικότερα στους πατέρες σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Κατ'αντιστοιχεία κανένα άτομο από το δείγμα μας (μάρτυρες και συγγενείς), δεν εμφανίζει τον πολύ υψηλού κινδύνου γονότυπο HLA-DQB1*02/DQB1*0302, αλλά ο σχετικά χαμηλού κινδύνου

(αλλά με αυξημένο ποσοστό σε σύγκριση με τους άλλους συνδυασμούς), γονότυπος HLA-DQB1*02/y βρέθηκε συχνότερα στους συγγενείς σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Κατά την προσπάθεια συσχέτισης μεταξύ γονοτύπου και ποσοστού Τρυθμ δε βρέθηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις του ποσοστού των Τρυθμ ανάλογα με τον γονότυπο HLA-DR, HLA-DQ με εξαίρεση μια στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού των Τρυθμ στα άτομα που φέρουν τον γονότυπο nonDR3/nonDR4, σε σχέση με τα άτομα που φέρουν μόνο το προδιαθετικό αλληλόμορφο HLA-DR3.

Τέλος, με βάση το διαχωρισμό κατά Miyaga και συν. 2009, έγινε περαιτέρω μελέτη των χαρακτηριστικών των υποπληθυσμών των Τρυθμ. Επιβεβαιώνοντας τη διακύμανση της έκφρασης του *FoxP3* που αναφέρεται στη βιβλιογραφία, αναδείξαμε επιπλέον ότι τα ενεργοποιημένα Τρυθμ (a Tregs- II) είναι CD127^{low/-} ενώ τα rTregs (πληθυσμός I) είναι CD127^{high/low} και τα μη κατασταλτικά CD4⁺FoxP3⁺ κύτταρα T (πληθυσμός III) είναι CD127^{high/low/-}.

Κατά τη μελέτη της έκφρασης του CD2 στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ παρατηρούμε ότι παρόλο που όλοι οι υποπληθυσμοί εκφράζουν το μόριο CD2, τα rTregs

(πληθυσμός I) έχουν σχεδόν τη μισή μέση ένταση φθορισμού σε σχέση με τους άλλους δύο υποπληθυσμούς. Επιπλέον, η μέση έκφραση φθορισμού του μορίου CD4, είναι χαμηλότερη στους υποπληθυσμούς I και II χωρίς να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ aTregs και σε rTregs. Η μελέτη της έκφρασης του HLA-DR στους υποπληθυσμούς των Τρυθμ σε φυσιολογικούς μάρτυρες ανέδειξε ότι τα aTregs είναι στην πλειοψηφία τους HLA-DR⁺ (από 62-94 %), ενώ τα rTregs είναι κυρίως HLA-DR⁻ (93,3- 98,2%). Το ίδιο ισχύει και με τη μέση ένταση φθορισμού, η οποία στα aTregs είναι η υψηλότερη σε σχέση με όλα τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα T. Παρόμοια διακύμανση έχει και η έκφραση του CD122 στους τρεις υποπληθυσμούς των CD4⁺FoxP3⁺ κυττάρων T με τα aTregs να έχουν και εδώ την υψηλότερη έκφραση αυτού του δείκτη. Κατά τη μελέτη της έκφρασης του CD81 παρατηρούμε ότι τα aTregs εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη μέση ένταση φθορισμού σε σχέση με τα υπόλοιπα Τρυθμ. Τέλος, τα aTregs έχουν χαμηλή ένταση φθορισμού στο 42% των κυττάρων που εκφράζουν το δείκτη CD221 και τα αντίστοιχα θετικά ως προς την έκφραση του CD221 rTregs (85%) έχουν ενδιάμεση ένταση στην έκφραση του δείκτη αυτού.

Συμπεράσματα: Στη παρούσα μελέτη μελετήθηκε η κατάσταση των Τρυθμ σε συγγενείς ατόμων με ΣΔ1. Η εργασία μας καθιερώνει τρόπο επιλογής των Τρυθμ βασισμένο σε τρίχρωμο φθορισμό και δείχνει πως η χρήση του CD127 ως τρίτου δείκτη μετά τα CD4/CD25 προσθέτει στην ακρίβεια υπολογισμού των Τρυθμ. Ωστόσο ο διαχωρισμός και η μελέτη με το πρωτόκολλο τρίχρωμου φθορισμού των Miyaga και συν. 2009 εγείρει υποψίες για την ομοιογένεια του πληθυσμού που καθορίζεται με τη χρήση των κλασσικών μορίων CD127/ FoxP3.

Η μελέτη του ποσοστού των Τρυθμ σε συγγενείς ατόμων με ΣΔ1 (αδέλφια, μητέρες, πατέρες και παιδιά) δεν έδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορετική κατανομή αυτού του πληθυσμού σε κάποια από τις πιο πάνω κατηγορίες καθώς επίσης και των τριών υποπληθυσμών των Τρυθμ που εκφράζουν την πρωτεΐνη FoxP3, όπως διαχωρίζονται με βάση την τεχνική Miyaga και συν. 2009, χωρίς επίσης να αναδειχθεί καμιά διαφορά. Αυτό αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σημασία αν αναλογιστούμε ότι περισσότεροι από τους μισούς συγγενείς των ατόμων με ΣΔ1 είχαν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο HLA-DR/DQ το οποίο να προδιαθέτει για ΣΔ1.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της έκφρασης διαφόρων δεικτών κυτταρικής επιφάνειας σε Τρυθμ, Τδραστ και Τπαρθ σε φυσιολογικά άτομα και τους συγγενείς ατόμων με ΣΔ1. Καταγράφηκαν σημαντικά χαρακτηριστικά των Τρυθμ σε φυσιολογικά άτομα όπως π.χ. η εκτεταμένη έκφραση CD122 και HLA-DR από τα Τρυθμ, αλλά καθόλου από τα ηρεμούντα. Η εκτεταμένη ανάλυση των χαρακτηριστικών αυτών σε συγγενείς διαβητικών ατόμων έδειξε λίγες μόνο αποκλίσεις, η μεγάλη πλειοψηφία των οποίων αφορούσε σε αδέλφια ατόμων με ΣΔ1. Μια σειρά μορίων εκφράζονται σε χαμηλότερα ποσοστά κυττάρων ή MFI στα Τρυθμ ή/ και Τδραστ, αλλά οι δύο αυτές κατηγορίες κυττάρων έχουν υψηλή MFI του μορίου CD152 (CTLA-4).

Από την κατανομή των αλληλόμορφων ιστοσυμβατότητας τάξης II προκύπτει αυξημένη συχνότητα του HLA-DR3 στον γενικό πληθυσμό και αρκετά μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική στους πληθυσμούς των συγγενών διαβητικών ατόμων. Αντίστοιχη κατανομή υπάρχει και για τα HLA-DQB1*02 και -DQB1*0302, τα οποία είναι και στον Ελληνικό πληθυσμό σε ανισορροπία σύνδεσης με τα -DR3 και -DR4, αντίστοιχα.

Η μελέτη των Miyaga και συν. η οποία εμφανίστηκε τον Ιούνιο του 2009 μας υποχρέωσε να μελετήσουμε ορισμένα χαρακτηριστικά των Τρυθμ και σύμφωνα με τον συγκεκριμένο τρόπο ανάλυσης, ο οποίος καθιερώνεται αργά μεν αλλά σταθερά.

