



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ
ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 1**

**ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ Α. ΠΑΣΧΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ
ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 1**

**ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ Α. ΠΑΣΧΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

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

Στους λατρευτούς μου γονείς

«Πρέπει να είσαι η αλλαγή
που εύχεται να δεις στον κόσμο»

Μ. Γκάντι

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 τον γνωρίσω στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Υπήρξε για μένα όλα αυτά τα χρόνια εξαιρετικός σύμβουλος και τον ευχαριστώ για τις εύστοχες υποδείξεις του και τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Η συνεργασία μας υπήρξε άψογη και δημιουργική. Ευχή μου είναι όλοι οι νέοι συνάδελφοί μου να συναντήσουν στο δρόμο τους τέτοιους δασκάλους για να τους εμπνεύσουν.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον Καθηγητή Τ.Ε.Ι. Ηπείρου κ. Γεώργιο Κ. Παπαδόπουλο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη σημαντική καθοδήγηση που μου παρείχε. Με τη βαθιά του γνώση και το μεράκι του για την επιστήμη μου εμφύσησε την αγάπη για την έρευνα και την επιστημονική αναζήτηση. Ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα και η στήριξή του ήταν πραγματικά ανεκτίμητη. Τον ευχαριστώ τόσο για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε όσο και για το ξεχωριστό ήθος που μου δίδαξε.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, επιστημονικό υπεύθυνο της Μονάδας Μοριακής Βιολογίας, που μου έμαθε Κυτταρομετρία Ροής με περισσή υπομονή και χαρακτηριστικό ζήλο. Τον ευχαριστώ για τις δημιουργικές συζητήσεις μας, τις γνώσεις που απλόχερα μοιράστηκε μαζί μου και τη μεγάλη του βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής, αλλά και για τον ενθουσιασμό που μου εμφύσησε τόσο για την επιστήμη όσο και για την ίδια τη ζωή. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον κ. Νικόλαο Κολαΐτη, Διευθυντή του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για τις εύστοχες υποδείξεις του και τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Χωρίς τη βοήθειά τους η ολοκλήρωση της διατριβής θα ήταν ανέφικτη. Θερμές ευχαριστίες θέλω να απευθύνω και σε όλους τους συνεργάτες της Μονάδας Μοριακής Βιολογίας για την άψογη συνεργασία μας, τις επικοινωνιακές συζητήσεις μας, το ευχάριστο κλίμα και τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε.

Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Τ.Ε.Ι. Ηπείρου κα Ελένη Γιωτάκη για τη μεγάλη βοήθεια και την ευγένειά της. Επίσης, όλους τους ιατρούς και

νοσηλευτές της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, καθώς και τον κ. Αναστάσιο Σέρμπη, ιατρό της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για την κατανόηση και τη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παθολογίας-Ρευματολογίας κ. Αλέξανδρο Δρόσο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Ήταν ο πρώτος που με τις ενδιαφέρουσες παραδόσεις του στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών με έφερε σε επαφή με την Ανοσολογία που τόσο με γοήτευσε στη συνέχεια. Τον ευχαριστώ και για την καλή του πάντα διάθεση και τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και προς όλα τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής και συγκεκριμένα στον Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας κ. Κωνσταντίνο Μπουραντά, στον Αν. Καθηγητή Δερματολογίας κ. Ιωάννη Μπασούκα, στον Επίκ. Καθηγητή Παθολογίας κ. Χαράλαμπο Μηλιώνη και στον Επίκ. Καθηγητή Ενδοκρινολογίας κ. Στυλιανό Τίγκα. Οι περισσότεροι αποτέλεσαν δασκάλους μου στα χρόνια των προπτυχιακών μου σπουδών και τους ευχαριστώ διπλά.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία που τίμησε με δύο βραβεία επιστημονικές εργασίες σχετικές με τη διδακτορική μου διατριβή. Επίσης, την Ευρωπαϊκή Διαβητολογική Εταιρεία που πολλές φορές υποστήριξε τη συμμετοχή μου σε διεθνή συνέδρια και σεμινάρια.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την κα Μαρία Ζυγούρη, γραμματέα του Καθηγητή κ. Αγαθοκλή Τσατσούλη, για την καλή της πάντα διάθεση και τη βοήθειά της.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και στις αδερφές μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους και τη συνεχή ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια σπουδών, καθώς και στους αγαπημένους συγγενείς και καλούς φίλους που με συντροφεύουν στο όμορφο ταξίδι της ζωής.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AIRE= autoimmune regulator gene

APECED= autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy

APC= antigen presenting cell

APS= autoimmune polyendocrine syndrome

ADP= adenosine diphosphate

ATP= adenosine triphosphate

cAMP= cyclic adenosine monophosphate

CTLA-4= cytotoxic T lymphocyte antigen-4

DC= dendritic cell

ELISA= enzyme linked immunosorbent assay

FoxP3= forkhead box P3

GAD= glutamic acid decarboxylase

GATA= globulin trans-acting T-cell-specific transcription factor

GITR= glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor

HLA= human leucocyte antigen

IAA= insulin autoantibodies

IFN= interferon

IL= interleukin

Ins= insulin

InsR= insulin receptor

IPEX= immune deficiency-polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked

MFI= mean fluorescence intensity

MHC= major histocompatibility complex

PD-L1= programmed cell death-ligand 1

PTPN22= protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22

RIA= radioimmunoassay

ROR γ t= orphan nuclear receptor gamma T (cell)

STAT= signal transducer and activator transcription factor

T-bet= TH1 box family transcription factor

TCR= T cell receptor

Teff= T effector lymphocytes

TGF β = transforming growth factor β

TGF β RII= transforming growth factor β receptor type II

Tn= T naive lymphocytes

TNF= tumour necrosis factor

Tregs= T regulatory lymphocytes

VNTR= variable number (of) tandem repeats

Σ . Δ .= σακχαρώδης διαβήτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

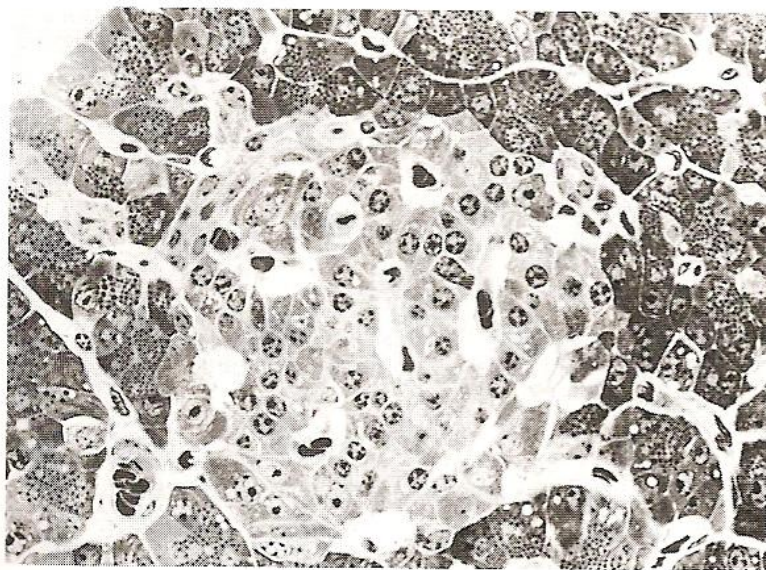
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ενδοκρινές πάγκρεας	2
1.2 Βιοσύνθεση, έκκριση και δράση της Ινσουλίνης	3
1.3 Σακχαρώδης Διαβήτης	5
1.4 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1	10
1.4.1 Επιδημιολογία	10
1.4.2 Παθογένεια	11
1.5 Γενετικοί Παράγοντες	13
1.5.1 Το σύμπλεγμα HLA	13
1.5.1.1 Ορισμός	14
1.5.1.2 Πολυμορφισμός-Κληρονομικότητα	14
1.5.1.3 Ονοματολογία	16
1.5.1.4 Δομή και βιοσύνθεση	17
1.5.1.5 Βιολογικός ρόλος του MHC	21
1.5.1.6 Συσχετισμοί HLA με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1	23
1.5.2 Insulin-VNTR	24
1.5.3 CTLA-4	24
1.5.4 Άλλες γενετικές συσχετίσεις	27
1.5.4.1 PTPN22	27
1.5.4.2 AIRE	27
1.5.4.3 FoxP3	28
1.6 Περιβαλλοντικοί παράγοντες	29
1.7 Αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων	30
1.7.1 Ανοσία	31
1.7.2 Ανοσολογική αναγνώριση και απάντηση	32
1.7.3 Αυτοάνοση απάντηση στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1	36
1.8 T κυτταρική ανοχή	37
1.8.1 Κεντρική ανοχή	37
1.8.2 Περιφερική ανοχή	38
1.8.3 Ο ρόλος των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs)	40
1.8.3.1 Κατηγορίες-Ανοσοφαινότυπος	40

1.8.3.2 Παραγωγή των Tregs	43
1.8.3.3 Κατασταλτική λειτουργία των Tregs	48
1.8.3.4 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 και Tregs	51
1.9 Σκοπός της μελέτης	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	57
2.1 Ασθενείς και Μάρτυρες	58
2.2 Κυτταρομετρία Ροής	59
2.2.1 Μέθοδος	59
2.2.2 Υλικά	69
2.2.3 Πρωτόκολλο εκτέλεσης	72
2.2.4 Ανάλυση	73
2.3 Προσδιορισμός Αυτοαντισωμάτων	77
2.3.1 ELISA	78
2.3.1.1 Μέθοδος	78
2.3.1.2 Υλικά	81
2.3.1.3 Προετοιμασία δειγμάτων	82
2.3.1.4 Πρωτόκολλο μεθόδου	83
2.3.2 Ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA)	86
2.4 Στατιστική επεξεργασία	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	89
3.1 Διαφορές μεταξύ Tregs και T _H 17	90
3.2 Ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές των Tregs μεταξύ ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και φυσιολογικών μαρτύρων	93
3.2.1 Ποσοτικές διαφορές	94
3.2.2 Ποιοτικές διαφορές	96
3.3 Έκφραση Αυτοαντισωμάτων	101
3.4 Συσχέτιση της συχνότητας και της έντασης έκφρασης των διαφόρων δεικτών των Tregs	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	133
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ	139
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ (ABSTRACT)	149
ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	159
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	161

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ενδοκρινές πάγκρεας

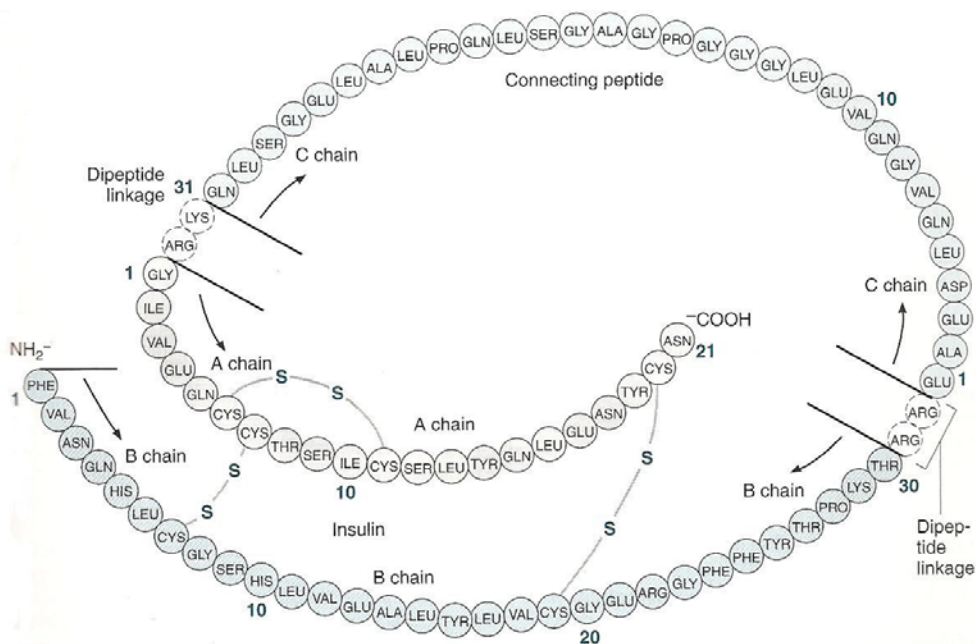
Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος συνίσταται από περίπου 1 εκατομμύριο μικρούς αδένες, τα νησίδια του Langerhans, διασκορπισμένους ανομοιόμορφα ανάμεσα στον εξωκρινή παγκρεατικό ιστό. Τα νησίδια αποτελούν το 1.5 % περίπου του συνολικού παγκρεατικού όγκου και ζυγίζουν 1-2 gr στον φυσιολογικό ενήλικα. Τέσσερις τουλάχιστον κυτταρικοί τύποι έχουν αναγνωρισθεί στα νησίδια του Langerhans: α) Τα κύτταρα *α* που εκκρίνουν γλυκαγόνη και αποτελούν το 33-46 % των νησιδιακών κυττάρων, β) Τα κύτταρα *β* που εκκρίνουν ινσουλίνη και αποτελούν το 48-59 % των νησιδιακών κυττάρων, γ) Τα κύτταρα *δ* που εκκρίνουν σωματοστατίνη και αποτελούν το 8-12 % των νησιδιακών κυττάρων και δ) τα κύτταρα *F* (PP cells) που εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο και αποτελούν το 2-3 % των νησιδιακών κυττάρων (Cabrera και συν. 2005, Greenspan & Gardner 2007). Σε ένα τυπικό νησίδιο του Langerhans τα κύτταρα *α* εμφανίζονται κυρίως στην περιφέρεια μαζί με κάποια κύτταρα *δ*, ενώ ο κεντρικός πυρήνας του νησιδίου αποτελείται κυρίως από κύτταρα *β*. Τα νησίδια παρουσιάζουν εξαιρετικά πλούσια αγγείωση (5 ως 10 φορές μεγαλύτερη από την εξωκρινή μοίρα) με αιματική ροή από το κέντρο προς την περιφέρεια, γεγονός εξαιρετικά σημαντικό για τη ρύθμιση έκκρισης γλυκαγόνης από τα κύτταρα *α* της περιφέρειας, με βάση την ποσότητα της ινσουλίνης που εκκρίνεται από τα κύτταρα *β* του κέντρου (Cabrera και συν. 2005, Greenspan & Gardner 2007) (Εικ. 1.1).



Εικ. 1.1 Τυπικό ανθρώπινο νησίδιο του Langerhans (Πηγή: Greenspan & Gardner 2007)

1.2 Βιοσύνθεση, έκκριση και δράση της Ινσουλίνης

Βιοσύνθεση Το γονίδιο της ανθρώπινης ινσουλίνης εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11. Η ινσουλίνη παράγεται στα β κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος. Αρχικά συντίθεται ως πρόδρομο πολυπεπτίδιο με μονή αλυσίδα 86 αμινοξέων, την προπροϊνσουλίνη, από την οποία με πρωτεολυτική επεξεργασία απομακρύνεται το αμινοτελικό πεπτίδιο-σήμα και παράγεται η προϊνσουλίνη. Με αποκοπή ενός εσωτερικού τμήματος 31 αμινοξέων από την προϊνσουλίνη παράγεται το συνδετικό πεπτίδιο C και οι αλυσίδες A (21 αμινοξέα) και B (30 αμινοξέα), οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς και αποτελούν την ινσουλίνη (Εικ. 1.2). Το ώριμο μόριο της ινσουλίνης και το πεπτίδιο C αποθηκεύονται μαζί και εκκρίνονται ταυτόχρονα από τα εκκριτικά κοκκία των β κυττάρων. Επειδή το πεπτίδιο C είναι λιγότερο ευπαθές από την ινσουλίνη στην αποικοδόμηση που επιτελείται στο ήπαρ, αποτελεί χρήσιμο δείκτη έκκρισης της ινσουλίνης και επιτρέπει τη διάκριση της ενδογενούς από την εξωγενή ινσουλίνη κατά την κλινική αξιολόγηση. Σήμερα παράγεται ανθρώπινη ινσουλίνη με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Οι δομικές μεταβολές σε ένα ή περισσότερα αμινοξέα της ινσουλίνης επιφέρουν τροποποίηση των φυσικών και φαρμακολογικών χαρακτηριστικών της και έχουν κλινική εφαρμογή (Saltiel και συν. 2001, Harrison 2005).



Εικ. 1.2 Η δομή της προπροϊνσουλίνης (Πηγή: Greenspan & Gardner 2007)

Έκκριση Το ανθρώπινο πάγκρεας εκκρίνει περίπου 30 μονάδες ινσουλίνης ημερησίως σε έναν φυσιολογικό ενήλικα. Η γλυκόζη είναι κύριος ρυθμιστής της έκκρισης της ινσουλίνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος. Ωστόσο, η έκκριση της ινσουλίνης επηρεάζεται επίσης από αμινοξέα, κετόνες, γαστρεντερικά πεπτίδια και νευροδιαβιβαστές. Επίπεδα γλυκόζης > 70 mg/dl (3.9 mM) διεγείρουν τη σύνθεση ινσουλίνης, κυρίως αυξάνοντας τη μετάφραση και την ωρίμανσή της. Η διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης από τη γλυκόζη αρχίζει από τη μεταφορά της γλυκόζης μέσα στο β κύτταρο μέσω του μεταφορέα GLUT-2. Η φωσφορυλίωση της γλυκόζης από τη γλυκοκινάση είναι η καθοριστική αντίδραση για την ταχύτητα της συνολικής οδού, που ελέγχει τη ρυθμιζόμενη από τη γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης. Ο περαιτέρω μεταβολισμός της 6-φωσφορικής γλυκόζης μέσω γλυκόλυσης οδηγεί σε παραγωγή ATP, που αναστέλλει τη δραστηριότητα του ATP-εξαρτώμενου διαύλου K^+ . Η αναστολή αυτού του διαύλου K^+ προκαλεί εκπόλωση της μεμβράνης των β -κυττάρων, η οποία διανοίγει τους τασοεξαρτώμενους διαύλους Ca^{++} (με αποτέλεσμα την εισροή Ca^{++}) και διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης. Το προφίλ έκκρισης της ινσουλίνης αποκαλύπτει ένα παλμικό πρότυπο απελευθέρωσης της ορμόνης κατά ώσεις, με μικρές εκκριτικές αιχμές που συμβαίνουν κάθε 10 min και επιπροστίθενται σε εκκριτικές αιχμές μεγαλύτερου ύψους που εμφανίζονται ανά 80 ως 150 min. Τα γεύματα και άλλα σημαντικά ερεθίσματα έκκρισης ινσουλίνης προκαλούν μεγάλες αιχμές έκκρισης (αύξηση κατά 4 ως 5 φορές πάνω από τα βασικά επίπεδα), που διαρκούν συνήθως για 2 ως 3 ώρες πριν επανέλθουν στα βασικά επίπεδα (Saltiel και συν. 2001, Harrison 2005).

Δράση Μετά την έκκριση ινσουλίνης στο πυλαίο φλεβικό σύστημα περίπου 50 % αυτής αποδομείται στο ήπαρ. Η μη αποδομηθείσα ινσουλίνη εισέρχεται στην κυκλοφορία όπου συνδέεται με υποδοχείς στις θέσεις-στόχους. Η σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της ενεργοποιεί την τυροσυλοκινάση με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα και τη στρατολόγηση των ενδοκυττάρων μορίων μεταγωγής σήματος. Αυτά τα μόρια αρχίζουν μια πολύπλοκη σειρά αντιδράσεων φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης που καταλήγουν στις μεταβολικές και μιτογόνες δράσεις της ινσουλίνης. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της οδού της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI-3 κινάση) διεγείρει τη μετάθεση των μεταφορέων γλυκόζης (π.χ. του GLUT-4) στην κυτταρική επιφάνεια, γεγονός πολύ σημαντικό για την πρόσληψη γλυκόζης από τους σκελετικού μυς και το λιπώδη ιστό. Η ενεργοποίηση άλλων οδών μεταγωγής σήματος από τον υποδοχέα της ινσουλίνης

επάγει τη σύνθεση γλυκογόνου, τη σύνθεση προτεϊνών, τη λιπογένεση και τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων (Saltiel και συν. 2001, Harrison 2005).

Η ομοιόσταση της γλυκόζης αντανακλά το ακριβές ισοζύγιο μεταξύ ηπατικής παραγωγής και περιφερικής πρόσληψης και χρησιμοποίησης της γλυκόζης. Η ινσουλίνη είναι ο πιο σημαντικός ρυθμιστής αυτής της μεταβολικής ισορροπίας, αλλά με την επίδραση του νευρικού συστήματος, μεταβολικών σημάτων και άλλων ορμονών (π.χ. της γλυκαγόνης) διαμορφώνεται ένα ολοκληρωμένο σύστημα ελέγχου. Σε κατάσταση νηστείας, τα χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης αυξάνουν την παραγωγή γλυκόζης προάγοντας την ηπατική γλυκονεογένεση και γλυκογονόλυση. Επίσης, μειώνουν τη σύνθεση γλυκογόνου, την πρόσληψη γλυκόζης στους ινσουλινοευαίσθητους ιστούς και προάγουν την κινητικοποίηση των αποθηκευμένων πρόδρομων ενώσεων (που χρησιμοποιούνται για γλυκονεογένεση). Μεταγευματικά, το φορτίο της γλυκόζης συνεπάγεται αύξηση της ινσουλίνης και μείωση της γλυκαγόνης, με αποτέλεσμα αναστροφή αυτών των δράσεων. Το μεγαλύτερο μέρος της μεταγευματικής γλυκόζης χρησιμοποιείται από τους σκελετικούς μυς και αυτό αποτελεί ένα παράδειγμα πρόσληψης γλυκόζης που διεγείρεται από την ινσουλίνη. Άλλοι ιστοί, όπως το ήπαρ και ιδιαίτερα ο εγκέφαλος, χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι ινσουλίνης (Saltiel και συν. 2001, Harrison 2005, Greenspan & Gardner 2007).

1.3 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) περιλαμβάνει μια ομάδα διαταραχών του μεταβολισμού που έχουν ως κοινό τους χαρακτηριστικό την υπεργλυκαιμία. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ΣΔ και προκαλούνται από την πολύπλοκη αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, καθώς και του τρόπου ζωής. Ανάλογα με την αιτιολογία του ΣΔ, οι παράγοντες που συμβάλλουν στην υπεργλυκαιμία μπορεί να περιλαμβάνουν τη μειωμένη έκκριση ινσουλίνης, τη μειωμένη χρησιμοποίηση γλυκόζης και την αυξημένη παραγωγή γλυκόζης. Ο ΣΔ ταξινομείται σήμερα με βάση τον παθογενετικό μηχανισμό που οδηγεί σε υπεργλυκαιμία, σε αντίθεση με τα παλιότερα κριτήρια της ηλικίας έναρξης ή του τύπου θεραπείας.

Πίνακας 1.1 Αιτιολογική ταξινόμηση Σακχαρώδη Διαβήτη

I. Διαβήτης τύπου 1 (καταστροφή β κυττάρων, συνήθως οδηγεί σε πλήρη ανεπάρκεια ινσουλίνης)

A. Ανοσολογικής Αιτιολογίας

B. Ιδιοπαθής

II. Διαβήτης τύπου 2 (περιλαμβάνει όλες τις καταστάσεις, από την επικράτηση της αντίστασης στην ινσουλίνη με σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης μέχρι την επικράτηση της διαταραχής στην έκκριση της ινσουλίνης με αντίσταση στην ινσουλίνη)

III. Άλλοι ειδικοί τύποι διαβήτη

A. Γενετικές διαταραχές της λειτουργίας των β κυττάρων που χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις:

1. στον παράγοντα μεταγραφής στον πυρήνα των ηπατοκυττάρων HNF-4a (MODY 1)

2. Στη γλυκοκινάση (MODY 2)

3. Στον HNF-1a (MODY 3)

4. Στον παράγοντα-υποκινητή της ινσουλίνης IPF 1 (MODY 4)

5. Στον HNF-1 β (MODY 5)

6. Στο νευροD1 (MODY 6)

7. Στο μιτοχονδριακό DNA

8. Στη μετατροπή της προϊνσουλίνης ή της ινσουλίνης

B. Γενετικές διαταραχές στη δράση της ινσουλίνης:

1. Αντίσταση στην ινσουλίνη τύπου A

2. Λεπρεχωνισμός

3. Σύνδρομο Rabson-Mendenhall

4. Σύνδρομο λιποδυστροφίας

Γ. Νόσοι της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος:

1. Παγκρεατίτιδα

2. Παγκρεατεκτομή

3. Νεοπλασία

4. Κυστική ίνωση

5. Αιμοχρωμάτωση

6. Ινολιθιασική παγκρεατοπάθεια

Δ. Ενδοκρिनοπάθειες:

1. Μεγαλακρία
2. Σύνδρομο Cushing
3. Γλυκαγόνωμα
4. Φαιοχρωμοκύττωμα
5. Υπερθυρεοειδισμός
6. Σωματοστατίνωμα
7. Αλδοστερίνωμα

Ε. Επαγόμενος από φάρμακα ή χημικές ουσίες:

1. Πενταμιδίνη
2. Νικοτινικό οξύ
3. Γλυκοκορτικοειδή
4. Θυρεοειδικές ορμόνες
5. Διαζοξειδή
6. β-αδρενεργικοί αγωνιστές
7. θειαζίδες
8. Φαινυτοίνη
9. Ιντερφερόνη-α
10. Αναστολείς πρωτεάσης
11. Κλοζαπίνη
12. β-αποκλειστές

ΣΤ. Λοιμώξεις:

1. Συγγενής ερυθρά
2. Μεγαλοκυτταροϊός
3. Ιοί Coxsackie

Ζ. Ασυνήθεις μορφές διαβήτη ανοσολογικής αιτιολογίας:

1. Σύνδρομο “δύσκαμπτου βραχίονα” (“stiff arm” syndrome)
2. Αντισώματα κατά υποδοχέα της ινσουλίνης

Η. Άλλα γενετικά σύνδρομα που μερικές φορές σχετίζονται με ΣΔ:

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

IV. Σακχαρώδης Διαβήτης κύησης (ΣΔΚ)

Πηγή: Harrison 2005, Προσαρμοσμένος από την Αμερικάνικη Διαβητολογική Εταιρεία 2004

Οι δύο μεγάλες κατηγορίες του ΣΔ καθορίζονται ως τύπος 1 και τύπος 2. Ο ΣΔ τύπου 1 είναι αποτέλεσμα καταστροφής των β κυττάρων, η οποία οδηγεί σε ανεπάρκεια ινσουλίνης. Τα άτομα με ΣΔ τύπου 1B δεν εμφανίζουν ανοσολογικούς δείκτες ενδεικτικούς αυτοάνοσης καταστροφής των β β-κυττάρων. Ωστόσο, αναπτύσσουν ανεπάρκεια ινσουλίνης με άγνωστους μηχανισμούς και παρουσιάζουν την τάση να εμφανίζουν κετοξέωση. Λίγοι ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 (< 10 %) υπάγονται στον τύπο 1B που θεωρείται ιδιοπαθής. Πολλά από τα άτομα αυτά είναι αφρικανοαμερικανικής ή ασιατικής καταγωγής (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

Ο ΣΔ τύπου 2 χαρακτηρίζεται από τις εξής παθοφυσιολογικές διαταραχές: περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη, μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και υπερβολική ηπατική παραγωγή γλυκόζης. Διάφοροι γενετικοί τόποι συμβάλλουν ισχυρά στην ευπάθεια, ενώ περιβαλλοντικοί παράγοντες (όπως η διατροφή και η φυσική δραστηριότητα) ρυθμίζουν περαιτέρω τη φαινοτυπική έκφραση της νόσου. Η παχυσαρκία, ιδιαίτερα η σπλαχνική ή κεντρική (όπως αυτή καθορίζεται από το λόγο περιφέρειας-ισχίων) είναι πολύ συνήθης στο ΣΔ τύπου 2. Τα σπλαχνικά λιποκύτταρα εκκρίνουν πολλά βιολογικά προϊόντα (λεπτίνη, TNF- α , ελεύθερα λιπαρά οξέα, ρεζιστίνη και αδιπονεκτίνη), τα οποία ρυθμίζουν την έκκριση και τη δράση της ινσουλίνης αλλά και το σωματικό βάρος και μπορεί να συμβάλλουν στην αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία προηγείται της διαταραχής της έκκρισης της ινσουλίνης. Στα πρώιμα στάδια της διαταραχής, η ανοχή στη γλυκόζη παραμένει φυσιολογική παρά την αντίσταση στην ινσουλίνη, επειδή τα β κύτταρα αντισταθμίζουν αυξάνοντας την παραγωγή ινσουλίνης. Καθώς εξελίσσεται η αντίσταση στην ινσουλίνη και η αντισταθμιστική υπερινσουλιναιμία, τα παγκρεατικά νησίδια σε ορισμένα άτομα αδυνατούν να διατηρήσουν την υπερινσουλινική κατάσταση. Σε αυτή τη φάση

αναπτύσσεται η μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη (impaired glucose tolerance, IGT), που χαρακτηρίζεται από αύξηση των επιπέδων της μεταγευματικής γλυκόζης και ορίζεται ως επίπεδα γλυκόζης πλάσματος μεταξύ 140 (7.8 mM) και 200 mg/dl (11.1 mM) 2 ώρες μετά από φόρτιση με 75 g γλυκόζης από το στόμα. Η περαιτέρω μείωση της έκκρισης ινσουλίνης και αύξηση της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης οδηγούν σε κλινικό διαβήτη με υπεργλυκαιμία νηστείας, δηλαδή επίπεδα γλυκόζης πλάσματος νηστείας > 126 mg/dl (7 mM) (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

Δύο χαρακτηριστικά της τρέχουσας ταξινόμησης του ΣΔ αποκλίνουν από τις προηγούμενες ταξινομήσεις. Πρώτα, οι όροι *ινσουλινοεξαρτώμενος Σακχαρώδης Διαβήτης (IDDM)* και *μη ινσουλινοεξαρτώμενος Σακχαρώδης Διαβήτης (NIDDM)* θεωρούνται απαρχαιωμένοι. Εφόσον πολλά άτομα με ΣΔ τύπου 2 χρειάζονται τελικά θεραπεία με ινσουλίνη για τον έλεγχο της γλυκαιμίας, η χρήση του τελευταίου όρου δημιουργούσε σημαντική σύγχυση. Μια δεύτερη διαφορά είναι ότι η ηλικία δεν αποτελεί πλέον κριτήριο ταξινόμησης. Παρόλο που ο ΣΔ τύπου 1 εμφανίζεται στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων πριν την ηλικία των 30 ετών, η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Παρομοίως, ο ΣΔ τύπου 2 αναπτύσσεται πιο τυπικά σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, αλλά παρατηρείται επίσης σε παιδιά, ιδιαίτερα παχύσαρκα, και εφήβους (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

Άλλες αιτίες που προκαλούν ΣΔ περιλαμβάνουν ειδικές διαταραχές στην έκκριση ή τη δράση της ινσουλίνης, μεταβολικές ανωμαλίες που διαταράσσουν την έκκριση της ινσουλίνης, διαταραχές των μιτοχondρίων και πλήθος άλλων καταστάσεων που διαταράσσουν την ανοχή στη γλυκόζη, όπως φαίνεται στην ταξινόμηση. Ο *νεανικός διαβήτης με έναρξη σε ώριμη ηλικία (maturity onset diabetes of the young, MODY)* είναι ένας υπότυπος ΣΔ που χαρακτηρίζεται από αυτοσωματικό επικρατούντα τύπο κληρονομικότητας, πρόωμη έναρξη υπεργλυκαιμίας και μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης. Οι μεταλλάξεις στον υποδοχέα της ινσουλίνης προκαλούν μια ομάδα σπάνιων διαταραχών που χαρακτηρίζεται από σημαντική αντίσταση στην ινσουλίνη (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

Ο ΣΔ μπορεί να προκληθεί από νόσο της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, αν αυτή περιλαμβάνει καταστροφή της πλειονότητας των παγκρεατικών νησιδίων (>80 %). Οι ορμόνες που ανταγωνίζονται τη δράση της ινσουλίνης είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε ΣΔ. Έτσι, ο ΣΔ αποτελεί συχνή εκδήλωση ορισμένων ενδοκρινικών

διαταραχών, όπως η μεγαλακρία και το σύνδρομο Cushing. Ιογενείς λοιμώξεις έχουν ενοχοποιηθεί για την καταστροφή των παγκρεατικών νησιδιοκυττάρων, αλλά στα περισσότερα από τα άτομα αυτά υπάρχουν και ανοσολογικοί δείκτες αυτοάνοσης καταστροφής των β κυττάρων (Harrison 2005, Greenspan & Gardner 2007).

Όσον αφορά το Σακχαρώδη Διαβήτη της κύησης, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να εμφανιστεί μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη. Η αντίσταση στην ινσουλίνη που σχετίζεται με αλλαγές του μεταβολισμού που συμβαίνουν τις τελευταίες εβδομάδες της κύησης αυξάνει τις απαιτήσεις σε ινσουλίνη και μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη (IGT). Ο ΣΔ της κύησης παρατηρείται στο 4 % περίπου των κυήσεων. Στις περισσότερες γυναίκες αποκαθίσταται φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη μετά τον τοκετό, αλλά παρατηρείται σημαντικός κίνδυνος (30 ως 60 %) εμφάνισης ΣΔ αργότερα (Harrison 2005).

1.4 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1

Στην εποχή της αυξανόμενης παχυσαρκίας ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 αποτελεί μόλις το 5-10 % όλων των περιπτώσεων Σακχαρώδη Διαβήτη. Παρουσιάζεται όμως παγκοσμίως με αυξανόμενη επίπτωση στις περισσότερες χώρες και εμφανίζεται συνήθως νωρίτερα στη ζωή των ασθενών από τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Οδηγεί συχνά -παρά τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου- σε σοβαρές βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιπλοκές που ταλανίζουν τις ζωές των ασθενών και τείνουν να εξοβελίσουν τα συστήματα Δημόσιας Υγείας (Daneman 2006).

1.4.1 Επιδημιολογία

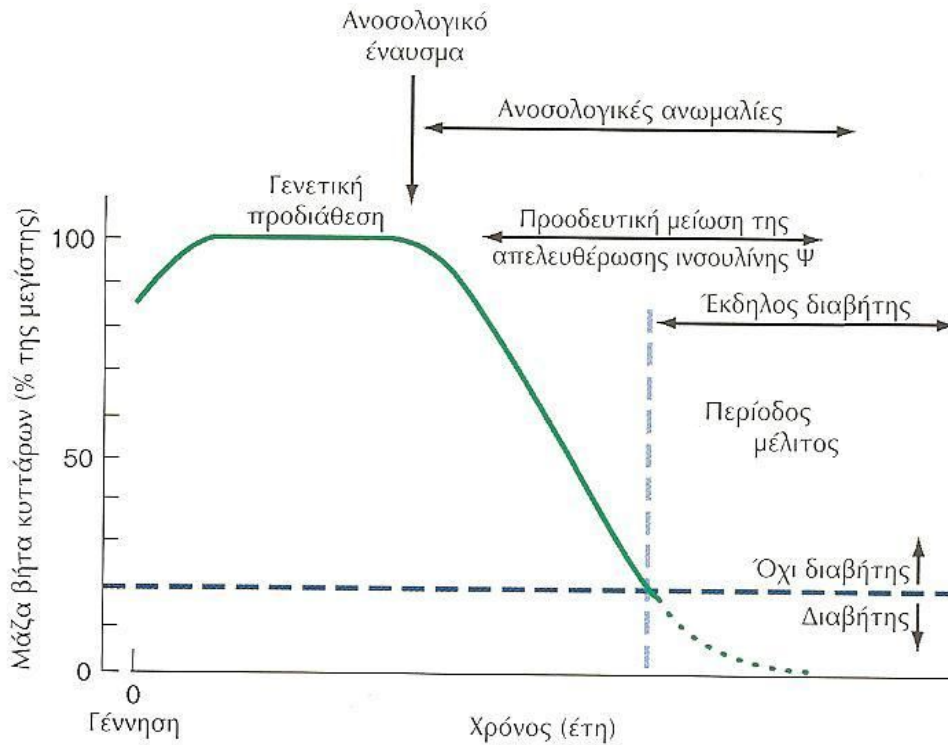
Στις κλασικές περιγραφές ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 παρουσιάζεται ως νόσημα της παιδικής και της πρώιμης εφηβικής ηλικίας με ξαφνική έναρξη και θορυβώδη συμπτωματολογία. Θεωρείται ότι οι περισσότεροι ασθενείς κατά την έναρξη της νόσου έχουν ηλικία μικρότερη των 20 ετών και διαγιγνώσκονται με συμπτώματα διαβητικής κετοξέωσης. Πρόσφατα όμως δεδομένα αποκαλύπτουν ότι μόνο περίπου 50-60 % των διαβητικών τύπου 1 είναι κάτω των 16-18 ετών κατά την έναρξη της νόσου. Η νόσος συνεχίζει να εμφανίζεται με μικρότερη επίπτωση και κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Επιπλέον, μελέτες της φυσικής ιστορίας του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 σε πρώτου βαθμού συγγενείς θετικούς σε αυτοαντισώματα καταδεικνύουν ότι προηγείται συχνά μια πρόδρομη περίοδος στην

οποία η ομοιοστασία της γλυκόζης είναι μάλλον φυσιολογική ή ελαφρώς διαταραγμένη. Τέλος, η διαβητική κετοξέωση δεν είναι καθολικά παρούσα κατά την έναρξη της νόσου. Στα παιδιά αναφέρονται ποσοστά 15-67 % (φτάνουν 40-50 % σε ηλικίες 0-4 ετών), τα οποία μάλιστα στις διάφορες χώρες σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με την επίπτωση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

Η επίπτωση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 αυξάνεται παγκοσμίως κατά περίπου 2-5 % κατά έτος. Η νόσος παρουσιάζει τεράστια γεωγραφική κατανομή. Η μικρότερη επίπτωση καταγράφεται στην Κίνα, με 0.57 περιπτώσεις νεοδιαγνωσθέντος Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ανά 100.000 νεανικού πληθυσμού το χρόνο. Τριάντα φορές υψηλότερα είναι τα ποσοστά στη Μεγάλη Βρετανία (18-20 ανά 100.000 ανά έτος) και 100 φορές υψηλότερα στη Φινλανδία και στη Σαρδηνία (48-49 ανά 100.000 ανά έτος). Μεγάλες μελέτες καταδεικνύουν ότι υπάρχει μια τάση μείωσης της ηλικίας εμφάνισης του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 τα τελευταία χρόνια. Χαρακτηριστικά είναι τα δεδομένα από τη Σουηδία και το Βέλγιο. Φαίνεται ότι νωρίτερα τα νήπια και τα παιδιά εκτίθενται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες που μπορεί να πυροδοτούν την ενεργοποίηση των μηχανισμών που οδηγούν στην καταστροφή των β νησιδιοκυττάρων του ενδοκρινούς παγκρέατος. Ενδιαφέρον αποτελεί επίσης το γεγονός ότι πληθυσμοί που μεταναστεύουν σε άλλες χώρες σε σύντομο χρονικό διάστημα αφομοιώνουν τα ποσοστά επίπτωσης που εμφανίζει ο τόπος που τους φιλοξενεί για τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των παιδιών Ινδών της Βρετανίας που εμφανίζουν τα ίδια ποσοστά με τους Βρετανούς κι όχι τα πολύ χαμηλά ποσοστά του πληθυσμού της Ασίας. Κι εδώ η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων φαίνεται να είναι σημαντική (Harrison, 2005, Daneman 2006).