Αφ' ενός δείξαμε ότι όντως προκύπτει ο ίδιος τύπος διαχωρισμός, και το ίδιο σχήμα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3. Αφ' ετέρου, φάνηκε η διαφορετική έκφραση

των πληθυσμών I, II και III ως προς την έκφραση του CD127. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο πληθυσμός III βρέθηκε να μην διαθέτει καθόλου ρυθμιστικές ικανότητες, ενώ η πολύ μεγάλη πλειοψηφία των κυττάρων του εκφράζουν λίγο έως καθόλου CD127 (CD127^{low/-}), κατανοούμε το σφάλμα του διαχωρισμού των κυττάρων σε Τρυθμ και Τδραστ με βάση την υψηλή έκφραση CD25 και την χαμηλή έως καθόλου έκφραση CD127. Επιπλέον, η εργασία μας επιβεβαιώνει παλαιότερες αναφορές που υποδεικνύουν ότι τα ανθρώπινα aTregs είναι HLA-DR⁺ και αποτελούν τον πιο ενεργό υποπληθυσμό των Τρυθμ καθώς η πλειοψηφία αυτών εκφράζουν εκτός από το HLA-DR⁺ και το IL-2Rαβγ⁺, ενώ τα rTregs είναι HLA-DR⁻ και IL-2Rβ⁻. Επομένως τα aTregs είναι λειτουργικώς έτοιμα να χρησιμοποιήσουν προς οφέλος τους την IL-2 που παράγεται από τα ενεργοποιημένα CD4 Τδραστ. Η διαφορά μεταξύ aTregs και rTregs επεκτείνεται και σε χαρακτηριστικά που τα διαχωρίζουν από τα υπόλοιπα CD4⁺ κύτταρα T, όπως για παράδειγμα στη χαμηλότερη μεμβρανική έκφραση των μορίων CD2, CD4, CD11a, CD58, CD81 (όλα τους εμπλεκόμενα στην ανοσολογική σύναψη), καθώς και των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων CD127 και CD221.

ABSTRACT

Introduction: Regulatory T cells are considered to have a primary role in maintaining the immune homeostasis and they are thought of as the main regulators of peripheral tolerance. After the initial enthusiasm, the term of “T suppressor” cells was abandoned due to problems in the field; the subsequent use of the markers CD25 (α -chain of the IL-2 receptor) and CD127 (α -chain of IL-7 receptor) is considered very important in defining the subpopulation of Tregs. A hallmark in Tregs is the high expression of the transcription factor, FoxP3 (forkhead box P3, winged helix transcription factor). Mutations in the *FoxP3* gene are correlated with the absence of Tregs and autoimmunity in mice and it can lead to the IPEX syndrome in humans. Importantly, there is a negative correlation between the expression of CD127 and the expression of FoxP3.

The generation and differentiation of Tregs is similar to the other T cells. Based on the place of differentiation, Tregs are defined as tTregs (thymus-derived Tregs) and pTregs (peripherally-derived Tregs). The exact mechanism of action is not clear. However, there is no doubt that physical contact between Tregs and Teff takes place. In vivo the activation of Teff cells results in the activation of Tregs which leads in the accumulation of molecules, such as cAMP, CTLA-4, HLA-DR/DQ, TGF- β , IL-2 and adenosine. The role of Tregs is very important, as they seem to be necessary for the maintenance of balance between autoimmunity and cancer/infections.

A new approach to human Tregs was presented by Shimon Sakaguchi and his team in 2009. Miyara et al have shown that 6 subpopulations of CD4⁺ T cells with different levels of *FoxP3* expression (three positive and three negative) can be separated based on the expression of CD25 and CD45RA [21]. According to these authors, the FoxP3⁺ T cells are not a homogenous population and based on the expression of CD25 and CD45RA (or CD45RO whose expression is mutual exclusive to the expression of CD45RA) can be separated in the following subpopulations:

activated- aTregs (CD45RA⁻FoxP3^{high}CD4⁺, population II), resting- rTregs (CD45RA⁺FoxP3^{low}CD4⁺, population I) and non-Tregs activated T cells (CD45RA⁻FoxP3^{int}CD4⁺, population III, int = intermediate). Active Tregs exhibited the highest regulatory activity, whereas rTregs exhibited only the half of this activity and the rest populations (III-VI) exhibited no regulatory or suppressive activity at all, implying different pathways of differentiation.

Diabetes mellitus is a disease which is characterized by a relative or complete insulin deficiency and peripheral resistance of insulin. There are two main types of diabetes, type 1 and type 2, and especially Type 1 diabetes mellitus (T1D) is characterised by a complete lack of endogenous insulin secretion. Islet cell autoantibodies are markers of the autoimmune process in T1D. The list of autoantibodies is long, but there is a correlation between the number of autoantibodies and the probability of occurrence of the disease among genetically susceptible persons.

Genetic susceptibility to T1D is encoded by several loci, the most important of which is the HLA region (it has been estimated that HLA provides up to 40–50% of the familial clustering of T1D); second in importance is the region of insulin promoter VNTR polymorphisms (*INS-VNTR*), and the *CTLA-4* gene is among the 20 or so remaining loci. Even though in the last decades the HLA-DRB1*03 (DR3) and HLA-DRB1*04 (DR4) alleles were considered the main alleles predisposing to the disease, recent studies have shown that the *HLA-DQ* locus is the area with the highest risk for T1D. Moreover, environmental factors are considered to start an autoimmune destruction of islet beta cells in genetically susceptible individuals. Viral infections (e.g. enteroviruses), dietary factors (e.g. low vitamin D consumption, early exposure to cow's milk), exposure to stress are some of the

environmental factors which are thought to interact with the genetic factors until the disruption of immune tolerance and the appearance of the disease.

Early studies on the percentage of Tregs in T1D, reported a diminished number, a finding which was not verified in subsequent studies. These differences were attributed to the lack of markers in defining Tregs. However these studies reported a lack in the suppressive ability of Tregs from T1D patients compared to controls. The use of new markers, such as the high FoxP3 and low CD127 expression [167], the transcription factor Helios and *TSDR* demethylation [172], and the study of Treg subpopulations based on CD45RA expression [173] did not find any difference in the percentage of Tregs, even though a slight reduction was observed in newly diagnosed T1D patients. However, we should highlight the fact that these studies were conducted in peripheral blood and may not reflect the T-cell repertoire present at the site of inflammation (i.e., the pancreas and draining pancreatic lymph node). Of great importance is the study of Ferraro et al, which was conducted in pancreatic lymph nodes and it has demonstrated that in contrast to the peripheral blood Tregs of the same patients, Tregs at the site of infection lose FoxP3 expression and suppression activity (whereas no differences in *TSDR*-demethylation was proved) accompanied by an increase in Th17 cell activity [177].

First degree relatives (FDR) of T1D patients are considered a high risk group for the disease. This risk is strongly correlated to the expression of autoantibodies. Many studies were conducted on FDR, which are individuals with an increased genetic susceptibility and an increased disease incidence.

Objective: The aim of our study was to investigate the frequency and the phenotype of Tregs in FDR compared to healthy control, in order to investigate any possible correlation to the disease appearance.