1.4.2 Παθογένεια

Ο ΣΔ τύπου 1 αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα συνεργειακής επίδρασης γενετικών, περιβαλλοντικών και ανοσολογικών παραγόντων οι οποίοι τελικά καταστρέφουν τα β -κύτταρα του παγκρέατος (Εικ. 1.3).



Εικ 1.3 Η πορεία του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ως συνάρτηση της μάζας των β κυττάρων (Πηγή: Harrison 2005, Προσαρμοσμένο από την Αμερικάνικη Διαβητολογική Εταιρεία 1998 και Rossini, Diabetes 1988)

Τα άτομα με γενετική ευπάθεια έχουν φυσιολογικό αριθμό β κυττάρων κατά τη γέννησή τους, αλλά αρχίζουν να χάνουν β κύτταρα δευτεροπαθώς λόγω αυτοάνοσης καταστροφής που συμβαίνει κατά τη διάρκεια μηνών ή ετών. Αυτή η αυτοάνοση διαδικασία θεωρείται ότι πυροδοτείται από ένα λοιμώδες ή περιβαλλοντικό ερέθισμα. Στην πλειονότητα των ατόμων ανευρίσκονται ανοσολογικοί δείκτες κατά την έναρξη αυτής της διαδικασίας και πριν εκδηλωθεί κλινικά ο διαβήτης. Ο αριθμός των β κυττάρων αρχίζει τότε να μειώνεται και προοδευτικά μειώνεται επίσης η έκκριση ινσουλίνης, ενώ διατηρείται φυσιολογική η ανοχή στη γλυκόζη. Ο ρυθμός μείωσης του αριθμού των β κυττάρων ποικίλλει ευρέως από άτομο σε άτομο, με αποτέλεσμα σε μερικούς ασθενείς να παρατηρείται γρήγορη εξέλιξη σε κλινικό διαβήτη, ενώ σε άλλους η εξέλιξη να είναι περισσότερο βραδεία. Οι κλινικές εκδηλώσεις εμφανίζονται μόνο αφού καταστραφεί η πλειονότητα των β κυττάρων (~ 80 %). Όταν συμβεί αυτό, υπάρχουν ακόμα κάποια υπολειπόμενα λειτουργικά β κύτταρα, αλλά ο αριθμός τους δεν επαρκεί για να διατηρηθεί η ανοχή στη γλυκόζη. Τα γεγονότα που πυροδοτούν τη μετάβαση από τη μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη στον αληθή διαβήτη

συνδέονται συχνά με αυξημένες απαιτήσεις σε ινσουλίνη, όπως μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια λοιμώξεων ή στην εφηβεία. Μετά την αρχική κλινική εκδήλωση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 μπορεί να ακολουθήσει μία φάση «περιόδου μέλιτος», κατά την οποία ο γλυκαιμικός έλεγχος επιτυγχάνεται με μέτριες δόσεις ινσουλίνης, ή σπάνια, χωρίς ινσουλίνη. Όμως, αυτή η πρόσκαιρη φάση ενδογενούς παραγωγής ινσουλίνης από τα υπολειπόμενα β κύτταρα παρέρχεται καθώς η αυτοάνοση διαδικασία καταστρέφει τα εναπομείναντα β κύτταρα και επέρχεται έτσι πλήρης ανεπάρκεια ινσουλίνης (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

1.5 Γενετικοί Παράγοντες

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 εκδηλώνεται συνήθως σε άτομα χωρίς σχετικό κληρονομικό ιστορικό. Μόνο 10-15 % των ασθενών έχουν πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενείς που εμφανίζουν επίσης τη νόσο. Ακόμα, η εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 σε μονοωγενή δίδυμα κυμαίνεται μεταξύ 30 και 70 %. Ωστόσο, ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου δεκαπλασιάζεται σε συγγενείς ατόμων με τη νόσο. Μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (genome-wide screening) και αναλύσεις συσχέτισης (linkage analyses) έχουν καταδείξει ότι στη γενετική ευπάθεια στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 εμπλέκονται πολλά γονίδια, που σχετίζονται κυρίως με το ανοσοποιητικό. Τα κύρια γονίδια που καθορίζουν την προδιάθεση εντοπίζονται στην περιοχή του HLA στο χρωμόσωμα 6 (IDDM 1). Πολυμορφικά αλληλόμορφα του συμπλέγματος HLA ευθύνονται για το 40 ως 50 % του γενετικού κινδύνου ανάπτυξης Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Ακολουθούν οι πολυμορφισμοί στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου της ινσουλίνης (*Ins-VNTR*, IDDM 2) στο χρωμόσωμα 11 και στο γονίδιο για το *CTLA-4* (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4) στο χρωμόσωμα 2 (IDDM 12) που ευθύνονται μαζί για το 15 % της προδιάθεσης. Τουλάχιστον άλλες 12 διαφορετικές γενετικές θέσεις έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν λιγότερο στην γενετική ευπάθεια για Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

1.5.1 Το σύμπλεγμα HLA

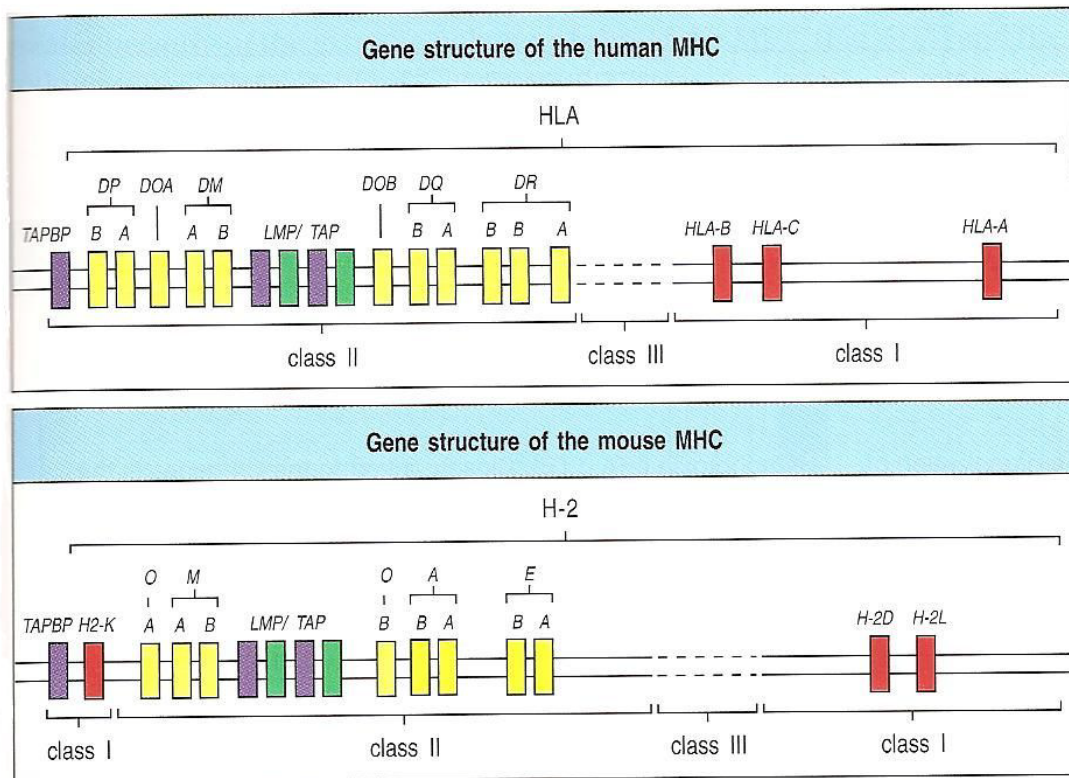
Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex-MHC), συχνά αποκαλούμενο HLA (Human Leucocyte Antigen), ανακαλύφθηκε μέσα από τα πεδία της Ανοσολογίας των μεταμοσχεύσεων και της Ανοσολογίας των

όγκων, όπου φάνηκε ότι υπάρχει ένας αριθμός γενετικών συστημάτων που οδηγούν στην απόρριψη «ξένων» ιστών. Μεταξύ των συστημάτων αυτών αναγνωρίστηκε το MHC να έχει εξαιρετικά μεγάλη σημασία (μείζον) και να αποτελεί το μεγαλύτερο φραγμό στην επιτυχία των μεταμοσχεύσεων. Αρκετά μετά την ανακάλυψή του, έγινε κατανοητό ότι η σημασία του ξεπερνά τα στενά όρια της απόρριψης μοσχευμάτων. Ο σημαντικός βιολογικός ρόλος των μορίων MHC είναι η διάκριση του «ιδίου» από το «ξένο» και η ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης που επιτελείται από τα T λεμφοκύτταρα, δεδομένου ότι τα τελευταία αναγνωρίζουν το ξένο αντιγόνο στην επιφάνεια ενός κυττάρου μόνο εάν τους παρουσιασθεί συνδεδεμένο σε ένα «ίδιο» MHC μόριο (περιορισμός MHC).

1.5.1.1 Ορισμός Το MHC ορίζεται ως μια ομάδα στενά συνδεδεμένων γενετικών τόπων, οι οποίοι κωδικοποιούν μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και περιορίζουν την ειδικότητα των T λεμφοκυττάρων να αναγνωρίζουν αντιγόνα (Klein και συν. 1982). Με βάση τη λειτουργική εξειδίκευση των προϊόντων τους, οι HLA γενετικοί τόποι διακρίνονται σε α) Τάξης I, που ασκούν τον περιορισμό αναγνώρισης αντιγόνων κυρίως από τα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα και β) Τάξης II, που περιορίζουν την αναγνώριση κυρίως από T βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Επιπλέον της λειτουργικής αυτής διαφοράς, τα μόρια των δύο τάξεων διαφέρουν στις ορολογικές τους ιδιότητες, την ιστική τους κατανομή και τη δομή τους (Klein και συν. 1982, Lehner και συν. 1996, Janeway και συν. 2005).

1.5.1.2 Πολυμορφισμός-Κληρονομικότητα Στον άνθρωπο τα MHC γονίδια καταλαμβάνουν 4 περίπου centimorgans πάνω στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (6 p21.3). Είναι περισσότερα από 100 και οργανωμένα σε τρεις τύπους ή περιοχές: τάξεις I, II και III (Εικ. 1.4). Στις περιοχές I και II κωδικοποιούνται τα HLA αντιγόνα που εκφράζονται πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων καθώς και άλλα μόρια (LMP, TAP) που συμμετέχουν σε διάφορες ανοσολογικές λειτουργίες όπως η ενδοκυττάρια επεξεργασία και μεταφορά αντιγονικών πεπτιδίων. Τα γονίδια τάξης III βρίσκονται μεταξύ εκείνων των τάξεων I και II και δεν κωδικοποιούν για αντιγόνα HLA, αλλά για παράγοντες συμπληρώματος (C2, C4, Bf), ένζυμα (21-υδροξυλάση – CYP), κυτταροκίνες (TNF), και άλλες πρωτεΐνες (πρωτεΐνες θερμικού shock-Hsp). Κάθε μια από τις περιοχές HLA τάξης I και II περιλαμβάνει έναν αριθμό γενετικών τόπων (γονιδιακές θέσεις). Με τα σημερινά δεδομένα οι λειτουργικοί γενετικοί τόποι, οι οποίοι κωδικοποιούν αντιγόνα εκφραζόμενα πάνω στα κύτταρα είναι 6: οι A, B, C, της τάξης I και οι DR, DQ, DP της τάξης II. Πέραν των λειτουργικών αυτών

γενετικών τύπων στις περιοχές I και II έχουν προσδιορισθεί και άλλοι τύποι των οποίων οι αλληλουχίες DNA χαρακτηρίζονται ως ψευδογονίδια, γιατί δεν έχουν ανιχνευθεί αντίστοιχα προϊόντα τους. Ορισμένοι τύποι τάξης I (HLA-E, -F, -G, -H, -J) χαρακτηρίζονται ως «μη κλασικοί» και για μερικούς από αυτούς έχει δειχθεί περιορισμένη έκφραση προϊόντων (π.χ. HLA-G αντιγόνα στην τροφοβλάστη) (Janeway και συν. 2005).



Εικ. 1.4 Η γονιδιακή οργάνωση του MHC (Πηγή: Janeway 2005)

Στο γενικό πληθυσμό τα γονίδια κάθε γενετικού τύπου HLA έχουν υποστεί εκτεταμένες μεταλλάξεις, μετασχηματισμούς και άλλους τύπους μεταβολών, με αποτέλεσμα την ύπαρξη μιας μεγάλης σειράς εναλλακτικών γονιδιακών μορφών (αλληλομόρφων), τα οποία μπορεί να εκφραστούν στο χρωμόσωμα (γονιδιακός πολυμορφισμός). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί >80 αλληλόμορφα για τον HLA-A γενετικό τόπο, >180 για τον -B, >40 για τον -C, >400 για τον -DR, >50 για τον -DQA και τον -DQB και >80 για τον -DP. Από τα εναλλακτικά αυτά αλληλόμορφα, σε κάθε χρωμόσωμα 6 εκφράζεται ένα για καθέναν από τους τύπους A, B, C, τρία για τον DR και ανά δύο για τους DQ και DP, τα οποία θα κωδικοποιήσουν για ένα συγκεκριμένο HLA-A, -B, -C, -DQ, -DP και δύο -DR

αντιγόνα που ο συνδυασμός τους εκφράζεται πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων. Εάν ληφθεί υπόψη ότι κάθε άνθρωπος έχει δύο χρωμοσώματα 6 (πατρικής και μητρικής προέλευσης), ο τελικά εκφραζόμενος αριθμός αντιγόνων πάνω στα κύτταρα είναι ο διπλάσιος. Προφανές δε είναι ότι οι δυνατοί αντιγονικοί συνδυασμοί στα διάφορα άτομα ανέρχονται σε τεράστιο αριθμό (φαινοτυπικός πολυμορφισμός) και η πιθανότητα της ομοιότητας μεταξύ τυχαίων ατόμων ως προς τα αντιγόνα HLA είναι εξαιρετικά μικρή (Klein και συν. 1982, Lehner και συν. 1996, Janeway και συν. 2005, Bondinas και Papadopoulos 2007).

Η κληρονομική μεταβίβαση των γονιδίων HLA ακολουθεί τους νόμους του Mendel. Ο συνδυασμός των γονιδίων που συνδέονται στενά πάνω στο χρωμόσωμα και κληρονομούνται από έναν γονέα ονομάζεται απλότυπος. Από τους δύο απλότυπους του καθενός από τους γονείς ο ένας μεταβιβάζεται στο παιδί. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο διαχωρισμός και η μεταβίβαση γίνεται χωρίς διάσπαση και χιασματυπία γενετικών τόπων μεταξύ των απλοτύπων. Σε σπάνιες όμως περιπτώσεις μπορεί να συμβεί μια τέτοια χιασματυπία κατά τη μείωση, με επακόλουθο τη δημιουργία ενός νέου απλοτύπου, που φέρει μερικούς γενετικούς τόπους από τον ένα απλότυπο του γονέα και μερικούς από τον άλλον του απλότυπο. Οι κληρονομηθέντες από τους γονείς δύο απλότυποι αποτελούν τον γονότυπο του ατόμου και η απλή αναγραφή των αντιγόνων που εκφράζει αναφέρεται ως φαινότυπος. Ένα χαρακτηριστικό του συστήματος HLA είναι η εμφάνιση προτίμησης σε γενετικούς συνδυασμούς μεταξύ μερικών αλληλομόρφων των διάφορων γενετικών τόπων (συμπεριλαμβανομένων και εκείνων της τάξης III). Το φαινόμενο αυτό, που αναφέρεται ως ανισορροπία σύνδεσης των γονιδίων (linkage disequilibrium-LD), φαίνεται πρακτικά από την εμφάνιση ορισμένων αντιγόνων στους απλότυπους ορισμένων ατόμων. Π.χ., τα αντιγόνα A1, B8, DR3 εμφανίζονται ως απλότυπος συχνότερα από το ανεμενόμενο με βάση τη συχνότητα του καθενός από αυτά στον πληθυσμό και τα γονιδιά τους χαρακτηρίζονται ως έχοντα θετική ανισορροπία σύνδεσης.

1.5.1.3 Ονοματολογία Στην ονοματολογία τους τα αντιγόνα HLA χαρακτηρίζονται από ένα γράμμα του αλφαβήτου που αντιπροσωπεύει τη γονιδιακή θέση στην οποία κωδικοποιούνται (A, B, C κτλ) και έναν αριθμό που τους έχει δοθεί με τη σειρά της ανακάλυψής τους (κοινή σειρά για τα -A και -B π.χ. HLA-A1, -A2, -A3, -B5, -B7, -B8, -A9 και ξεχωριστή για τα αντιγόνα των άλλων τόπων). Μερικά αντιγόνα φέρουν το γράμμα w (από workshop), το οποίο δηλώνει ότι η ονομασία τους δεν είναι ακόμη

οριστική (HLA-Cw1, HLA-Cw2 κτλ). Τα αλληλόμορφα χαρακτηρίζονται από την αναγραφή ενός αστερίσκου μετά τα γράμματα της γονιδιακής τους θέσης και τετραψήφιους ή πενταψήφιους αριθμούς, οι οποίοι αρχίζουν με πρώτο το ψηφίο 0 όταν το αλληλόμορφο αντιστοιχεί σε μονοψήφιο ορολογικά καθοριζόμενο αντιγόνο και με τον αριθμό του αντιγόνου όταν αυτό είναι διψήφιο (π.χ. τα αλληλόμορφα του HLA-A1 αναγράφονται ως A*0101 κτλ, ενώ του HLA-B44 ως B*4401 κτλ). Σε μία ορολογικά καθοριζόμενη ειδικότητα μπορεί να αντιστοιχούν περισσότερα του ενός (συνήθως πολλά) αλληλόμορφα (π.χ. τα αλληλόμορφα A*0101 και A*0102 αντιστοιχούν στο HLA-A1, ενώ για το HLA-A2 έχουν ανιχνευθεί 22 αλληλόμορφα (A*0201 έως A*0222) (Janeway και συν. 2005), ενώ στην περίπτωση ταυτοποίησης με μέθοδο ανασυνδυασμένου DNA ελάχιστες αμφιβολίες μπορεί να υπάρχουν.

1.5.1.4 Δομή και βιοσύνθεση

Μόρια Τάξης I Τα τάξης I HLA-μόρια είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο αλυσίδες, μία βαριά ή αλυσίδα α (MB 44 kD) και μία ελαφριά ή αλυσίδα β (MB 12 kD) (Abbas και συν 1994). Εμφανίζονται κατά την 6^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής και εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού. Η έκφρασή τους ποικίλλει στους διάφορους ιστούς: χαμηλή έκφραση ή απουσία παρατηρείται στα ηπατοκύτταρα, στους νευρώνες του ΚΝΣ, στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς, στην εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος και την τροφοβλάστη (Janeway και συν. 2005). Η βαριά αλυσίδα κωδικεύεται από γονίδια στις αντίστοιχες κλασικές θέσεις του χρωμοσώματος 6, οι οποίες παρουσιάζουν έντονο πολυμορφισμό και γι' αυτό είναι διαφορετική στα διάφορα HLA-μόρια. Αντίθετα, η ελαφριά αλυσίδα είναι η β_2 -μικροσφαιρίνη που κωδικεύεται από γονίδιο στο χρωμόσωμα 15 και είναι ίδια σε όλα τα μόρια. Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα που περιλαμβάνει τρεις δομικές περιοχές (domains), τις $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ με 90 αμινοξέα περίπου η καθεμία, ένα διαμεμβρανικό τμήμα (~25 αμινοξέα) και ένα ενδοκυττάριο (~30 αμινοξέα). Οι $\alpha 1$ και $\alpha 2$ δομικές περιοχές σχηματίζουν μια σχημοειδή αύλακα, στην οποία συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο για παρουσίαση στα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (Abbas και συν 1994, Janeway και συν. 2005). Η αύλακα αυτή (antigen-binding cleft ή groove) έχει τοιχώματα από 2 αλυσίδες με δομή α έλικας και δάπεδο που σχηματίζεται από οκτώ αντιπαράλληλες πεπτιδικές αλυσίδες σε μορφή πτυχωτής επιφάνειας (β plated sheets). Το δάπεδο εμφανίζει μία ή περισσότερες θήκες (pockets) για την υποδοχή του αντιγονικού πεπτιδίου, οι οποίες

αποτελούν θέσεις αγκυροβόλησης με τις κατάλληλες πλευρικές αλύσεις στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης του πεπτιδίου (pocket-binding residues ή anchor residues). Το κάθε τάξης I HLA-μόριο έχει χαρακτηριστικές θέσεις αγκυροβόλησης, οι οποίες του προσδίδουν την ειδικότητα για να μπορεί να συνδέεται σταθερά με ένα φάσμα πεπτιδίων που φέρουν τα ίδια κατάλοιπα στις κύριες θέσεις πρόσδεσης. Η ιδιότητα αυτή των μορίων HLA εξασφαλίζει την ανοσιακή απάντηση σε μεγάλο αριθμό αντιγόνων, παρ' όλο που ο αριθμός των HLA κάθε ατόμου είναι περιορισμένος. Η διαμόρφωση της σχισμοειδούς αύλακας επιτρέπει τη σύνδεση μικρών πεπτιδίων (8-11 αμινοξέων). Η σύνδεση γίνεται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς και τα άκρα των πεπτιδίων σταθεροποιούνται μέσα στις σταθερές θήκες (pockets) των άκρων της αύλακας, οι οποίες είναι ίδιες σε όλα τα HLA τάξης I (Bjorkman και συν. 1987, Abbas και συν 1994, Janeway και συν. 2005).

Στην αύλακα των MHC τάξης I συνδέονται ενδογενή αντιγόνα (π.χ. ιικά ενδοκυττάρια παθογόνα ή νεοπλασματικά αντιγόνα) και παρουσιάζονται στα T-κυτταροτοξικά (CD8+) λεμφοκύτταρα. Η σύνδεση γίνεται μέσα στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων, όπου σχηματίζονται και τα πλήρη μόρια τάξης I, των οποίων η νεοσχηματισμένη βαριά αλυσίδα είναι συνδεδεμένη αρχικά με μία προστατευτική διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την καλνεξίνη, η οποία αποσπάται όταν η αλυσίδα συνδεθεί με τη β2 μικροσφαιρίνη. Της σύνδεσης των αντιγονικών πεπτιδίων στο πλήρες HLA-μόριο προηγείται πρωτεολυτική τους διάσπαση στο κυτταρόπλασμα από ένα κυλινδρικό σύμπλεγμα, το πρωτεόσωμα, στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες LMP2 και LMP7, των οποίων η σύνθεση κωδικεύεται από γονίδια MHC τάξης II. Στη συνέχεια, η μεταφορά τους στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου γίνεται μέσω ενός ετεροδιμερούς συμπλέγματος της μεμβράνης του δικτύου, το οποίο αποτελούν οι πρωτεΐνες «μεταφορείς» TAP. Τα συμπλέγματα TAP κατευθύνουν κυριολεκτικά τα αντιγονικά πεπτιδία (μήκους 8-11 αμινοξέων) στον αυλό όπου θα συνδεθούν στη θήκη των HLA και θα μεταφερθούν στην επιφάνεια του κυττάρου για παρουσίαση (Rammensee και συν. 1993).

Μόρια Τάξης II Τα τάξης II HLA-μόρια είναι επίσης γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την α (MB 32-34 kD) και τη β (MB 29-32 kD), οι οποίες κωδικεύονται από διαφορετικά γονίδια (Abbas και συν 1994). Κάθε μία από τις υποπεριοχές DR, DQ, DP περιέχει περισσότερες από μία γονιδιακές θέσεις (τουλάχιστον από ένα A και ένα B αλληλόμορφο γονίδιο), που θα κωδικοποιήσουν για τις αλυσίδες α και β των

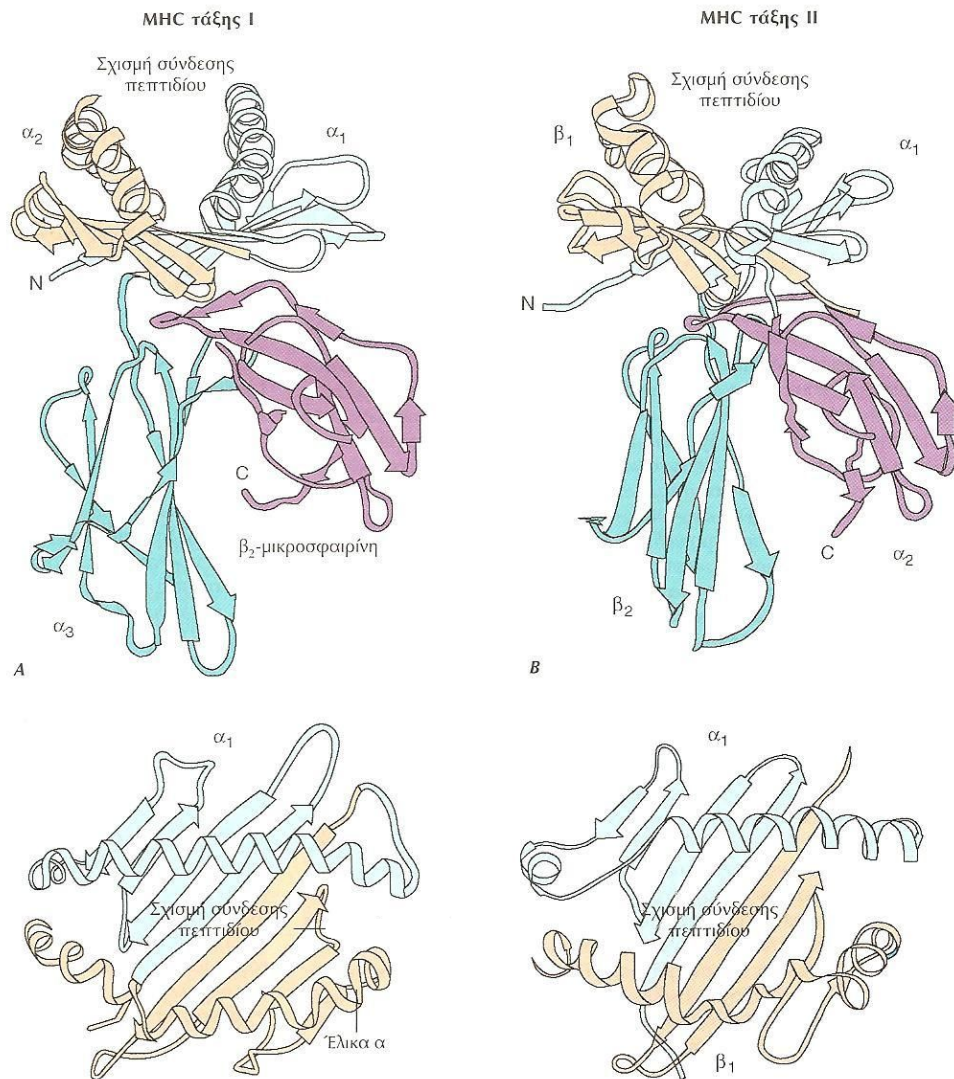
αντίστοιχων HLA-μορίων (Cambell και συν. 1993, Bodmer και συν. 1996). Συγκεκριμένα: α) Η υποπεριοχή DR περιέχει μια γονιδιακή θέση DRA, η οποία είναι μη πολυμορφική και υπεύθυνη για τη σύνθεση της αλυσίδας α και 4 λειτουργικές DRB γονιδιακές θέσεις DRB. Από αυτές τα γονίδια της θέσης DRB1, που εμφανίζουν το μεγαλύτερο πολυμορφισμό της τάξης II γονιδίων, κωδικοποιούν τη σύνθεση των αλυσίδων DR β 1 που θα συνδεθούν με τις αλυσίδες DR α για το σχηματισμό των κυρίων μορίων DR $\alpha\beta$, ενώ τα γονίδια των θέσεων DR3, DR4 και DR5 εμφανίζουν μικρό πολυμορφισμό και κωδικοποιούν τη σύνθεση των αλυσίδων DR β 3, DR β 4 και DR β 5, οι οποίες συνδέονται με αλυσίδα α για σχηματισμό των υπερτυπικών ορολογικών ειδικοτήτων DRw52, DRw53 και DRw51. β) Οι υποπεριοχές DQ και DP έχουν η καθεμιά μία A και μία B λειτουργική θέση (DQA1/DQB1 και DPA1/DPB1), τα γονίδια των οποίων κωδικεύουν για τις αλυσίδες α και β των μορίων DQ και DP (Cambell και συν. 1993, Bodmer και συν. 1996, Janeway και συν. 2005).

Οι δύο αλυσίδες των τάξης II μορίων αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο (μήκους περίπου 180 αμινοξέων), ένα διαμεμβρανικό (μήκους περίπου 25 αμινοξέων) καθώς και ένα ενδοκυττάριο με μη σταθερό μήκος. Το εξωκυττάριο αμινοτελικό τμήμα τόσο της αλυσίδας α όσο και της β διακρίνεται σε δύο επιμέρους δομικές περιοχές, τις α 1, α 2 και β 1, β 2 αντίστοιχα, από τις οποίες οι α 1 και β 1 είναι εξαιρετικά πολυμορφικές και σχηματίζουν τη σχισμοειδή αύλακα της δέσμευσης του αντιγονικού πεπτιδίου. Η αύλακα αυτή έχει μεγάλη ομοιότητα με εκείνη των τάξης I HLA-μορίων. Η διαφορά της με αυτήν είναι ότι, ενώ στα τάξης I μόρια HLA σχηματίζεται από αλληλεπιδράσεις των τμημάτων της βαριάς αλυσίδας μόνο, στα τάξης II μόρια HLA συμμετέχουν στο σχηματισμό της και οι δύο αλυσίδες με τις α 1 και β 1 δομικές περιοχές τους. Επιπλέον, στα τάξης II μόρια HLA τα άκρα της σχισμοειδούς αύλακας είναι ανοικτά και επιτρέπουν τη δέσμευση μεγαλύτερων πεπτιδίων (10-30 αμινοξέα, με διάμεσο μέγεθος 14 αμινοξέα), τα άκρα των οποίων προεξέχουν από την αύλακα. Οι πολυμορφικές αλληλουχίες που καθορίζουν την HLA ειδικότητα του μορίου και επομένως και το αντιγονικό πεπτίδιο που θα δεσμευθεί από ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο, εντοπίζονται τόσο στα τοιχώματα όσο και στο δάπεδο της θήκης (Janeway και συν. 2005).

Στη σχισμοειδή αύλακα των τάξης II HLA-μορίων συνδέονται κυρίως εξωγενή αντιγονικά πεπτίδια (π.χ. βακτηριακά αντιγόνα ή αλλοαντιγόνα) και παρουσιάζονται στα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Τα εξωγενή αυτά αντιγόνα, αφού εισέλθουν στον

οργανισμό, παραλαμβάνονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και ενδοκυτταρώνονται. Τα ενδοκυτταρωμένα αντιγόνα υφίστανται στο διαμέρισμα των ενδοσωμάτων-λυσοσωμάτων πρωτεολυτική διάσπαση σε μικρότερα πεπτίδια. Παράλληλα, μετά τη βιοσύνθεσή τους στα ριβοσώματα, οι αλυσίδες α και β των MHC συναθροίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σχηματίζονται τα $\alpha\beta$ ετεροδιμερή μόρια στα οποία συνδέεται παροδικά μία επιπρόσθετη σταθερή μη πολύμορφη αλυσίδα, η Ii (Invariant chain). Η Ii (CD74) χρησιμεύει για τον προσανατολισμό και την ενδοκυττάρια διαδρομή των MHC-μορίων και παράλληλα, με τη σύνδεση της CLIP περιοχής της μέσα στη σχισμοειδή αύλακα, τα προστατεύει από αλληλεπιδράσεις άλλων ενδογενών πεπτιδίων (Charman και συν. 1998). Το όλο σύμπλεγμα μεταφέρεται μέσα σε ενδοκυττάρια κυστίδια στο διαμέρισμα των ενδοσωμάτων-λυσοσωμάτων, όπου γίνεται σύντηξη των κυστιδίων με εκείνα που φέρουν τα διασπασθέντα αντιγονικά πεπτιδία. Η αλυσίδα Ii αποδομείται από ενδοσωματικές πρωτεάσες και κυρίως τις καθεψίνες S και L και η CLIP περιοχή της απομακρύνεται με τη βοήθεια του ετεροδιμερούς HLADM (μόριο που κωδικοποιείται από τα DMA και DMB γονίδια της MHC τάξης II περιοχής). Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα MHC-II/αντιγονικό πεπτίδιο μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου για να αναγνωρισθεί από τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα ($CD4^+$) (Charman και συν. 1998).

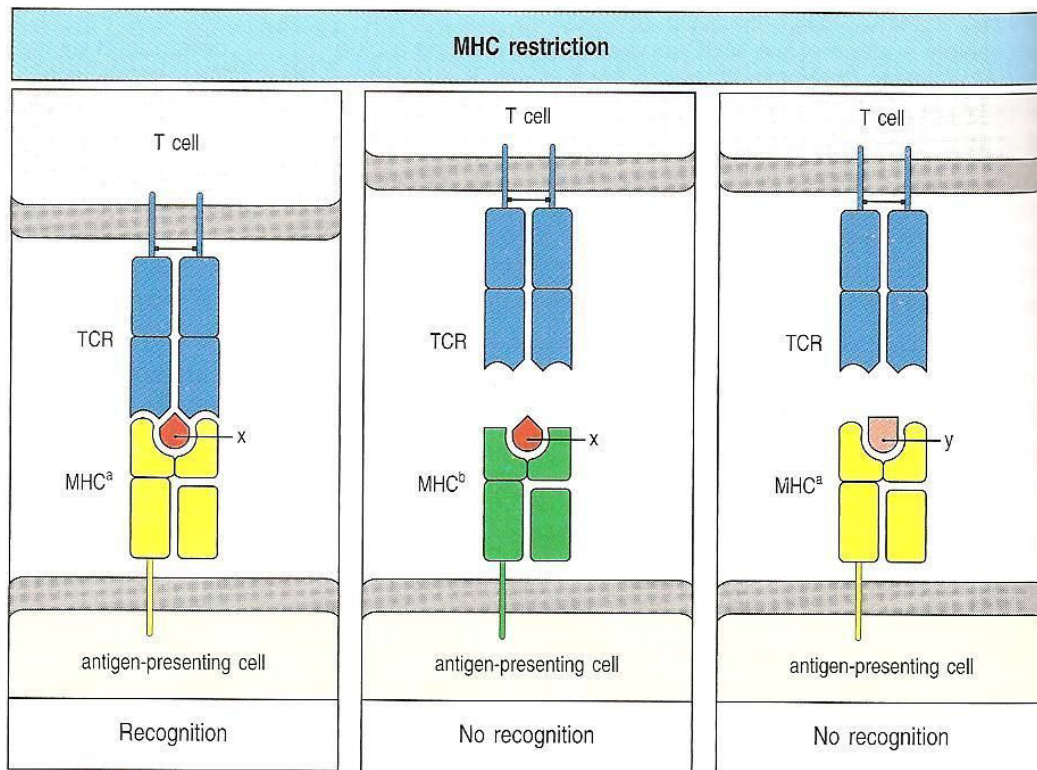
Τα τάξης II HLA-μόρια εμφανίζονται μεταξύ 20^{ης} και 32^{ης} εβδομάδας της εμβρυϊκής ζωής και έχουν περιορισμένη έκφραση σε ορισμένες κατηγορίες κυττάρων: B λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα (όλα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα), τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου και τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα. Έκτοπη έκφραση μπορεί να προκληθεί σε ιστούς που φυσιολογικά δεν τα εκφράζουν μετά την επίδραση κυτταροκινών (κυρίως IFN- γ), διαδικασία που κατά το παρελθόν έχει ενοχοποιηθεί ως ένας από τους μηχανισμούς πρόκλησης αυτοάνοσων νοσημάτων (Janeway και συν. 2005).



Εικ. 1.5 Απεικόνιση των μορίων MHC τάξης I και τάξης II από πλάγια (A,B) και από πάνω (Γ,Δ) (Πηγή: Harrison 2005)

1.5.1.5 Βιολογικός ρόλος του MHC Ο κύριος βιολογικός ρόλος των MHC-μορίων είναι η ρύθμιση την οποία ασκούν στην ανοσιακή απάντηση όπου λειτουργούν ως δείκτες του «ιδίου» για περιορισμό της αναγνώρισης του «ξένου» από τα T-λεμφοκύτταρα. Τα τάξης I HLA συνδυάζονται με το ξένο αντιγόνο για να συναναγνωρισθούν από των υποδοχέα των κυτταροτοξικών (CD8⁺) λεμφοκυττάρων, τα οποία τελικά και θα καταστρέψουν τον αντιγονικό στόχο. Τα τάξης II HLA, εκφραζόμενα στα αντιγοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), είναι απαραίτητα για την αναγνώριση του αντιγόνου από τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺), τα οποία θα

ξεκινήσουν την ανοσιακή απάντηση και θα ευοδώσουν την κυτταρική συνεργασία (Dausset και συν. 1977, Abbas και συν 1994, Janeway και συν. 2005) (Εικ. 1.6).



Εικ. 1.6 Τα μόρια του MHC περιορίζουν την αναγνώριση αντιγόνων από τα T λεμφοκύτταρα (MHC restriction) (Πηγή: Janeway 2005)

Οι συσχετίσεις HLA με νοσήματα είναι συνήθως αποτέλεσμα της συμμετοχής των μορίων του συστήματος σε ανοσολογικούς μηχανισμούς σε φλεγμονές, κακοήθειες ή αλλεργικές αντιδράσεις. Έτσι αναφέρονται συσχετίσεις αντιγόνων HLA με νοσήματα στα οποία υπεισέρχονται ανοσολογικοί μηχανισμοί (αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, νόσος του Reiter, βαρεία μυασθένεια, ερπητική δερματίτιδα, Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 κτλ). Εντούτοις, συσχετίσεις έχουν αναφερθεί και για νοσήματα χωρίς ανοσοπαθογενετική βάση ή άγνωστης αιτιολογίας (π.χ. ιδιοπαθής αιμοχρωμάτωση), τα οποία συνδέονται κυρίως με αντιγόνα τάξης I. Όσον αφορά τα αλλεργικά νοσήματα, μολονότι αναφέρθηκαν θετικές συσχετίσεις με HLA (άσθμα, πυρετός εκ χόρτου, ουρτικάρια, έκζεμα), καμία από αυτές δεν ήταν επαναλήψιμη και κλινικά χρήσιμη. Αντίθετα, στα πλαίσια των μελετών διερεύνησης της σχέσης του συστήματος HLA με ανοσιακές απαντήσεις σε ειδικά αντιγόνα, έχουν δειχθεί

συσχετίσεις HLA με απάντηση σε συγκεκριμένα αλλεργιογόνα (Dausset και συν. 1977, Janeway και συν. 2005).

1.5.1.6 Συσχετισμοί HLA με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 οι συσχετισμοί με συγκεκριμένα αλληλόμορφα ή απλότυπους HLA αφορούν την περιοχή της τάξης II, όπως συμβαίνει με τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 σχετίζεται με αμφοτέρους τους ορότυπους DR3 και DR4 και τα αντίστοιχα γονίδια (Cudworth και συν. 1975, Davies και συν. 1994, Mein και συν. 1998, De Oliveira και συν. 2000, Cucca και συν. 2001, Pani και συν. 2002). Η παρουσία αμφοτέρων των απλότυπων DR3 και DR4 στο ίδιο άτομο δημιουργεί τον υψηλότερο γνωστό γενετικό κίνδυνο για τη νόσο, αλλά και η παρουσία του ενός μόνο απλότυπου αποτελεί παράγοντα κινδύνου. Με αναλυτικότερο καθορισμό του γονοτύπου των θέσεων HLADQ προσδιορίστηκε ότι οι απλότυποι DQA1*0301, DQB1*0302 και DQA1*0501, DQB1*0201 συσχετίζονται ισχυρότερα με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Αυτοί οι απλότυποι παρουσιάζονται στο >90 % των παιδιών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (Ευρώπη, Βόρεια Αμερική), ενώ η συχνότητα εμφάνισής τους στο φυσιολογικό πληθυσμό των Η.Π.Α. είναι ~2 %. Ορισμένα ειδικά γονίδια της τάξης II έχουν μελετηθεί εκτενώς σε κάθε απλότυπο και ο ισχυρότερος συσχετισμός βρέθηκε με το DQB1*0302, ένα ειδικό γονίδιο στον απλότυπο DR4. Έτσι, όλοι οι απλότυποι DR4 που φέρουν το γονίδιο DQB1*0302 σχετίζονται με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, ενώ οι συναφείς απλότυποι DR4 με διαφορετικό γονίδιο DQB1 δεν έχουν σχέση. Κατά συνέπεια, πρωταρχικός καθοριστής της προδιάθεσης στην τάξη II είναι τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα HLA-DQB1*0302 (Karayanni και συν. 1993, Davies και συν. 1994, Mein και συν. 1998, Hermann και συν. 2004).

Πάντως, ο σχετικός κίνδυνος εκείνων που κληρονόμησαν αυτό το γονίδιο μπορεί να τροποποιηθεί, ανάλογα με τη συνύπαρξη άλλων γονιδίων HLA στον ίδιο ή σε άλλον απλότυπο. Για παράδειγμα, όπως η παρουσία ενός δεύτερου απλότυπου που περιέχει το DR3 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, η παρουσία ενός απλότυπου DR2 με το γονίδιο DQB1*0602 έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο. Το εν λόγω γονίδιο, DQB1*0602, θεωρείται «προστατευτικό» για τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Ο απλότυπος αυτός συναντάται στο 20 % του πληθυσμού των Η.Π.Α., αλλά είναι εξαιρετικά σπάνιος σε άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Ακόμα και μερικά αλληλόμορφα DRB1 που μπορεί να βρεθούν

στον ίδιο απλότυπο με το DQB1*0302 είναι πιθανό να τροποποιούν τον κίνδυνο, έτσι ώστε τα άτομα με απλότυπο DR4 που περιέχει DRB1*0403 είναι λιγότερο επιρρεπή στο ν Τύπο 1 Σακχαρώδη Διαβήτη από τα άτομα με άλλο απλότυπο DR4-DQB1*0302 (Davies και συν. 1994, Mein και συν. 1998, De Oliveira και συν. 2000, Cucca και συν. 2001, Pani και συν. 2002).

1.5.2 Insulin-VNTR (IDDM 2)

Πολυμορφισμοί στην περιοχή του προγωγέα του γονιδίου της ινσουλίνης θεωρείται ότι ευθύνονται για το ~10 % της γενετικής προδιάθεσης για Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Η περιοχή αυτή εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 περίπου 600 bp από το γονίδιο που κωδικεύει την προΐνσουλίνη. Ο πολυμορφικός αυτός τύπος αποτελείται από μια ποικιλία αλληλόμορφων επαναλήψεων (Variable Numbers of Tandem Repeats-VNTRs) (Mein και συν. 1998). Εμφανίζεται σε δύο συνηθισμένες τάξεις μεγέθους στον Καυκάσιο πληθυσμό: τη μικρή τάξη (26-63 επαναλήψεις, τύπος I) ή τη μεγάλη τάξη (140-243 επαναλήψεις, τύπος III). Ο γενετικός αυτός τύπος δεν κωδικεύει για κάποια πρωτεΐνη, αλλά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μεταγραφής για την ινσουλίνη. Ο τύπος III είναι παρών στο 30 % περίπου του πληθυσμού και παρέχει προστασία ανεξάρτητα από τους απλότυπους HLA του ατόμου. Θεωρείται ότι η παρουσία του μεγάλου αλληλίου διευκολύνει τη μεταγραφή και την επιθηλιακή έκφραση, άρα την και παρουσίαση της ινσουλίνης στον εμβρυϊκό θύμο. Παρέχει έτσι έναν ισχυρό προστατευτικό παράγοντα προωθώντας την αρνητική επιλογή (απάλειψη-deletion) των αυτοαντιδραστικών για την ινσουλίνη T λεμφοκυττάρων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αυτοάνοση καταστροφή των β νησιδιοκυττάρων του ενδοκρινούς παγκρέατος στην περίπτωση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Η υπόθεση αυτή έχει ελεγχθεί πειραματικά στους NOD (Non-Obese Diabetic) ποντικούς, παρέχοντας ισχυρές αποδείξεις για την αξία της κεντρικής ανοσολογικής ανοχής στην πρόληψη της εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων (Hashimoto και συν. 1994, Pugliese και συν. 1997, Vafiadis και συν. 1997, Mein και συν. 1998, Durinovic-Bello και συν. 2002).

1.5.3 CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4, IDDM 12)

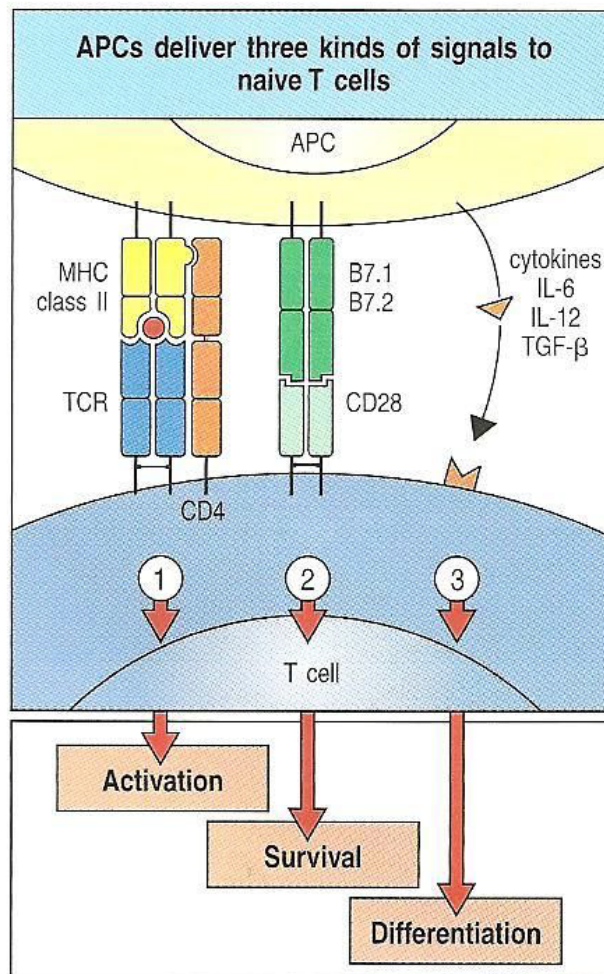
Το γονίδιο για το CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 2 (2q33) κι έχει συσχετισθεί επίσης με το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Έχει ρόλο κατασταλτικό, ρόλο μετάδοσης αρνητικού

σήματος και επαγωγής ανέργειας στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια κυρίως. Στη χρωμοσωμιακή περιοχή του γονιδίου για το CTLA-4 ανευρίσκονται γονιδιακοί τόποι και για άλλα, επίσης σημαντικά για την εξέλιξη της ανοσιακής απάντησης, μόρια (CD28, inducible costimulator-ICOS) (Salomon και συν. 2001, Donner και συν. 2002, Ueda και συν. 2003, Anjos και Polychronacos 2004).

Η αναγνώριση του αντιγόνου από το ανερέθιστο T λεμφοκύτταρο επιτυγχάνεται μέσω ενός τριμοριακού συμπλέγματος που αποτελείται από το αντιγόνο, το HLA του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου (τάξης I για το CD8⁺ T λεμφοκύτταρο και τάξης II για το CD4⁺ T λεμφοκύτταρο) και τον αντιγονικό υποδοχέα TCR του παρθένου T λεμφοκυττάρου (Ag + HLA + TCR). Εντούτοις, η αναγνώριση αυτή δεν είναι ικανή να διεγείρει το παρθένο T λεμφοκύτταρο σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση σε ενεργοποιημένο T λεμφοκύτταρο, αλλά είναι απαραίτητη η συμμετοχή συνδिएγερτικών μορίων. Τέτοια μόρια είναι αφενός μεν οι γλυκοπρωτεΐνες B7.1 (CD80) και B7.2 (CD86) επί των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και αφετέρου ο υποδοχέας CD28, μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, επί των παρθένων T λεμφοκυττάρων. Επί απουσίας συνδिएγερτικών μορίων το T λεμφοκύτταρο δεν διεγείρεται και μεταπίπτει στην κατάσταση ανέργειας (Εικ 1.7). Το ενεργοποιημένο T λεμφοκύτταρο εκφράζει επιπλέον τον υποδοχέα CTLA-4, ο οποίος ομοιάζει ως προς την αλληλουχία με τον CD28, αλλά έχει 20 φορές μεγαλύτερη συγγένεια με τις γλυκοπρωτεΐνες B7. Ο υποδοχέας CTLA-4 συνδεόμενος με ένα από τα B7 (CD80/CD86) μόρια του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου μεταβιβάζει στο T λεμφοκύτταρο αρνητικά μηνύματα, που περιορίζουν την παραγωγή της IL-2 και τον πολλαπλασιασμό των διεγερμένων κυττάρων. Έτσι, επέρχεται η ισορροπία και αποφεύγεται η καταστρεπτική δράση λόγω της υπέρμετρης διέγερσης και πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων (Janeway και συν. 2005).

Επίσης, δύο νέα ζεύγη υποδοχέων - προσδετών έχουν εμπλακεί στη μετάδοση του σήματος ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων. Η πρωτεΐνη B7RP-1 επί των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων προσδένεται στον υποδοχέα ICOS επί των T λεμφοκυττάρων και μεταδίδει διεγερτικό σήμα. Το γονίδιο για τον υποδοχέα ICOS ανευρίσκεται στην ίδια χρωμοσωμιακή περιοχή που ανευρίσκεται και το γονίδιο για το CTLA-4. Η πρόσδεση των B7-H1 (PD-L1) και B7DC (PD-L2) επί των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τον υποδοχέα PD1 επί των T λεμφοκυττάρων

μεταδίδει ανασταλτικό σήμα (Guo και συν. 2001, Coyle και συν. 2004, Roza και συν. 2005).



Εικ. 1.7 Η αναγνώριση του αντιγόνου από το ανερέθιστο T λεμφοκύτταρο απαιτεί την παρουσία συνδιεγερτικών μορίων (Πηγή: Janeway 2005)

Πολυμορφισμοί του γονιδίου για το CTLA-4 έχουν συσχετισθεί με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, αλλά και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως την αυτοάνοση θυρεοειδική νόσο, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη νόσο του Addison. Οι σχετικές μεταλλάξεις είναι στη σηματοδοτική αλληλουχία 5' ανοδικές και 3'καθοδικές περιοχές (ενδεχόμενα ρυθμιστικές) του γονιδίου. Έχει προταθεί ότι αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν σε μειωμένη ενδοκυττάρια έκφραση της πρωτεΐνης. Έτσι, δεν επιτυγχάνεται η αναστολή της υπέρμετρης διέγερσης και πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη εξέλιξη της ανοσιακής απάντησης

και τη διαταραχή της ανοσολογικής ισορροπίας. Το CTLA-4 απαντάται και σε διαλυτή μορφή (sCTLA-4), ο ρόλος της οποίας δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί ακριβώς. Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, πολυμορφισμοί του γονιδίου συνδέονται συνήθως με ελαττωμένα επίπεδα mRNA της διαλυτής μορφής. Σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (αυτοάνοση θυρεοειδική νόσο) μελέτες αναδεικνύουν είτε αυξημένα, είτε ελαττωμένα επίπεδα της διαλυτής μορφής του CTLA-4, με τις επιφυλάξεις για το ρόλο της να αυξάνονται στη βιβλιογραφία (Salomon και συν. 2001, Donner και συν. 2002, Ueda και συν. 2003, Anjos και συν. 2004, Tector και συν. 2009).

1.5.4 Άλλες γενετικές συσχετίσεις

Τουλάχιστον άλλες 12 διαφορετικές γενετικές θέσεις έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν λιγότερο στην γενετική προδιάθεση για Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Σημαντικά για την κατανόηση της παθογένεσης της νόσου θεωρούνται γονίδια που σχετίζονται και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (PTPN22) ή σπάνια σύνδρομα που εμπεριέχουν και την εκδήλωση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (AIRE, FoxP3).

1.5.4.1 PTPN22 Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού C1858T (Arg620Trp) του γονιδίου PTPN22 και του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, καθώς και άλλων αυτοάνοσων καταστάσεων. Το γονίδιο PTPN22 (Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 22) κωδικεύει για την ειδική λεμφοειδική τυροσιλο-φωσφατάση γνωστή ως LYP. Η φωσφατάση LYP αποτελεί ισχυρό αναστολέα της ενεργοποίησης των ανερέθιστων T λεμφοκυττάρων.

1.5.4.2 AIRE Η παρουσίαση των αυτοαντιγόνων στο θύμο, αλλά και στην περιφέρεια ώστε να επιλεγούν αρνητικά και να πεθάνουν μέσω απόπτωσης T λεμφοκύτταρα που είναι πολύ αντιδραστικά (κεντρική και περιφερική ανοσολογική ανοχή αντίστοιχα) αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό μηχανισμό της αυτοανοσίας. Η πρωτεΐνη AIRE (AutoImmune REgulator) εκφράζεται κυρίως σε επιθηλιακά καθώς και δενδριτικά κύτταρα του μυελού του θύμου. Αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα υπό τον έλεγχο του οποίου βρίσκεται η έκφραση πολλών ειδικών αυτοπεπτιδίων. Ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο AIRE, που εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 21 (21q22.3), εμφανίζουν Αυτοάνοσο Πολυαδενικό Σύνδρομο I (APS I) ή γνωστό επίσης ως σύνδρομο APECED που εκδηλώνεται με αυτοάνοση πολυενδοκρινοπάθεια (νόσος Addison, υποπαραθυρεοειδισμός, Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1) καντιντίαση και εξωδερμική δυστροφία (Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy-APECED) (Peterson και συν.

1998, Aschenbrenner και συν. 2007). Η παρουσία Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 στους ασθενείς με μετάλλαξη του AIRE (λιγότερο συχνή βέβαια απ' ό τι στο Αυτοάνοσο Πολυαδενικό Σύνδρομο II) αποδεικνύει πως η έκφραση και παρουσίαση στο θύμο σχετικών αυτοαντιγόνων (insulin, GAD, IA-2) υπόκειται στην επιτήρηση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα. Συνυπάρχουν δε στα άτομα αυτά βλάβες και στους περιφερικούς μηχανισμούς ανοσορρύθμισης και ανοχής. Μελέτες σε ποντικούς AIRE^{-/-} ανέδειξαν πλήρη ανικανότητα εξάλειψης ορισμένων οργανοειδικών αυτοαντιγόνων στο θύμο με ηπιότερο φαινότυπο όμως από το αντίστοιχο του ανθρώπινου Αυτοάνοσου Πολυαδενικού Συνδρόμου I (APS I) (Peterson και συν. 1998, Kekalainen και συν. 2007, Aschenbrenner και συν. 2007).

1.5.4.3 FoxP3 Το γονίδιο για το μεταγραφικό παράγοντα FoxP3 εδράζεται στο χρωμόσωμα X και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη γνωστή ως “scurfin”. Η εκ γενετής δυσλειτουργία του παράγοντα FoxP3 οδηγεί σε αυτοάνοσο φαινότυπο ο οποίος στα ποντίκια έχει χαρακτηριστεί ως «scurfy» με μαζικές εκδηλώσεις αυτοανοσίας και λεμφοκυτταρικού υπερπολλαπλασιασμού που οδηγεί συνήθως σύντομα στο θάνατο. Στον άνθρωπο εμφανίζεται ως σύνδρομο αυτοάνοσης πολυενδοκρिनοπάθειας που συνδέεται με το χρωμόσωμα X (σύνδρομο IPEX) και εκδηλώνεται με πιο ήπιο φαινότυπο από αυτό του «scurfy» ποντικού. Εμφανίζονται έτσι Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 (ακόμη και σε DQB1*0602 άτομα), αλλεργίες, εντεροπάθειες, έκζεμα (Bennett και συν. 2001, Hori και συν. 2003, Ziegler 2006, Kim και συν. 2007). Ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3 αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στον άνθρωπο και στα ποντίκια. Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν ότι ο παράγοντας FoxP3 μόνος ή σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ενεργοποιεί ή καταστέλλει γονίδια που είναι σημαντικά για τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων σε ρυθμιστικά κατά τη διαδικασία της επιλογής στο θύμο (Zheng και συν. 2007, Gavin και συν. 2007, Zheng & Rudnesky 2007). Το επίπεδο έκφρασης του Foxp3 στα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα είναι ανάλογο της έκφρασης της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-2 (CD25) και αντιστρόφως ανάλογο της έκφρασης της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-7 (CD127) (Liu και συν. 2006).

1.6 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Ισχυρή απόδειξη γι' αυτό αποτελούν μελέτες με ομοζυγωτικά δίδυμα που δείχνουν ότι η συνύπαρξη της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50 % και ποτέ δεν φτάνει το 100 %. Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί περιλαμβάνονται ιοί (ιός της ερυθράς, ιός Coxsackie), τοξίνες (νιτροζαμίνες), διατροφικά συστατικά (αγελαδινό γάλα, δημητριακά) (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 οι ιοί αποτελούν σημαντικούς υπόπτους, με σημαντικότερο τον ιό της ερυθράς. Ως και 20 % των παιδιών που στην εμβρυική ζωή εκτέθηκαν στον ιό της ερυθράς αναπτύσσουν τη νόσο. Παιδιά με συγγενή ερυθρά εμφανίζουν αυξημένη επίπτωση και για άλλες επίσης αυτοάνοσες διαταραχές, όπως θυρεοειδίτιδα, υπεργαμμασφαιριναιμία κτλ. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα παθογόνα αυτά επάγουν την αυτοάνοση απάντηση φαίνεται να είναι οι διαδικασίες του μοριακού μιμητισμού. Η υπόθεση του μοριακού μιμητισμού προτείνει ότι η ανοσιακή απάντηση που έχει ως στόχο τους παθογόνους παράγοντες μέσω διασταυρούμενης αναγνώρισης στρέφεται κατά αυτοαντιγόνων που προσομοιάζουν τα εξωτερικά αντιγόνα με αποτέλεσμα την κυτταρική καταστροφή. Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα μοριακού μιμητισμού αποτελεί η πρωτεΐνη P2-C του ιού Coxsackie B4. Υπάρχει σημαντική ομοιότητα στη μοριακή αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ της πρωτεΐνης P2-C του ιού Coxsackie B4 και του ενζύμου GAD65 (Glutamic Acid Decarboxylase) που ανευρίσκεται στα κύτταρα β του ενδοκρινούς παγκρέατος (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

Η σημασία της δίαιτας στην ανάπτυξη του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 παραμένει ακόμα αμφιλεγόμενη. Σε αρκετές μελέτες έχει παρατηρηθεί συσχέτιση της πρόωρης έκθεσης στο αγελαδινό γάλα με αύξηση του κινδύνου για Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Για παράδειγμα, κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι αφορμή για έναρξη της ανοσιακής απάντησης κατά της ινσουλίνης αποτελεί η έκθεση του βρέφους σε ινσουλίνη που βρίσκεται στο αγελαδινό γάλα. Από την άλλη, επιλεγμένα αντιγόνα (βόεια λευκωματίνη ορού ή ινσουλίνη χοίρου) εδόθησαν από το στόμα σε ποντικούς με μεγάλο φάσμα αυτοάνοσων διαταραχών περιλαμβανομένου και Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (NOD-Non Obese Diabetic) με σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα. Τα πορίσματα αυτά οδήγησαν σε δοκιμασίες ανοχής από το στόμα και

σε ανθρώπους. Τρεις μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες που σχεδιάστηκαν για να καθυστερήσουν ή να προλάβουν την εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 – οι δύο Diabetes Prevention Trials (DPT 1 & 2) και η European Diabetes Nicotinamide Intervention Trial – απέτυχαν δυστυχώς να αναδείξουν θεραπευτικό αποτέλεσμα. Περισσότερες μελέτες απαιτούνται ώστε να αποδειχθεί ισχυρή αιτιολογική συσχέτιση της νόσου με κάποιον συγκεκριμένο περιβαλλοντικό παράγοντα, που θα φωτίσει τους μηχανισμούς της αυτοάνοσης καταστροφής των β κυττάρων και θα οδηγήσει ενδεχομένως σε επιτυχημένη θεραπευτική παρέμβαση (Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

1.7 Αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων

Γενικά

Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου έρχεται καθημερινά αντιμέτωπο με μια τεράστια ποικιλία αντιγόνων και σκοπός του είναι να διακρίνει τα «δικά του» από τα «ξένα». Το ρεπερτόριο των ειδικών μορίων για την αναγνώριση (υποδοχείς TCR για τα T λεμφοκύτταρα, ανοσοσφαιρίνες για τα B λεμφοκύτταρα) δεν περιορίζεται γονιδιακά και μέσω μηχανισμών γενετικής αναδιοργάνωσης (rearrangement) καταλήγει εξαιρετικά ευρύ (της τάξης του 10^{15} για τους υποδοχείς TCR). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν αντιγονικοί υποδοχείς αυτοαντιδραστικοί για τον οργανισμό, άρα και τα β κύτταρα του παγκρέατος. Τα δυνητικά επικίνδυνα ανοσοκύτταρα κατά την ανάπτυξη των T λεμφοκυττάρων στο θύμο και των B λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών επιλέγονται αρνητικά και εξαλείφονται (κεντρική ανοχή). Αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα που μπορεί να διαφύγουν τους μηχανισμούς της κεντρικής ανοχής και να καταλήξουν στην περιφέρεια, υπεισέρχονται φυσιολογικά σε διεργασίες που είτε τα εξουδετερώνουν, είτε τα καταστέλλουν (περιφερική ανοχή). Διαταραχές αυτών των μηχανισμών ανοσορρύθμισης είναι που πυροδοτούν καταστάσεις αυτοανοσίας γενικά και Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 συγκεκριμένα (Greenspan & Gardner 2007).

Η καταστροφή των β νησιδιοκυττάρων του ενδοκρινούς παγκρέατος στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 πραγματοποιείται μέσω απόπτωσης, γνωστή ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που περιλαμβάνει καταρράκτη αλληλοδιαδοχικών ενεργοποιήσεων κυστεϊνο-ασπαραγινοπρωτεασών (caspases). Η ακριβής αλληλουχία των μοριακών γεγονότων που υπάγουν την απόπτωση των β κυττάρων είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Σύμφωνα με μια υπόθεση, προκαλείται

φλεγμονώδης αντίδραση με υψηλά επίπεδα έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1, TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) και INF- γ (Interferon- γ) από τα αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα στο νησιδιακό μικροπεριβάλλον. Οι κυτταροκίνες αυτές ενεργοποιούν των καταρράκτη των κασπασών που οδηγεί στον προγραμματισμένο θάνατο των β κυττάρων. Άλλες θεωρίες προτείνουν ότι η απόπτωση στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 επάγεται απευθείας με επαφή των αυτοαντιδραστικών T λεμφοκυττάρων με τα β κύτταρα μέσω του συστήματος διατητρίνης ή αλληλεπίδρασης Fas/Fas ligand. Ακόμη και στην περίπτωση αυτή, προαπαιτείται διαταραχή της έκκρισης κυτταροκινών (Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

Προ της εκδήλωσης Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 παρατηρείται ιστολογικά χρόνια, ατροφική νησιδίτιδα, κατά την οποία τα νησίδια του Langerhans βρίθουν T λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, B λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων. Επιπλέον, η διαταραγμένη ανοσολογική απάντηση εμπεριέχει και χυμικό σκέλος με παραγωγή αυτοαντισωμάτων που μπορεί να προηγείται της εμφάνισης κλινικού διαβήτη για χρόνια. Τα κύρια αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 είναι αυτά κατά της αποδεκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (GAD65), της τυροσιλο-φωσφατάσης (IA-2) και της ινσουλίνης (IAA) (Gorsuch και συν. 1982, Baekkeskov και συν. 1987, Harrison 2005, Daneman 2006, Greenspan & Gardner 2007).

1.7.1 Ανοσία

Το ανθρώπινο σώμα έχει την ικανότητα να ανθίσταται σε όλων σχεδόν των ειδών τους μικροοργανισμούς ή τοξίνες που τείνουν να προκαλέσουν βλάβη σε ιστούς και όργανα. Η ικανότητα αυτή καλείται ανοσία. Μεγάλο μέρος της ανοσίας καλείται επίκτητη ανοσία, η οποία δεν αναπτύσσεται παρά μόνο όταν το σώμα προσβληθεί από μικροβιακή νόσο ή τοξίνη και συχνά απαιτείται γι' αυτό χρονικό διάστημα εβδομάδων ή και μηνών. Ένα επιπρόσθετο μέρος της ανοσίας προκύπτει από γενικές διεργασίες παρά από διεργασίες που κατευθύνονται σε ειδικούς νοσογόνους μικροοργανισμούς. Αυτή καλείται εγγενής ανοσία και περιλαμβάνει: α) φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών και άλλων εισβολέων από λευκά αιμοσφαίρια και κύτταρα του συστήματος των ιστικών μακροφάγων, β) καταστροφή από το όξινο έκκριμα του στομάχου και από τα πεπτικά ένζυμα μικροοργανισμών που καταπίνονται και φτάνουν στο στομάχι, γ) αντίσταση του δέρματος έναντι εισβολής

μικροοργανισμών και δ) παρουσία στο αίμα ορισμένων κυττάρων ή ουσιών που προσκολλώνται σε ξένους μικροοργανισμούς ή τοξίνες και προκαλούν την καταταστροφή τους, όπως: 1. τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK, Natural Killers), τα οποία μπορούν να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν ξένα καρκινικά και μολυσμένα κύτταρα, 2. η λυσοζύμη, βλεννολυτικός πολυσακχαρίτης, που προσβάλλει μικροοργανισμούς και προκαλεί τη διάλυσή τους, 3. βασικά πολυπεπίδια, τα οποία αντιδρούν με ορισμένους τύπους Gram⁺ μικροβίων και τα αδρανοποιούν, 4. το σύμπλεγμα του συμπληρώματος, που αποτελείται από 20 περίπου πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται με διάφορους τρόπους και καταστρέφουν μικροοργανισμούς (Janeway και συν. 2005).

Εκτός από την εγγενή ανοσία το ανθρώπινο σώμα διαθέτει επίσης την ικανότητα να αναπτύσσει εξαιρετικά ισχυρή ειδική ανοσία εναντίον μεμονωμένων παραγόντων εισβολέων όπως είναι θανατηφόρα μικρόβια, ιοί, τοξίνες, ακόμα και ξένοι ιστοί που προέρχονται από άλλα ζώα. Αυτή λέγεται επίκτητη ανοσία και επιτυγχάνεται από ειδικό σύστημα ανοσίας το οποίο παράγει αντισώματα και/ή ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα που επιτίθενται και καταστρέφουν τον εισβολέα. Υπάρχουν δύο βασικοί, αλλά στενά συσχετιζόμενοι μεταξύ τους τύποι επίκτητης ανοσίας. Κατά τον ένα τύπο, το σώμα αναπτύσσει κυκλοφορούμενα αντισώματα, που είναι μόρια σφαιρίνης. Αυτός ο τύπος ονομάζεται χυμική ανοσία ή ανοσία των Β κυττάρων (γιατί τα αντισώματα παράγονται από Β λεμφοκύτταρα). Κατά τον δεύτερο τύπο της επίκτητης ανοσίας, παράγονται σε πολύ μεγάλο αριθμό ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι ειδικά προγραμματισμένα να καταστρέφουν τον ξένο παράγοντα. Αυτός ο τύπος ανοσίας λέγεται κυτταρική ανοσία ή ανοσία των Τ κυττάρων (Janeway και συν. 2005).

1.7.2 Ανοσολογική αναγνώριση και απάντηση

Τα Β και Τ λεμφοκύτταρα αποτελούν θεμελιώδη κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα Β λεμφοκύτταρα ωριμάζουν και διαφοροποιούνται στο μυελό των οστών και στη συνέχεια μεταναστεύουν στις περιοχές Β κυττάρων των περιφερικών λεμφικών οργάνων. Με την επίδραση παραγόντων εκκρινόμενων από τα Τ βοηθητικά κυρίως λεμφοκύτταρα (CD4⁺) που ενεργοποιούνται προηγουμένως από επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) μερικά Β κύτταρα διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν ανοσοσφαιρίνες (IgM). Ένα μέρος των υπόλοιπων ενεργοποιημένων Β κυττάρων μεταπίπτουν σε Β κύτταρα

μνήμης. Όταν αυτά τα κύτταρα μνήμης ενεργοποιηθούν στη συνέχεια, θα παράγουν πλέον νέες τάξεις ανοσοσφαιρινών (IgA, IgE και IgG) ή ακόμα θα αυξήσουν την ειδικότητα τους μέσω υπερμεταλλάξεων της μεταβλητής περιοχής που κωδικοποιεί για τις ανοσοσφαιρίνες. Τα πρόδρομα T λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στο θύμο αδένα, όπου υπεισέρχονται διαδικασίες επιλογής, ωρίμανσης και διαφοροποίησης σε CD4⁺ ή CD8⁺ T λεμφοκύτταρα. Τα ώριμα αυτά T λεμφοκύτταρα μεταφέρονται στη συνέχεια στις T περιοχές των περιφερικών λεμφικών οργάνων και λειτουργούν ως βοηθητικά ή κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αντίστοιχα. Η ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων απαιτεί αναγνώριση ολόκληρου του αντιγόνου, ενώ για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων απαιτείται παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων μέσω του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC) στην επιφάνεια επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Janeway και συν. 2005).

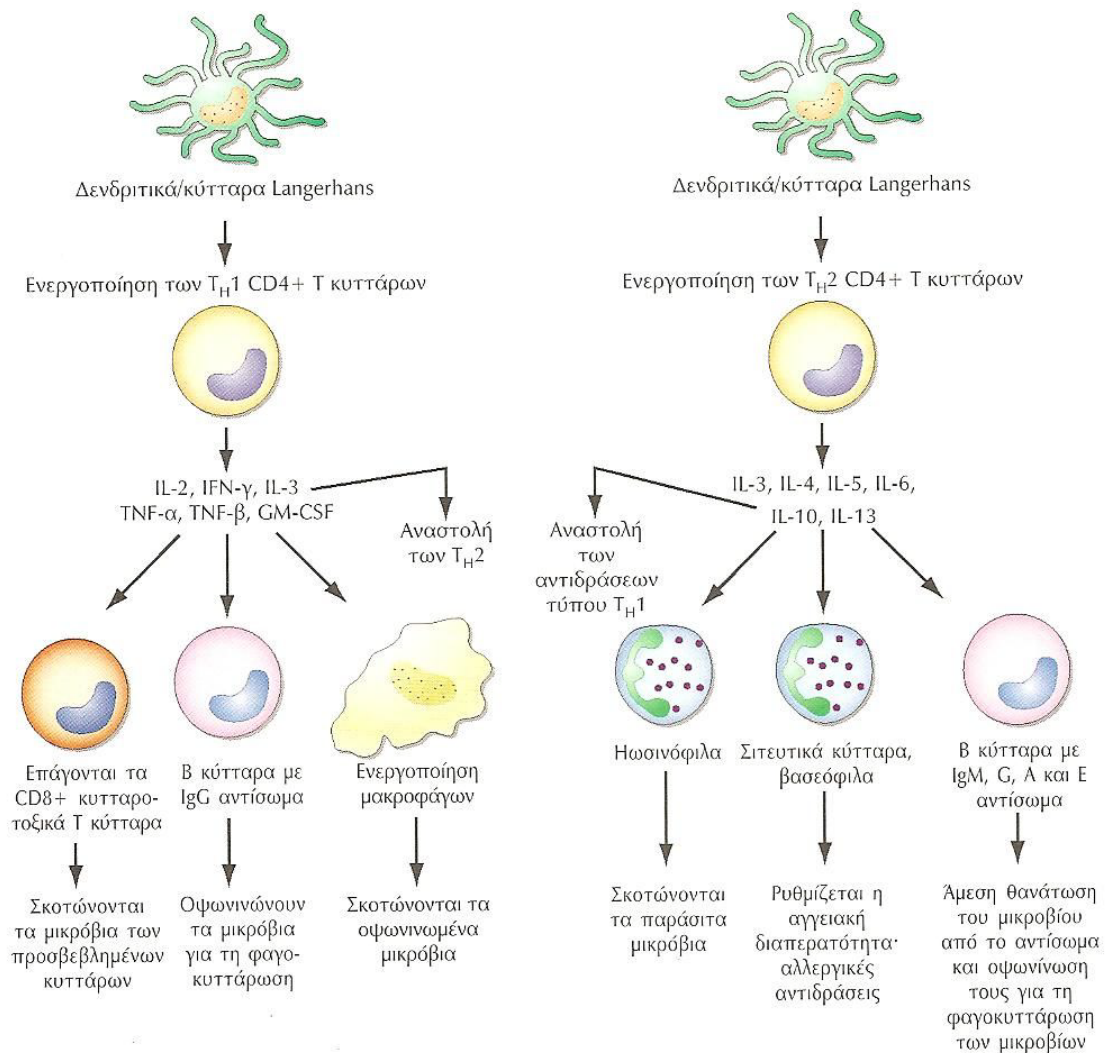
Τα ανερέθιστα T λεμφοκύτταρα (T_{naive}) πριν ενεργοποιηθούν από το αντιγόνο είναι ήρεμα κύτταρα, βρίσκονται στη φάση G₀ και χαρακτηρίζονται από πυκνωτικό πυρήνα, λίγο κυτταρόπλασμα και μικρή μεταγραφική δραστηριότητα. Τα ανερέθιστα T λεμφοκύτταρα ζουν 5-7 εβδομάδες, ίσως και περισσότερο, μπορεί όμως να ζήσουν και χρόνια χωρίς να διαιρούνται. Η ενεργοποίησή τους από το σύμπλεγμα πεπετιδίου-MHC διεγείρει το κύτταρο να μεταπέσει σε φάση G₁, επάγοντας την πρωτογενή απάντηση (Kuby και συν. 1997, Janeway και συν. 2005). Το T λεμφοκύτταρο σε 48 ώρες μετά την ενεργοποίηση μεγθύνεται σε βλάστη και ακολουθούν επανειλημμένοι κύκλοι διαίρεσης. Η μεταγωγή σημάτων από μόρια επιφανείας στον πυρήνα επάγει μεταγραφή του γονιδίου της IL-2 και της αλυσίδας α του υποδοχέα της (CD25), ενώ το συνδιεγερτικό σήμα αυξάνει το χρόνο ημίσειας ζωής του mRNA της IL-2. Η παραγωγή της IL-2 αυξάνει κατά 100 φορές και η σύνδεσή της με το ν υψηλής συγγένειας υποδοχέα της (IL-2R) επάγει περαιτέρω ενεργοποίηση παρθένων T λεμφοκυττάρων προς πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα διαιρούνται 2-3 φορές την ημέρα επί 4-5 ημέρες και δημιουργούν κλώνους κυττάρων που διαφοροποιούνται σε δραστικά ή μνημονικά T λεμφοκύτταρα. Τα δραστικά T λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως IL-2, INF γ , TNF α (T_{H1} λεμφοκύτταρα), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (T_{H2} λεμφοκύτταρα) που ενεργοποιούν τα μακροφάγα καθώς και τα B λεμφοκύτταρα προς παραγωγή αντισωμάτων ή εκκρίνουν διατητρίνες και πρωτεάσες καθώς και INF γ και TNF α και

έχουν κυτταροτοξική δράση ($CD8^+$ T λεμφοκύτταρα) (Kuby και συν. 1997, Janeway και συν. 2005).