Materials and methods: 38 FDR (17 siblings, age 22.7 ± 10.4 years (mean \pm sd), 5 children aged 28.2 ± 2 years, 9 mothers aged 36.4 ± 7.8 years, and 7 fathers aged 46 ± 7.8 years) and 45 healthy controls aged 31.6 ± 14 years were recruited. The control subjects had no first or second degree relatives suffering from any autoimmune disease, no sign of any other illness, and were not taking any medication at the time of the study.

Four colour flow cytometry was performed in whole fresh blood samples and the following conjugated anti-human monoclonal antibodies were used : CD2-FITC , CD4-PERCP, CD11a-FITC, CD25-APC, CD27-FITC, CD28-FITC, CD44-FITC, CD45RO-FITC/PE, CD54-PE, CD58-PE, CD74-PE, CD81, CD95, CD122-PE/ FITC, CD127-PE, CD132-PE, CD152-PE, CD178-PE, CD221-PE, FoxP3-Alexa Fluor488, CLIP-PE, HLA—DR-PE/FITC, HLA—DQ-FITC, TCR α/β -FITC, TGF— β -PE, TGF— β RII-FITC.

Using the appropriate software (Cell Quest, Becton Dickinson) the population of CD4⁺ lymphocytes was identified from CD4-PerCP and side scatter characteristics. For investigation of the characteristics of Tregs, at least 10,000 CD4⁺ lymphocytes were gated. Tregs were defined as a homogenous subpopulation of CD4⁺ T cells with the following phenotype CD4^{int}CD25^{high}CD127^{low/-}. Negative control fluorescence was set at the 99.5 % mark of the fluorescence from the isotype control mAb.

HLA class II typing was tailored to define major HLA-DR/DQ haplotypes associated with risk or protection against type 1 diabetes.

All calculations were performed using SPSS for Windows, Version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Results are expressed as mean \pm SD. To compare the mean values among different

groups we used the two-tailed Student's t test. Correlations were tested with Pearson's test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: First, we tried to verify by independent means the estimated percentage of Tregs based on the phenotype $CD4^{int}CD25^{high}CD127^{-/low}$. The $89,9 \pm 5,4\%$ of the cells we defined as Tregs are $Foxp3^{+}$. In order to verify the estimated percentage of Tregs, we correlated this estimate with what we defined as the "verifying population" and corresponds to the percentage of $CD127^{low/-}$ cells included in the top 7% of $CD4^{+}$ Tcells on a CD4-CD25 dot plot. This correlation was very significant at the $p < 0.01$ level ($r = 0.865$ and $r^2 = 0,749$). Besides, there was a strong correlation between the percentage of Tregs and the percentage of Tregs subpopulations as defined by Miyara's et al technique.

After proving that the way we estimate Tregs is reliable, we compared the frequency of Tregs between healthy control and FDR (siblings, mothers, fathers and children). The population of Tregs was not significantly different ($p < 0.05$) for any of these subgroups. This was also the case, when we compared the percentages of the different subpopulation of Tregs (aTregs, rTregs and non-Tregs), between FDRs and controls.

We found significant differences between the surface expression of several markers on Tregs compared to Teff and Tnaive. More specifically Tregs express in a high level and have a higher MFI of the following markers: CD122, HLA-DR, HLA-DQ, CD74, CLIP, CD95 and CD152 (surface and intracellular expression) compared to Teff and Tnaive and also express a higher level of CD27 compared to Teff. Besides, we observed a higher percent of cells coexpressing the pairs of CD122/CD132, HLA-DR/CLIP, HLA-DR/HLA-DQ and CD28/CD152. Tregs express the γ -chain of the IL-2 receptor (CD132) and the respective MFI was higher compared to Tnaive. Finally, there is a lower expression of TGF- β R2 and CD178 in Tregs compared to Teff.

As far as the expression of different markers in FDRs compared to controls is concerned, we observed few significant differences, especially in siblings. More specifically, the siblings expressed: a lower percentage of TGF- β^{+} Tregs and Tnaive, and a lower MFI of Tregs and Teff, a lower percentage of HLA-DR $^{+}$ Tregs and Teff and had lower MFI of Tnaive, a lower MFI of CD28 expression of Tregs and Tnaive, a lower MFI of CD27 expression of Teff and Tnaive, and a low percentage of CD95 $^{+}$ Tnaive cells. On the contrary, there was an increase in MFI of CD152 expression of Tnaive and Teff. The mothers expressed a lower percentage of TGF- β^{+} Tregs and Tnaive and a lower MFI of Tnaive. The fathers expressed a lower level of CD122 in Teff and a higher level of CD132 in Tregs and a higher MFI of Teff and Tnaive, and a higher MFI of CD74 expression of Tregs. Finally, the children showed a low MFI of CD132 expression of Tregs and a lower MFI of CD122 expression on Tnaive.

The genotyping analysis of FDR revealed no person carrying both of the high risk alleles HLA-DR3/HLA-DR4, but the frequency of one of the alleles (especially HLA-DR3) which is considered high risk for diabetes, was increased in FDRs and especially fathers compared to control. Respectively, no person had the high risk genotype HLA-DQB1*02/DQB1*0302, but the moderate risk genotype HLA-DQB1*02/y had a higher frequency in FDRs comparison to controls. We also tried to determine an association between genotype and the frequency of Tregs. No significant relationship was determined with the exception of a significant reduction of Tregs in nonDR3/nonDR4 individuals in comparison to individuals carrying the HLA-DR3 haplotype.

Finally, based on the separation of Tregs according to the technique of Miyara et al 2009, we studied the distinct characteristics of the subpopulations of Tregs. After verifying the different levels of FoxP3 expression, we have shown that aTregs (population II) are

CD127^{low/-}, rTregs (population I) are CD127^{high/low} and CD4+FoxP3+ non-Tregs (population III) are CD127^{high/low/-}.

Even though all subpopulations are CD2⁺ we found out that rTregs have half the MFI of the other two subpopulations for this marker. Moreover, the MFI of CD4 is lower in aTregs and rTregs. The majority of aTregs are HLA-DR⁺ (62-94 %), whereas rTregs are mainly HLA-DR⁻ (93,3-98,2 %). Respectively, the MFI of HLA-DR expression of Tregs is the highest of all CD4⁺ T lymphocytes. We observed the same fluctuations in the expression of CD122, in all three subpopulations of Tregs, with the highest expression observed in aTregs. On the contrary, aTregs express a lower MFI of CD81 compared to the rest of Tregs. Finally, regarding the receptor of IGF-1 (CD221), all CD221⁺ aTregs (42%) have a low MFI compared to the MFI of rTregs, which are in their majority CD221⁺ (85%)

Conclusions: In this study we have investigated Tregs in FDRs of T1D patients. We have established a method of separating Tregs based on three-colour flow cytometry and we have proven that the use of CD127 as a third marker besides CD4/CD25, adds more accuracy in estimating the percentage of Tregs. However, the separation of Tregs according to the Miyara et al 2009 technique (CD4/CD25/CD45RA(CD45RO)), raises suspicion about the homogeneity of the population of Tregs determined, based on the classic markers CD127/FoxP3.

The frequency of Tregs in FDRs (siblings, mothers, fathers, children) compared to controls was not significantly different, neither was the percentage of the subpopulations of Tregs. This is more important if we take account the fact that more than half of FDRs had at least on high risk HLA-DR/DQ allele.

The extended study of the expression of different markers in Tregs, Teff and Tnaive showed important characteristics of Tregs such as the high level of CD122 and HLA-DR expression compared to not activated cells. Studying these markers on FDRs showed little variation, mainly concerning siblings of T1D patients. Several markers show lower frequency and lower MFI in Tregs and/or Teff, but in both of these subpopulations of CD4⁺ T cells we observed a high MFI of CD152 (CTLA-4) expression.

The genotyping analysis of our sample revealed an increased frequency of HLA-DR3 allele in the population and a statistically significant increase of this allele in FDR. A corresponding distribution is observed for the alleles HLA-DQB1*02, DQB1*0302, which in Greek population are in strong linkage disequilibrium with -DR3 and -DR4 genes, respectively.

More characteristics of Tregs were studied based on Miyara et al technique (2009), while this study was in progress. First we showed a similar distribution of FoxP3 expression, and then we studied the distribution of CD127 expression in the populations I, II and III, revealing that even though population III that is devoid of regulatory activity contains a considerable amount of cells that are CD127^{low/-}. This observation suggests that the separation of Tregs based on CD25^{high}/CD127^{low/-} expression is fraught with problems as it depends on where exactly the bar is set on separating the CD25^{high} population from the remaining cells. Moreover, our study verifies the suggestion of older publication that human aTregs are HLA-DR⁺ and consist of a distinct more active subpopulation of Tregs, because the majority of aTregs are HLA-DR⁺/IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ⁺, in comparison to rTregs which are mainly HLA-DR⁻/IL-2R β ⁻. Active Tregs seem to be ready to use for their benefit the IL-2 produced by activated Teffectors, while resting Tregs need to be activated first. The differences between aTregs and rTregs is extended not only in markers important for their discrimination from other CD4⁺ lymphocytes such as CD2, CD4, CD11a, CD58 and CD81 (which are also important

components of the immunological synapse), but also in receptors of growth factors such as CD127 and CD221.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970 May; 18(5):723-37.
- [2] Steinmetz M, Minard K, Horvath S, McNicholas J, Srelinger J et al. A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature*. 1982 Nov 4; 300(5887):35-42
- [3] Klein J, Nagy ZA. Trouble in the J-land. *Nature*. 1982 Nov; 300 : 12 - 13
- [4] Dorf ME, Benacerraf B. Suppressor cells and immunoregulation. *Annu Rev Immunol*. 1984; 2:127-57. Review.
- [5] Shevach EM. The resurrection of T cell-mediated suppression. *J Immunol*. 2011 Apr 1; 186(7):3805-7
- [6] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1; 155(3):1151-64.
- [7] Saoudi A, Seddon B, Fowell D et al. The thymus contains a high frequency of cells that prevent autoimmune diabetes on transfer into prediabetic recipients. *J Exp Med*. 1996 Dec 1; 184(6):2393-8.
- [8] Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 2007 Nov; 37 Suppl 1:S116-23.
- [9] Vrabelova Z, Hrotekova Z, Hladikova Z et al. CD 127- and FoxP3+ expression on CD25+CD4+ T regulatory cells upon specific diabetogenic stimulation in high-risk relatives of type 1 diabetes mellitus patients. *Scand J Immunol*. 2008 Apr; 67(4):404-10
- [10] Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996 Aug 1; 184(2):387-96.
- [11] Zhang Y, Bandala-Sanchez E, Harrison LC. Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012 Aug; 19(4):271-8 Review.
- [12] Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013 Apr; 14(4):307-8.
- [13] Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005 Apr; 6(4):331-7. Review.
- [14] Paschou SA, Tigas S, Naka K et al. The Role of T regulatory Cells (Tregs) in the Development and Prevention of Type 1 Diabetes. *J Clin Cell Immunol* 2012 Jul; S2:003

- [15] Van der Vliet HJ, Nieuwenhuis EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol*. 2007:89017. Review.
- [16] Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004 Oct 21(4):589-601.
- [17] Bopp T, Becker C, Klein M et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11 204(6):1303-10. Epub 2007 May 14.
- [18] Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Nov 116(5):949-59. Review.
- [19] Chatila TA. Molecular mechanisms of regulatory T-cell development. *Chem Immunol Allergy*. 2008 94:16-28. Review.
- [20] Stockis J, Colau D, Coulie PG et al. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol*. 2009 Dec 39(12):3315-22
- [21] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009 Jun 19 30(6):899-911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019. Epub 2009 May 21.
- [22] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat.Rev. Immunol*. 2006. 6: 295–307.
- [23] Jutel M, Akdis CA. T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011 Apr 11(2):139-45. Review.
- [24] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10 203(7):1701-11. Epub 2006 Jul 3.
- [25] Baron U, Floess S, Wieczorek G et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007 Sep 37(9):2378-89.
- [26] Fukuhara K, Okumura M, Shiono H et al. A study on CD45 isoform expression during T-cell development and selection events in the human thymus. *Hum Immunol*. 2002 63: 394-404
- [27] Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG et al. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood*. 2006 Apr 1 107(7):2830-8. Epub 2005 Dec 6.
- [28] Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG et al. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 12 112(19):6140-5.

- [29] de la Fuente H, Cibrián D, Sánchez-Madrid F. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response. *FEBS Lett.* 2012 Aug 31;586(18):2897-905 Review.
- [30] Nakarai T, Robertson MJ, Streuli M et al. J. Interleukin 2 receptor gamma chain expression on resting and activated lymphoid cells. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):241-51.
- [31] Gasteiger G, Kastenmuller W. Foxp3+ Regulatory T-cells and IL-2: The Moirai of T-cell Fates? *Front Immunol.* 2012;3:179. doi: 10.3389/fimmu.2012.00179. Epub 2012 Jul 12
- [32] Hulme MA, Wasserfall CH, Atkinson MA et al. Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2012 Jan;61(1):14-22. Review.
- [33] Weiss EM, Schmidt A, Vobis D et al. Foxp3-mediated suppression of CD95L expression confers resistance to activation-induced cell death in regulatory T cells. *J Immunol.* 2011 Aug 15;187(4):1684-91.
- [34] Wing K, Ekmark A, Karlsson H et al. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *J Immunology.* 2002 Jun;168(2):190-9.
- [35] Bollyky P.L., Falk B.A., Long S.A. et al. CD44 costimulation promotes FoxP3(+) regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol.* 2009 Aug 15;183(4):2232-41.
- [36] Nagy N, Kaber G, Johnson PY, Gebe JA et al. Inhibition of hyaluronan synthesis restores immune tolerance during autoimmune insulinitis. *J Clin Invest.* 2015 Oct 1;125(10):3928-40. doi: 10.1172/JCI79271. Epub 2015 Sep 14.
- [37] Liu T, Soong L, Liu G et al. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biol Direct.* 2009 Oct 23;4:40.
- [38] Bucala R, Shachar I. The integral role of CD74 in antigen presentation, MIF signal transduction, and B cell survival and homeostasis. *Mini Rev Med Chem.* 2014;14(14):1132-8.
- [39] Grzanka J, Leveson-Gower D, Golab K et al. FoxP3, Helios, and SATB1: Roles and relationships in regulatory T cells. *Int Immunopharmacol.* 2013 Jul;16(3):343-7.
- [40] Thornton AM, Korty PE, Tran DQ et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010;184:3433-41.
- [41] Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2012;188:976-80.
- [42] Jacquot S, Kobata T, Iwata S et al. CD27/CD70 interaction contributes to the activation and the function of human autoreactive CD27+ regulatory T cells. *Cellular Immunology* 1997;179:48-54.