Οι δύο βασικοί υποπληθυσμοί των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων - TH1 και TH2 φαίνεται ότι αναπτύσσονται από το ίδιο πρόδρομο T λεμφοκύτταρο υπό την επίδραση κυτταροκινών στον επιχώριο λεμφαδένα. Η IL-12 που παράγεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα επάγει TH1 διαφοροποίηση μέσω ενεργοποίησης τριών μεταγραφικών παραγόντων των STAT1, STAT3, και STAT4. Η INF γ επάγει επίσης διαφοροποίηση TH1 αφενός μέσω αύξησης της έκκρισης IL-12 από τα μακροφάγα και αφετέρου λόγω της διατήρησης της έκφρασης των υποδοχέων για την IL-12 επί των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων. Φαίνεται όμως ότι η INF γ έχει και επαγωγική δράση ανεξάρτητη από την IL-12. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η IL-18 αν και δεν επάγει ανάπτυξη των κυττάρων TH1, ασκεί ουσιαστικό ρόλο στην επαγωγή και ενεργοποίησή τους από την IL-12. Μικροοργανισμοί που πολλαπλασιάζονται σε ενδοκυττάρια κυστίδια, όπως τα μυκοβακτήρια, διεγείρουν τη διαφοροποίηση των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων προς τον πλυθυσμό TH1 λόγω διέγερσης των μακροφάγων προς παραγωγή IL-12. Η διαφοροποίηση των ανερέθιστων πρόδρομων $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων προς TH2 επάγεται από την IL-4 μέσω του μεταγραφικού παράγοντα STAT6. Η IL-4 φαίνεται ότι παράγεται σε μικρές ποσότητες κατά την αρχική ενεργοποίηση των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων και δρα ως αυτοκρινής παράγοντας για τη διαφοροποίησή τους προς TH2. Επιπλέον, η ποσότητα του αντιγόνου συμβάλλει στη διαφοροποίηση των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων προς TH1 ή TH2 υποπληθυσμό. Με λίγες εξαιρέσεις, μικρή συγκέντρωση αντιγόνου διεγείρει προς υποπληθυσμό TH1, ενώ μεγάλη συγκέντρωση προς υποπληθυσμό TH2. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η παρουσίαση του αντιγόνου μέσω μακροφάγων ή δενδριτικών κυττάρων επάγει κατά προτίμηση TH1 απάντηση, ενώ η παρουσίαση που συνδέεται και με χυμική απάντηση επάγει την ανάπτυξη κυττάρων TH2 (Kuby και συν. 1997, Janeway και συν. 2005).

Επομένως, ανοσολογικά ερεθίσματα που ενεργοποιούν μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα και διεγείρουν την παραγωγή της IL-12, όπως ενδοκυττάρια μικρόβια και ιοί, επάγουν απάντηση TH1. Αντιθέτως, εξωκυτταρικά μικρόβια και μεγάλες συγκεντρώσεις αντιγόνου επάγουν TH2 διαφοροποίηση και κατ' επέκταση ενεργοποίηση ειδικών B λεμφοκυττάρων προς παραγωγή IgM, IgA, IgE και IgG με εξουδετερωτική και οψωνινοποιητική δράση. Τα λεμφοκύτταρα TH1 εκκρίνουν κυρίως IL-2, INF γ , TNF α , GM-CSF και IL-3 και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των μακροφάγων, την υπερευαισθησία επιβραδυνόμενου τύπου και την ενεργοποίηση

των κυτταροτοξικών κυττάρων, ενώ τα λεμφοκύτταρα TH2 εκκρίνουν IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 και μικρές ποσότητες GM-CSF, βοηθούν στην παραγωγή αντισωμάτων κυρίως IgE και IgG και ενεργοποιούν επίσης τα ηωσινόφιλα και τα μαστοκύτταρα. Τελευταία, έχει αναγνωρισθεί και ένας τρίτος υποπληθυσμός CD4⁺ T λεμφοκυττάρων που ονομάζεται TH17. Πρόκειται για CD4⁺ T λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν κυρίως IL-6 και IL-17 και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έκλυση της φλεγμονής τοπικά καθώς επιστρατεύουν ουδετερόφιλα στην περιοχή της λοίμωξης. Τέλος, στην ομάδα των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων ανήκουν και τα ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs, CD4⁺CD25^{high}), στα οποία θα αναφερθούμε εκτενώς στη συνέχεια (Kuby και συν. 1997, Janeway και συν. 2005).



Εικ. 1.8 Ο δύο βασικές υποομάδες (TH1 και TH2) των CD4⁺ βοηθητικών T λεμφοκυττάρων (Πηγή: Harrison 2005)

1.7.3 Αυτοάνοση απάντηση στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1

Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 τα αυτοαντισώματα που σχετίζονται με την καταστροφή των β νησιδιοκυττάρων είναι συχνά παρόντα χρόνια πριν την κλινική εκδήλωση της νόσου. Δύο δεκαετίες πριν ανακαλύφθηκε αρχικά σαν αντιγόνο μια νησιδιακή πρωτεΐνη 64 kD M.B., που αναγνωρίστηκε ως η μικρότερη ισομορφή της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (GAD65). Το αυτοαντίσωμα κατά του αντιγόνου αυτού ανιχνεύεται σε ποσοστό 70-80 % στον ορό νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών και ατόμων σε προδιαβητική φάση. Δεύτερο στη σειρά αναγνωρίστηκε το αυτοαντίσωμα έναντι της οιωνεί-τυροσιλο-φωσφατάσης (IA-2), που ανιχνεύεται σε ποσοστό 60-70 % στον ορό νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών και ατόμων σε προδιαβητική φάση. Με τη χρήση και των δύο αυτοαντισωμάτων μπορούν να ανευρεθούν σε ποσοστό 90 % άτομα που αναπτύσσουν Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και επομένως μπορούν μαζί να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο ομάδων υψηλού κινδύνου. Ένα τρίτο καλά χαρακτηρισμένο αυτοαντιγόνο αποτελεί η ινσουλίνη (IAA), το αυτοαντίσωμα κατά της οποίας ανιχνεύεται σε ποσοστό 50 % περίπου στον ορό νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών (Greenspan & Gardner 2007).

Από πειράματα που έγιναν σε NOD ποντίκια που είχαν ταυτόχρονα και ανοσολογική ανεπάρκεια που αφορά τα Β λεμφοκύτταρα (NOD-SCID) φάνηκε ότι τα αυτοαντισώματα, αν και αποτελούν καλά καθιερωμένους δείκτες για τη νόσο, δεν φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα στην καταστροφή των β κυττάρων, μιας κι αυτή ξεκινάει κανονικά με ενεργή την Τ κυτταρική ανοσία μόνο. Ωστόσο, η παρουσία Β λεμφοκυττάρων επιταχύνει την εκδήλωση της νόσου, οπότε είναι πιθανό να λειτουργούν ακόμα και ως σημαντικά αντιγονοπαρουσιαστικά στο νησιδιακό μικροπεριβάλλον για σπάνια αυτοαντιγόνα όπως τα GAD65 και IA-2. Για την καταστροφή των β κυττάρων του ενδοκρινούς παγκρέατος απαιτούνται τόσο $CD4^+$ T_H όσο και $CD8^+$ T_C . Αν και τα $CD4^+$ Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη της αυτοάνοσης διαδικασίας και την εμφάνιση νησιδίτιδας τοπικά, πιθανότερο είναι ότι την απευθείας καταστροφική δράση να έχουν τα $CD8^+$ Τ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 κυριαρχεί η απόκριση T_H1 , ενώ τα λεμφοκύτταρα T_H2 μπορεί να δρουν και ανασταλτικά στην εξέλιξη της νόσου. Τα λεμφοκύτταρα T_H1 εκκρίνουν κυρίως IL-2, IL-12, TNF α και INF γ και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών $CD8^+$ λεμφοκυττάρων, ενώ τα λεμφοκύτταρα T_H2 εκκρίνουν IL-4, η οποία στα NOD ποντίκια φάνηκε να λειτουργεί αποτρεπτικά όσον αφορά την

καταστροφή των β κυττάρων. Επίσης, στον άνθρωπο χαμηλοί τίτλοι της IL-4 ανευρίσκονται σε διαβητικούς τύπου 1, ενώ υψηλότεροι τίτλοι της συσχετίστηκαν με τον προστατευτικό απλότυπο HLADR2, γεγονός που καταδεικνύει ότι μια ισχυρή TH2 απάντηση μπορεί όντως να δρα ανασταλτικά για τη νόσο (Greenspan & Gardner 2007).

1.8 T κυτταρική ανοχή

1.8.1 Κεντρική ανοχή

Τα T λεμφοκύτταρα που αναπτύσσονται στο θύμο (pre-T cells) προορίζονται να ωριμάσουν σε T α/β κύτταρα μέσω ανακατανομών του γονιδίου TCRβ αρχικά και στη συνέχεια του TCRα (TCR rearrangement). Αν τυχόν η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα μη λειτουργικές πρωτεΐνες TCR α ή β ακολουθεί απόπτωση των pre-T αυτών λεμφοκυττάρων. Αν η διαδικασία αυτή οδηγήσει σε λειτουργικούς συνδυασμούς, τα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν διμερή TCR α/β και CD3 μόρια σε χαμηλά επίπεδα στην επιφάνειά τους. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται τότε άμεσα και σε μεγάλο βαθμό. Πραγματοποιείται τότε θετική ή αρνητική επιλογή με βάση την ικανότητα του υποδοχέα TCRα/β του κάθε T λεμφοκυττάρου να αναγνωρίσει πεπτίδια συνδεδεμένα με MHC μόρια στην επιφάνεια των επιθηλιακών ή δενδριτικών κυττάρων του θύμου. Αρνητική επιλογή (negative selection) φαίνεται να λαμβάνει χώρα στο μυελό του θύμου αδένου, όταν ο υποδοχέας TCR α/β αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα. Τουλάχιστον 97 % των αναπτυσσόμενων T λεμφοκυττάρων θα οδηγηθούν σε θάνατο μέσω απόπτωσης λόγω της αυτοαντιδραστικότητάς τους ή της καθόλου αντιδραστικότητας και αυτή ακριβώς η διαδικασία (κεντρική ανοχή) αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό μηχανισμό της αυτοανοσίας. Τα υπόλοιπα T λεμφοκύτταρα που επιλέγονται θετικά αυξάνουν περισσότερο την έκφραση του υποδοχέα TCRα/β, εκφράζουν επίσης είτε CD4 είτε CD8 και καταλήγουν ώριμα T λεμφοκύτταρα. Αυτά τα T λεμφοκύτταρα εξέρχονται του θύμου και κατευθύνονται στην περιφέρεια. Τα CD4 ενεργοποιούνται στην περιφέρεια με περιορισμό αναγνώρισης αντιγόνων από τα τάξης II μόρια του MHC, ενώ τα CD8 από τα τάξης I μόρια του MHC (Dorf και συν. 1984, Saoudi και συν. 1996, Kuby και συν. 1997, Stephens και συν. 2001, Janeway και συν. 2005).

Για να εξηγηθούν οι ενδιάμεσες περιπτώσεις μεταξύ θετικής και αρνητικής επιλογής προτείνεται κι ένα μοντέλο ανοχής όπου η ένταση της συγγένειας μεταξύ του υποδοχέα TCRα/β και του αντιγόνου είναι αυτή που καθορίζει τη μοίρα του T

λεμφοκυττάρου. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, T λεμφοκύτταρα με υψηλή ένταση πρόσδεσης του αντιγονικού υποδοχέα με το σύμπλεγμα MHC-αυτοπεπτίδιο φυσιολογικά εξαλείφονται, ενώ αυτά με χαμηλή ισχύ του δεσμού τους με το σύμπλεγμα MHC-αυτοπεπτίδιο επιλέγονται θετικά. Αν όμως ο η ισχύς του δεσμού είναι κοντά στο «μηδέν» και πάλι εξαλείφονται λόγω έλλειψης ικανού σήματος για επιβίωση (Dorf και συν. 1984, Saoudi και συν. 1996, Stephens και συν. 2001).

Οι βιοχημικοί παράγοντες που σε μοριακό επίπεδο οδηγούν είτε σε απόπτωση είτε σε αυξημένο σήμα για επιβίωση και πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων είναι υπό διερεύνηση. Είναι αποδεκτό ότι η πρωτεΐνη AIRE (AutoImmune REgulator), που εκφράζεται κυρίως σε επιθηλιακά καθώς και δενδριτικά κύτταρα του μυελού του θύμου, αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα υπό τον έλεγχο του οποίου βρίσκεται η έκφραση πολλών ειδικών αυτοπεπτιδίων. Συνδιεγερτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ CD28 και CD80/86, καθώς και μεταξύ CD154, CD40 και μορίων προσκόλλησης όπως το LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) φαίνεται να ενέχονται επίσης στην επιλεκτική εξάλειψη των αυτοαντιδραστικών T λεμφοκυττάρων στην περιοχή του μυελού του θύμου (Peterson και συν. 1998, Aschenbrenner και συν. 2007, Janeway και συν. 2005).

Είναι γνωστό ότι η αρνητική αυτή επιλογή στο θύμο δεν είναι 100% αποτελεσματική, αφού κάποια πιθανά αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα διαφεύγουν στην περιφέρεια. Επίσης, κάποια αυτοαντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που σχετίζονται με πρωτεΐνες που δεν εκφράζονται σταθερά αλλά υπό αυστηρό ρυθμιστικό έλεγχο όπως συμβαίνει στην περίπτωση των ενδοκρινών αδένων, μπορεί να μην παρουσιαστούν στα πρόδρομα T λεμφοκύτταρα κατά τη διαδικασία επιλογής και ωρίμανσής τους. Επομένως, οι μηχανισμοί της κεντρικής ανοχής δεν είναι απολύτως επαρκείς για να την αποφυγή της αυτοανοσίας κι έτσι η ανοχή πρέπει να διατηρηθεί στην περιφέρεια μέσω συμπληρωματικών ρυθμιστικών μηχανισμών (Janeway και συν. 2005, Greenspan & Gardner 2007).

1.8.2 Περιφερική ανοχή

Η περιφερική ανοχή επιτυγχάνεται και συντηρείται είτε με μηχανισμούς ανέργειας (anergy) των αυτοαντιδραστικών T λεμφοκυττάρων είτε με μηχανισμούς καταστολής τους από τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs). Η κλωνική απάλειψη (clonal deletion) των αυτοαντιδραστικών T λεμφοκυττάρων που διέφυγαν από το θύμο στην περιφέρεια αποτελεί τον σημαντικότερο μηχανισμό που οδηγεί στην ανέργειά τους,

παρόλα αυτά κάποια παραμένουν. Μερικά από αυτά βέβαια ποτέ δεν θα συναντήσουν τα αντίστοιχα αυτοαντιγόνα, γιατί τα δεύτερα μπορεί να απομονωθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα (ignorance). Επιπλέον, σημαντικό μηχανισμό ανέργειας αποτελεί η ανοσολογική παρέκκλιση (immune deviation), κατά την οποία η ενίσχυση των μη φλεγμονωδών αποκρίσεων TH2 αποδυναμώνει τις αυτοαντιδραστικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις TH1. Τα TH1 λεμφοκύτταρα, που ρυθμίζουν την κυτταρική ανοσία, εκκρίνουν ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και μικρή ποσότητα ιντερλευκίνης-4 (IL-4). Αντίθετα, τα TH2 λεμφοκύτταρα, που επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα, εκκρίνουν άφθονη ποσότητα ιντερλευκίνης-4 (IL-4) και ελάχιστη ιντερφερόνη-γ (IFN-γ). Μια επικρατούσα άποψη είναι ότι στην ανθρώπινη αυτοανοσία γενικά επικρατούν οι TH1 αποκρίσεις. Έχει αποδειχθεί σε ζωικά μοντέλα ότι η επαγωγή των TH2 αποκρίσεων βελτιώνει και καθιστά λιγότερο αυτοαντιδραστικές τις φλεγμονώδεις TH1 απαντήσεις. Συνεπώς, ανοσολογική παρέκκλιση προς TH1 μπορεί να ευνοήσει την εκδήλωση αυτοανοσίας, ενώ η αντίθετη περίπτωση προς TH2 να βοηθήσει να διατηρηθεί η περιφερική ανοχή και να προστατευθεί ο οργανισμός από την αυτοανοσία. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της αυτοάνοσης ενδοκρινικής νόσου μπορεί να ισχύσει και το αντίθετο, αφού ανάλογα με την έκφασή της (θυρεοειδίτιδα Hashimoto ή νόσος Graves) μπορεί να υπερισχύει η μία ή η άλλη T λεμφοκυτταρική ανταπόκριση (TH1 στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto και TH2 στη νόσο του Graves) (Janeway και συν. 2005, Greenspan & Gardner 2007).

Η κλωνική απάλειψη (clonal deletion) και συνεπώς η ανέργεια των T αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται μέσω απόπτωσης είτε στο σημείο της ενεργοποίησης είτε μέσω διέλευσης από το ήπαρ. Η υψηλή δόση αντιγόνου και η χρόνια έκθεση σ' αυτό στην περιφέρεια είναι οι συνθήκες που οδηγούν στην εξάλειψη τόσο των CD4⁺ όσο και των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων. Τα ενεργοποιημένα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα εκφράζουν μόρια Fas στην επιφάνειά τους αλλά είναι ανθεκτικά στην απόπτωση μέσω Fas-ligand εξαιτίας της ταυτόχρονης έκφρασης και του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-xL, που επάγεται από την πρόσδεση CD28 κατά την ενεργοποίησή τους. Αρκετές ημέρες μετά την ενεργοποίηση, όταν η έκφραση του μορίου Bcl-xL υποστρέφει, τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα γίνονται ευαίσθητα στην απόπτωση μέσω Fas-ligand (Activation-induced cell death, AICD). Ένας παρόμοιος μηχανισμός μέσω του υποδοχέα p75 του TNFα (TNFαRII) έχει προταθεί για την εξάλειψη των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων. Επομένως, τα

αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα μπορούν να εξαλειφθούν μέσω απόπτωσης που επάγεται από την υψηλή σε δόση και διάρκεια διέγερση από τα αυτοαντιγόνα, που είναι άφθονα στην περιφέρεια. Ωστόσο, είναι φανερό ότι αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα για σπάνια αυτοαντιγόνα είναι δύσκολο να εισέλθουν σε ανέργεια με το μηχανισμό αυτό (Janeway και συν. 2005, Greenspan & Gardner 2007).

Ανέργεια επίσης μπορεί να προκύψει από την απουσία δεύτερου συνδιεγερτικού σήματος. Κατά την αντιγονοπαρουσίαση μέσω μορίων τάξης II του MHC, αυτοαντιδραστικά CD4 T λεμφοκύτταρα μπορούν να καταστούν ανενεργά λόγω έλλειψης του CD28-CD80/86 σήματος. Ωστόσο, ακόμα κι αν τα δύο σήματα είναι παρόντα, η ελαττωμένη ποσότητα έκκρισης κάποιων κυτταροκινών, όπως οι IL-2, IL-4, IL-7, είναι δυνατό να οδηγήσει σε ανέργεια. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η ανέργεια και η περιφερική ανοχή μπορεί να επιτευχθεί και μέσω αλληλεπίδρασης CD154-CD80/86. Έτσι, αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα που φέρουν το μόριο CTLA-4 (CD154) μπορούν να περιοριστούν κατά την παρουσίαση των αυτοαντιγόνων στην περιφέρεια. Ακόμα και το διαλυτό μόριο sCTLA-4 όσο και το μόριο PD-1 φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανέργειά τους και συμβάλλουν στη διατήρηση της περιφερικής ανοχής (Piccirillo και συν. 2004, Janeway και συν. 2005, Greenspan & Gardner 2007).

1.8.3 Ο ρόλος των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs)

1.8.3.1 Κατηγορίες-Ανοσοφαινότυπος

Από τις αρχές της δεκαετίας του '70 είχαν περιγραφεί T κυτταρικοί πληθυσμοί που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για την καταστολή ανοσιακών απαντήσεων στην περιφέρεια. Τα κύτταρα αυτά είχαν ονομαστεί κατασταλτικά T κύτταρα (suppressor T cells) και θεωρούνταν ότι πρόκειται για CD8⁺ T λεμφοκύτταρα. Οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί δράσης των κατασταλτικών αυτών κυττάρων δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστούν, με αποτέλεσμα το ενδιαφέρον των ερευνητών να ατονήσει. Το θέμα επανήλθε στο προσκήνιο μετά από μελέτες της ιαπωνικής ομάδας του S. Sakaguchi (1995), που κατέδειξαν ότι η θυμεκτομή νεογνών ποντικών οδηγεί στην εμφάνιση οργανοειδικής αυτοανοσίας με εκδήλωση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, θυρεοειδίτιδα, ορχίτιδα και ατροφική γαστρίτιδα, η οποία προλαμβάνεται με τη χορήγηση CD4⁺ CD25⁺ T λεμφοκυττάρων από μη ακτινοβολημένα πειραματόζωα. Οι ίδιοι ερευνητές περιέγραψαν τα κύτταρα αυτά ως ρυθμιστικά T κύτταρα και αυτή η μη αναμενόμενη αποκάλυψη της κατασταλτικής δράσης των CD4⁺ κυττάρων έδωσε

ισχυρή ώθηση στη σχετική έρευνα και προσέθεσε μια νέα διάσταση στο πολύπλοκο φαινόμενο της περιφερικής ανοχής (Sakaguchi και συν. 1995).

Δυστυχώς, η αδυναμία προσδιορισμού ειδικών μεμβρανικών δεικτών για τα T ρυθμιστικά κύτταρα, καθώς και οι διαφορετικές συνθήκες απομόνωσης και μελέτης τους από τους διάφορους ερευνητές συσσώρευσαν και συνεχίζουν να επιφέρουν αρκετή σύγχυση, ενώ περιορίζουν τη δυνατότητα συναγωγής έγκυρων και οριστικών αποτελεσμάτων αναφορικά με το βιολογικό ρόλο αυτών των κυττάρων, ο οποίος σε κάθε περίπτωση διαφαίνεται εξαιρετικά ενδιαφέρον. Μέχρι στιγμής είναι επιβεβαιωμένο ότι υπάρχουν δύο ειδών T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs): α) Τα φυσικά (natural, constitutive, professional, nTregs) και β) τα επαγώγιμα (inducible, adaptive, iTregs). Έχουν διαφορετική προέλευση, αντιγονική ειδικότητα και μηχανισμούς δράσης, αλλά πιθανότατα συμπληρωματική ή και επικαλυπτόμενη δράση στη ρύθμιση των ανοσιακών απαντήσεων (Sakaguchi και συν. 1995, Jonuleit και συν. 2003, Piccirilo & Thornton 2004, Piccirilo και συν. 2004, Jiang και συν. 2004, Lan και συν. 2005, Janeway και συν. 2005).

Φυσικά Tregs (nTregs) Τα nTregs παράγονται στο θύμο μετά από επιλογή που μεσολαβείται από τη σύνδεση των υποδοχέων τους με τα αυτοπεπτίδια και θεωρούνται η κύρια ομάδα με κατασταλτική δράση. Βασικό ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηριστικό των nTregs είναι η σταθερή επιφανειακή έκφραση της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-2 (CD25). Το CD25 βέβαια δεν είναι ειδικός δείκτης. Πρόκειται για δείκτη ενεργοποίησης όλων των T κυττάρων, ενώ, από την άλλη πλευρά κατασταλτική δράση εκδηλώνουν επίσης και ορισμένοι CD25⁻ T κυτταρικοί υποπληθυσμοί. Η διαφορά είναι ότι η έκφραση του CD25 στα ενεργοποιημένα T κύτταρα είναι παροδική και χαμηλού βαθμού (CD25^{low}), ενώ στα nTregs είναι σταθερή και υψηλή (CD25^{high}). Τα CD4⁺CD25⁺ T λεμφοκύτταρα ανέρχονται στο 20-30% των CD4⁺ περιφερικών T λεμφοκυττάρων και διακρίνονται σε CD4⁺CD25^{high} και CD4⁺CD25^{low}, από τα οποία μόνο τα πρώτα που αντιπροσωπεύουν το 2-4% CD4⁺ περιφερικών T λεμφοκυττάρων είναι τα πραγματικά T ρυθμιστικά κύτταρα (Jonuleit και συν. 2003, Piccirilo & Thornton 2004, Piccirilo και συν. 2004, Jiang και συν. 2004, Lan και συν. 2005, Janeway και συν. 2005). Ειδικός λειτουργικός δείκτης των nTregs είναι ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3 (forkhead box P3) που εκφράζεται ενδοκυττάρια κι έτσι για την ανίχνευσή του απαιτείται σταθεροποίηση και διαπερατοποίηση των κυττάρων στη συνέχεια (Bennett και συν. 2001, Hori και συν. 2003, Ziegler 2006, Kim και συν. 2007). Επίσης, ειδικό ανοσοφαινοτυπικό

χαρακτηριστικό τους αποτελεί η χαμηλή έκφραση της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-7 (CD127) (Liu και συν. 2006). Εκτός από τα τρία αυτά ειδικά ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά για την αναγνώρισή τους - την σταθερή και υψηλή μεμβρανική έκφραση του CD25, την ενδοκυττάρια έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 και τη χαμηλή μεμβρανική έκφραση του CD127 - έχουν περιγραφεί κι άλλα μόρια που εκφράζονται στη μεμβράνη τους, όπως CD38, CD103, CD134 (OX-40L), GITR (Glucocorticoid-Induced TNF Receptor), καθώς και σε χαμηλή συγκέντρωση CD45RB και CD45RC. Επιπλέον, τα nTregs χαρακτηρίζονται από πλούσια μεμβρανική έκφραση των HLA-DR, TGF β (Transforming Growth Factor β), CD5, CD62L (L-σελεκτίνη) και CD122 (β αλυσίδα του υποδοχέα για την IL-2 και από επίσης πλούσια μεμβρανική αλλά και ενδοκυττάρια έκφραση του CTLA-4 (CD152). Στη μεμβράνη τους εντοπίζεται ακόμη ο παράγοντας LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3, CD223), που φαίνεται να διαδραματίζει μαζί με τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP3 σημαντικό ρόλο τόσο στη δέσμευσή τους στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και στην εξελικτική διαφοροποίησή τους, όσο και στην έκφραση της κατασταλτικής τους λειτουργίας, φαινόμενα που θα περιγραφούν αναλυτικά στη συνέχεια (Jonuleit και συν. 2003, Piccirilo & Thornton 2004, Piccirilo και συν. 2004, Jiang και συν. 2004, Lan και συν. 2005, Janeway και συν. 2005).

Επαγώγιμα Tregs (iTregs) Αντίθετα με τα nTregs, τα iTregs δεν αντιπροσωπεύουν ξεχωριστή κυτταρική σειρά, αλλά δημιουργούνται στην περιφέρεια μέσω μιας ειδικής διαδικασίας διαφοροποίησης των ανερέθιστων (Thaive) CD4⁺CD25⁻ T λεμφοκυττάρων και ασκούν την κατασταλτική τους δράση μέσω της παραγωγής IL-10 ή TGF β (Transforming Growth Factor β). Έτσι, διακρίνονται σε δύο είδη iTregs: τα Tr1 που παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-10 και μικρές ως μέτριες ποσότητες TGF β και τα TH3 που παράγουν αποκλειστικά TGF β (Jonuleit και συν. 2003, Jiang και συν. 2004, Lan και συν. 2005).

Tr1 iTregs Όπως ήδη αναφέρθηκε, χαρακτηριστικό τους είναι ότι ασκούν τη ρυθμιστική τους δράση μέσω της IL-10, την οποία εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες. Τα Tr1 παράγουν επίσης μικρή ποσότητα IL-5 και IFN- γ , ακόμη λιγότερο TGF β και καθόλου ή ελάχιστη ποσότητα IL-2 και IL-4. Τα TR1 ειδικά για μια ποικιλία αντιγόνων, συμπεριλαμβανομένων και ιδίων αντιγόνων, εντοπίζονται επιλεκτικά στον εντερικό βλεννογόνο. Ομοιάζουν με τα nTregs στο γεγονός ότι ο πολλαπλασιασμός τους μετά από πολυκλωνική ή αντιγονοειδική ενεργοποίηση είναι περιορισμένος

καθώς και στο ότι εκφράζουν CTLA-4. Έχουν την ικανότητα να ελέγχουν την ενεργοποίηση των ανερέθιστων και των μνημονικών T κυττάρων, να καταστέλλουν τις TH1 και TH2 μεσολαβούμενες αποκρίσεις σε παθογόνα, όγκους και αλλοαντιγόνα, καθώς και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα (Jonuleit και συν. 2003, Jiang και συν. 2004, Lan και συν. 2005).

TH3 iTregs Τα TH3 αποτελούν ενιαίο υποπληθυσμό T κυττάρων η δημιουργία των οποίων *in vivo* επάγεται μετά από την από του στόματος χορήγηση ξένων αντιγόνων. Το γεγονός ότι ο TGFβ ανευρίσκεται στο έντερο σε μεγάλες ποσότητες διευκολύνει τη διαφοροποίηση των ανερέθιστων (Tnaive) CD4⁺CD25⁻ σε TH3. Αν και η διέγερση των TH3 γίνεται κατά αντιγονοειδικό τρόπο, η κατασταλτική τους δράση μεσολαβείται από τον TGFβ και δεν είναι αντιγονοειδική. Όπως και τα nTregs, τα TH3 εκφράζουν στην επιφάνειά τους CTLA-4 και η διέγερσή τους μέσω αυτού έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του TGFβ. Η ενεργοποίηση των TH3 ακολουθείται από έκφραση τόσο του CD25 όσο και του FoxP3. Τα TH3 λεμφοκύτταρα καταστέλλουν τις TH1 και TH2 μεσολαβούμενες απαντήσεις, ενώ επάγουν την παραγωγή IgA από τα πλασματοκύτταρα (Jonuleit και συν. 2003, Jiang και συν. 2004, Lan και συν. 2005).

Άλλα ρυθμιστικά κύτταρα Πέραν των σαφώς καθορισμένων CD4⁺ Tregs, σχετικά πρόσφατα απομονώθηκε από εμβρυικούς και νεογνικούς θύμους ένας πληθυσμός CD8⁺CD25⁺ T λεμφοκυττάρων τα οποία παρουσιάζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα nTregs. Εντοπίζονται στις ίδιες περιοχές του θύμου και εκφράζουν FoxP3 και GITR mRNA, ενώ σε αντίθεση με τα δραστικά CD8⁺CD25⁺ T λεμφοκύτταρα δεν διαθέτουν κυτταρολυτικό μηχανισμό (διατηρίνη και κοκκιοένζυμο A). Μετά από πολυκλωνική διέγερση δεν παράγουν κυτταροκίνες, αλλά εκφράζουν στη μεμβράνη τους CTLA-4 και TGFβ. Επίσης, έχει περιγραφεί η ύπαρξη CD8⁺ γδ T κυττάρων που παράγουν IL-10 ή TGFβ και στα οποία έχει αποδοθεί ανοσορρυθμιστική δράση. Τέλος, ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες έχουν αποδοθεί και στα NK T κύτταρα, που συνεκφράζουν δείκτες των NK και T κυττάρων και εκκρίνουν ρυθμιστικές κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένης της IL-10 (Piccirilo & Thornton 2004, Piccirilo και συν. 2004, Jiang και συν. 2004).

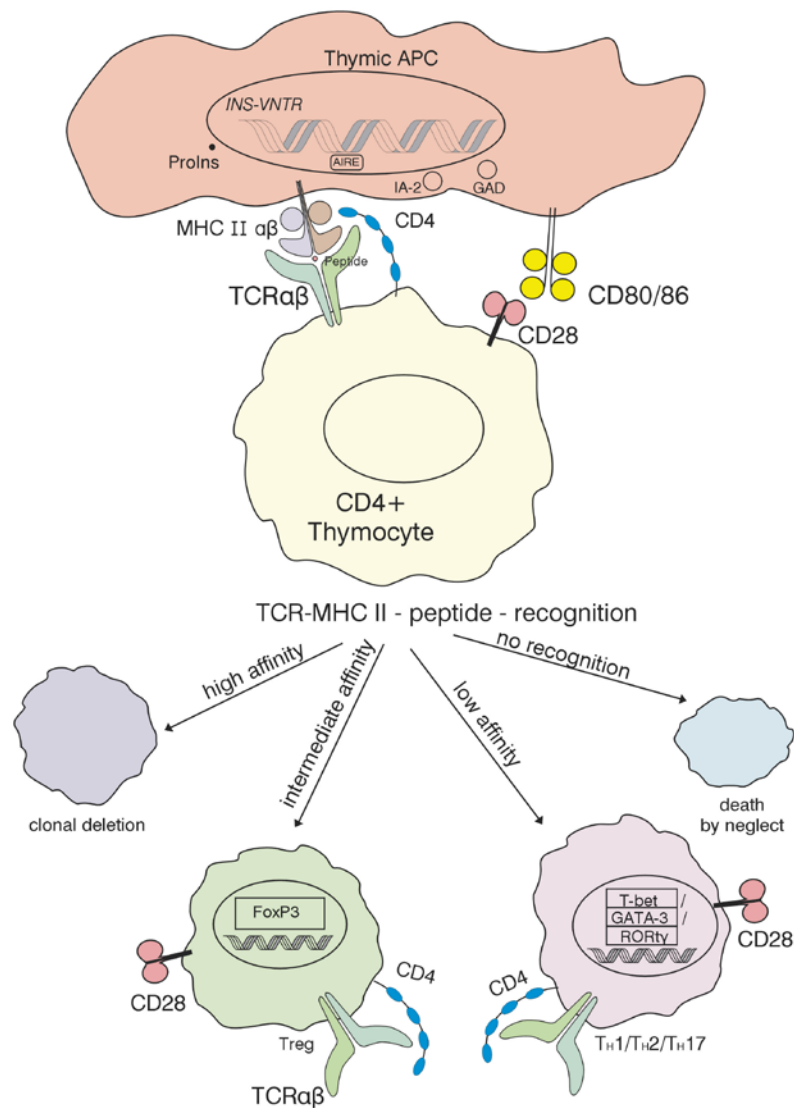
1.8.3.2 Παραγωγή των Tregs

Τα nTregs παράγονται στο θύμο μετά από επιλογή που μεσολαβείται από τη σύνδεση των TCR υποδοχέων τους με ίδια πεπτίδια που παρουσιάζονται από MHC

μόρια τάξης II στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (κυρίως επιθηλιακών) πρώτα στον φλοιό και κατά συνέχεια στον μυελό (Dorf και συν 1984). Η μοίρα των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων καθορίζεται από την ένταση της αλληλεπίδρασης αυτής. Η μηδενική αλληλεπίδραση οδηγεί σε θάνατο (death by neglect), η χαμηλής συγγένειας σύνδεση σε θετική επιλογή, ενώ η υψηλή συγγένεια αλληλεπίδρασης σε αρνητική επιλογή (Dorf και συν 1984, Saoudi και συν. 1996, Stephens και συν. 2001). Η επιλογή των nTregs απαιτεί αρκετά υψηλή συγγένεια σύνδεσης, μικρότερη όμως από αυτή που θα μπορούσε να προκαλέσει την αρνητική επιλογή τους. Έτσι, μια ενδιάμεση ένταση αλληλεπίδραση μεταξύ TCR-αυτοπεπτιδίου-MHC II επάγει γενετικό πρόγραμμα για την παραγωγή των Tregs που περιλαμβάνει: προαγωγή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-2 (CD25), του CTLA-4 και άλλων κατασταλτικών μορίων (cAMP, HLA-DQ, TGF β , αδενosίνη), μείωση της έκφρασης της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-7 (CD127) και «παύση» των γονιδίων που κωδικοποιούν για την IL-2 και τις άλλες ειδικές για τις αποκρίσεις T_H1, T_H2 και T_H17 κυτταροκίνες ((IFN γ , IL-4, and IL-6, αντίστοιχα), καθώς και για τους αντίστοιχους για κάθε απάντηση μεταγραφικούς παράγοντες T-bet, GATA-3 and ROR γ T (Saoudi και συν. 1996, Stephens και συν. 2001, Dieckmann και συν. 2001, Jonuleit και συν. 2001, Baecher-Allan και συν. 2001, Fontenot και συν. 2005, Liu και συν. 2006, Gavin και συν. 2007, Zheng και Rudnesky 2007, Singh και συν. 2007) (Εικ. 1.9).

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3, αφού πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν ότι μόνος ή σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ενεργοποιεί ή καταστέλλει τα παραπάνω γονίδια που είναι σημαντικά για τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων σε ρυθμιστικά κατά τη διαδικασία αυτή της επιλογής στο θύμο. Το επίπεδο έκφρασης του Foxp3 στα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs) είναι ανάλογο της έκφρασης της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-2 (CD25) και αντιστρόφως ανάλογο της έκφρασης της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-7 (CD127) (Gavin και συν. 2007, Zheng και συν. 2007, Zheng και Rudnesky 2007). Κάποιες μελέτες έχουν δείξει έκφραση του Foxp3 και σε Teffectors κύτταρα. Αξίζει να σημειώσουμε ότι στα Tregs η χρωματίνη που περιβάλλει το γονίδιο για τον μεταγραφικό παράγοντα Foxp3 είναι ολοκληρωτικά απομεθυλιωμένη, ένδειξη σταθερής και υψηλής έκφρασης του Foxp3 στα Tregs, σε αντίθεση με την περίπτωση έκφρασής του από τα Teffectors. Επίσης, η πρωτεΐνη AIRE (AutoImmune REgulator)

που εκφράζεται κυρίως σε επιθηλιακά καθώς και δενδριτικά κύτταρα του μυελού του θύμου και αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα υπό τον έλεγχο του οποίου βρίσκεται η έκφραση πολλών ειδικών αυτοπεπτιδίων (μεταξύ των οποίων και ινσουλίνη, GAD, IA-2) είναι μεγάλης σημασίας, μιας και ασθενείς με μεταλλάξεις της παρουσιάζουν αυτοάνοσο φαινότυπο και μειωμένη κατασταλτική λειτουργία των Tregs (Peterson και συν. 1998, Pugliese και συν. 2001, Narendran και συν. 2006, Kekalainen και συν. 2007).



Εικ. 1.9 Η μοίρα των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων καθορίζεται από την ένταση της αλληλεπίδρασης των TCR υποδοχέων τους με αυτοαντιγόνα που παρουσιάζονται από τάξης II MHC μόρια στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του θύμου (Σ. Α. Πάσχου, Α. Τσατσούλης, Γ. Κ. Παπαδόπουλος)

Ποικίλα είναι τα ευρήματα σχετικά με την εξάρτηση της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των Tregs στην περιφέρεια από την παρουσία κυτταροκινών, που παράγονται ως αποτέλεσμα συνδιεγερτικών μηνυμάτων B7-CD28. Τα Tregs μπορεί να μην παράγουν τα ίδια IL-2, φαίνεται όμως ότι επηρεάζονται ουσιαστικά από την κυτταροκίνη αυτή (Earle και συν. 2005). Πειραματικές μελέτες σε ποντίκια ανέδειξαν ότι η γενετική εξάλειψη της IL-2 έχει ως αποτέλεσμα πληθυσμούς με δυσλειτουργικά Tregs και εκδηλώσεις αυτοανοσίας (Danke και συν. 2004, Earle και συν. 2005, Yamanouchi και συν. 2007). Επίσης, ο παράγοντας TGFβ (Transforming Growth Factor β) θεωρείται απαραίτητος για την επιβίωση των Tregs τουλάχιστον στην περιφέρεια, καθώς επάγει και διατηρεί την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 (Pyzik και συν. 2007). Ποντίκια με απόλειψη των γονιδίων για TGFβ- και TGFβRII παρουσιάζουν σοβαρή λεμφοκυττάρωση, μειωμένα ποσοστά Tregs και εκδηλώσεις αυτοανοσίας, έναν φαινότυπο που προσομοιάζει αρκετά σ' αυτόν του *scurfy* ποντικού (Li και συν. 2007).