- [43] Jacquot S. CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation. *Immunol Res.* 2000;21(1):23-30. Review.
- [44] Golovina TN, Mikheeva T, Suhoski MM et al. CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function. *J Immunol.* 2008 Aug 15; 181(4):2855-68
- [45] Duggleby RC, Shaw TN, Jarvis LB et al. CD27 expression discriminates between regulatory and non-regulatory cells after expansion of human peripheral blood CD4+ CD25+ cells. *Immunology.* 2007 May; 121(1):129-39.
- [46] Hoffmann HJ, Malling TM, Topcu A, Ryder LP et al. CD4dimCD25bright Treg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytometry A.* 2007 Jun; 71(6):371-8.
- [47] Mjösberg J, Svensson J, Johansson E et al. Systemic reduction of functionally suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17beta-estradiol. *J Immunol.* 2009 Jul 1; 183(1):759-69. doi: 10.4049/jimmunol.0803654. Epub 2009 Jun 17
- [48] Lawson JM, Tremble J, Dayan C et al. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 154: 353-359. 2008.
- [49] Garg G, Tyler JR, Yang JH et al. Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4+CD25+ regulatory T cell function. *J Immunol.* 188: 4644-4653. 2012
- [50] Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:89-109.
- [51] Levy S. Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. *Immunol Res.* 2014 May; 58(2-3):179-85.
- [52] Secrist H, Levy S, DeKruyff RH et al. Ligation of TAPA-1 (CD81) or major histocompatibility complex class II in co-cultures of human B and T lymphocytes enhances interleukin-4 synthesis by antigen-specific CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1996 Jul; 26(7):1435-42.
- [53] Oberlin D, Fellbaum C, Eppler E. Insulin-like growth factor I messenger RNA and protein are expressed in the human lymph node and distinctly confined to subtypes of macrophages, antigen-presenting cells, lymphocytes and endothelial cells. *Immunology.* 2009 Nov; 128(3):342-50
- [54] Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *Journal of Experimental Medicine* 2001 194 629-644.

- [55] Harrison's, Kasper, Fauci et al. Principles of internal medicine, 19th edition. 2015; 2:2399-2600
- [56] Hanafusa T, Imagawa A. Fulminant type 1 diabetes: a novel clinical entity requiring special attention by all medical practitioners. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3:36-45
- [57] Pozzilli P, Buzzetti R. A new expression of diabetes: double diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18:52-7.
- [58] Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care* 2001; 24:1460-7.
- [59] Sladek R, Rocheleau G, Rung J et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007 Feb 22; 445(7130):881-5. Epub 2007 Feb 11.
- [60] Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Jun; 39(6):770-5. Epub 2007 Apr 26.
- [61] Maahs DM, West NA, Lawrence JM et al. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39:481-97.
- [62] Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem* 2011; 57:168-75.
- [63] Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J et al. Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet*. 1981 Dec 19; 2(8260-61):1363-5.
- [64] Lernmark Å, Freedman ZR, Hofmann C et al. Islet-cell-surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1978 Aug 24; 299(8):375-80.
- [65] Roll U, Turck CW, Gitelman SE et al. Peptide mapping and characterisation of glycation patterns of the glima 38 antigen recognised by autoantibodies in Type I diabetic patients. *Diabetologia*. 2000 May; 43(5):598-608.
- [66] Yang L, Zhou ZG, Tan SZ et al. Carboxypeptidase-H autoantibodies differentiate a more latent subset of autoimmune diabetes from phenotypic type 2 diabetes among Chinese adults. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1150:263-6.
- [67] Palmer JP, Asplin CM, Clemons P et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science (Wash DC)* 1983; 222:1337-9.
- [68] Kuglin B, Halder B, Bertrams J et al. Proinsulin autoantibodies: association with type I diabetes but not with islet cell antibodies, insulin autoantibodies or HLA-DR type. *J Autoimmun* 1990; 3:573-7.

- [69] Wenzlau JM, Moua O, Sarkar SA et al. SIC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann NY Acad Sci* 2008;1150:256–9.
- [70] Verge CF, Gianani R, Kawasaki E et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996;45:926
- [71] Kawasaki E, Hutton JC, Eisenbarth GS. Molecular cloning and characterization of the human transmembrane protein tyrosine phosphatase homologue, phogrin, an autoantigen of type 1 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:440–7.
- [72] Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M et al. Presence of autoantibodies to carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: proposal of the concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Diabetes Care* 2001;24:1695–6.
- [73] Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J et al. IDDM patients' sera recognize a novel 30-kD pancreatic autoantigen related to chymotrypsinogen. *Immunol Invest* 1993;22:219–27.
- [74] Chang YH, Hwang J, Shang HF et al. Characterization of human DNA topoisomerase II as an autoantigen recognized by patients with IDDM. *Diabetes* 1996;45:408–14.
- [75] Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990;347:151–6.
- [76] Rorsman F, Husebye ES, Winqvist O et al. Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8626–9.
- [77] Park SG, Park HS, Jeong IK et al. Autoantibodies against aminoacyl-tRNA synthetase: novel diagnostic marker for type 1 diabetes mellitus. *Biomarkers* 2010;15:358–66.
- [78] Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J et al. Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *J Clin Invest* 1996;97:2772–83.
- [79] Johnson JH, Crider BP, McCorkle K et al. Inhibition of glucose transport into rat islet cells by immunoglobulins from patients with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990;332:653–9.
- [80] Cabrera-Rode E, Diaz-Horta O, Fernandez LE et al. Glycolipids as the major autoantigens of cytoplasmatic islet cell antibodies. *Autoimmunity* 1995;20:145–51.
- [81] Dotta F, Falorni A, Tiberti C et al. Autoantibodies to the GM2–1 islet ganglioside and to GAD-65 at type 1 diabetes onset. *J Autoimmun* 1997;10:585–8.

- [82] Jones DB, Hunter NR, Duff GW. Heat-shock protein 65 as a beta cell antigen of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990; 336:583–5.
- [83] Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; 2:1279–83.
- [84] Pak CY, Cha CY, Rajotte RV et al. Human pancreatic islet cell specific 38 kilo-dalton autoantigen identified by cytomegalovirus induced monoclonal islet cell autoantibody. *Diabetologia* 1990; 33:569–72.
- [85] Gerling Baekkeskov S, Lernmark Å. Rodent islet cell antigens recognized by antibodies in sera from diabetic patients. *Acta Biol Med Ger.* 1982; 41(12):1111-5.
- [86] Gerling I, Baekkeskov S, Lernmark Å. Islet cell and 64K autoantibodies are associated with plasma IgG in newly diagnosed insulin-dependent diabetic children. *J Immunol.* 1986 Dec 15; 137(12):3782-5.
- [87] Baekkeskov S, Warnock G, Christie M et al. Revelation of specificity of 64K autoantibodies in IDDM serums by high-resolution 2-D gel electrophoresis. Unambiguous identification of 64K target antigen. *Diabetes.* 1989 Sep; 38(9):1133-41.
- [88] Torii S. Expression and function of IA-2 family proteins, unique neuroendocrine-specific protein-tyrosine phosphatases. *Endocr J.* 2009; 56(5):639-48. Epub 2009 Jun 24
- [89] De Camilli P, Cameron R, Greengard P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J Cell Biol.* 1983 May; 96(5):1337-54.
- [90] Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G et al. Autoantibodies to insulin, insulinoma-associated antigen-2, and zinc transporter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Feb; 95(2):707-13.
- [91] Morran MP, Casu A, Arena VC et al. Humoral autoimmunity against the extracellular domain of the neuroendocrine autoantigen IA-2 heightens the risk of type 1 diabetes. *Endocrinology.* 2010 Jun; 151(6):2528-37.
- [92] Wenzlau JM, Frisch LM, Gardner TJ et al. Novel antigens in type 1 diabetes: the importance of ZnT8. *Curr Diab Rep.* 2009; 9:105–12.
- [93] Snell-Bergeon JK, Smith J, Dong F et al. Early childhood infections and the risk of islet autoimmunity: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes Care.* 2012 Dec; 35(12):2553-8
- [94] Ferrannini E, Mari A, Nofrate V et al. DPT-1 Study Group Progression to diabetes in relatives of type 1 diabetic patients: mechanisms and mode of onset. *Diabetes.* 2010 Mar; 59(3):679-85

- [95] Cudworth AG, Wolf E. The genetics of Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Curr Probl Clin Biochem.* 1983;12:45-64. *Clin Immunol.* 2013 Dec;149(3):268-78. doi: 10.1016/j.clim.2013.05.001. Epub 2013 May 11.
- [96] Tarn AC, Thomas JM, Dean BM et al. Predicting insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 1988 Apr 16;1(8590):845-50.
- [97] Canivell S, Gomis R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun Rev.* 2014 Apr-May;13(4-5):403-7..
- [98] Thompson JA, Perry D, Brusko TM. Autologous regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2012 Oct;12(5):623-32
- [99] Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986 May 22;314(21):1360-8.
- [100] Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 155: 173–181, 2009.
- [101] Oresic M, Simell S, Sysi-Aho M et al. Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med* 205: 2975–2984, 2008.
- [102] La Torre D, Seppänen-Laakso T, Larsson HE et al. DiPiS Study Group. Decreased cord-blood phospholipids in young age-at-onset type 1 diabetes. *Diabetes.* 2013 Nov;62(11):3951-6.
- [103] Foulis AK, Stewart JA. The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia.* 1984 Jun;26(6):456-61.
- [104] Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA et al. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia.* 1986 May;29(5):267-74.
- [105] Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A et al. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest.* 1993 Nov;92(5):2313-22.
- [106] Kukreja A, Cost G, Marker J et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest.* 2002 Jan;109(1):131-40
- [107] Badami E, Sorini C, Coccia M et al. Defective differentiation of regulatory Foxp3+ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; 60:2120–2124.

- [108] Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH et al. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol.* 2007 Apr;8(4):351-8. Epub 2007 Feb 25
- [109] Scott HS, Heino M, Peterson P et al. Common mutations in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients of different origins. *Mol Endocrinol.* 1998 Aug;12(8):1112-9.
- [110] Rao A, Kamani N, Filipovich A et al. Successful bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning. *Blood.* 2007 Jan 1;109(1):383-5. Epub 2006 Sep 21.
- [111] Creutzfeldt W, Kobberling J, Neel JV et al. *The Genetics of Diabetes Mellitus.* Berlin: SpringerVerlag, 1976: 1-11.
- [112] van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011 Jan;91(1):79-118
- [113] Kim MS, Polychronakos C. Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm Res.* 2005;64(4):180-8. Epub 2005 Oct 24. Review.
- [114] Sanderson F, Trowsdale J. Antigen presentation: Kissing cousins exchange CLIP. *Curr Biol.* 1995 Dec 1;5(12):1372-6.
- [115] Lempainen J, Ilonen J. Influence of type 1 diabetes genes on disease progression: similarities and differences between countries. *Curr Diab Rep.* 2012 Oct;12(5):447-55. Review.
- [116] Erlich H, Valdes AM, Noble J et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 57.2008: 1084–1092,.
- [117] Thorsby E, Rønningen KS. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1993 May;36(5):371-7.
- [118] Aly TA, Ide A, Jahromi MM et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; (103): 14074–14079
- [119] Nejentsev S, Howson JM, Walker NM et al. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature.*2007;450: 887–892.
- [120] Lipponen K, Gombos Z, Kiviniemi M et al. Effect of HLA class I and class II alleles on progression from autoantibody positivity to overt type 1 diabetes in children with risk-associated class II genotypes. *Diabetes.* 2010; 59:3253–3256.
- [121] Mbunwe E, Van der Auwera BJ, Weets I et al. Belgian Diabetes Registry. In antibody-positive first-degree relatives of patients with type 1 diabetes, HLA-A*24 and HLA-B*18,

but not HLA-B*39, are predictors of impending diabetes with distinct HLA-DQ interactions. *Diabetologia*. 2013 Sep;56(9):1964-70.

[122] Fennessy M, Metcalfe K, Hitman GA et al. A gene in the HLA class I region contributes to susceptibility to IDDM in the Finnish population. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetologia*. 1994 Sep;37(9):937-44.

[123] Robles DT, Eisenbarth GS, Wang T et al. Millennium award recipient contribution. Identification of children with early onset and high incidence of anti-islet autoantibodies. Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Clin Immunol*. 2002 Mar;102(3):217-24.

[124] Moustakas AK, Papadopoulos GK. Molecular properties of HLA-DQ alleles conferring susceptibility to or protection from insulin-dependent diabetes mellitus: keys to the fate of islet beta-cells. *Am J Med Genet*. 2002 May 30;115(1):37-47. Review.

[125] Green A, Gale EA, Patterson CC. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study. *Lancet*. 1992 Apr 11;339(8798):905-9.

[126] Ilonen JI, Sjöroos M, Knip M et al. Estimation of genetic risk for type 1 diabetes. *Am J Med Genet*. 2002 May 30;115(1):30-6.

[127] Karayanni C, Anastasiadou V, Spyropoulou M et al. Genetic predisposition and IDDM in Greece. *Genet Couns*. 1993;4(3):181-6.

[128] Valdes AM, Thomson G, Erlich HA et al. Association between type 1 diabetes, age of onset, and HLA among sibling pairs. *Diabetes*, 1999 Aug;48(8):1658-61

[129] Caillat-Zucman S, Garchon HJ, Timsit J et al. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1992 Dec;90(6):2242-50.

[130] Ongagna JC, Sapin R, Pinget M et al. Markers for risk of type 1 diabetes in relatives of Alsacian patients with type 1 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res*. 2002;3(1):1-9.

[131] Ko HS, Fu SM, Winchester RJ et al. Ia determinants on stimulated human T lymphocytes: occurrence on mitogen and antigen-activated T cells. *J Exp Med*. 1979 Aug 1;150(2):246-55.

[132] Evans RL, Faldetta TJ, Humphreys RE et al. Peripheral human T cells sensitized in mixed leukocyte culture synthesize and express Ia-like antigens. *J Exp Med*. 1978 Nov 1;148(5):1440-5.

[133] Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol*. 2006 Apr 15;176(8):4622-31.

[134] Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984 Feb;33(2):176-83.