Σε αντίθεση με τα nTregs που παράγονται στο θύμο και αποτελούν ξεχωριστή σειρά κυττάρων, τα iTregs δημιουργούνται στην περιφέρεια μέσα από μια διεργασία διαφοροποίησης των παρθένων (Tnaive) CD4⁺CD25⁻ T λεμφοκυττάρων. Συρρέουσες ενδείξεις υποστηρίζουν ότι η διαφοροποίηση των παρθένων (Tnaive) CD4⁺CD25⁻ T λεμφοκυττάρων σε επαγωγίμα Tregs (iTregs) ελέγχεται κυρίως από τον τύπο και την κατάσταση ενεργοποίησης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και ειδικά των δενδριτικών που παρουσιάζουν σ' αυτά το αντιγόνο. Όπως είναι γνωστό, τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) μετά από την πρόσληψη του αντιγόνου μετατρέπονται σε ώριμα DCs και επάγουν τη διαφοροποίηση των παρθένων (Tnaive) CD4⁺CD25⁻ T λεμφοκυττάρων σε δραστικά κύτταρα T_H1 ή T_H2. Κάτω από ορισμένες συνθήκες όμως, τα DCs αντί να ωριμάσουν μεταπίπτουν σε μια ανεκτικογόνο κατάσταση ανωριμότητας, η οποία προσανατολίζει τη διαφοροποίηση των ανερέθιστων (Tnaive) CD4⁺CD25⁻ T λεμφοκυττάρων προς την κατεύθυνση των iTregs. Τέτοιες συνθήκες είναι η παρουσία IL-10 ή άλλων ανοσοτροποποιητικών παραγόντων, όπως η βιταμίνη D3, και η έκθεση σε ορισμένα βακτήρια ή ενδογενείς πρωτεΐνες. Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί. Η επικρατούσα άποψη είναι ότι, όταν επί απουσίας σημάτων κινδύνου, τα άωρα DCs προσλαμβάνουν τα αυτοαντιγόνα, εισπνεόμενες ή από του στόματος πρωτεΐνες ή αποπτωτικό υλικό δεν ωριμάζουν αλλά μεταναστεύουν στους λεμφαδένες ως άωρα κύτταρα. Στους λεμφαδένες, η επαφή των άωρων DCs με τα T

κύτταρα συνεπάγεται ανεπαρκή σηματοδότηση, η οποία δεν είναι ικανή να επάγει τη διαφοροποίηση των τελευταίων προς δραστικά T κύτταρα, με αποτέλεσμα αυτά να μεταπίπτουν σε Tregs. Αντίθετα, αν η ενσωμάτωση των ίδιων αντιγόνων από τα DCs γίνει παρουσία σημάτων κινδύνου (φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, μικροβιακά προϊόντα, συνδέτες των TLRs κτλ) τα DCs ενεργοποιούνται, εκφράζουν συνδιεγερτικά μόρια, εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες κι έτσι τελικά επάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε δραστικά κύτταρα (Jonuleit και συν. 2003, Piccirilo & Thornton 2004, Piccirilo και συν. 2004, Jiang και συν. 2004, Lindebo και συν. 2004, Lan και συν. 2005).

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το ισχυρό ενδεχόμενο ότι και τα ίδια τα $CD4^+CD25^{high}$ nTregs επάγουν την ανάπτυξη των διαφόρων υποπληθυσμών iTregs. Πιο συγκεκριμένα, η επαφή των $CD4^+CD25^{high}$ nTregs με τα $CD4^+CD25^-$ T λεμφοκύτταρα, αφού καταστείλει την ενεργοποίησή τους και τα μετατρέψει σε ανεργικά κύτταρα, επάγει στα τελευταία την ικανότητα παραγωγής TGFβ ή IL-10 διαφοροποιώντας τα κατ' αυτόν τον τρόπο σε κατασταλτικά κύτταρα. Ο μηχανισμός αυτός φέρεται ως μεταδιδόμενη ανοχή (infectious tolerance). Η εκλεκτική επαγωγή της ικανότητας παραγωγής TGFβ ή IL-10 από τα $CD4^+CD25^-$ T λεμφοκύτταρα έχει σχέση με την έκφραση διαφορετικών ιντεγκρινών (ενσωματινών) από τα nTregs. Ανάλογα με τη μεμβρανική έκφραση ιντεγκρινών θεωρείται ότι υπάρχουν δύο διακριτοί πληθυσμοί nTregs στην περιφέρεια: τα nTregs που εκφράζουν ιντεγκρίνη $\alpha_4\beta_7$ και μετατρέπουν τα $CD4^+CD25^-$ T λεμφοκύτταρα σε κύτταρα που παράγουν IL-10 (Tr1 like cells) και εκείνα που εκφράζουν ιντεγκρίνη $\alpha_4\beta_1$ και επάγουν τη δημιουργία κυττάρων που εκκρίνουν TGFβ (TH3 like cells). Οι ιντεγκρίνες $\alpha_4\beta_1$ και $\alpha_4\beta_7$ είναι υποδοχείς που εξυπηρετούν την εγκατάσταση (homing) των T κυττάρων στους φλεγμαίνοντες ιστούς και στους βλεννογόνους αντίστοιχα. Η επέκταση της κατασταλτικής ικανότητας των nTregs σε συμβατικά $CD4^+$ κύτταρα διαφορετικής αντιγονικής ειδικότητας εξηγεί το τεράστιο κατασταλτικό δυναμικό ενός τόσο μικρού κυτταρικού πληθυσμού, όπως είναι τα nTregs στην περιφέρεια, και τη δυνατότητά του να ελέγχει συγκριτικά πολύ μεγαλύτερης έκτασης αυτοαντιδραστικές αποκρίσεις. Γενικώς, οι συνθήκες επαγωγής της παραγωγής Tregs στην περιφέρεια αποτελούν σημαντικό πεδίο έρευνας. Και τούτο επειδή διαφαίνονται σημαντικά περιθώρια εξωγενούς ελέγχου της περιφερικής ανοχής, γεγονός που αναμένεται να οδηγήσει στη διαμόρφωση νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων για τα αυτοάνοσα νοσήματα και τις μεταμοσχεύσεις (Jonuleit και συν. 2003, Piccirilo & Thornton 2004, Piccirilo και

συν. 2004, Jiang και συν. 2004, Lindebo και συν. 2004, Lan και συν. 2005, Janeway και συν. 2005).

1.8.3.3 Κατασταλτική λειτουργία των Tregs

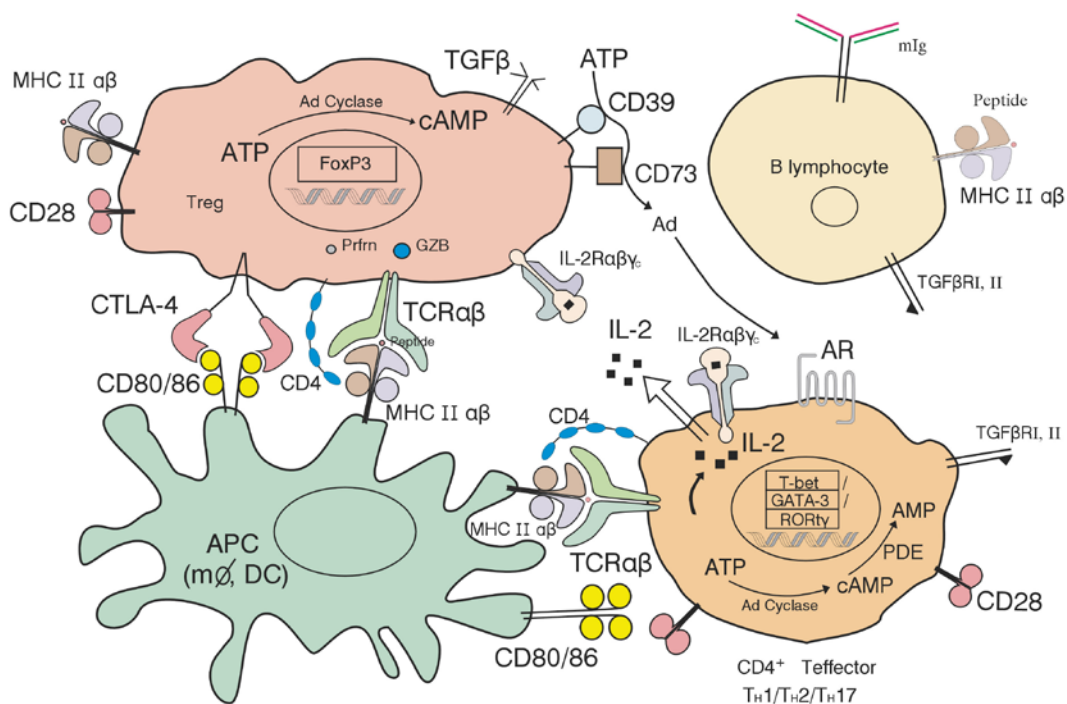
Τα Tregs καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την εκκριτική δραστηριότητα των CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων, καθώς και την κυτταρολυτική δράση των τελευταίων (Saoudi και συν. 1996, Stephens και συν. 2001, Dieckmann και συν. 2001). Η παρουσία IL-2 φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την πλήρη εκδήλωση του φαινομένου, μιας και ασθενής κατασταλτική δράση μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και απουσία της IL-2. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί, οι οποίοι κατά πάσα πιθανότητα λειτουργούν συμπληρωματικά αλλά στις λεπτομέρειές τους παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι και σε αρκετές περιπτώσεις τα ερευνητικά αποτελέσματα εμφανίζονται αντικρουόμενα. Γενικά, η ενεργοποίηση και κατασταλτική δράση των Tregs ακολουθεί αυτή των Teffectors και χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκφραση παραγόντων ενεργοποίησης που ανευρίσκονται στα Teffectors και από την άλλη συσσώρευση κατασταλτικών μορίων ενδοκυττάρια, μεμβρανικά και εξωκυττάρια (cAMP, CTLA-4, HLA-DQ, TGFβ, αδενοσίνη), μέσω των οποίων επιδρούν σε T κύτταρα αλλά και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Saoudi και συν. 1996, Stephens και συν. 2001, Dieckmann και συν. 2001, Jonuleit και συν. 2001, Baecher-Allan και συν. 2001, Zheng και συν. 2007, Gavin και συν. 2007, Zheng και συν. 2007).

Από τις κυτταροκίνες που έχουν προταθεί ως διαμεσολαβητές της κατασταλτικής δράσης των Tregs, αν και για την IL-10 έχει μάλλον αποκλειστεί ένας τέτοιος ρόλος, δεν έχει συμβεί το ίδιο και για τον TGFβ, ειδικά τη μεμβρανική μορφή του (mTGFβ). Υπέρ της πιθανής εμπλοκής του συνηγορεί και η έκφραση της θρομβοσπονδίνης, του παράγοντα που τον ενεργοποιεί, σε όλα τα Tregs. Πάντως, φαίνεται ότι κατασταλτική τους λειτουργία αυτή ασκείται κατά κύριο λόγο μέσω άμεσης διακυτταρικής επαφής και αρκετοί τρόποι έχουν ήδη προταθεί. *In vitro* βρέθηκε ότι ανθρώπινα Tregs μπορούν άμεσα να «σκοτώσουν» CD4⁺ και CD8⁺ T κύτταρα μέσω της οδού της περφορίνης (Grossman και συν. 2004). Αν και δεν υπάρχουν αποδείξεις για μια τέτοιου είδους κυτταροτοξικότητα *in vivo*, ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο της διατητρίνης πάσχουν από το σύνδρομο HLH (haemophagolytic lymphohistiocytosis), γεγονός που καταδεικνύει την εμπλοκή της διατητρίνης στη διαδικασία της ανοσορρύθμισης, ίσως και μέσω Tregs (Stepp και συν. 1999).

Στα Tregs παρατηρείται μείωση της έκφρασης της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-7 (CD127), καθώς και καταστολή του γονιδίου για τη φωσφοδιεστεράση 4, του ενζύμου που αποδομεί το μόριο cAMP. Συνεπώς, παρατηρείται αύξηση της ποσότητας του cAMP στα Tregs σε σχέση με τα Teffectors (Liu και συν. 2006, Zheng και συν. 2007, Gavin και συν. 2007, Zheng και συν. 2007). Έτσι, η επαφή τους με τα Teffectors (μέσω αλληλεπίδρασης MHC II-πεπτιδιο-TCR) οδηγεί σε gap junctions που επιτρέπουν τη μεταφορά σημαντικής ποσότητας μορίων cAMP στα τελευταία, καθιστώντας τα έτσι ανενεργά (Borpp και συν. 2007). Επιπρόσθετα, οι ενδονουκλεάσες CD39 και CD73 στην επιφάνεια των Tregs προάγουν την παραγωγή αδενοσίνης (adenosine) από ATP που συνδέεται με τους κατασταλτικούς υποδοχείς αδενοσίνης στην επιφάνεια των γειτονικών Teffector κυττάρων (Borsellino και συν. 2007).

Πέρα από την κατασταλτική δράση των Tregs στα Teffector κύτταρα, απόλυτα ουσιαστική θεωρείται η αλληλεπίδρασή τους με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) ως βασικής σημασίας φαινόμενο για την εκδήλωση της λειτουργίας τους. Υποστηρίζεται ότι τα Tregs μπορεί να παρεμβαίνουν ανασταλτικά ή και ανταγωνιστικά στην έκφραση των συνδιεγερτικών μηνυμάτων (Salomon και συν. 2001, Donner και συν. 2002, Ueda και συν. 2003, Anjos και συν. 2004, Janeway 2005). Το μεμβρανικό μόριο CTLA-4 συνδέεται με 20 φορές μεγαλύτερη συγγένεια στους CD80/CD86 (B7 family) υποδοχείς που βρίσκονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα από ότι συνδέεται με το CD28. Η αλληλεπίδραση CD28-CD80/86 λειτουργεί ως δεύτερο σήμα στη διαδικασία αναγνώρισης μέσω του τριμερούς TCR-MHC II-πεπτιδιο. Επομένως, όταν CTLA-4⁺ Tregs συνδέονται σθεναρά με τους υποδοχείς CD80/86 στην επιφάνεια των APC παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση APC-Teffector που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των τελευταίων. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι αυτή η σύνδεση του CTLA-4 των Tregs με τα B7-1 και B7-2 της επιφάνειας των APCs έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή 2,3-διοξυγονάσης της ινδολοαμίνης (IDO). Η IDO καταλύει μέσω της οδού των κυνουρενινών την αποδόμηση της τρυπτοφάνης που είναι απαραίτητη για την επιβίωση των λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την επαγωγή ανοσοκαταστολής. Στα ποντίκια τα γονίδια για το CTLA-4 και τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP3 πρέπει να εκφράζονται στα ίδια Tregs έτσι ώστε τα κύτταρα αυτά να είναι λειτουργικά, γεγονός που αποδεικνύει την εξάρτηση της έκφρασης κατασταλτικού φαινότυπου των Tregs

από τον παράγοντα FoxP3. Πέρα από το CTLA-4 και άλλα χαρακτηριστικά κατασταλτικά μόρια της επιφάνειας των Tregs (HLA-DQ, TGFβ) φαίνεται να συμμετέχουν στις ανοσολογικές συνάψεις με τα αντιγονοπαρουσιαστικά καθώς και τα T κύτταρα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανοσορρυθμιστική τους δράση (Salomon και συν. 2001, Donner και συν. 2002, Ueda και συν. 2003, Anjos και συν. 2004).



Εικ. 1.10 Αλληλεπιδράσεις των Tregs με άλλα κύτταρα του ανοσολογικού κυκλώματος (Σ. Α. Πάσχου, Α. Τσατσούλης, Γ. Κ. Παπαδόπουλος)

Ανεξάρτητα από τους μοριακούς μηχανισμούς και τις πορείες της ρυθμιστικής δράσης των Tregs, φαίνεται ότι δρουν σε διάφορα τοπικοπεριοχικά επίπεδα. Αρχικά, τα Tregs ρυθμίζουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων κατά την πρώτη ανοσολογική δραστηριοποίηση εντός του λεμφαδένα. Στη φάση αυτή, τα Tregs συναθροίζονται μαζί με τα δενδριτικά κύτταρα στη συμβολή φλοιού-μυελού κυρίως στους επιχώριους λεμφαδένες (Bluestone και συν. 2005, Haribhai και συν. 2007) Επιπρόσθετα, τα Tregs μπορούν να μετακινηθούν στο σημείο της φλεγμονής και να ρυθμίσουν κι εκεί την ανοσιακή απάντηση (Bluestone και συν. 2005). Έχει πειραματικά αποδειχθεί σε ποντίκια που υπέστησαν

ανοσοποίηση ότι τα Tregs πληθαίνουν εντυπωσιακά στους εγγύς λεμφαδένες αν και λίγο αργότερα από τα κύτταρα T effector, μιας και τα τελευταία είναι η μόνη πηγή IL-2, που είναι απολύτως απαραίτητη για την ανάπτυξη και επιβίωση των Tregs (Haribhai και συν. 2007). Στην αιχμή της ανοσολογικής απάντησης τα Tregs φάνηκε ότι αυξήθηκαν εκεί κατά περίπου 3.5 φορές, ενώ τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα μόνο κατά 2 φορές. Τα Tregs ήταν κατά κύριο λόγο παρόντα στην ζώνη T και στα σύνορα των ζωνών T/B, υπήρχαν όμως κάποια και στη ζώνη B. Βρισκόταν δε σε επαφή με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, άλλα T κύτταρα καθώς και άλλα Tregs. Μετά το πέρας της ανοσοποίησης, οι πληθυσμοί τόσο των T effector όσο και των Treg κυττάρων ελαττώθηκαν στα αρχικά επίπεδα (Bluestone και συν. 2005, Haribhai και συν. 2007). Σε μια άλλη μελέτη με διαγονιδιακούς ποντικούς που εκφράζουν το «διαβητογόνο» B2DC5 TCR, φάνηκε ότι τα Tregs είχαν μεγαλύτερης διάρκειας επαφές με τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) στους εγγύς λεμφαδένες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα CD4⁺ T effector κύτταρα (Samy και συν. 2005).

1.8.3.4 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 και Tregs

Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 η πρώτη εργασία σχετική με Tregs ανέδειξε μειωμένα ποσοστά του CD4⁺CD25⁺ πληθυσμού των T λεμφοκυττάρων σε μικρής ηλικίας νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς σε σύγκριση με μεγαλύτερους σε ηλικία φυσιολογικούς μάρτυρες (Kukreja και συν. 2002). Μελέτες με νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς τύπου 1 που ακολούθησαν δεν κατέληξαν σε τέτοιες παρατηρήσεις, ακόμα κι όταν πραγματοποιήθηκε κάποιος διαχωρισμός μεταξύ CD4⁺CD25⁺ (T effectors) και CD4⁺CD25^{high} (Tregs) (Lindley και συν. 2005, Putnam και συν. 2005, Brusko και συν. 2005, Tree και συν. 2006). Ακόμα και οι μέσες τιμές των ποσοστών των κυτταρικών πληθυσμών διέφεραν σημαντικά, ενώ σε μια παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των Tregs με την ηλικία σε φυσιολογικούς μάρτυρες (Brusko και συν. 2005). Σε μια μεταανάλυση που περιέλαβε τις εργασίες αυτές τονίστηκε ότι οι διαφορές στο διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών ήταν ένα πρόβλημα κι ότι η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν ασφαλές κριτήριο χαρακτηρισμού των Tregs, αν και έγινε σαφές ότι σε χαμηλότερα επίπεδα μπορεί να εκφράζεται παροδικά και σε ενεργοποιημένα T effectors (Tree και συν. 2006). Βέβαια, μια μεταγενέστερη μελέτη που συμπεριέλαβε ως ρυθμιστικά όλα τα T λεμφοκύτταρα που εξέφραζαν FoxP3 δεν

ανέδειξε διαφορές στα ποσοστά αυτών των κυττάρων μεταξύ ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και φυσιολογικών μαρτύρων (Brusko και συν. 2007).

Σε μια άλλη εργασία βρέθηκε ότι Tregs νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών τύπου 1 παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση για απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) σε σύγκριση με τα Tregs φυσιολογικών ή και διαβητικών με μακρά διάρκεια νόσου (Glisic-Milosavljevic και συν. 2007). Μία επόμενη έδειξε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο αριθμό Tregs στο περιφερικό αίμα διαβητικών 18 μήνες μετά από σύντομη θεραπεία με anti-CD3 λίγο μετά τη διάγνωση γεγονός που συνόδευε την παρατηρούμενη ελάττωση των απαιτήσεων για ινσουλίνη από τη μια και τα υψηλότερα επίπεδα C πεπτιδίου από την άλλη (Chatenoud και συν. 2007). Τα αποτελέσματα από τα 4 χρόνια follow-up αυτής της σημαντικής μελέτης αναμένονται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Μεγάλου ενδιαφέροντος είναι επίσης η παρατηρούμενη αύξηση των Tregs στην περίπτωση των μεταμοσχεύσεων (Graca και συν. 2002). Αν και οι αναφορές σχετικά με τη συμπεριφορά των Tregs στη μεταμόσχευση συγκεκριμένα παγκρεατικών νησιδίων στον άνθρωπο είναι ελάχιστες, φαίνεται ότι η κυκλοσπορίνη καταστέλλει την επαγωγή τους από Teffectors (Gao και συν. 2007). Η παράταση της επιβίωσης παγκρεατικών αλλομοσχευμάτων που επιτεύχθηκε με την έγχυση υβριδικής πρωτεΐνης αποτελούμενης από CTLA-4-Ig σε ποντίκια πιστεύεται ότι σχετίζεται με τον καταβολισμό της τρυπτοφάνης από τα δενδριτικά κύτταρα μέσω του ενζύμου IDO (Grohmann και συν. 2002, Munn και συν. 2002). Ακόμα, η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση μυελού των οστών με σύνδρομο IPEX σε 4 αγόρια που μεταξύ των άλλων εκδήλωσαν και Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 οδήγησε σε ελάττωση των επιπέδων του αυτοαντισώματος GADA καθώς και της ημερήσιας δόσης ινσουλίνης στον μικρότερο σε ηλικία ασθενή (1.5 ετών) που συνοδεύτηκαν από εμφάνιση ικανού αριθμού Tregs (Rao και συν. 2007).

Εκτός από τον άνθρωπο, σε μελέτες που έγιναν και σε διαβητικά ποντίκια NOD διαφαίνονται διάφορες διαταραχές -ποσοτικές και ποιοτικές- στον κυτταρικό πληθυσμό των Tregs (You και συν. 2005, Ochado και συν. 2005). Έτσι, μπορεί Tregs από NOD ποντίκια μέχρι 4 εβδομάδων να είναι ικανά να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και με τα Tregs μεγαλύτερων σε ηλικία διαβητικών ποντικών (You και συν. 2005). Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η εξέλιξη του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 εξαρτάται από τη λεπτή ισορροπία μεταξύ των Teffectors και των Tregs τόσο εντός των επιχώριων

λεμφαδένων όσο και εντός του παγκρεατικού ιστού (Salomon και συν. 2000, Green και συν. 2002). Μετά την εμφάνιση της νόσου, η κατάσταση της αυτοανοσίας εξελίσσεται καθώς το ποσοστό των Teffectors προς τα Tregs συνεχώς αυξάνεται (Bour-Jordan και συν. 2002). Από την άλλη, φάνηκε ότι ο παράγοντας TGF- β μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού των Tregs στο σημείο της βλάβης είτε μέσω επαγωγής της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 σε κύτταρα Teffector ή μέσω πολλαπλασιασμού των ήδη υπαρχόντων Tregs (Pyzik και συν. 2007). Αποδείχθηκε ότι μια παροδική έγχυση TGF β στα παγκρεατικά νησιδιοκύτταρα NOD ποντικών κατά την αρχική προδιαβητική φάση είναι ικανή να αναστείλει την έναρξη της νόσου, διεγείροντας παράλληλα την αύξηση των Tregs (Reng και συν. 2004). Τέλος, ενόψει των ιδιαίτερων ιδιοτήτων που προσδίδονται στο αλληλόμορφο MHC II (H2-A^{g7}) των ποντικών NOD ήταν σημαντικό να προσδιοριστεί αν και σε ποιο βαθμό το αλληλόμορφο αυτό διαμορφώνει κάποια από τα χαρακτηριστικά των Tregs σε αυτό το πειραματικό μοντέλο (Moustakas και συν. 2000). Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός ότι φάνηκε πως η απαλοιφή της αμετάβλητης αλυσίδας MHC II (Ii) από ποντίκια NOD παρέχει διαρκή προστασία από το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, συνοδευόμενη και από αύξηση του αριθμού των Tregs. Ακόμα μεγαλύτερη αύξηση σε αυτόν τον πληθυσμό παρατηρείται σε ποντίκια με απάλειψη του γονιδίου Ii και γενετικό υπόστρωμα H-2^k και H-2^b (Mellanby και συν. 2006).

Εκτός από το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, ισχυρές ενδείξεις για το σημαντικό ρόλο των Tregs στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης προέρχονται κι από άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Έτσι, στην περίπτωση της σοβαρής νεανικής αρθρίτιδας για την οποία δοκιμάστηκε θεραπεία με μεταμόσχευση αυτόλογων βλαστικών κυττάρων με ή χωρίς ολική ακτινοβολία φάνηκε ότι μετά από 4.7 έτη μέσης περιόδου παρακολούθησης η αποκατάσταση της ανοσολογικής ισορροπίας συσχετίστηκε με αύξηση του αριθμού των Tregs, που ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμα πριν τη θεραπεία (Wulffraat και συν. 2006, Verbsky και συν. 2007). Παρομοίως, η θεραπεία ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα με Fc-TNFR2 συμπλέγματα συνοδεύτηκε από αύξηση του ποσοστού των λειτουργικών Tregs στην περιφέρεια παράλληλα με την υποχώρηση των κλινικών συμπτωμάτων (Ehrenstein και συν. 2004, Verbsky και συν. 2007). Και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. σκλήρυνση κατά πλάκας, APS II) φάνηκε ότι κατά την έναρξη της νόσου μπορεί να υπάρχει ποσοτική ή/και ποιοτική ανεπάρκεια των Tregs στο περιφερικό αίμα ή και στο σημείο της φλεγμονής επίσης (Viglietta και συν. 2004, Kriegel και συν. 2004, Luther και συν. 2005). Σε ασθενείς με πολλαπλή

σκλήρυνση έχει παρατηρηθεί και σχετική ελάττωση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 στο κυτταρόπλασμα των Tregs (Huan και συν. 2005). Βέβαια, πρέπει εδώ να τονιστεί ότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των διαφόρων μελετών πρέπει να γίνεται με επιφύλαξη, καθώς για τον καθορισμό των Tregs δεν χρησιμοποιήθηκαν πάντα οι ίδιοι δείκτες, τα δεδομένα δε για την ειδικότητα της σταθερής και υψηλής μεμβρανικής έκφρασης του CD25 (αλυσίδα α του υποδοχέα για την IL-2), της ενδοκυττάριας έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 και της χαμηλής μεμβρανικής έκφρασης του CD127 (αλυσίδα α του υποδοχέα για την IL-7) είναι σχετικά πρόσφατα.

1.9 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs) σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ποικίλου χρόνου διάγνωσης (νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας νόσου) σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές. Επιπλέον, η συσχέτιση των ήδη χρησιμοποιούμενων δεικτών αυτοανοσίας στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (αυτοαντισώματα κατά GAD65, IA2 και ινσουλίνης) με τα ευρήματα στον βραχίονα της κυτταρικής ανοσίας.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά θεωρούμε σημαντικό τον ακριβή καθορισμό του πληθυσμού των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs), επειδή οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί ως τώρα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των ανθρώπινων Tregs είναι και πολύ λίγες και παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα. Είναι δε σημαντικό να τονιστεί ότι σπάνια έγινε πραγματικός διαχωρισμός μεταξύ $CD25^{high}$ Tregs και $CD25^{low}$ Teff, ενώ συνήθως θεωρούνται ως T ρυθμιστικά κύτταρα, σε ανθρώπους και σε ποντίκια, όλα τα $CD4^{+}CD25^{+}$ T λεμφοκύτταρα.

Στη συνέχεια, σκοπός μας είναι η μελέτη του ποσοστού εμφάνισης των Tregs (ως ποσοστό των $CD4^{+}$ T κυττάρων) σε νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας διαβητικούς τύπου 1 σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Θα αναζητήσουμε έτσι ποσοτικές διαφορές μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών, αλλά και θα παρατηρήσουμε τυχόν μεταβολές στον αριθμό τους ανάλογα με τη διάρκεια της νόσου που μπορούν να φωτίσουν πτυχές της παθογένεσης και της εξέλιξης του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1.

Πέρα όμως από τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των Tregs θα μελετήσουμε και ποιοτικές συνιστώσες του φαινοτύπου τους. Θα συμπεριλάβουμε στις αναλύσεις μας δείκτες που έχουν συνδεθεί με τη ρυθμιστική λειτουργία των Tregs (FoxP3, CD28, CD45RO, CD127, CD152, TGFβ και τον τύπου II υποδοχέα του TGFβRII), γονιδιακά προϊόντα ή τους υποδοχείς τους που έχουν συσχετιστεί κληρονομικά με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (HLA-DR, HLA-DQ, CD25, InsR, CD152), καθώς και πρωτεΐνες που συνδέονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό (CD27) από τη μια και απόπτωση (CD95) από την άλλη. Θα μελετήσουμε τόσο τη συχνότητα όσο και την ένταση της έκφρασή τους στη μεμβράνη ή/και στο κυτταρόπλασμα (CD152, FoxP3) των Tregs με κυτταρομετρία ροής και στη συνέχεια θα αναζητήσουμε διαφορές μεταξύ διαβητικών τύπου 1 και υγιών μαρτύρων, αλλά και μεταξύ

νεοδιαγνωσθέντων και μακράς διάρκειας ασθενών, για να παρατηρήσουμε τυχόν μεταβολές κατά την πορεία της νόσου.

Επίσης, με τη χρήση των μεθόδων ELISA και RIA θα προχωρήσουμε στον προσδιορισμό των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 (GADA), IA-2 (IA-2A) και ινσουλίνης (IAA) στον ορό ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ποικίλου χρόνου διάγνωσης (νεοδιαγνωσθέντων και μακράς διάρκειας νόσου) και υγιών εθελοντών. Έτσι, θα καταγράψουμε τα επίπεδα της διαταραχής και του χυμικού σκέλους της ανοσολογικής απάντησης που μπορεί να προηγείται της κλινικής εμφάνισης διαβήτη για χρόνια.

Τέλος, με τη χρήση στατιστικών προγραμμάτων σκοπεύουμε να ελέγξουμε συσχετίσεις για τη συχνότητα και την ένταση έκφρασης μεταξύ των διαφόρων μεμβρανικών και ενδοκυττάρων δεικτών, καθώς και μεταξύ των δεικτών αυτών και του ποσοστού εμφάνισης Tregs, της έκφρασης των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων και της ηλικίας των συμμετεχόντων στη μελέτη τόσο σε διαβητικούς τύπου 1 όσο και σε φυσιολογικούς μάρτυρες.

Οι γνώσεις αυτές θα είναι πολύτιμες, ώστε να αποτελέσουν ουσιαστικό υπόβαθρο της ανοσολογικής εκτίμησης για πιθανή μελλοντική ανοσοπαρέμβαση με ή χωρίς μεταμόσχευση νησιδίων για θεραπεία της νόσου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ασθενείς και Μάρτυρες

Στη μελέτη συμμετείχαν 13 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, 26 ασθενείς με μακρά διάρκεια Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και 32 εθελοντές υγείς 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 αυστηρά οι όροι της συνθήκης του Helsinki.

Οι νεοδιαγνωσθέντες διαβητικοί τύπου 1 (9 άρρενες και 4 θήλειες) μέσης ηλικίας 12.5 ± 9.4 ετών ήταν ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και εξετάστηκαν από ιατρό της Ενδοκρινολογικής Κλινικής ή παραπέμφθηκαν από ιδιώτες ιατρούς στα εξωτερικά ιατρεία της Ενδοκρινολογικής Κλινικής. Η λήψη αίματος στους ασθενείς αυτούς έγινε κατά τη δεύτερη εβδομάδα μετά τη διάγνωση κι ενώ είχαν ρυθμιστεί τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα τους με ινσουλinoθεραπεία.

Οι ασθενείς με μακρά διάρκεια Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (12 άρρενες και 14 θήλειες) μέσης ηλικίας 26.7 ± 9.2 ετών ήταν ασθενείς που παρακολουθούνται στα τακτικά εξωτερικά ιατρεία της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Είχαν μέση διάρκεια νόσου τα 11.6 ± 7.4 έτη (από 2 ως 25 έτη) και τα επίπεδα της Γλυκοζυλιωμένης Αιμοσφαιρίνης (HbA1c) τους ήταν 7.4 ± 0.43 % (από 6.9 ως 8.4 %). Μόνο ένας από αυτούς ελάμβανε επιπλέον αγωγή εκτός της ινσουλίνης (ατορβαστατίνη, 10 mg την ημέρα για έλεγχο της υπερχοληστερολαιμίας).

Οι φυσιολογικοί μάρτυρες (13 άρρενες και 19 θήλειες) που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν υγείς εθελοντές με μέση ηλικία τα 25.3 ± 11 έτη. Τα άτομα αυτά δεν ελάμβαναν καμιά φαρμακευτική αγωγή, δεν έπασχαν τα ίδια από οποιοδήποτε αυτοάνοσο νόσημα και ούτε είχαν κανέναν πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενή με αυτοάνοσο νόσημα. Επίσης, άτομα με υποψία λοίμωξης ή όποιας μορφής φλεγμονής αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Η λήψη φλεβικού αίματος γινόταν το πρωί (από τις 9:00 ως τις 10:00 π.μ.) από νηστικούς ασθενείς και μάρτυρες μετά από φυσιολογικό ύπνο. Τα δείγματα αίματος αποθηκεύονταν σε σωληνάρια γενικής αίματος της BD Vacutainer (BD, Plymouth, UK) στα οποία υπάρχει επίστρωση αντιπηκτικού K3E 3,6 mg. Η επεξεργασία των

κυττάρων για κυτταρομετρία ροής ξεκινούσε το αργότερο μέσα σε 10 λεπτά από τη λήψη του αίματος. Επίσης, επαρκής ποσότητα αίματος τοποθετούνταν σε σωληνάρια Wasserman της BD (BD Vacutainer SST II Advance) και στη συνέχεια φυγοκεντρώνταν στις 3.000 rpm για 10 λεπτά στη φυγόκεντρο της Μονάδας Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ο υπερκείμενος ορός αφαιρούνταν με σιφόνιο αναρρόφησης και αποθηκεύονταν σε σωληνάρια Eppendorf των 2 ml στους -20 °C για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια στην εκτέλεση ELISA και RIA για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων.

2.2 Κυτταρομετρία Ροής

2.2.1 Μέθοδος

Η Κυτταρομετρία Ροής είναι η τεχνολογία με την οποία γίνονται ποικίλες μετρήσεις και προσδιορισμοί σε κατάλληλα προετοιμασμένα κύτταρα ή οργανίδια κυττάρων. Η προετοιμασία των κυττάρων ή οργανιδίων αυτών έγκειται στη σήμανσή τους με φθορίζουσες χρωστικές. Τα υπό έλεγχο σωματίδια, ρέουν με μορφή εναιωρήματος μπροστά από μία ή δύο φωτεινές ακτίνες LASER, δια μέσου θαλάμου με ταχύτητα αρκετών χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. Η μέτρηση, αναγνώριση και η διαλογή γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός. Τα εκπεμπόμενα φωτεινά σήματα από το κάθε κύτταρο ή οργανίδιο κατευθύνονται στους ανιχνευτές, αναλύονται και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτά τα σήματα ενισχύονται, μετρούνται και τέλος διοχετεύονται υπό μορφή ψηφιακών ενδείξεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος με ειδικό λογισμικό τα επεξεργάζεται και τα παρουσιάζει. Στο κάθε κύτταρο ή οργανίδιο μετρούνται το μέγεθος, η κοκκίωση και τα άλλα χαρακτηριστικά της ενδοκυτταρικής ή εξωκυτταρικής επιφάνειας, που έχουν σημειωθεί με τις φθορίζουσες χρωστικές. Με βάση αυτά τα δεδομένα, τα κύτταρα ή τα σωματίδια ταξινομούνται σε σύνολα και υποσύνολα και στη συνέχεια γίνεται η στατιστική επεξεργασία τους.

Προέκταση της τεχνολογίας αυτής είναι ο Κυτταροδιαχωρισμός Ροής (cell sorting), κατά τον οποίο οποιοδήποτε μεμονωμένο κύτταρο ή σωματίδιο, που έχει τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, απομακρύνεται επιλεκτικά από το εναιώρημα. Αυτό επιτυγχάνεται με τον εγκλωβισμό τους σε σταγονίδια, τα οποία φορτίζονται ηλεκτρικά επιλεκτικά. Στη συνέχεια τα σταγονίδια περνούν μέσα από ηλεκτροστατικό πεδίο, όπου, εκείνα που επιλέχθηκαν, εκτρέπονται από την πορεία

τους και οδηγούνται για να συλλεχθούν σε ειδικό χώρο. Η σπουδαιότητα της μεθόδου έγκειται στο ότι εξασφαλίζει τη μέτρηση και ανάλυση των σημάτων του κάθε κυττάρου ή σωματιδίου τα οποία εστιάζονται ένα ένα στο σημείο ανάλυσης, όπου γίνεται η μέτρηση των διαφόρων παραμέτρων.