- [135] Barratt BJ, Payne F, Lowe CE et al. Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004 Jul;53(7):1884-9.
- [136] Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* 1997;15:289–292.
- [137] Chentoufi AA, Polychronakos C: Insulin expression levels in the thymus modulate insulin- specific autoreactive T-cell tolerance. The mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes* 2002;51:1383–1390.
- [138] Thébault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest* 2003;111:851–857.
- [139] Ueda H, Howson JM, Esposito L et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506–511
- [140] Anjos SM, Tessier MC, Polychronakos C. Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes:evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6257–6265
- [141] Anjos SM, Shao W, Marchand L et al. Allelic effects on gene regulation at the autoimmunity-predisposing CTLA4 locus: a re-evaluation of the 3'+6230G1 A polymorphism. *Genes Immun* 2005;6:305–311.
- [142] Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H et al. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* 2002;277:46478–46486.
- [143] Cerosaletti K, Schneider A, Schwedhelm K et al. Multiple autoimmune-associated variants confer decreased IL-2R signaling in CD4+ CD25(hi) T cells of type 1 diabetic and multiple sclerosis patients. *PLoS One*. 2013 Dec 23;8(12):e83811.
- [144] Long SA, Cerosaletti K, Wan JY et al. An autoimmune-associated variant in PTPN2 reveals an impairment of IL-2R signaling in CD4(+) T cells. *Genes Immun*. 2011 Mar;12(2):116-25.
- [145] Fousteri G, Liossis SN, Battaglia M. Roles of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 in immunity and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2013 Dec;149(3):556-65
- [146] Akerblom HK, Vaarala O, Hyöty H et al. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet*. 2002 May 30;115(1):18-29.
- [147] Lönnrot M, Korpela K, Knip M et al. Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes*. 2000 Aug;49(8):1314-8.

- [148] Lönnrot M, Lynch K, Larsson HE et al. TEDDY study group. A method for reporting and classifying acute infectious diseases in a prospective study of young children: TEDDY. *BMC Pediatr.* 2015 Mar 20;15:24.
- [149] Cohn A, Sofia AM, Kupfer SS. Type 1 diabetes and celiac disease: clinical overlap and new insights into disease pathogenesis. *Curr Diab Rep.* 2014 Aug;14(8):517.
- [150] Frisk G, Hansson T, Dahlbom I et al. A unifying hypothesis on the development of type 1 diabetes and celiac disease: gluten consumption may be a shared causative factor. *Med Hypotheses.* 2008;70(6):1207-9
- [151] Ventura A, Neri E, Ughi C et al. Gluten dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *J Pediatr.* 2000;137:263
- [152] Prietl B, Treiber G, Pieber TR et al. Vitamin D and immune function. *Nutrients.* 2013 Jul 5;5(7):2502-21.
- [153] Karvonen M, Jääntti V, Muntoni S et al. Comparison of the seasonal pattern in the clinical onset of IDDM in Finland and Sardinia. *Diabetes Care.* 1998 Jul;21(7):1101-9.
- [154] The EURODIAB Substudy 2 Study Group. Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1999 Jan;42(1):51-4.
- [155] Simpson M, Brady H, Yin X et al. No association of vitamin D in take or 25-hydroxyvitamin D levels in childhood with risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetologia* 2011, 54, 2779–2788
- [156] Huynh T, Greer RM, Nyunt O et al. The association between ketoacidosis and 25 (OH)-vitamin D levels at presentation in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2008; 10: 38–43.
- [157] Devidayal, Singh MK, Sachdeva N et al. Vitamin D levels during and after resolution of ketoacidosis in children with new onset Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2013 Jul;30(7):829-34.
- [158] Stene LC, Ulriksen J, Magnus P et al. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of type I diabetes in the offspring. *Diabetologia* 2000, 43, 1093–1098
- [159] Dong JY, Zhang WG, Chen JJ et al. Vitamin D intake and risk of type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies. *Nutrients.* 2013 Sep 12;5(9):3551-62
- [160] McKinney PA, Parslow R, Gurney K et al. Antenatal risk factors for childhood diabetes mellitus: a case-control study of medical record data in Yorkshire, UK. *Diabetologia* 1997. 40:933–939
- [161] Baum JD, Ounsted M, Smith MA. Weight gain in infancy and subsequent development of diabetes mellitus in childhood. *Lancet.* 1975 Nov 1;2(7940):866.

- [162] D'Angeli MA, Merzon E, Valbuena LF et al. Environmental factors associated with childhood-onset type 1 diabetes mellitus: an exploration of the hygiene and overload hypotheses. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 164 (2010), pp. 732–738
- [163] Gale EA. A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia*. 2002 Apr;45(4):588-94
- [164] Wilkin T.J. The accelerator hypothesis: a review of the evidence for insulin resistance as the basis for type I as well as type II diabetes. *Int J Obes (Lond)*. 2009 Jul;33(7):716-26
- [165] Lamb MM, Yin X, Zerbe GO et al. Height growth velocity, islet autoimmunity and type 1 diabetes development: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Diabetologia*, *Diabetologia*. 2009 Oct;52(10):2064-71.
- [166] Vehik K, Hamman RF, Lezotte D et al. Childhood growth and age at diagnosis with Type 1 diabetes in Colorado young people. *Diabet Med*. 2009 Oct;26(10):961-7.
- [167] Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ et al. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:1407–1414.
- [168] Lindley S, Dayan CM, Bishop A et al. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:92–99.
- [169] Putnam AL, Vendrame F, Dotta F et al. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 2005; 24:55–62.
- [170] Tree TI, Roep BO, Peakman M. A mini meta-analysis of studies on CD4+CD25+ T cells in human type 1 diabetes: report of the Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1079:9-18. Review.
- [171] Brusko T, Wasserfall C, McGrail K et al. No alterations in the frequency of Foxp3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2007; 56:604–612.
- [172] McClymont SA, Putnam AL, Lee MR et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Immunol* 2011; 186:3918–3926.
- [173] Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C et al. Cutting edge: increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol*. 2010;185:3814–8.
- [174] Glisic-Milosavljevic S, Waukau J, Jailwala P et al. At-risk and recent-onset type 1 diabetic subjects have increased apoptosis in the CD4+CD25+ T-cell fraction. *PLoS One*. 2007 Jan 3;2(1):e146
- [175] Schneider A, Rieck M, Sanda S et al. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181:7350–7355

- [176] Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes*. 2010 Feb; 59(2):407-15.
- [177] Ferraro A, Socci C, Stabilini A et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; 60:2903–2913.
- [178] Herold KC, Hagopian W, Auger JA et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002 May 30; 346(22):1692-8.
- [179] Herold KC, Gitelman SE, Masharani U et al. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005 Jun; 54(6):1763-9.
- [180] Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005 Jun 23; 352(25):2598-608.
- [181] Keymeulen B, Walter M, Mathieu C et al. Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. *Diabetologia*. 2010 Apr; 53(4):614-23. Epub 2010 Jan 14
- [182] Penaranda C, Tang Q, Bluestone JA. Anti-CD3 therapy promotes tolerance by selectively depleting pathogenic cells while preserving regulatory T cells. *J Immunol*. 2011. 187: 2015-2022.
- [183] Daifotis AG, Koenig S, Chatenoud L et al. Anti-CD3 clinical trials in type 1 diabetes mellitus.
- [184] Reijonen H, Vähäsalo P, Karjalainen J et al. HLA-DQB1 genotypes and islet cell antibodies in the identification of siblings at risk for insulin-dependent diabetes (IDDM) in Finland. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J Autoimmun*. 1994 Oct; 7(5):675-86.
- [185] Deschamps I, Homberg JC, Janssen F et al. Islet-cell antibodies (ICA-CFICA) and HLA genotypes in 107 IDD patients and their first-degree relatives. *Hum Immunol*. 1984 Jun; 10(2):129-34.
- [186] Thivolet C, Beaufrère B, Geburher L et al. Autoantibodies and genetic factors associated with the development of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in first degree relatives of diabetic patients. *Diabetologia*. 1991 Mar; 34(3):186-91.

- [187] Deschamps I, Boitard C, Hors J et al. Life table analysis of the risk of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in siblings according to islet cell antibodies and HLA markers. An 8-year prospective study. *Diabetologia*. 1992 Oct `35(10):951-7.
- [188] Veijola R, Vähäsalo P, Tuomilehto-Wolf E et al. Human leukocyte antigen identity and DQ risk alleles in autoantibody-positive siblings of children with IDDM are associated with reduced early insulin response. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes*. 1995 Sep `44(9):1021-8.
- [189] Veijola R, Reijonen H, Vähäsalo P et al. HLA-DQB1-defined genetic susceptibility, beta cell autoimmunity, and metabolic characteristics in familial and nonfamilial insulin-dependent diabetes mellitus. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J Clin Invest*. 1996 Dec 1 `98(11):2489-95.
- [190] Gorus FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, Christie MR, Pipeleers DG. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia*. 1997 Jan `40(1):95-9
- [191] Cinek O, Kolousková S, Pechová M et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in children of first-degree relatives of diabetic patients. *Cas Lek Cesk*. 2001 Aug `140(16):492-6.
- [192] Vavrinec J, Cinek O, Sumník Z et al. [Prediction of type 1 diabetes mellitus in first degree Czech relatives of diabetic patients]. *Vnitr Lek*. 2002 Jun `48(6):483-9.
- [193] Decochez K, De Leeuw IH, Keymeulen B et al. IA-2 autoantibodies predict impending type I diabetes in siblings of patients. *Diabetologia*. 2002 Dec `45(12):1658-66. Epub 2002 Nov 12. Belgian Diabetes Registry.
- [194] Knip M, Kukko M, Kulmala P et al. Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. *Am J Med Genet*. 2002 May 30 `115(1):48-54.
- [195] Pietropaolo M, Becker DJ, LaPorte RE et al. Progression to insulin-requiring diabetes in seronegative prediabetic subjects: the role of two HLA-DQ high-risk haplotypes. *Diabetologia*. 2002 Jan `45(1):66-76.
- [196] Kukko M, Kimpimäki T, Kupila A et al. Signs of beta-cell autoimmunity and HLA-defined diabetes susceptibility in the Finnish population: the sib cohort from the Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetologia*. 2003 Jan `46(1):65-70. Epub 2002 Dec 18.
- [197] Decochez K, Truyen I, van der Auwera B et al. Belgian Diabetes Registry. Combined positivity for HLA DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2005 Apr `48(4):687-94. Epub 2005 Mar 9.

- [198] Aly TA, Ide A, Humphrey K et al. Genetic prediction of autoimmunity: initial oligogenic prediction of anti-islet autoimmunity amongst DR3/DR4-DQ8 relatives of patients with type 1A diabetes. *J Autoimmun.* 2005`25 Suppl:40-5. Epub 2005 Oct 19.
- [199] Achenbach P, Warncke K, Reiter J et al. Type 1 diabetes risk assessment: improvement by follow-up measurements in young islet autoantibody-positive relatives. *Diabetologia.* 2006 Dec`49(12):2969-76. Epub 2006 Sep 26.
- [200] Truyen I, De Grijse J, Weets I et al` Belgian Diabetes Registry. Identification of prediabetes in first-degree relatives at intermediate risk of type I diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2007 Aug`149(2):243-50. Epub 2007 May 22
- [201] Wang JP, Zhou ZG, Lin J et al. Islet autoantibodies are associated with HLA-DQ genotypes in Han Chinese patients with type 1 diabetes and their relatives. *Tissue Antigens.* 2007 Nov`70(5):369-75.
- [202] Βαρθολομάτος Γ. Κυτταρομετρία ροής: Αρχές και κλινικοερευνητικές εφαρμογές της (για τους ειδικευόμενους γιατρούς στη Βιοπαθολογία και Αιματολογία). 2007
- [203] Minna Kiviniemi, Jussi Nurmi, Timo Lövgren et al. Locked nucleic acid (LNA) probes in high-throughput genetic analysis: Application to an assay for type 1 diabetes-related HLA-DQB1 alleles. *Clinical Biochemistry* 38, 1015–1022, 2005.
- [204] Minna Kiviniemi, Robert Hermann, Jussi Nurmi et al and The TEDDY Study Group. *Diabetes Technology & Therapeutics* 9, 460-472, 2007.
- [205] Zhou Z, Reyes-Vargas E, Escobar H et al. Type 1 diabetes associated HLA-DQ2 and DQ8 molecules are relatively resistant to HLA-DM mediated release of invariant chain-derived CLIP peptides. *Eur J Immunol.* 2015 Dec 28
- [206] Malhotra D, Linehan JL, Dileepan T et al. Tolerance is established in polyclonal CD4(+) T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol.* 2016. 17:187-195.
- [207] Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I et al. HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigens in humans. *Nature* 1987. 327:426–429.
- [208] Bilbao D, Luciani L, Johannesson B et al. Insulin-like growth factor-1 stimulates regulatory T cells and suppresses autoimmune disease. *EMBO Mol Med* 2014. 6:1423-1435.
- [209] Campana S, De Pasquale C, Carrega P et al. Cross-dressing: an alternative mechanism for antigen presentation. *Immunol Lett.* 2015. 168:349-354.
- [210] Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunol Res.* 2014. 2(11):1023-1033.

[211] Helling B, König M, Dälken B et al. A specific CD4 epitope bound by tregalizumab mediates activation of regulatory T cells by a unique signaling pathway. *Immunol Cell Biol.* 2015. 93:396-405

[212] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2014 Jan;37

[213] Winkler C, Lauber C, Adler K et al. An interferon-induced helicase (IFIH1) gene polymorphism associates with different rates of progression from autoimmunity to type 1 diabetes. *Diabetes.* 2011 Feb;60(2):685-90

[214] Butty V, Campbell C, Mathis D et al. DPT-1 Study Group. Impact of diabetes susceptibility loci on progression from pre-diabetes to diabetes in at-risk individuals of the diabetes prevention trial-type 1 (DPT-1). *Diabetes.* 2008 Sep;57(9):2348-59.

[215] Tait BD, Colman PG, Morahan G et al. HLA genes associated with autoimmunity and progression to disease in type 1 diabetes. *Tissue Antigens.* 2003 Feb;61(2):146-53.

[216] Honeyman MC, Harrison LC, Drummond B et al. Analysis of families at risk for insulin-dependent diabetes mellitus reveals that HLA antigens influence progression to clinical disease. *Mol Med.* 1995 Jul;1(5):576-82.