Γενικά, ο κυτταρομετρητής ροής μπορεί να αναλύσει οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό στο οποίο μπορεί να προσδεθεί χρωστική. Εάν η σύνδεση της χρωστικής είναι στοιχειομετρική (δηλ. η ποσότητα της δέσμευσης της χρωστικής είναι ανάλογη της ποσότητας του κυτταρικού συστατικού), η μέτρηση είναι ποσοτική και υψηλής ακριβείας.

Πίνακας 2.1 Ιδιότητες και Συστατικά των κυττάρων που μετρώνται με Κυτταρομετρία Ροής

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ
Κυτταρική Διάμετρος	DNA
Κατανομή Χρωστικής	Πυρηνικά Αντιγόνα
Εσωτερική Δομή	Ένζυμα
Δυναμικό Μembrάνης	Πρωτεΐνες
Πυρηνική Διάμετρος	RNA
Εμβαδόν Επιφανείας	Ορμόνες
Όγκος	Αντιγόνα Επιφανείας

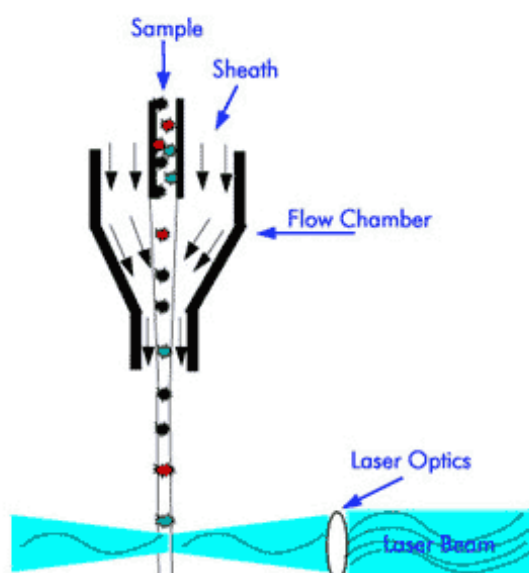
Ένας Κυτταρομετρητής Ροής αποτελείται από τρία συστήματα:

1. Σύστημα Ροής
2. Οπτικό Σύστημα
3. Σύστημα ανίχνευσης, επεξεργασίας και μετατροπής σε ηλεκτρονικό σήμα

Σύστημα Ροής Πρόκειται για ένα υδραυλικό σύστημα, που εξαναγκάζει τα κύτταρα ή τα σωματίδια να ρέουν το ένα μετά το άλλο μπροστά από την ακτίνα Laser (από τα αρχικά Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), απορροφώντας τα από το εναιώρημα εργασίας. Αυτό επιτυγχάνεται με τη εισαγωγή του δείγματος στο κέντρο ενός καναλιού, στο οποίο ρέει ένα αδρανές υγρό (Sheath Fluid). Το κανάλι είναι κατάλληλα σχεδιασμένο προκειμένου το δείγμα να ρέει κατά μήκος του κεντρικού του άξονα, περιβαλλόμενο από το αδρανές υγρό χωρίς να αναμιγνύεται, δηλαδή σαν να βρίσκεται μέσα σε μια θήκη (sheath). Το κανάλι

τοποθετείται μέσα στο θάλαμο ροής (flow chamber). Εκεί, ανάλογα με τις υδροδυναμικές ρυθμίσεις, επιτυγχάνεται και η υδροδυναμική εστίαση, έτσι ώστε το κύτταρο ή το σωματίδιο να έρχεται σε επαφή με την ακτίνα Laser με προσέγγιση +1 μm .

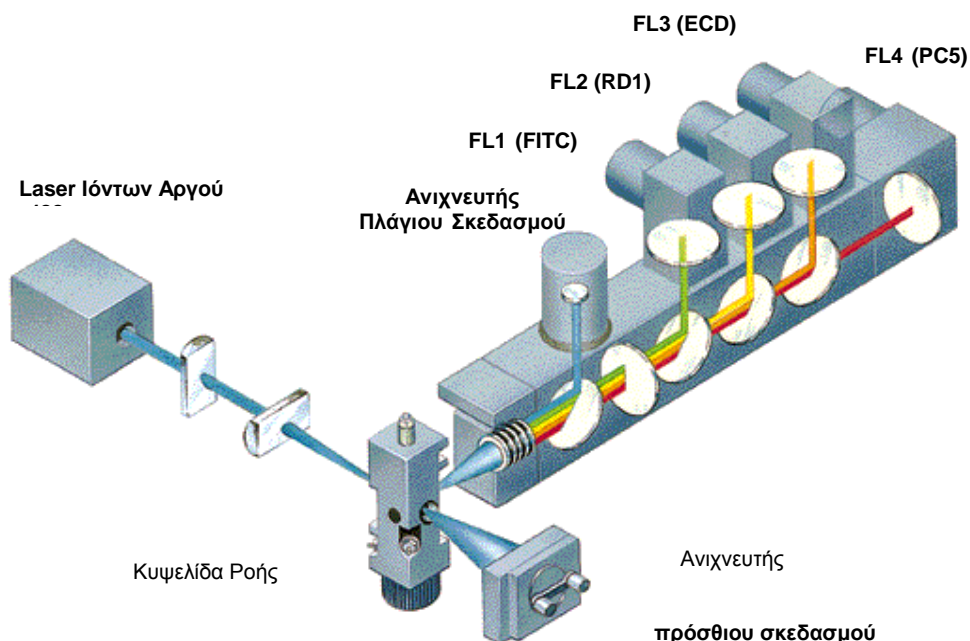
Οι θάλαμοι ροής διακρίνονται σε θαλάμους νηματικής ροής (Laminar Flow) και σε θαλάμους τυρβώδους ορίου (turbulent boundary), ανάλογα με την υδροδυναμική τους αρχή. Επίσης, οι θάλαμοι ροής διακρίνονται και σε θαλάμους ανάλυσης (analytical chambers), για κυτταρομετρητές μέτρησης της σκέδασης και του φθορισμού, και σε θαλάμους διαλογής (sorting chambers), γι' αυτούς που διαθέτουν και σύστημα διαλογής κυττάρων ή σωματιδίων.



Εικ. 2.1 Διάταξη κυψελίδας σε Κυτταρομετρητή Ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπτωση σε ένα κύτταρο (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής-Αρχές και Κλινικοερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος 2007)

Οπτικό Σύστημα Το σύστημα αυτό συλλέγει τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από τα κύτταρα ή τα σωματίδια όταν προσπίπτει πάνω τους η φωτεινή δέσμη φωτός της συσκευής laser. Στη συνέχεια αναλύεται η συλλεγόμενη ακτινοβολία, η οποία αντιστοιχεί στη σκέδαση του φωτός και στον εκπεμπόμενο φθορισμό καθορισμένης

έντασης με βάση το φθοριόχρωμα. Η σκέδαση του φωτός δημιουργείται όταν το κύτταρο ή το σωματίδιο δέχεται την κάθετη προς τη διεύθυνση ροής δέσμη της λυχνίας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία απορροφάται κατά ένα μέρος από το κύτταρο και κατά το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται στην κατεύθυνση της προέκτασης (ευθεία γραμμή) της ακτίνας Laser, με γωνία 1° - 20° , ονομάζεται πρόσθια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Forward Scattered Light, FSC) και είναι ευθέως ανάλογη προς το μέγεθος του κυττάρου ή του σωματιδίου. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται σε κατεύθυνση κάθετη προς τον άξονα της ακτίνας Laser, με γωνία 90° , ονομάζεται κάθετη ή πλάγια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Right Angle Scatter, ή Side Scattered Light, SSC) και είναι ανάλογη προς την κοκκίωση (granularity) του κυτταροπλάσματος του κυττάρου ή σωματιδίου.



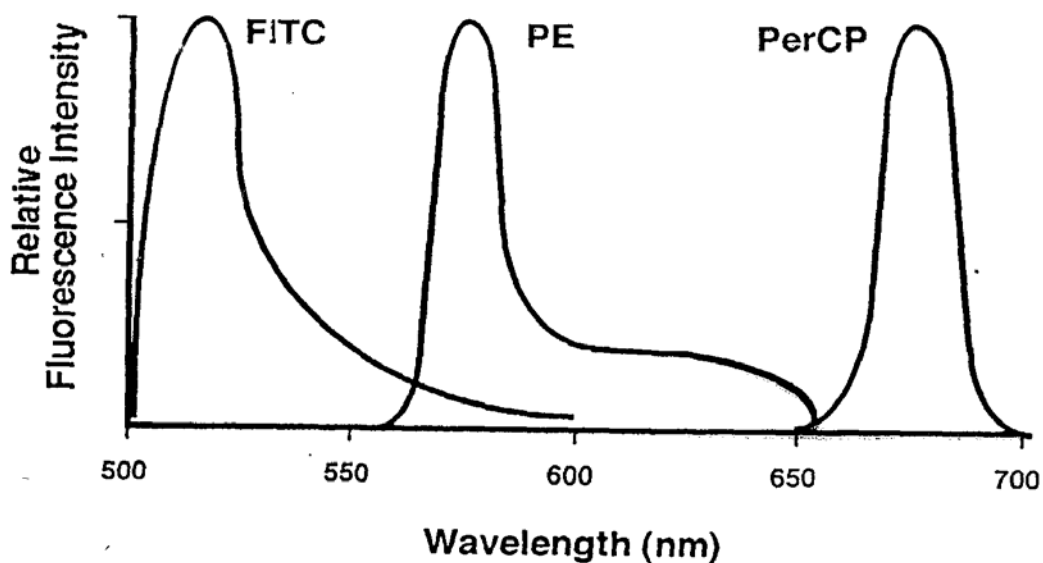
Εικ 2.2 Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διάταξης ενός κυτταρομετρητή ροής. Διαθέτει μία φωτεινή πηγή Laser ιόντων Αργού (488 nm) και τέσσερις φωτοπολλαπλασιαστές για την ταυτόχρονη ανίχνευση 4 φθοριοχρωμάτων (FITC, PE, ECD/PI και PC5/PercP/PC5.5) (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής-Αρχές και Κλινικοερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος 2007)

Όταν κατά τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος τα κύτταρα ή τα σωματίδια σημανθούν με φθορίζουσες ουσίες, όπως η ισοθειοκυανική φθοουρεσκεΐνη (FITC, πράσινο), η τετραμεθυλοροδαμίνη, η R-φυκοερυθρίνη (PE, κόκκινο), η περιδινούχος χλωροφύλλη-A-πρωτεΐνη (PerCP, κόκκινο του Texas) ή άλλες φθορίζουσες ουσίες προσδεδεμένες στα μονοκλωνικά αντισώματα, παράγεται φθορισμός. Τα φθοριοχρώματα αυτά διεγείρονται από την προσπίπτουσα ακτινοβολία (διεγείρουσα) και στη συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος της διεγείρουσας, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε φθοριόχρωμα (πίνακας 2.2). Στην Εικ. 2.3 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής των φθοριοχρωμάτων FITC, PE και PerCP, που είναι τα περισσότερο διαδεδομένα δεσμευμένα φθοριοχρώματα στα αντισώματα του εμπορίου.

Πίνακας 2.2 Φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στην Κυτταρομετρία Ροής

ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΟΥΣΙΑ	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ LASER (nm)	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΕΚΠΟΜΠΗΣ (nm)
FITC	488 nm	525 nm
PE	488 nm	578 nm
ECD	488 nm	613 nm
PerCP	488 nm	675 nm
Alexa Fluor 405	405, 407	421
Alexa Fluor 430	405, 407	541
Alexa Fluor 488	488	519
Alexa Fluor 633	633, 635, 647	647
Alexa Fluor 647	633, 635, 647	665
Alexa Fluor 660	633, 635, 647	690
Alexa Fluor 680	633, 635, 647	702
APC	633, 635, 647	661

(Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής-Αρχές και Κλινικοερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος 2007)



Fluorescence Emission Spectra

Εικ. 2.3 Τα φάσματα εκπομπής των φθοριοχρωμάτων FITC, PE και PerC (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής-Αρχές και Κλινικοερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος 2007)

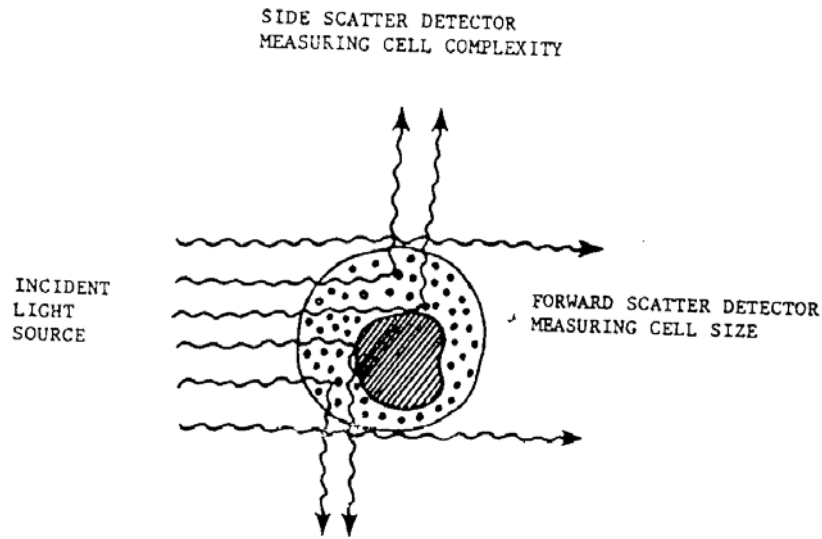
Από τα φθοριοχρώματα που αναφέρθηκαν η FITC παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση και διεγείρεται στα 495 nm, ενώ η PE στα 495 nm και 550 nm. Ακτινοβολία μήκους κύματος 488 nm με Laser αργού διεγείρει και τις δύο χρωστικές και η μεν FITC εκπέμπει μέγιστο φθορισμό στα 520 nm (πράσινος φθορισμός, FL1), η δε PE εκπέμπει μέγιστο φθορισμό στα 575 nm (κόκκινος φθορισμός, FL2). Οι δύο διαφορετικοί φθορισμοί FL1 και FL2 συλλέγονται, αναλύονται και μετρούνται με κατάλληλα συστήματα διχροϊκών κατόπτρων και φίλτρων. Τα διχροϊκά κάτοπτρα είναι τοποθετημένα στην πορεία της φωτεινής δέσμης υπό γωνία 45°, ενώ τα φίλτρα είναι τοποθετημένα κάθετα.

Οι χρωστικές PE, FITC και PerCP μπορούν να συνδεθούν με κατάλληλα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα, που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα της κυτταρικής επιφάνειας ή της ενδοκυττάριας επιφάνειας. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα της ανίχνευσης των αντιγόνων στην επιφάνεια του καθενός από τα μετρούμενα κύτταρα, με αποτέλεσμα την δυνατότητα χαρακτηρισμού και ταξινόμησης του κάθε κυττάρου σε υποπληθυσμούς, σύμφωνα με τους συνδυασμούς που έχουν σχεδιαστεί. Με την ολοκλήρωση των μετρήσεων των φωτεινών σημάτων

σκέδασης και φθορισμού, σε κάθε κύτταρο αντιστοιχεί μια τετράδα τιμών (FSC, SSC, FL1, FL2), η οποία μας δίνει τα δεδομένα για το μέγεθος, την κοκκίωση και το βαθμό έκφρασης των δύο αντιγόνων. Υπάρχει βέβαια δυνατότητα για περισσότερες αναλύσεις με 4 χρώματα μέσω 2 lasers.

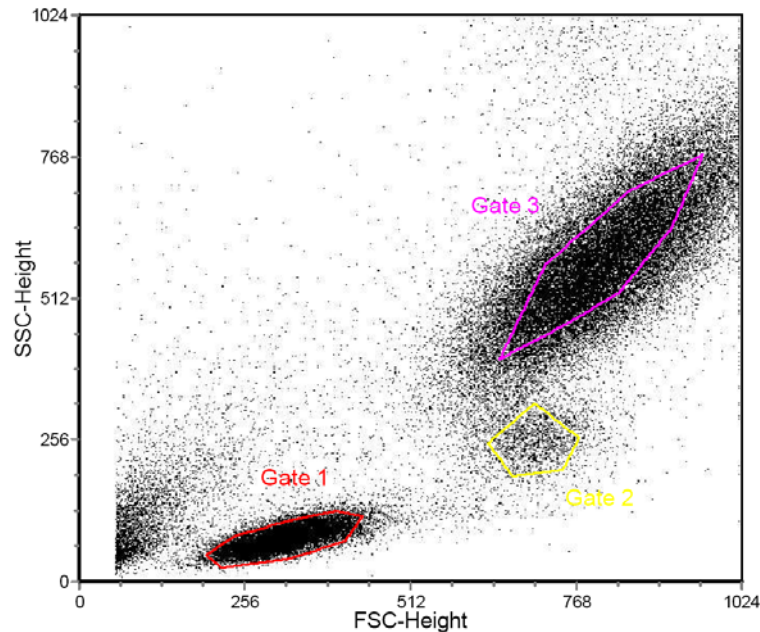
Σύστημα ανίχνευσης, επεξεργασίας και μετατροπής σε ηλεκτρονικό σήμα
Στους κυτταρομετρητές χρησιμοποιούνται δύο συστήματα ανίχνευσης των φωτεινών δεδομένων που προέρχονται από την σκέδαση και το φθορισμό: α) οι φωτοδιόδοι (PIN diodes) και β) οι φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes. PMTs). Οι PIN έχουν ευαισθησία στις μετρήσεις FSC και SSC, ενώ παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στον φθορισμό. Οι PMTs, αν και μικρότερου φάσματος, διαθέτουν, συγκρινόμενες με τις PIN, μεγαλύτερη ευαισθησία, όχι μόνο στις μετρήσεις FSC και SSC, αλλά και στον φθορισμό. Το παλμικό σήμα που παράγεται μένει στην έξοδο για 15-120 μsec. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, το οποίο λέγεται νεκρός χρόνος, δεν καταγράφονται άλλα σήματα στο σύστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο παρατεταμένος χρόνος να επηρεάζει κυρίως τη διαλογή και σε μικρότερο βαθμό την αναλυτική ικανότητα του Κυτταρομετρητή.

Το παλμικό σήμα αναλύεται ως προς το ύψος, το πλάτος και την επιφάνεια, δίνοντας έτσι πληροφορίες για το μέγεθος, την κοκκίωση και τον φθορισμό των κυττάρων ή σωματιδίων. Η επεξεργασία μπορεί να γίνει είτε γραμμικά, είτε λογαριθμικά μετά από χρήση ενισχυτή (amplifier). Με αυτόν τον τρόπο έχουμε ενίσχυση των ασθενών σημάτων και ταυτόχρονα περιορισμό των ενδείξεων που αντιστοιχούν στα ισχυρά σήματα. Έτσι, όλες οι τιμές λαμβάνονται στην ίδια κλίμακα. Τα δυαδικά αυτά σήματα μεταβιβάζονται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή, ώστε να ακολουθήσουν οι ανάλογες επεξεργασίες των δεδομένων.



Εικ. 2.4 Σχηματική ανάλυση κυττάρου ως προς την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος του (FSC) (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής-Αρχές και Κλινικοερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος 2007)

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων όπως τα Κυτταρογράμματα (Dot Plot), τα οποία σχετίζουν δύο παραμέτρους και χρησιμοποιούνται ευρύτερα. Στην Εικ. 2.5 ένα κυτταρόγραμμα παρουσιάζει το μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων του περιφερικού αίματος. Παρατηρούμε τους τρεις κύριους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα). Στα κυτταρογράμματα ανάλογα με τα δεδομένα που δίνονται στις συντεταγμένες, είναι δυνατόν να παίρνουμε : α) την κοκκίωση στο άξονα των χ και το μέγεθος στον άξονα των ψ ή β) το αντίστροφο. Επίσης, είναι δυνατόν το κυτταρόγραμμα να παρουσιάζει την ένταση ανοσοφθορισμού της έκφραση του πανλευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45 FITC και του CD14 PE.

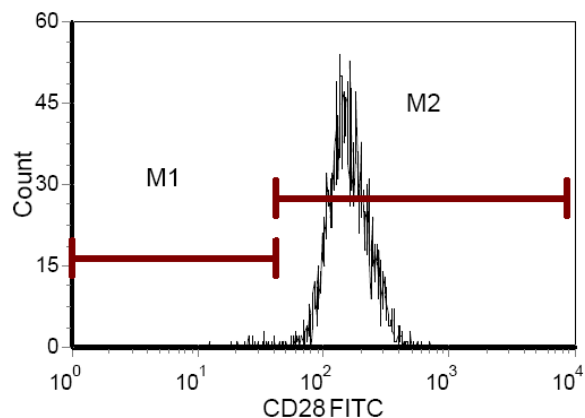


Εικ. 2.5. Κυτταρόγραμμα ως προς το μέγεθος (FSS, άξονας χ) και την κοκκίωση (SSC, άξονας ψ) μετά από λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων περιφερικού αίματος. Διακρίνονται οι τρεις βασικοί υποπληθυσμοί των λευκοκυττάρων (Πύλη 1= λεμφοκύτταρα, Πύλη 2= μονοκύτταρα, Πύλη 3= πολυμορφοπύρηνα)

Άλλοι τρόποι παρουσίασης και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων είναι τα διαγράμματα:

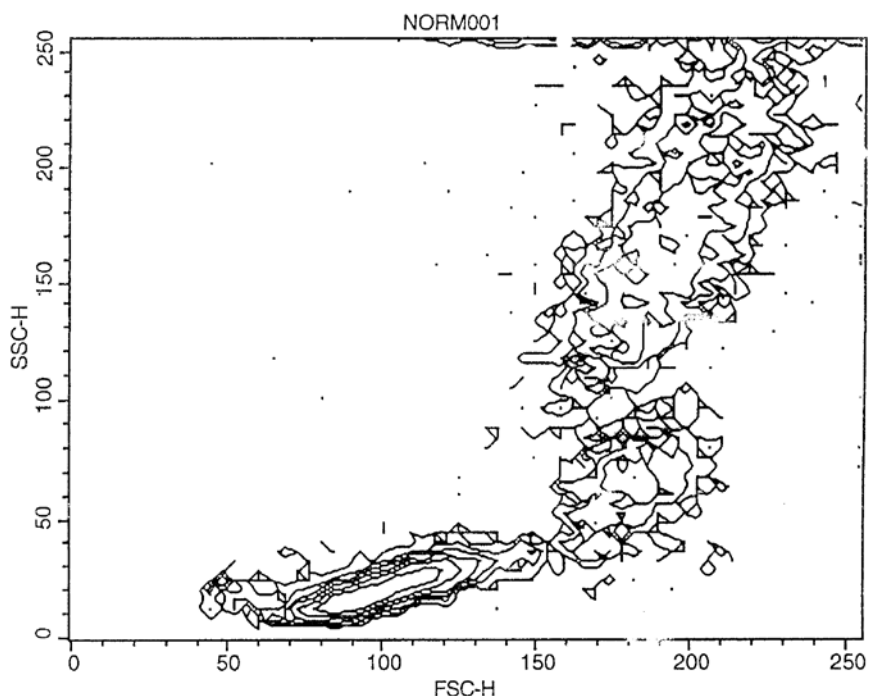
- α) κατανομής συχνοτήτων ή **Ιστόγραμμα** (στην Εικ. 2.6 φαίνεται η ένταση φθορισμού -άξονας χ-, προς τον αριθμό των συμβάντων -άξονας ψ-)
- β) **ισοψών καμπυλών (contour plot)** Εικ. 2.7
- γ) **ισομετρικών (isometric plot)** Εικ. 2.8

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 στα κυτταρογράμματα [-gate - «πύλη»], έχει την ευκαιρία να αναλύσει και να εξάγει σημαντικές παρατηρήσεις από την οριοθετημένη περιοχή. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός του εξεταζόμενου δείγματος σε κύτταρα ή σωματίδια. Τα κύτταρα, των οποίων οι τιμές FSC, SSC βρίσκονται μέσα στα όρια της πύλης, θα αναλύονται ως προς τις ανασοφαινοτυπικές παραμέτρους που έχουν σχεδιαστεί.

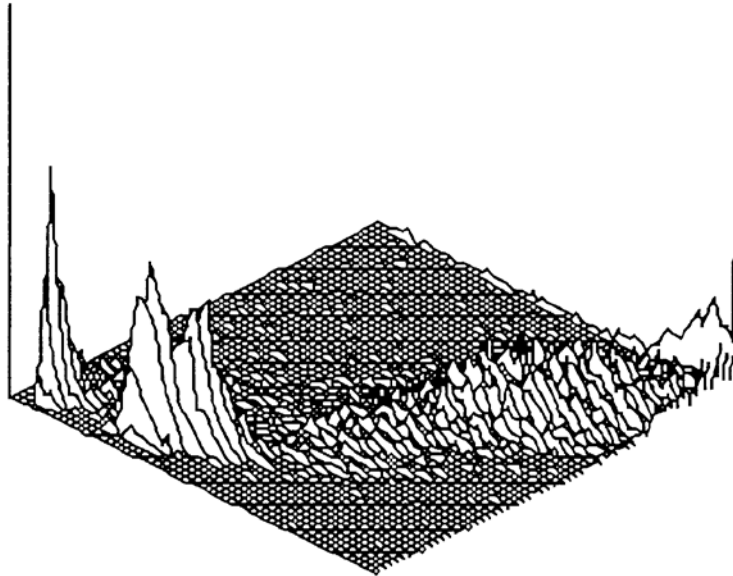


Parameter	Overlay Gate	Marker	Low bound	High bound	# of Events	% of all cells	% of gated cells	Median	Geometric Mean	Arithmetic Mean
CD28FITC	G3	M1	1	42	26	0,05	0,64	33,23	29,56	30,65
CD28FITC	G3	M2	42	8721	4007	7,45	99,36	153,99	158,66	169,52

Εικ. 2.6 Ιστόγραμμα συχνότητας. Στον άξονα χ απεικονίζεται η ένταση του φορισμού και στον άξονα ψ ο αριθμός των συμβάντων. Συγχρόνως παρουσιάζεται και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων



Εικ. 2.7 Διάγραμμα ισοψών καμπυλών (contour plot της FSC (άξονας χ) και SSC (άξονα ψ)).



Εικ. 2.8 Ισομετρικό διάγραμμα (isometric plot) της FSC (άξονας y) έναντι του SSC (άξονας x) και του αριθμού των συμβάντων (άξονας z)

2.2.2 Υλικά

A) Κυτταρόμετρο Ροής FACScan (Becton Dickinson), που βρίσκεται στη Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων

B) Φυγόκεντρος

Γ) Sheath fluid (Haema Line 2 diluent Serono Baker, INC Cat No. 49-00204777-000)

Δ) 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 (154 mM)

Ακολουθεί προσθήκη νερού σε όγκο 900 ml και στη συνέχεια αν χρειάζεται ρύθμιση του pH (επιθυμητή τιμή 7.2 ως 7.4) με προσθήκη 1 M NaOH ή 1 M HCl . Τέλος, προστίθεται νερό μέχρι τελικού όγκου 1 λίτρου. (Η BD προτείνει τροποποιημένο Dulbecco's με pH 7.2 ± 0.2 , 0.01 mol/l PO_4 και 0.15 mol/l NaCl . Πριν τη χρήση γίνεται φιλτράρισμα με φίλτρο 0.2 μm και αποθήκευση στους 2-8 °C).

E) BD FACS Lysing Solution (10x) Cat No. 349202 (περιέχει < 15 % φορμαλδεύδη και < 50 % διεθυλενγλυκόλη)

ΣΤ) BD FACS Permeabilization Solution

Z) Σιφόνια των 10 και 200 μl

H) Συσκευή ανάδευσης Vortex

Θ) Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυστυρολενίου μιας χρήσης 12x75 mm Falcon με πόμα

I) Μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριόχρωμα:

1) leucogate® CD45/CD14 (κλώνοι 2D1 και MOP9 αντίστοιχα) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

2) μάρτυρες ισotόπου γ_1/γ_{2a} -FITC and -PE (κλώνοι X39 και X40 αντίστοιχα) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

3) CD4-PerCP (κλώνος SK3) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

4) CD25 -FITC ή -PE (κλώνος 2A3) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

5) CD27-FITC (κλώνος M-T271) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

6) CD28-FITC (κλώνος CD28.2) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

7) CD45RO-FITC (κλώνος UCL1) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

8) CD95-PE (κλώνος DX2) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

9) CD122-FITC (κλώνος TU27) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

10) CD127-PE (κλώνος Hil-7R-M21) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

11) CD152-PE (κλώνος BNI3, μεμβρανικό και ενδοκυττάριο) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

12) CD220-PE (κλώνος 3B6/IR) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

13) HLA-DR-FITC (κλώνος L243) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

14) HLA-DQ-FITC (κλώνος SK10) από BD-Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

- 15) FoxP3-FITC (κλώνος PCH101) από eBioscience (San Diego, CA, USA),
- 16) TGFβRII-FITC (κλώνος 25508.111) από R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- 17) TGFβ-PE (κλώνος TB21) από IQ Products, Groningen, NL).

Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω αντισώματα δημιουργήθηκαν συνδυασμοί τριπλού φθορισμού που αποθηκεύτηκαν στο λογισμικό SimulSET™ (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA) ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό CellQuest™ (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA)

Συνδυασμοί αντισωμάτων:

1. CD45^{FITC}/ CD14^{PE}/ CD4^{PerCP}
2. Mouse IgG1^{FITC}/ Mouse IgG2a ^{PE}/ CD4^{PerCP}
3. CD45RO^{FITC}/ CD25^{PE}/ CD4^{PerCP}
4. CD122^{FITC}/ CD25^{PE}/ CD4^{PerCP}
5. CD25^{FITC}/ CD152^{PE}/ CD4^{PerCP}
6. CD25^{FITC}/ CD220^{PE}/ CD4^{PerCP}
7. Anti-HLA DR^{FITC}/ CD25^{PE}/ CD4^{PerCP}
8. Anti-HLA DQ^{FITC}/ CD25^{PE}/ CD4^{PerCP}
9. Anti-TGFβ RII^{FITC}/ CD25^{PE}/ CD4^{PerCP}
10. CD25^{FITC}/ Anti-TGFβ ^{PE}/ CD4^{PerCP}
11. CD28^{FITC}/ CD25^{PE}/ CD4^{PerCP}
13. CD27^{FITC}/ CD25^{PE}/ CD4^{PerCP}
14. CD25^{FITC}/ CD95^{PE}/ CD4^{PerCP}
15. Mouse IgG1^{FITC ic}/ Mouse IgG2a ^{PE ic}/ CD4^{PerCP}
16. CD25^{FITC}/ CD152^{PE ic}/ CD4^{PerCP}

17. Anti-human Foxp3^{FITC} ic/ CD25^{PE}/ CD4^{PerCP}

2.2.3 Πρωτόκολλο εκτέλεσης

Τοποθετούνται με σιφόνιο συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε μονοκλωνικό αντισώμα (10 μl από όλα εκτός από το TGFβ PE για το οποίο αρκούν 5 μl) σε διαφορετικό δοκιμαστικό σωλήνα το καθένα με βάση τον παραπάνω συνδυασμό. Χρησιμοποιούνται έτσι 17 σωλήνες Falcon. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας αριθμείται και τα αντισώματα που περιέχει σημειώνονται στην εξωτερική του επιφάνεια.

Προστίθενται με σιφόνιο 100 μl φλεβικού αίματος στον πυθμένα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα όπου ήδη έχουν τοποθετηθεί τα επιθυμητά αντισώματα. Ακολουθεί ανάδευση (vortex) σε χαμηλή ταχύτητα για 5 δευτερόλεπτα και τοποθέτηση των σωλήνων σε σκοτεινό μέρος με θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στο στάδιο αυτό τα αντισώματα προσδένονται στις ειδικές θέσεις για το καθένα στην κυτταρική επιφάνεια.

Στη συνέχεια, προστίθεται 2 ml διαλύματος FACS Lysing, ακολουθεί ήπια ανάδευση (vortex) σε χαμηλή ταχύτητα για 5 δευτερόλεπτα και τοποθέτηση των σωλήνων σε σκοτεινό μέρος με θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται λύση των ερυθρών κυττάρων και το διάλυμα γίνεται σταδιακά διαυγές.

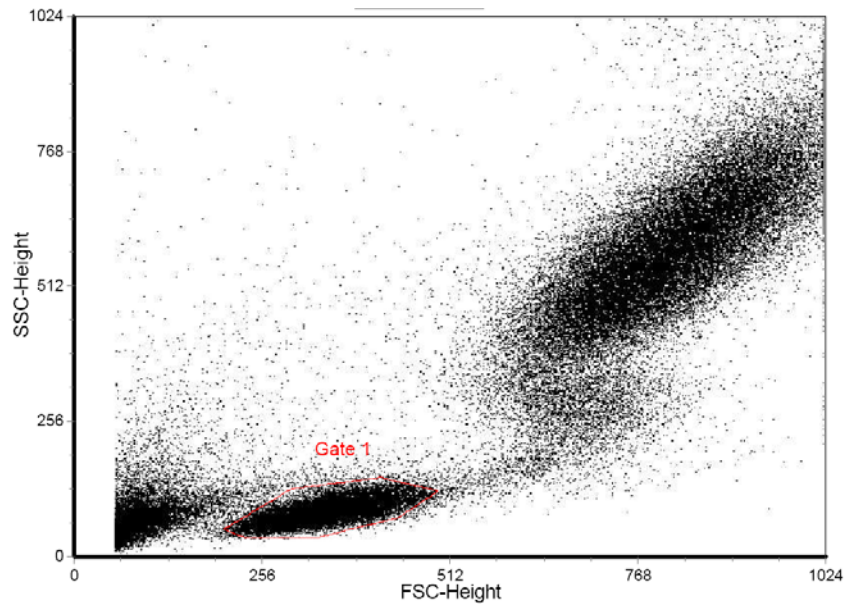
Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές το λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο διάλυμα των δοκιμαστικών σωλήνων αφαιρείται με απότομη κίνηση και τοποθετούνται 2 ml PBS. Ακολουθεί νέα ανάδευση (vortex) σε χαμηλή ταχύτητα για 5 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ξανά φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές το λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η διεργασία επαναλαμβάνεται για άλλη μια φορά (πλύση και φυγοκέντρηση). Τότε το υπερκείμενο διάλυμα των δοκιμαστικών σωλήνων αφαιρείται με απότομη κίνηση και τοποθετείται μικρή ποσότητα PBS, ώστε το τελικό διάλυμα να έχει όγκο περίπου 0.5 ml. Ακολουθεί ανάδευση (vortex) σε χαμηλή ταχύτητα για 5 δευτερόλεπτα και το δείγμα είναι έτοιμο για ανάλυση στο κυτταρόμετρο.

Για την ανίχνευση των ενδοκυττάρων αντισωμάτων (FoxP3-FITC και CD152-PE), μετά τη διαδικασία που περιγράφηκε για τα μεμβρανικά αντισώματα CD4/CD25, προστίθενται στους αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες 10 μl BD FACS Permeabilization Solution και αυτοί τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος με

θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολουθεί μία πλύση με PBS και προσθήκη με πιπέττα 10 µl από κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα (FoxP3-FITC και CD152-PE). Οι σωλήνες τότε τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος με θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Αμέσως μετά προστίθεται μικρή ποσότητα PBS, ώστε το τελικό διάλυμα να έχει όγκο περίπου 0.5 ml. Τέλος, πραγματοποιείται ανάδευση (vortex) σε χαμηλή ταχύτητα για 5 δευτερόλεπτα και το δείγμα είναι έτοιμο για ανάλυση στο κυτταρόμετρο.

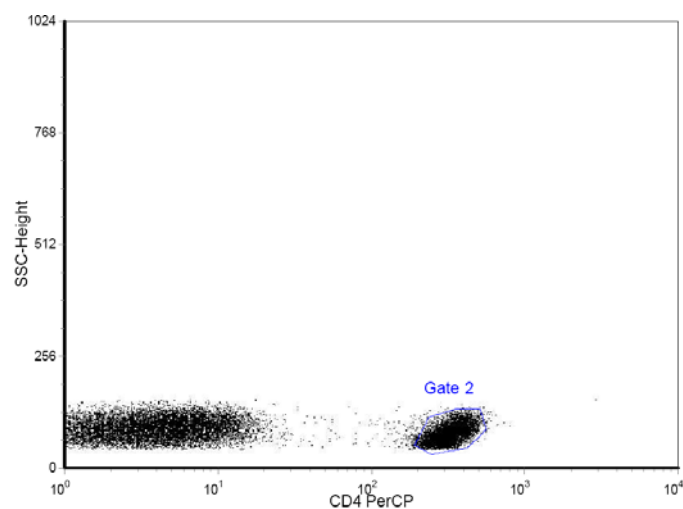
2.2.4 Ανάλυση

Χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης Cell Quest (Becton Dickinson) δημιουργήθηκε αρχικά διάγραμμα dot plot με άξονα X το βαθμό του πρόσθιου σκεδασμού (Forward Scatter-FSC) και άξονα Y το βαθμό του κάθετου σκεδασμού της δεξιάς γωνίας (Side Scatter-SSC). Από το διάγραμμα αυτό και γνωρίζοντας τις ιδιότητες των λεμφοκυττάρων (μικρό μέγεθος και μικρή κοκκίωση) περικλείουμε την ομάδα αυτών των κυττάρων δημιουργώντας την πύλη 1. Από την άλλη, τα πολυμορφοπύρηνα είναι πολυπληθέστερα, έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και κοκκίωση επιτρέποντας τον διαχωρισμό τους και τη δημιουργία του πύλη 3. Τέλος, τα μονοκύτταρα αναγνωρίζονται ως η μικρή ομάδα κυττάρων ανάμεσα στις προηγούμενες και περικλείονται στο πύλη 2. Επιπρόσθετα η χρήση των φθοριοχρωμάτων CD45 και CD14 μας επιτρέπει να διαχωρίσουμε με ακόμα μεγαλύτερη σαφήνεια τις παραπάνω υποομάδες. Το CD45 θεωρείται πανλευκοκυτταρικό αντιγόνο, ενώ το CD14 είναι αντιγόνο επιφανείας που ανιχνεύεται στα μονοκύτταρα. Δημιουργώντας λοιπόν διάγραμμα με άξονα X το CD45 και άξονα Y το CD14 μπορούμε και πάλι να διαχωρίσουμε τους πλυθυσμούς των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων. Τέτοια διαγράμματα χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ασθενή και μάρτυρα που συμμετείχε στη μελέτη ξεχωριστά.



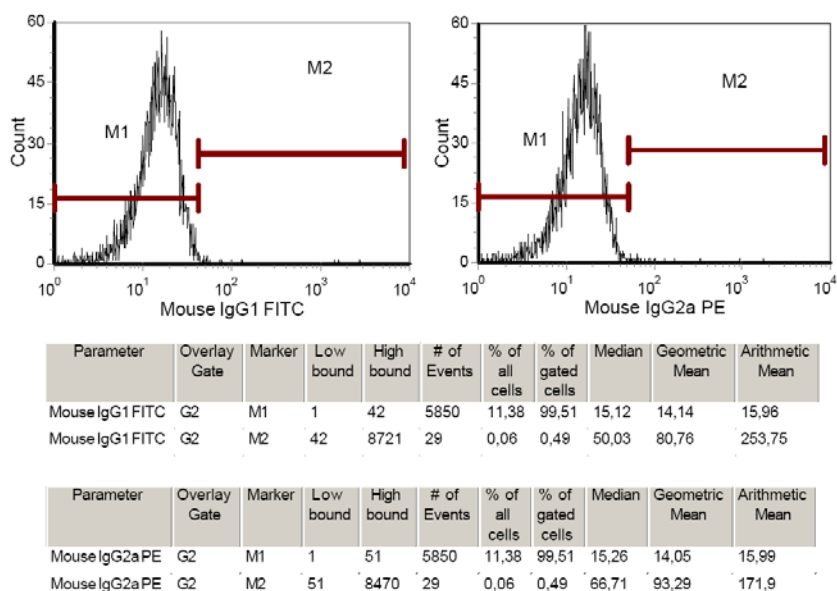
Εικ. 2.10 Διαχωρισμός των λεμφοκυττάρων από τα άλλα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος με κυτταρόγραμμα FSC/SSC

Για την οριοθέτηση του πληθυσμού των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων δημιουργήθηκε κυτταρόγραμμα με άξονα X το βαθμό του φθορισμού του CD4 και άξονα Y το βαθμό του κάθετου σκεδασμού της δεξιάς γωνίας (Side Scatter-SSC) για την ομάδα των λεμφοκυττάρων. Για απόλυτη ακρίβειας στο διάγραμμα συμπεριλήφθηκαν μόνο τα λεμφοκύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα που περικλείονται στο Gate 1 του αρχικού κυτταρογράμματος διαχωρισμού των κυτταρικών πληθυσμών (Εικ. 2.11)



Εικ. 2.11 Διαχωρισμός των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων από τα άλλα λεμφοκύτταρα με κυτταρόγραμμα CD4/SSC

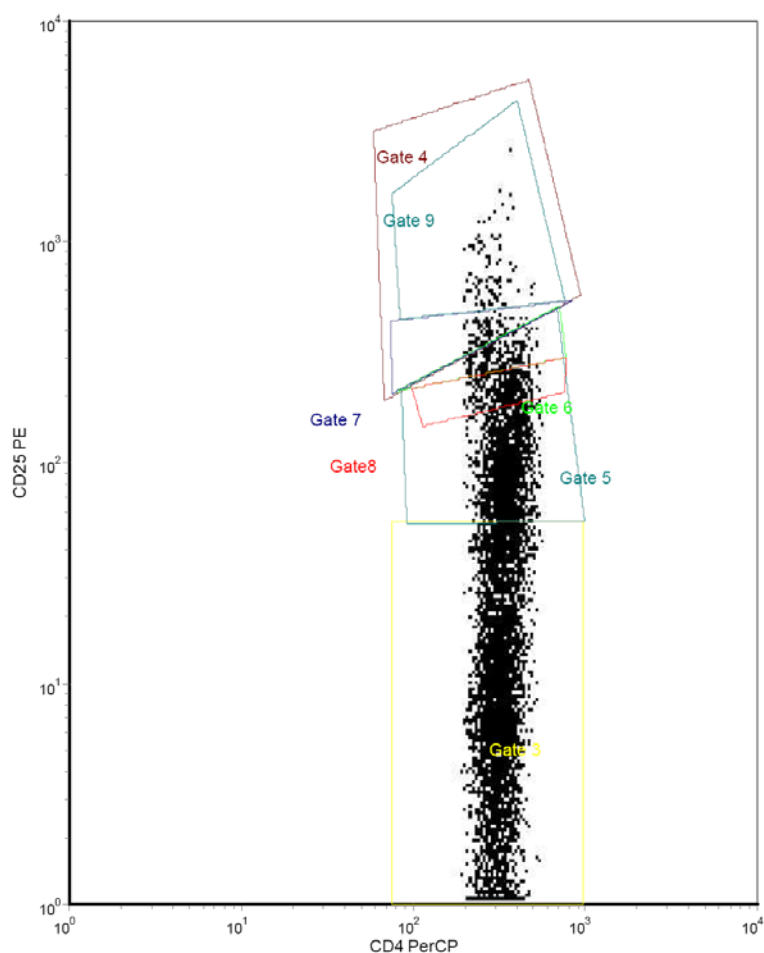
Για να μελετηθεί η ακριβής έκφραση μορίων στην επιφάνεια ή/και στο κυτταρόπλασμα των διαφόρων κυττάρων πρέπει να οριοθετηθεί η ελάχιστη αποδεκτή ένταση φθορισμού και αυτό γίνεται με βάση τον αρνητικό μάρτυρα Mouse IgG1/IgG2a, που περιέχει τα αντίστοιχα φθοριοχρώματα σε ίδια περίπου μοριακή αναλογία πρωτεΐνης. Έτσι, για κάθε πληθυσμό που θέλουμε να αναλύσουμε και διαφορετικά για την μεμβρανική και ενδοκυττάρια έκφραση δημιουργείται ιστόγραμμα με άξονα Χ την ένταση του φθορισμού του Mouse IgG1 ή τη ένταση του φθορισμού του Mouse IgG2a και άξονα Υ τον αριθμό των κυττάρων. Με βάση το διάγραμμα αυτό ορίζεται στο 99.5% της έκφρασης του αρνητικού μάρτυρα το σημείο πέραν του οποίου θεωρείται αληθώς θετική η έκφραση των διαφόρων δεικτών (Εικ. 2.12).



Εικ. 2.12 Θετική θεωρείται η έκφραση πέραν του 99,5 % της έκφρασης του αρνητικού μάρτυρα

Για την ανάλυση των χαρακτηριστικών των Tregs τουλάχιστον 10,000 CD4⁺ λεμφοκύτταρα συμπεριελήφθησαν στην αντίστοιχη πύλη για κάθε ασθενή και μάρτυρα της μελέτης ξεχωριστά. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε κυτταρόγραμμα για τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα και μόνο με άξονα Χ την ένταση του φθορισμού του CD4 και άξονα Υ την ένταση φθορισμού του CD25 για καθένα από τους συνδυασμούς των αντισωμάτων στα διάφορα σωληνάρια. Στα κυτταρογράμματα CD4/CD25 διαχωρίστηκαν εύκολα τα CD4⁺ Th1νε λεμφοκύτταρα ως αυτά που είναι αρνητικά

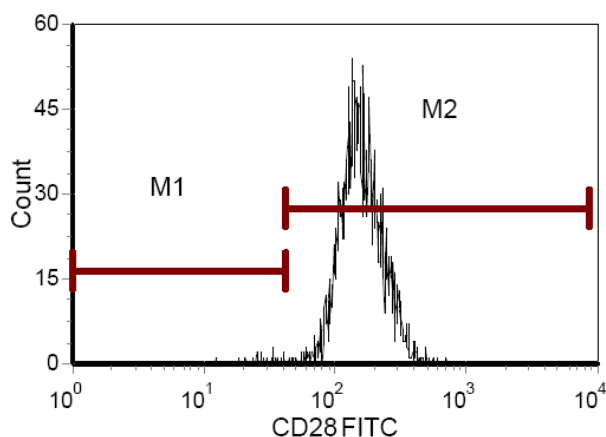
για το CD25. Ο διαχωρισμός των Tregs ($CD4^+CD25^{high}$) από τα Teff ($CD4^+CD25^+$) έγινε με βάση την υψηλότερη έκφραση του CD25 και την παρατηρούμενη χαμηλότερη έκφραση CD4 από τα Tregs. Επιβεβαιώθηκε δε από την υψηλότερη έκφραση του HLA-DR και τη χαμηλότερη μεμβρανική έκφραση του CD127 (αλυσίδα του υποδοχέα για την IL-7) στα Tregs σε σύγκριση με τα Teff.



Εικ. 2.13 Διαχωρισμός των Tregs ($CD4^+CD25^{high}$) λεμφοκυττάρων από τα άλλα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα με κυτταρόγραμμα CD4/CD25 (Πύλη 3: Tnaive, Πύλη 4: Tregs, Πύλη 5: Teff, Πύλες 6 & 8 : υποπληθυσμοί των Teff, Πύλες 7 & 9 : υποπληθυσμοί των Tregs)

Η έκφραση των διαφόρων δεικτών παρουσιάζεται με τη μορφή κατανομής συχνοτήτων, ιστογραμμάτων δηλαδή στα οποία στον άξονα X φαίνεται η ένταση φθορισμού και στον άξονα Y ο αριθμός των κυττάρων (Εικ. 2.14). Για τους διάφορους υποπληθυσμούς των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων τα ιστογράμματα περιλαμβάνουν τα κύτταρα που περικλείονται στην πύλη για αυτά που προκύπτει από

το κυτταρόγραμμα για τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα με άξονα X την ένταση φθορισμού του CD4 και άξονα Y την ένταση φθορισμού του CD25. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται είτε ως ποσοστά κυττάρων που παρουσιάζουν θετική έκφραση για κάποιο δείκτη είτε ως Μέση Ένταση Φθορισμού (MFI, Mean Fluorescence Intensity), δηλαδή αριθμητικός μέσος όρος έντασης φθορισμού που εκφράζει την πυκνότητα των μορίων του δείκτη ανά κύτταρο.



Parameter	Overlay Gate	Marker	Low bound	High bound	# of Events	% of all cells	% of gated cells	Median	Geometric Mean	Arithmetic Mean
CD28FITC	G3	M1	1	42	26	0,05	0,64	33,23	29,56	30,65
CD28FITC	G3	M2	42	8721	4007	7,45	99,36	153,99	158,66	169,52

Εικ. 2.14 Ιστόγραμμα συχνότητας

2.3 Προσδιορισμός Αυτοαντισωμάτων

Οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά των GAD65 (GADA) και IA-2 (IA-2A) καθορίστηκαν με τη μέθοδο της ELISA, που πραγματοποιήθηκε από εμάς στη Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Θετικοί θεωρήθηκαν οι οροί με συγκέντρωση > 5 U/ml. Οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της ινσουλίνης (IAA) καθορίστηκαν με τη μέθοδο της RIA, που πραγματοποιήθηκε από τους Carina Törn και Sten Ivarsson στο ερευνητικό εργαστήριο της Μονάδας Σακχαρώδη Διαβήτη του Πανεπιστημίου του Lund, στο Malmoe της Σουηδίας, μιας και δεν υπήρχε η δυνατότητα αυτή στο εργαστήριό μας. Θετικοί θεωρήθηκαν οι οροί με συγκέντρωση > 0.80 RU. Για τον υπολογισμό των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων

χρησιμοποιήθηκε ορός ασθενών ο οποίος είχε αποθηκευτεί στους -20°C .

2.3.1 ELISA

2.3.1.1 Μέθοδος

Ο ενζυμοσύνδετος ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (enzyme-linked immunosorbent assay) αποτελεί μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων διαλυτών ουσιών και ανίχνευσης αντισωμάτων-αντιγόνων σε βιολογικά υγρά. Είναι μια ετερογενής μέθοδος στερεάς φάσης και διακρίνεται σε δύο διαθέσιμες τεχνικές για τη μέτρηση του αντιγόνου, την τεχνική τύπου sandwich ή διπλού αντισώματος και την ανταγωνιστική τεχνική (competitive ELISA).

Στην τυπική τεχνική διπλού αντισώματος (sandwich) χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα που αναγνωρίζουν ξεχωριστούς και ειδικούς επιτόπους για το αντίστοιχο αντιγόνο που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Το ένα αντίσωμα είναι ακινητοποιημένο σε ένα μικροφρεάτιο πολυστυρολενίου, μέρος μιας πλακέτας που φέρει πολλά τέτοια μικροφρεάτια για την ταυτόχρονη μέτρηση πολλών δειγμάτων. Στο μικροφρεάτιο αυτό προστίθεται ο ορός που περιέχει το αντιγόνο που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, οπότε αυτό προσδένεται στο ακινητοποιημένο αντίσωμα. Ακολουθεί έκπλυση και στη συνέχεια προστίθεται ένα σύζευγμα του δεύτερου αντισώματος (ειδικό για το ίδιο αντιγόνο) με το κατάλληλο ένζυμο, το οποίο προσδένεται στο αντιγόνο σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα που διατηρεί παράλληλα την ανοσολογική και ενζυμική του ιδιότητα. Στη συνέχεια, προστίθεται το κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα που μετατρέπεται σε προϊόν από το σχηματισμένο σύμπλεγμα αντισώματος, αντιγόνου και ενζυμικού συζεύγματος. Με την προσθήκη του υποστρώματος η ενζυμική αντίδραση που πραγματοποιείται ανιχνεύεται ως παραγωγή έγχρωμου προϊόντος που απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (χρώμα) και με απορροφητικότητα ανάλογη της ποσότητας αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο ακινητοποιημένο αντίσωμα. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ειδική ανίχνευση του επιθυμητού αντιγόνου με μεγάλη ευαισθησία χάρη στη χρήση συγκεκριμένων και ειδικών μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων που προσδένονται σε χαρακτηριστικούς και μοναδικούς για το κάθε αντιγόνο επιτόπους.

Έτσι λοιπόν, το πρώτο βασικό βήμα που χαρακτηρίζει τη μέθοδο είναι η ακινητοποίηση του αντισώματος στη στερεά επιφάνεια. Τα βιοδραστικά μόρια προσκολλώνται στις επιφάνειες με πολλούς διαφορετικούς τρόπους που εξαρτώνται από τις χημικές ιδιότητες της επιφάνειας αλλά επηρεάζονται σίγουρα και από τις

φυσικές ιδιότητες του μικροφρεατίου και της πλακέτας και άλλους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το pH. Παθητική απορρόφηση συντελείται από αποκλειστικά υδροφοβικές ή υδροφοβικές και ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειας και του αντισώματος. Η αποκλειστικά υδροφοβική αλληλεπίδραση γίνεται σε επιφάνεια μέτριας πρόσδεσης και είναι κατάλληλη για μεγάλα μόρια > 20 kD με άφθονες υδρόφοβες περιοχές, ενώ η υδροφοβική/ιοντική αλληλεπίδραση γίνεται σε επιφάνειες υψηλής πρόσδεσης και είναι κατάλληλη για μέτριου μεγέθους μόρια > 10 kD που είναι θετικά φορτισμένα και περιέχουν ή όχι υδρόφοβες περιοχές. Ομοιοπολική ακινητοποίηση συμβαίνει σε επιφάνειες που φέρουν καρβοξυ- ή αμινο- ομάδες μέσω μορίων που συνδέουν την καρβοξυ- ή αμινο- ομάδα της στερεάς επιφάνειας σε αμινική ή σουλφυδρυλική ομάδα.

Οι φυσικές ιδιότητες της πλάκας που επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο είναι:

A) Το μέγεθος του μικροφρεατίου. Οι πλακέτες των 96 μικροφρεατίων είναι διαθέσιμες με μικροφρεάτια ολικού όγκου και μισού όγκου. Συνήθη είναι τα πρώτα με χωρητικότητα 300 μl. Όταν υπάρχει μειωμένη διαθεσιμότητα και υψηλό κόστος αντιδραστηρίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα δεύτερα με ταυτόχρονη μείωση του ολικού όγκου της αντίδρασης. Ταυτόχρονα μειώνεται και ο χρόνος της αντίδρασης, μιας και τα βιοδραστικά μόρια προσεγγίζουν το τοίχωμα του μικροφρεατίου σε μικρότερο χρόνο χωρίς να επηρεάζεται η ευαισθησία της μεθόδου.

B) Το σχήμα του μικροφρεατίου. Τα επίπεδου πυθμένα μικροφρεάτια είναι τα παραδοσιακά με εξαιρετική μετάδοση του οπτικού σήματος, ενώ το γεγονός ότι κατακρατούν μικρή ποσότητα υγρών (5-10 μl) μετά το άδειασμά τους είναι θετικό όταν το προσδεμένο βιομόριο επηρεάζεται έντονα από την υπερβολική ξήρανση. Τα κυκλικού πυθμένα μικροφρεάτια συντελούν στην αποτελεσματική απομάκρυνση του υγρού και την αποφυγή ανωμαλιών που σχετίζονται με την πρόσδεση μακρομοριακών ενώσεων στις γωνίες του επίπεδου πυθμένα. Δεν συνιστώνται για την ανίχνευση και των προσδιορισμό βιομορίων ευαίσθητων στην υπερβολική ξήρανση. Τέλος, τα τύπου easy wash είναι μικροφρεάτια που συνδυάζουν τις ιδιότητες των δύο προηγούμενων, παρέχοντας ελάχιστη κατακράτηση υγρού και άριστη μετάδοση του οπτικού σήματος.

Γ) Το χρώμα της πλακέτας. Οι συνήθεις πλακέτες κατασκευάζονται από καθαρό πολυστυρολένιο, ενώ στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ο φθορισμός ως μέθοδος ανίχνευσης αντί της παραγωγής έγχρωμου προϊόντος χρησιμοποιούνται μαύρου

χρώματος πλακέτες. Πυκνό μαύρο (Opaque black) χρησιμοποιείται για τη μείωση του θορύβου (background) λόγω αυτοφθορισμού και αυξάνει την ευαισθησία, μειώνοντας τη διάχυση του φωτός.

Στη συνέχεια, πρέπει να επιλεγεί το κατάλληλο ένζυμο και το αντίστοιχο υπόστρωμα. Η ανίχνευση της προς μέτρηση ουσίας μπορεί να γίνει με μέτρηση χρώματος, φθορισμού ή χημειοφωταύγειας (luminescence). Έτσι, υπάρχουν πρωτόκολλα που έχουν ως αποτέλεσμα χρωματιστό προϊόν αντίδρασης το οποίο απορροφά το φως στο ορατό φάσμα αλλά και πρωτόκολλα που το ένζυμο μετατρέπει το υπόστρωμα σε προϊόν που φθορίζει όταν διεγείρεται από φως συγκεκριμένου μήκους κύματος.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ένζυμα είναι η υπεροξειδάση, η αλκαλική φωσφατάση και η β-D γαλακτοσιδάση. Τα ένζυμα αυτά έχουν επιλεγεί γιατί είναι σταθερά στις θερμοκρασίες της μεθόδου (4 °C, 25 °C και 37 °C), έχουν χρόνο ζωής πάνω από 6 μήνες όταν αποθηκεύονται στους 4 °C, είναι διαθέσιμα στην αγορά, δύνανται να συζευχθούν με αντιγόνα ή αντισώματα, είναι οικονομικά, η δραστηρότητά τους μετράται εύκολα και δεν επηρεάζονται από τα βιολογικά υγρά. Για πειράματα όπου είναι επιθυμητή μεγάλη ευαισθησία το υπόστρωμα πρέπει να παράγει έντονο χρώμα σε πολύ γρήγορες ταχύτητες αντίδρασης (15-30 λεπτά). Σε ορισμένες περιπτώσεις προστίθεται αναστολέας της αντίδρασης μετά από καθορισμένο χρόνο και εδώ είναι επιθυμητά υποστρώματα με αργή ταχύτητα αντίδρασης (15-30 λεπτά). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική δραστηρότητά είναι πολλοί με κυριότερους τη θερμοκρασία, την έκθεση στο φως, το pH, το χρόνο αντίδρασης, την ποσότητα του υποστρώματος και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος.

Το επόμενο βήμα είναι η ανοσολογική αντίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, για την οποία πρέπει να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες έτσι ώστε να είναι επαναλήψιμη και αξιόπιστη. Οι συνθήκες αυτές διαφέρουν αναλόγως του αντιγόνου και του αντισώματος. Απαιτείται τέλος προσεκτική χρονομέτρηση της αντίδρασης που επιτυγχάνεται με τη χρήση χρονομέτρου και έναρξη με την προσθήκη υποστρώματος στο πρώτο μικροφρεάτιο, ρυθμική χρήση του σιφωνίου και όταν το χρονόμετρο δείξει το τέλος της περιόδου επώασης λήξη της αντίδρασης με προσθήκη αναστολέα με ρυθμικό τρόπο σε κάθε μικροφρεάτιο ξεκινώντας από το ίδιο μικροφρεάτιο που ξεκίνησε η προσθήκη υποστρώματος και με την ίδια αλληλουχία.

Στην προκειμένη περίπτωση λόγω της βιοχημικής αστάθειας των αντιγόνων GAD65 και IA-2 η τεχνική είναι ελαφρώς παραλλαγμένη. Χρησιμοποιούνται έτοιμα επιστρωμένα πλακίδια με τα αντίστοιχα αντιγόνα, στα οποία προσδένονται κάποια από τα αυτοαντισώματα του ορού. Τα υπόλοιπα αυτοαντισώματα προσδένονται σε αντιγόνα σημασμένα με βιοτίνη και με την προσθήκη του κατάλληλου ενζύμου πραγματοποιείται η αντίδραση και προκύπτει το έγχρωμο προϊόν, όπως αναλυτικά περιγράφεται στη συνέχεια στο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε.

2.3.1.2 Υλικά

- 1) Φυγόκεντρος (Hereus, Labofuge)
- 2) Επιτραπέζιος αναδευτήρας
- 3) Φωτόμετρο για πλακίδια 96 μικροφρεατίων
- 4) Πολυκάναλη πιπέτα
- 5) Απεσταγμένο νερό
- 6) RSR GAD65 autoantibody (GAD Ab) ELISA kit, RSR Limited Avenue Park Pentwyn Cardiff CF23 8HE United Kingdom
 - α. 12 ράβδοι των 8 μικροφρεατίων η καθεμιά (96 στο σύνολο) καλυμμένες με GAD65.
 - β. Βαθμονομητές (calibrators) 5, 18, 35, 120, 250, 2000 U/ml, 6 x 0.7 ml
 - γ. Θετικός μάρτυρας (0.7 ml)
 - δ. Αρνητικός μέρτυρας (0.7 ml)
 - ε. GAD65-Biotin (απαραίτητη η ανασύσταση με 5.5 ml του αντίστοιχου διαλύματος και η αποθήκευση στους 2-8 °C για το πολύ 3 ημέρες μετά)
 - στ. Διαλύτης για ανασύσταση του GAD65-Biotin (2 x 15 ml)
 - ζ. Streptavidin Peroxidase (SA-POD) (0.7 ml) (απαραίτητη η αραιώση σε αναλογία 1 προς 20 με το αντίστοιχο διάλυμα και η αποθήκευση στους 2-8 °C για το πολύ 16 εβδομάδες μετά)
 - η. Διάλυμα για ανασύσταση του SA-POD (15 ml)
 - θ. Αντιδραστήριο υποστρώματος (TMB, 3, 3', 5, 5'-τετραμεθυλο-βενζοδιένιο, 15 ml)
 - ι. Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης (Wash Concentrate, 125 ml) (απαραίτητη η αραιώση x 10 με απεσταγμένο νερό πριν τη χρήση και η αποθήκευση στους 2-8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης)
 - ια. Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (12 ml)

7) RSR IA-2 Autoantibody ELISA Kit, RSR Limited Avenue Park Pentwyn Cardiff CF23 8HE United Kingdom

- α. 12 ράβδοι των 8 μικροφρεατίων η καθεμιά (96 στο σύνολο) καλυμμένες με IA-2.
- β. Βαθμονομητές (calibrators) 15, 60, 200, 400, 4000 U/ml, 5 x 0.7 ml
- γ. Θετικός μάρτυρας (0.7 ml)
- δ. Αρνητικός μάρτυρας (0.7 ml)
- ε. Επιταχυντής αντίδρασης (Reaction Enhancer, 4 ml)
- στ. IA-2-Biotin (απαραίτητη η ανασύσταση με 5.5 ml του αντίστοιχου διαλύματος και η αποθήκευση στους 2-8 °C για το πολύ 3 ημέρες μετά)
- ζ. Διαλύτης για ανασύσταση του IA-2-Biotin (2 x 15 ml)
- η. Streptavidin Peroxidase (SA-POD) (0.7 ml) (απαραίτητη η αραίωση σε αναλογία 1 προς 20 με το αντίστοιχο διάλυμα και η αποθήκευση στους 2-8 °C για το πολύ 20 εβδομάδες μετά)
- θ. Διάλυμα για ανασύσταση του SA-POD (15 ml)
- ι. Αντιδραστήριο υποστρώματος (TMB, 3, 3', 5, 5'-τετραμεθυλο-βενζοδιένιο, 15 ml)
- ια. Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης (Wash Concentrate, x 10, 125 ml) (απαραίτητη η αραίωση x 10 με απεσταγμένο νερό πριν τη χρήση και η αποθήκευση στους 2-8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης)
- ιβ. Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (12 ml)

2.3.1.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τον υπολογισμό των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 χρησιμοποιήθηκε ορός ασθενών ο οποίος είχε αποθηκευτεί στους -20 °C. Μετά την απόψυξη των δειγμάτων 25 μl από κάθε δείγμα ορού είναι απαραίτητα για τη διαδικασία, χωρίς οποιαδήποτε αραίωση. Απαιτείται όμως μετατροπή του ορού σε πλάσμα, που πραγματοποιείται με την προσθήκη CaCl₂ την οποία ακολουθεί φυγοκέντρωση.

Όσον αφορά τον υπολογισμό των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά IA-2 χρησιμοποιήθηκε επίσης ορός ασθενών ο οποίος είχε αποθηκευτεί στους -20 °C. Στην περίπτωση του IA-2 50 μl από κάθε δείγμα ορού είναι απαραίτητα για τη διαδικασία, χωρίς πάλι οποιαδήποτε αραίωση. Απαιτείται επίσης μετατροπή του ορού σε πλάσμα, που πραγματοποιείται με την προσθήκη CaCl₂ την οποία ακολουθεί φυγοκέντρωση.

2.3.1.4 Πρωτόκολλο μεθόδου

Στάδιο 1: Επώαση δειγμάτων

Αρχικά γίνεται η έναρξη της χρονομέτρησης. Στη συνέχεια συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε δείγμα ορού (25 μl για το GAD65 και 50 μl για το IA-2), καθώς και τα διαλύματα αναφοράς (βαθμονομητές, θετικό control, αρνητικό control) τοποθετούνται με πολυκάναλη πιπέττα σε προκαθορισμένες θέσεις στο αντίστοιχο, για τον προσδιορισμό των GAD65 και IA-2, πλακίδιο με τα μικροφρεάτια. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη των δειγμάτων, οπότε είναι απαραίτητο να γίνονται ταχείες κινήσεις με αυστηρή χρονομέτρηση της διαδικασίας και τα υλικά να τοποθετούνται με την ίδια σειρά στα μικροφρεάτια. Ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) με ταυτόχρονη ανάδευση σε επιτραπέζιο αυτόματο αναδευτήρα σε 500 περίπου στροφές το λεπτό για το GAD65. Στην περίπτωση του IA-2 προστίθενται και 25 μl του επιταχυντή (Reaction Enhancer) σε κάθε μικροφρεάτιο, γίνεται ανάδευση σε επιτραπέζιο αυτόματο αναδευτήρα σε 500 περίπου στροφές το λεπτό για 5 περίπου δευτερόλεπτα και ακολουθεί επώαση χωρίς ταυτόχρονη ανάδευση για 16-20 ώρες στους 2-8 °C.

Στάδιο 2: Πλύσεις

Το περιεχόμενο των μικροφρεατίων αφαιρείται με αναποδογύρισμα του πλακιδίου και απότομες σταθερές κινήσεις. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της περίσσειας αντιγόνου. Έπειτα στα φρεάτια τοποθετείται το διάλυμα πλύσης που βρίσκεται στη θερμοκρασία δωματίου και το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται με τον ίδιο τρόπο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές.

Στάδιο 3: Επώαση αντισωμάτων

Στο στάδιο αυτό 100 μl ανασυσταμένου διαλύματος GAD65-Biotin και IA-2-Biotin τοποθετούνται στο κάθε μικροφρεάτιο στο αντίστοιχο, για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 και IA-2, πλακίδιο. Προσδένεται έτσι στις αντίστοιχες θέσεις του αντιγόνου GAD65 ή IA-2. Ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) με ταυτόχρονη ανάδευση σε επιτραπέζιο αυτόματο αναδευτήρα σε 500 περίπου στροφές το λεπτό.

Στάδιο 4: Πλύσεις

Το περιεχόμενο των μικροφρεατίων αφαιρείται με αναποδογύρισμα του πλακιδίου και απότομες σταθερές κινήσεις. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της περίσσειας αντιγόνου. Έπειτα στα φρεάτια τοποθετείται το διάλυμα πλύσης που βρίσκεται στη θερμοκρασία δωματίου και το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται με τον ίδιο τρόπο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές.

Στάδιο 5: Επώαση διαλύματος SA-POD

Στο στάδιο αυτό 100 μl ανασυσταμένου διαλύματος Streptavidin Peroxidase (SA-POD) τοποθετούνται στο κάθε μικροφρεάτιο στο αντίστοιχο πλακίδιο. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) με ταυτόχρονη ανάδευση σε επιτραπέζιο αυτόματο αναδευτήρα σε 500 περίπου στροφές το λεπτό. Στη φάση αυτή η υπεροξειδάση συνδέεται ειδικά με τη βιοτίνη που είναι συζευγμένη με τα αντιγόνα GAD65 ή IA-2 αντίστοιχα.

Στάδιο 6: Πλύσεις

Το περιεχόμενο των μικροφρεατίων αφαιρείται με αναποδογύρισμα του πλακιδίου και απότομες σταθερές κινήσεις. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της περίσσειας αντιγόνου. Έπειτα στα φρεάτια τοποθετείται το διάλυμα πλύσης που βρίσκεται στη θερμοκρασία δωματίου και το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται με τον ίδιο τρόπο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές. Τέλος, πραγματοποιείται και μία πλύση με απλό απεσταγμένο νερό.

Στάδιο 7: Επώαση υποστρώματος

Στο στάδιο αυτό προστίθενται 100 μl διαλύματος υποστρώματος με TMB (3, 3', 5, 5'-τετραμέθυλο-βενζιδένιο) σε θερμοκρασία δωματίου σε κάθε μικροφρεάτιο. Κατά την τοποθέτηση του διαλύματος υποστρώματος στα μικροφρεάτια απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην έλθει σε επαφή με μεταλλικά αντικείμενα, γιατί οξειδώνεται εύκολα από μεταλλικά ιόντα. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) στο σκοτάδι χωρίς ταυτόχρονη ανάδευση.

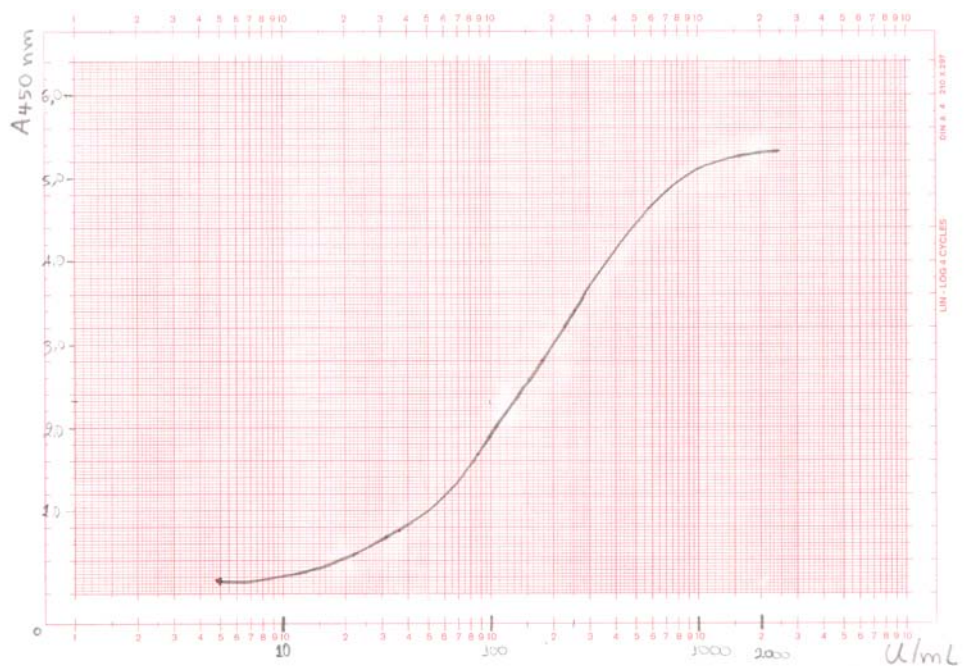
Στάδιο 8: Τερματισμός αντίδρασης

100 μl όξινου διαλύματος που προκαλούν διακοπή της αντίδρασης τοποθετούνται σε κάθε μικροφρεάτιο, ώστε να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση.

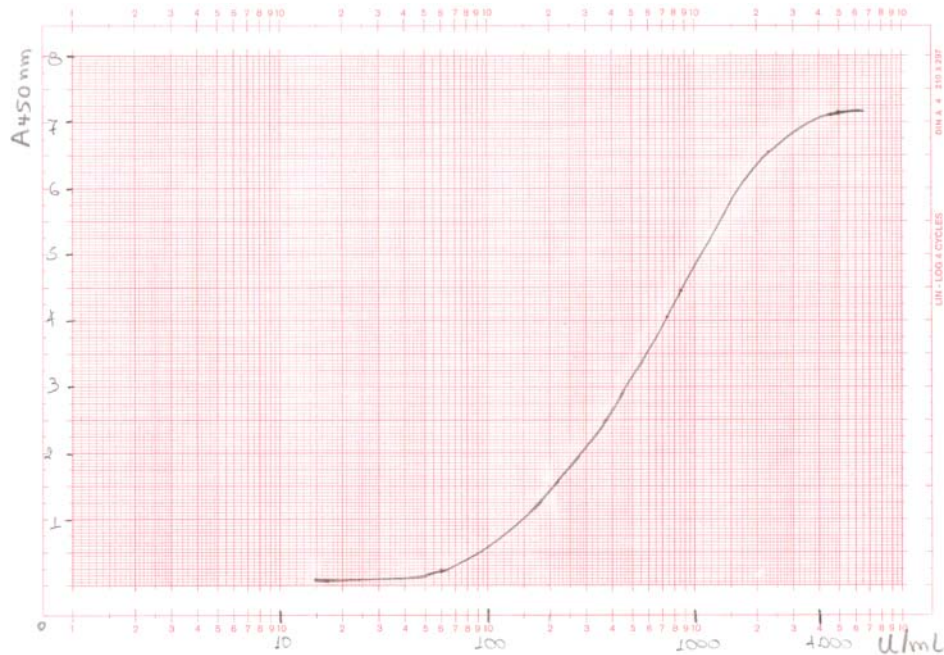
Στάδιο 9: Φωτομέτρηση

Η ανίχνευση του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης γίνεται αμέσως μετά τον τερματισμό της σε μήκος κύματος 450 nm, χρησιμοποιώντας ως μήκος κύματος αναφοράς τα 620 nm. Στο τελικό αυτό στάδιο γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 και IA-2 σε κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων των διαλυμάτων αναφοράς και των τιμών που λαμβάνουμε για τα αντίστοιχα διαλύματα από τη φωτομέτρηση. Χρησιμοποιούμε τη μέση τιμή απορρόφησης τόσο για τα διαλύματα αναφοράς όσο και για τα δείγματα των ασθενών.

Η τιμή υπολογίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς σε ημιλογαριθμικό χαρτί όπου στον οριζόντιο άξονα τοποθετείται η συγκέντρωση των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 και IA-2 (u/ml). Αφού σχεδιαστεί η καμπύλη αναφοράς, η συγκέντρωση του κάθε δείγματος υπολογίζεται απευθείας, μιας και δεν έχει υποβληθεί σε αραιώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις μετρήθηκαν διπλά δείγματα ορού από κάθε άτομο για τον προσδιορισμό των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 και IA-2.



Εικ. 2.15 Συγκέντρωση αυτοαντισωμάτων κατά GAD65



Εικ. 2.16 Συγκέντρωση αυτοαντισωμάτων κατά IA-2

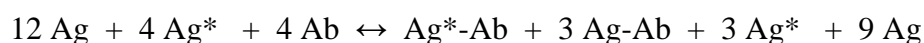
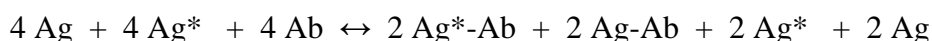
2.3.2 Ραδιοανοσολογική μέθοδος (Radioimmunoassay, RIA)

Η ραδιοανοσολογική μέθοδος αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ορμονών, των στεροειδών και διαφόρων φαρμάκων στην καθημερινή πρακτική, ενώ είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση οποιασδήποτε ουσίας που μπορεί να ραδιοεπισημανθεί. Συνδυάζει την ειδικότητα των ανοσολογικών αντιδράσεων και την ευαισθησία των ραδιοϊσοτοπικών τεχνικών.

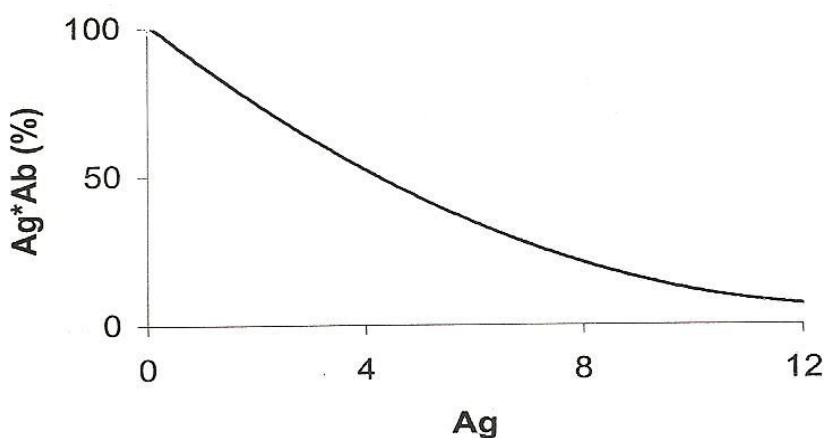
Η αρχή μιας κλασικής RIA είναι η ακόλουθη: Το δείγμα με την προσδιοριζόμενη ουσία (analyte) καθώς και διάλυμα της ίδιας ουσίας σημασμένης με ισότοπο ιχνηθέτη (tracer) γνωστής συγκέντρωσης φέρονται στο σύστημα εκτέλεσης της μεθόδου και αντιδρούν με την ειδική δεσμευτική ουσία ή προσδέτη (binder), που είναι ένα αντίσωμα. Η ουσία και ο ιχνηθέτης ανταγωνίζονται μεταξύ τους να συνδεθούν με το αντίσωμα. Ο βαθμός σύνδεσης του καθενός εξαρτάται από την αναλογία των συγκεντρώσεων του ιχνηθέτη και της ουσίας στο σύστημα εργασίας. Το αντίσωμα και ο ιχνηθέτης χρησιμοποιούνται σε κατάλληλες μικρές συγκεντρώσεις, ώστε σε μικρό διάστημα να δημιουργείται ισοζύγιο κορεσμού. Για το λόγο αυτό η RIA θεωρείται μέθοδος κορεσμού. Από τις συνδέσεις σχηματίζονται τα σύμπλοκα συνδέτη-προσδιοριζόμενης ουσίας και συνδέτη-ιχνηθέτη. Η ποσότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας που συνδέεται με τον συνδέτη ονομάζεται σύνδεμα (ligand) και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας στο δείγμα.

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ανταγωνιστική (competitive method) εξαιτίας του ανταγωνισμού δύο αντιγόνων. Πιο απλά, το ένα από αυτά είναι ραδιοσημασμένο αντιγόνο (Ag^*) για ειδική σύνδεση με ένα αντίσωμα (Ab) συγκεκριμένης συγκέντρωσης μέσα σε ένα αντιορό. Η συγκέντρωση του ραδιοεπισημασμένου αντιγόνου ή αντιγόνου ιχνηθέτη είναι πάντοτε μικρή και γνωστή. Πολύ σύντομα δημιουργείται ισοζύγιο κορεσμού (saturation equilibrium) και παρατηρούνται τόσο ανοσοσυμπλέγματα Ag - Ab , Ag^* - Ab όσο και ελεύθερα αντιγόνα Ag και Ag^* . Στη συνέχεια κάτω από ορισμένες συνθήκες η ποσότητα των Ag^* - Ab ανοσοσυμπλεγμάτων μειώνεται, ενώ αυξάνεται η ποσότητα των μη επισημασμένων αντιγόνων (Ag^*).

Σχηματικά:



Αν είναι γνωστή και η συγκέντρωση του μη επισημασμένου αντιγόνου, τότε μπορεί να υπολογιστεί το ποσό του Ag που αντέδρασε προς σχηματισμό Ag - Ab . Με διαχωρισμό των φάσεων απομακρύνονται οι ελεύθερες ουσίες (προσδιοριζόμενη ουσία, ιχνηθέτης) από τις δεσμευμένες (σύμπλοκα συνδέτη-προσδιοριζόμενης ουσίας και συνδέτη-ιχνηθέτη) και μετράται η ακτινοβολία που εκπέμπεται αντίστοιχα. Η μέτρηση ανάλογα με την ακτινοβολία γίνεται στον κατάλληλο μετρητή σε κτύπους ανά λεπτό (counts per minute, cpm). Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να κατασκευάσουμε μία πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια της οποίας μπορούμε να υπολογίσουμε οποιαδήποτε άγνωστη συγκέντρωση ενός αντιγόνου (Εικ 2.17).



Εικ. 2.17 Τυπική καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό άγνωστης συγκέντρωσης αντιγόνου

Η ραδιοανοσολογική μέθοδος παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση οποιασδήποτε ουσίας που μπορεί να ραδιοεπισημανθεί. Χαρακτηρίζεται επίσης από μεγάλη ευαισθησία και ταυτόχρονα από εξαιρετική ειδικότητα, ενώ πρόκειται για αυτοματοποιημένη μέθοδο που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων. Από την άλλη, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί που δεν επιτρέπουν την εκτέλεση της μεθόδου σε οποιοδήποτε εργαστήριο. Κατ' αρχάς, ο χρόνος ημιζωής των ^{125}I , ^{131}I ραδιοϊσοτόπων ανέρχεται σε 60 και 8 ημέρες αντίστοιχα καθιστώντας απαραίτητη τη συχνή ραδιοεπισημανση του αντιγόνου. Επίσης, το κόστος των αντιδραστηρίων είναι πολύ μεγάλο. Τέλος, επειδή ο κίνδυνος από την χρήση των ραδιοϊσοτόπων για την υγεία του προσωπικού είναι υπαρκτός και σημαντικός, απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό σε κατάλληλα εξοπλισμένο κέντρο που να γνωρίζει όχι μόνο την ίδια τη μέθοδο αλλά και τους κανόνες προφύλαξης.

2.4 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Statistical Package for Social Sciences Version 16.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (mean) \pm σταθερά απόκλιση (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).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Διαφορές μεταξύ Tregs (CD4⁺CD25^{high}) και Teff (CD4⁺CD25⁺)

Σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών και μαρτύρων που συμμετείχαν στη μελέτη παρατηρήθηκε στα κυτταρογράμματα CD4/CD25 dot plots μια συνεχής κατανομή CD4⁺ λεμφοκυττάρων από CD25⁻ σε CD25⁺ και CD25^{high}. Αξιοσημείωτη είναι η χαμηλότερη ένταση έκφρασης του CD4 στον κορυφαίο πληθυσμό CD25^{high} του διαγράμματος, που αντιπροσωπεύει σίγουρα Tregs (CD4⁺CD25^{high}). Η αναλογία Treg/Teff CD4 MFI εμφανίζεται στο 0.760 ± 0.073 (mean \pm SD) στους μάρτυρες, 0.791 ± 0.083 στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και 0.754 ± 0.090 στους διαβητικούς τύπου 1 με μακρά διάρκεια νόσου, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η αναλογία αυτή δεν ανευρέθη ίση ή μεγαλύτερη της μονάδας σε κανέναν απολύτως ασθενή ή μάρτυρα της μελέτης. Αντίθετα, καμία διαφορά δεν σημειώνεται στην ένταση έκφρασης του CD4 μεταξύ Teff (CD4⁺CD25⁺) and Tnaive (CD4⁺CD25⁻) λεμφοκυττάρων.

Έτσι, με βάση το χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης του CD4 πραγματοποιήθηκε ένας πρώτος διαχωρισμός μεταξύ Tregs και Teff. Στη συνέχεια, αναλύσαμε διαδοχικές υποομάδες CD4⁺CD25⁺ λεμφοκυττάρων σε ασθενείς και μάρτυρες ξεκινώντας από τα κύτταρα με υψηλότερη έκφραση για CD25 (CD25^{high}), με σκοπό να αναδειχθούν τυχόν σημαντικές διαφορές και να καθοριστεί με όσο μεγαλύτερη ακρίβεια η χρυσή τομή διαχωρισμού Tregs από Teff (Εικ. 2.13). Παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες ατόμων ότι η μετάβαση από Tregs σε Teff συνοδεύεται από μεγάλες διαφορές στην έκφραση επτά (7) επιφανειακών δεικτών και ενός (1) κυτταροπλασματικού: CD127, CD122, CD152, HLA-DR, HLA-DQ, CD27, TGFβRII, and FoxP3. Εκτός από τους δείκτες CD127 και TGFβRII, για όλους τους υπόλοιπους παρατηρείται μεγαλύτερη συχνότητα έκφρασης στα Tregs σε σύγκριση με τα Teff. Όσον αφορά συγκεκριμένα την έκφραση του CD127 τα Tregs στη μελέτη μας είναι CD127^{dim/-}, σε ποσοστό 59 % με καθαρά αρνητική έκφραση (CD127⁻) και τα υπόλοιπα 41% με MFI στο 40 % της αντίστοιχης των CD4⁺CD127⁺ Teff. Επομένως, ο κυτταρικός πληθυσμός που καθορίσαμε ως Tregs έχει όλα τα χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν ως ειδικά από άλλους ερευνητές (CD25^{high}FoxP3⁺CD127^{dim/-}) και επιπλέον παρουσιάζει και την υψηλότερη έκφραση για το CD25 (Baecher-Allan και συν. 2001, Stephens και συν. 2001, Jonuleit και συν. 2001, Dieckmann και συν. 2001, Cao και συν. 2003, de Kleer και συν. 2004, Makita

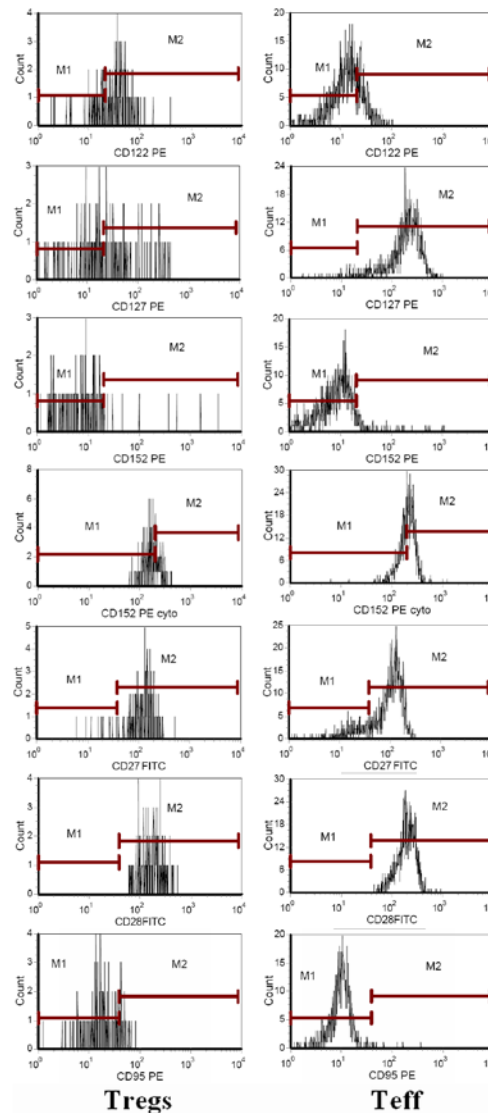
και συν. 2004, Baecher-Allan και συν. 2005, Liu και συν. 2006, Seddiki και συν. 2006) και είναι ακόμα CD4^{dim} (Πίνακας 3.1, Εικ. 3.1).

Πίνακας 3.1 Διαφορές μεταξύ Tregs (CD4⁺CD25^{high}) και Teff (CD4⁺CD25⁺) σε φυσιολογικούς μάρτυρες

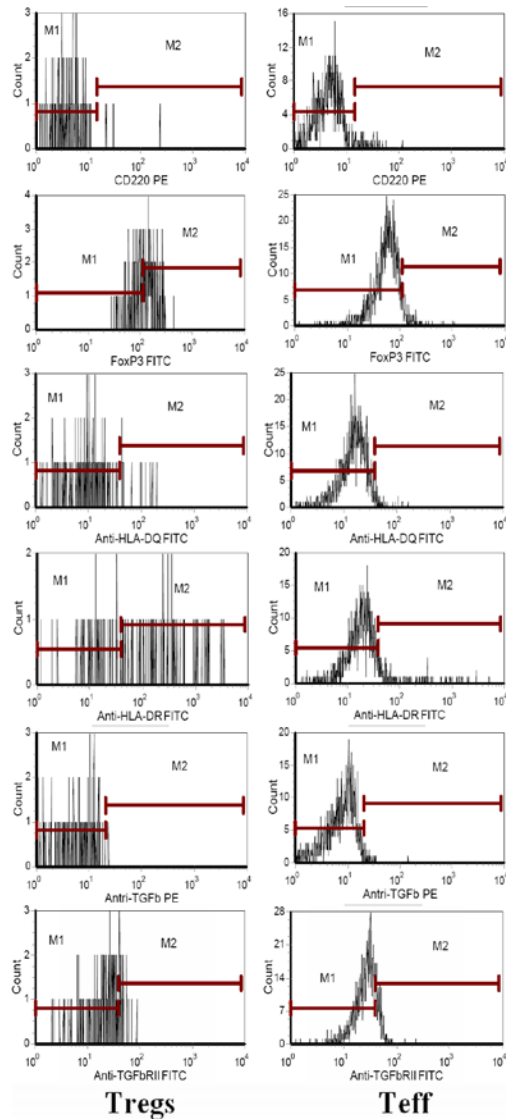
Χαρακτηριστικά	Treg Values (Mean ± SD)	Teff Values (Mean ± SD)	<i>p</i>
% CD4 ⁺	3.047 ± 0.333	30.18 ± 4.38	< 0.001
CD28 %	92.91 ± 20.79	96.98 ± 13.40	ns
MFI	116.48 ± 48.75	124.88 ± 50.50	0.007
CD27 %	79.53 ± 30.40	72.24 ± 28.12	<0.001
MFI	116.67 ± 119.91	86.62 ± 39.50	ns
CD95 %	39.14 ± 42.60	31.80 ± 40.87	0.02
MFI	146.48 ± 150.81	121.92 ± 137.58	ns
CD152ic %	37.93 ± 46.79	37.60 ± 47.00	ns
MFI	450.18 ± 598.00	646.04 ± 593.75	ns
FoxP3 %	44.70 ± 41.24	29.49 ± 38.22	0.002
MFI	189.45 ± 97.80	163.48 ± 111.45	ns
CD127 %	41.00 ± 24.82	90.68 ± 6.55	<0.001
MFI	109.94 ± 73.78	258.00 ± 96.53	<0.001
CD45RO %	89.11 ± 12.84	91.18 ± 10.19	ns
MFI	1,099.5 ± 699.90	902.35 ± 432.56	0.002
CD122 %	26.93 ± 28.44	15.65 ± 22.75	0.001
MFI	53.94 ± 60.38	62.03 ± 84.39	ns
CD152 %	19.23 ± 26.02	10.61 ± 13.88	0.005
MFI	178.73 ± 140.94	161.06 ± 127.52	ns
CD220 %	9.30 ± 25.15	1.65 ± 4.38	ns
MFI	81.87 ± 169.35	62.63 ± 81.36	ns
HLA-DR %	46.67 ± 17.35	8.57 ± 3.82	< 0.001
MFI	527.42 ± 548.50	302.69 ± 135.82	0.041
HLA-DQ %	14.89 ± 16.86	7.08 ± 17.08	<0.001
MFI	131.10 ± 95.54	92.47 ± 67.61	0.006
TGFβRII %	13.36 ± 15.73	18.50 ± 17.49	<0.001
MFI	123.72 ± 214.15	36.63 ± 25.46	< 0.036
TGFβ %	5.64 ± 11.40	4.09 ± 7.53	ns
MFI	53.82 ± 62.48	59.02 ± 56.30	ns

Εξαιρετικά ενδιαφέρονσα αποδείχθηκε η σύγκριση στη μια πλευρά της γραμμής διαχωρισμού Treg/Teff με βάση την έκφραση του CD4, όπου τα χαμηλότερα σε έκφραση CD25 Tregs είχαν το ίδιο επίπεδο έκφρασης CD25 με τα υψηλότερα σε έκφραση CD25 Teff (πύλες 6 & 7, Εικ 2.13). Η ανάλυση διαδοχικών υποομάδων του πληθυσμού των Teff αυτής της περιοχής έδειξε ότι τα λεμφοκύτταρα αυτά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά, τόσο όσον αφορά τα ποσοστά όσο και την ένταση

έκφρασης δεικτών, που μοιάζουν περισσότερο με αυτά των «καθαρόαιμων» κατώτερων ως προς CD25 στο διάγραμμα Teff παρά με αυτά των «καθαρόαιμων» ανώτερων ως προς CD25 στο διάγραμμα Tregs. Το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε την ορθότητα του αρχικού διαχωρισμού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά σε κάθε ασθενή και μάρτυρα που συμμετείχε στη μελέτη και ήταν ουσιώδης για το σωστό καθορισμό των υποομάδων των CD4⁺ λεμφοκυττάρων και τη μελέτη των χαρακτηριστικών Tregs. Ανέδειξε δε και τις σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές σε σχέση με τα υπόλοιπα ενεργοποιημένα CD4⁺ λεμφοκύτταρα (Teff) που εκφράζουν επίσης, αλλά σε χαμηλότερο επίπεδο την αλυσίδα α του υποδοχέα για την IL-2 (CD25).



Εικ. 3.1a



Εικ. 3.1b

Εικ. 3.1 Διαφορές μεταξύ Tregs ($CD4^+CD25^{high}$) και Teff ($CD4^+CD25^+$) σε φυσιολογικούς μάρτυρες

3.2 Ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές των Tregs μεταξύ ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και φυσιολογικών μαρτύρων

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται συνολικά τα χαρακτηριστικά των Tregs που προέκυψαν από τη μελέτη μας με κυτταρομετρία ροής σε φυσιολογικούς μάρτυρες, νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και μακράς διάρκειας διαβητικούς τύπου 1.

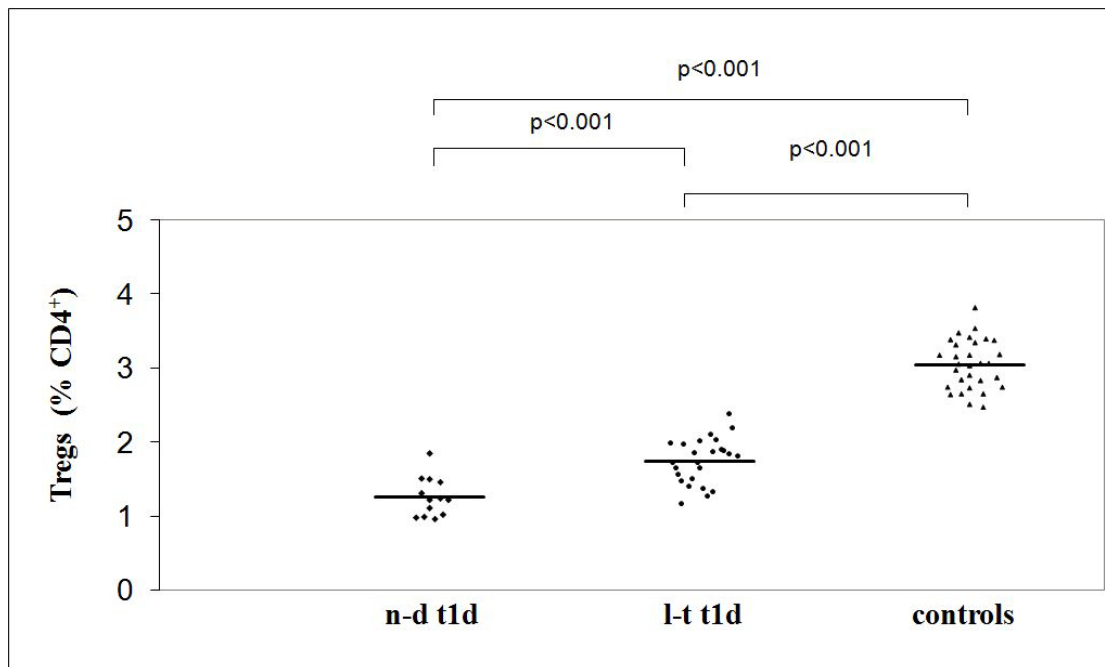
Πίνακας 3.2 Σύγκριση των χαρακτηριστικών των Tregs μεταξύ μαρτύρων, νεοδιαγνωσθέντων και μακράς διάρκειας διαβητικών τύπου 1

Χαρακτηριστικά των Tregs	1. Μάρτυρες (Mean ± SD)	2. Νεοδιαγνωσθέντες διαβητικοί τύπου 1 (Mean ± SD)	3. Μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 (Mean ± SD)	<i>p</i> 2. vs. 1.	<i>p</i> 3. vs. 1.	<i>p</i> 2. vs. 3
% CD4 ⁺	3.047 ± 0.333	1.259 ± 0.264	1.748 ± 0.306	< 0.001	< 0.001	< 0.001
CD28 %	92.91 ± 20.79	99.89 ± 0.39	99.95 ± 0.25	ns	ns	ns
MFI	116.48 ± 48.75	117.87 ± 36.62	105.99 ± 43.03	ns	ns	ns
CD27 %	79.53 ± 30.4	94.72 ± 3.94	91.95 ± 6.99	0.012	0.038	ns
MFI	111.67 ± 119.9	101.19 ± 35.83	85.44 ± 23.59	ns	ns	ns
CD95 %	39.14 ± 42.60	50.07 ± 47.08	66.89 ± 43.32	ns	0.022	ns
MFI	146.48 ± 150.81	167.66 ± 172.06	224.71 ± 146.07	ns	ns	ns
CD152ic %	37.93 ± 46.79	44.86 ± 37.70	44.02 ± 44.51	ns	ns	ns
MFI	450.18 ± 598.00	449.89 ± 282.60	350.81 ± 280.78	ns	ns	ns
FoxP3 %	44.70 ± 41.24	57.18 ± 39.09	66.73 ± 33.71	ns	ns	ns
MFI	189.45 ± 97.80	187.39 ± 121.62	145.76 ± 59.88	ns	ns	ns
CD127 %	41.00 ± 24.82	55.20 ± 35.75	25.66 ± 21.51	ns	ns	0.015
MFI	109.94 ± 73.78	141.46 ± 190.16	68.96 ± 52.86	ns	ns	ns
CD45RO %	89.11 ± 12.84	84.89 ± 17.63	92.07 ± 7.76	ns	ns	ns
MFI	1,099.5 ± 699.90	1,586.2 ± 2,256	912.47 ± 354.23	ns	ns	ns
CD122 %	26.93 ± 28.44	34.50 ± 27.06	40.84 ± 30.73	ns	ns	ns
MFI	53.94 ± 60.38	221.92 ± 531.56	60.26 ± 65.59	ns	ns	ns
CD152 %	19.23 ± 26.02	26.20 ± 28.33	14.97 ± 18.84	ns	ns	ns
MFI	178.73 ± 140.94	129.18 ± 151.48	172.33 ± 158.68	ns	ns	ns
CD220 %	9.30 ± 25.15	3.88 ± 7.90	1.77 ± 2.58	ns	ns	ns
MFI	81.87 ± 169.35	51.23 ± 95.41	185.7 ± 455.24	ns	ns	ns
HLA-DR %	46.67 ± 17.35	45.94 ± 22.85	55.39 ± 11.58	ns	0.043	ns
MFI	527.42 ± 548.50	556.59 ± 324.54	394.49 ± 126.92	ns	ns	ns
HLA-DQ %	14.89 ± 16.86	14.01 ± 17.39	15.96 ± 7.75	ns	ns	ns
MFI	131.10 ± 95.54	204.29 ± 272.24	127.03 ± 82.23	ns	ns	ns
TGFβRII %	13.36 ± 15.73	17.59 ± 17.32	10.37 ± 9.52	ns	ns	ns
MFI	123.72 ± 214.15	38.96 ± 34.98	604.27 ± 1,149.13	0.043	ns	0.028
TGFβ %	5.64 ± 11.40	7.73 ± 12.44	0.80 ± 1.14	ns	0.028	ns
MFI	53.82 ± 62.48	23.66 ± 21.05	65.40 ± 111.55	0.029	ns	ns

3.2.1 Ποσοτικές διαφορές

Οι ασθενείς με Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένο αριθμό Tregs (ως ποσοστό των CD4⁺ T κυττάρων) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες: 1.259 ± 0.264 % vs 3.047 ± 0.264 % αντίστοιχα (p < 0.001). Στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των Tregs (ως ποσοστό των CD4⁺ T κυττάρων) παρατηρείται επίσης και μεταξύ των μακράς διάρκειας διαβητικών τύπου 1 και των φυσιολογικών μαρτύρων: 1.748 ± 0.308 % vs 3.047 ±

0.264 % αντίστοιχα ($p < 0.001$). Η διαφορά παραμένει στατιστικά σημαντική κι όταν συγκρίνουμε τον αριθμό των Tregs (ως ποσοστό των $CD4^+$ T κυττάρων) μεταξύ νεοδιαγνωσθέντων και μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p < 0.001$). Οι διαφορές αυτές είναι εντυπωσιακές και δείχνουν ότι η κλινική έναρξη της νόσου χαρακτηρίζεται από σημαντικά μειωμένο ποσοστό Tregs σε σχέση με τους υγιείς. Φαίνεται ότι με την πάροδο του χρόνου πραγματοποιείται μια προσπάθεια αύξησης του αριθμού τους (φαινόμενο ανάκαμψης-rebound), που επιτυγχάνεται εν μέρει μόνο αφού οι μακράς διάρκειας διαβητικοί έχουν μεν μεγαλύτερο ποσοστό Tregs από τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς όχι όμως τόσα όσα οι υγιείς μάρτυρες. Σε μερικές προηγούμενες εργασίες, στις οποίες βέβαια θεωρήθηκε το σύνολο των $CD4^+CD25^+$ T λεμφοκυττάρων ως Tregs (Lindley και συν. 2005, Brusko και συν. 2005, Brusko και συν. 2007) ανακοινώθηκαν θετικές συσχετίσεις του ποσοστού εμφάνισής τους με την ηλικία, σε μία δε φάνηκε η συσχέτιση αυτή να ισχύει ασθενέστερα και για τα $CD4^+CD25^{high}$ T λεμφοκύτταρα (Brusko και συν. 2005). Στη δική μας μελέτη δεν επαληθεύεται καμιά τέτοια συσχέτιση με την ηλικία ούτε με τα Tregs ($CD4^{dim}CD25^{high}$) ούτε με το άθροισμα Tregs και Teff ($CD4^+CD25^+$).



Εικ. 3.2 Οι ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένο αριθμό Tregs σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες

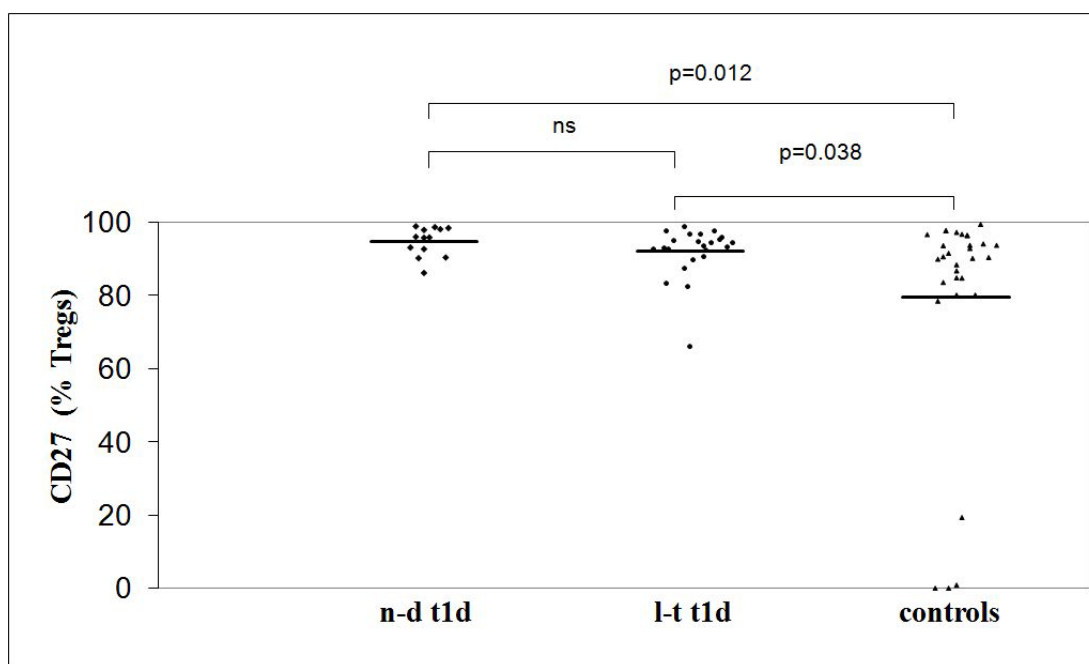
3.2.2 Ποιοτικές διαφορές

Κατ' αρχάς, όλοι οι δείκτες που μελετήθηκαν ανευρέθηκαν στην μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα των Tregs τόσο στους ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας) όσο και στους υγιείς εθελοντές που συμμετείχαν ως μάρτυρες. Παρατηρούμε μεμβρανική έκφραση και των μορίων που μελετήθηκαν για πρώτη φορά από εμάς στα Tregs ανθρώπινου περιφερικού αίματος (CD27, CD28, CD95, CD220, HLA-DQ, TGFβ, TGFβRII). Θεωρούμε ιδιαίτερα σημαντικά τόσο τα αποτελέσματα για την έκφραση των νέων αυτών παραγόντων που μελετήσαμε στα Tregs όσο και τις διαφορές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους μεταξύ διαβητικών και υγιών ατόμων.

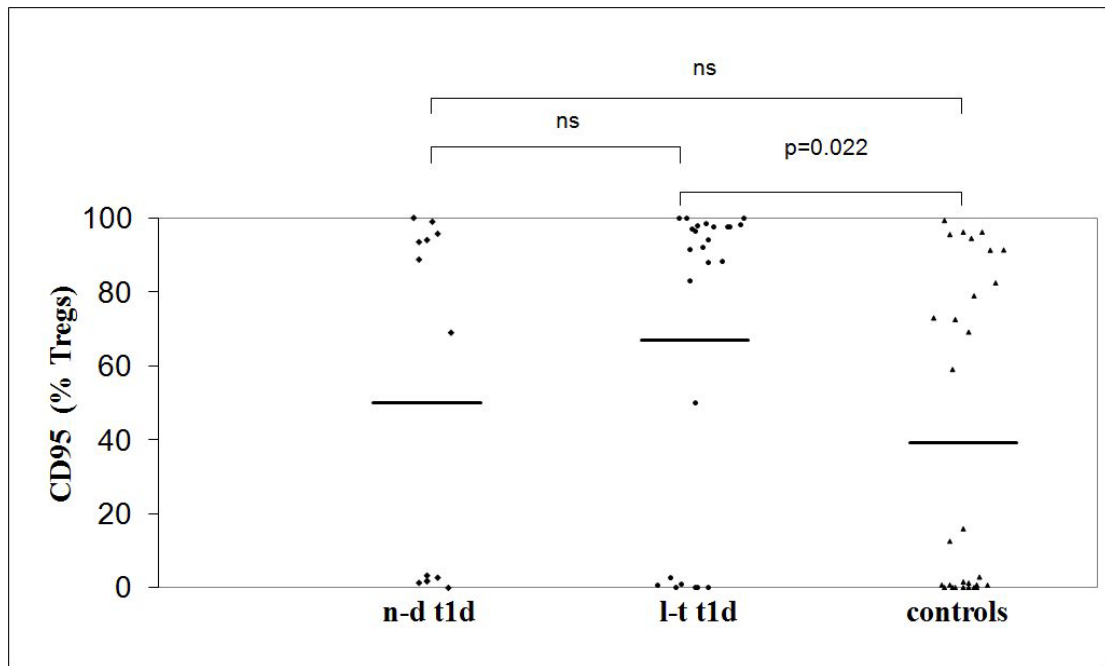
Το CD27, που ανευρέθη στο σύνολο σχεδόν των Tregs των νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών τύπου 1, συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και την επιβίωση των B λεμφοκυττάρων μνήμης. Ο δείκτης CD95 αντιπροσωπεύει το μόριο Fas και συνδέεται με την τάση προς απόπτωση. Και τα δύο αυτά μόρια παρουσιάζονται με υψηλή μεμβρανική έκφραση στα ανθρώπινα Tregs για πρώτη φορά. Το CD122 αντιπροσωπεύει την αλυσίδα β του υποδοχέα για την IL-2 και ανευρίσκεται σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό στα Tregs σε σύγκριση με τα Teff όχι μόνο στους υγιείς αλλά και στους διαβητικούς. Το ίδιο παρατηρείται και στην περίπτωση του CD152 που δεν είναι άλλο παρά το γνωστό CTLA-4. Ο δείκτης CD220 είναι ο υποδοχέας για την ινσουλίνη και εκφράζεται στο 10% περίπου των Tregs στους υγιείς μάρτυρες και σε μη στατιστικά σημαντικά μικρότερο ποσοστό των Tregs στους διαβητικούς τύπου 1. Ο παράγοντας TGFβ θεωρήθηκε ένα από τα πιθανά μόρια μέσω των οποίων τα Tregs πραγματοποιούν τη ρυθμιστική τους δράση και φαίνεται να εκφράζεται περίπου στο 5 % των Tregs στους υγιείς, ενώ είναι μόλις ανιχνεύσιμο στους μακράς διάρκειας διαβητικούς τύπου 1. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι ο αντίσωμα για τον παράγοντα TGFβ που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας δεν διακρίνει τον ώριμο από τον πρόδρομο τύπο της κυτταροκίνης αυτής. Το μόριο HLA-DQ, ο παράγοντας που πιο πολύ από καθένα έχει συνδεθεί γενετικά με το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ανευρίσκεται σε μια σημαντική μειοψηφία των Tregs και στις τρεις ομάδες και σε διπλάσια επίπεδα σε σύγκριση με τα Teff (Πίνακας 3.1, Πίνακας 3.2). Ο άλλος σημαντικός τόπος MHC II, το HLA-DR, εκφράζεται από τα μισά περίπου Tregs τόσο των ασθενών όσο και των μαρτύρων και πολύ

υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα Teff (Πίνακας 3.1, Πίνακας 3.2), όπως έχει ήδη δημοσιευθεί και από άλλους ερευνητές (Baecher-Allan και συν. 2006).

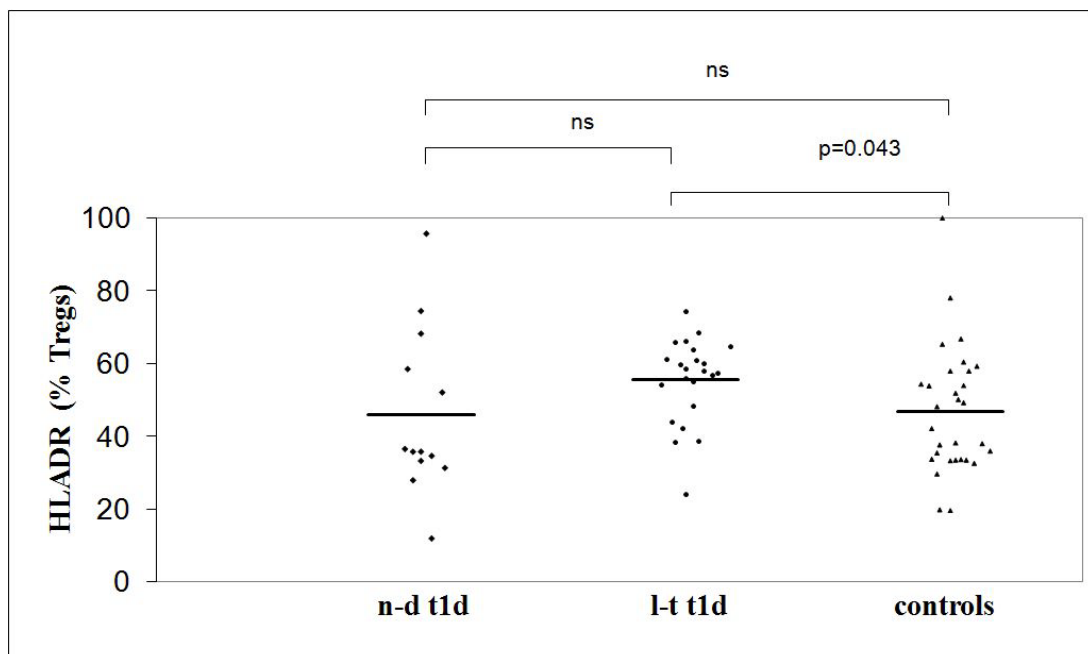
Περνώντας σε σαφείς φαινοτυπικές διαφορές των Tregs μεταξύ διαβητικών τύπου 1 και φυσιολογικών μαρτύρων, είναι αξιοσημείωτη η πολύ υψηλότερη συχνότητα έκφρασης του CD27 σε νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Πίνακας 3.2, Εικ. 3.3). Ακόμα, οι μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα έκφρασης των μορίων CD95 (Πίνακας 3.2, Εικ. 3.4) και HLA-DR (Πίνακας 3.2, Εικ. 3.5), καθώς και μόλις ανιχνεύσιμη έκφραση του παράγοντα TGFβ (Πίνακας 3.2, Εικ. 3.6). σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών μαρτύρων. Επίσης, σημαντικά ελαττωμένη συχνότητα έκφρασης του CD127 σε σύγκριση με την ομάδα των νεοδιαγνωσθέντων (Πίνακας 3.2, Εικ. 3.7).



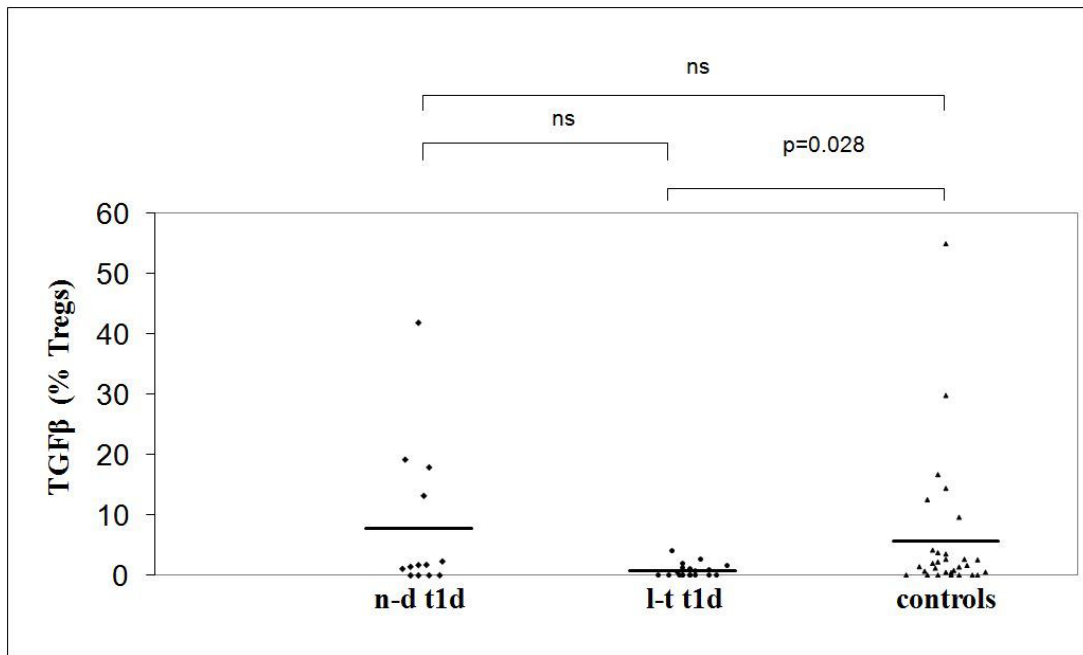
Εικ. 3.3 Οι νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα μεμβρανικής έκφρασης στα Tregs του μορίου CD27 σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες



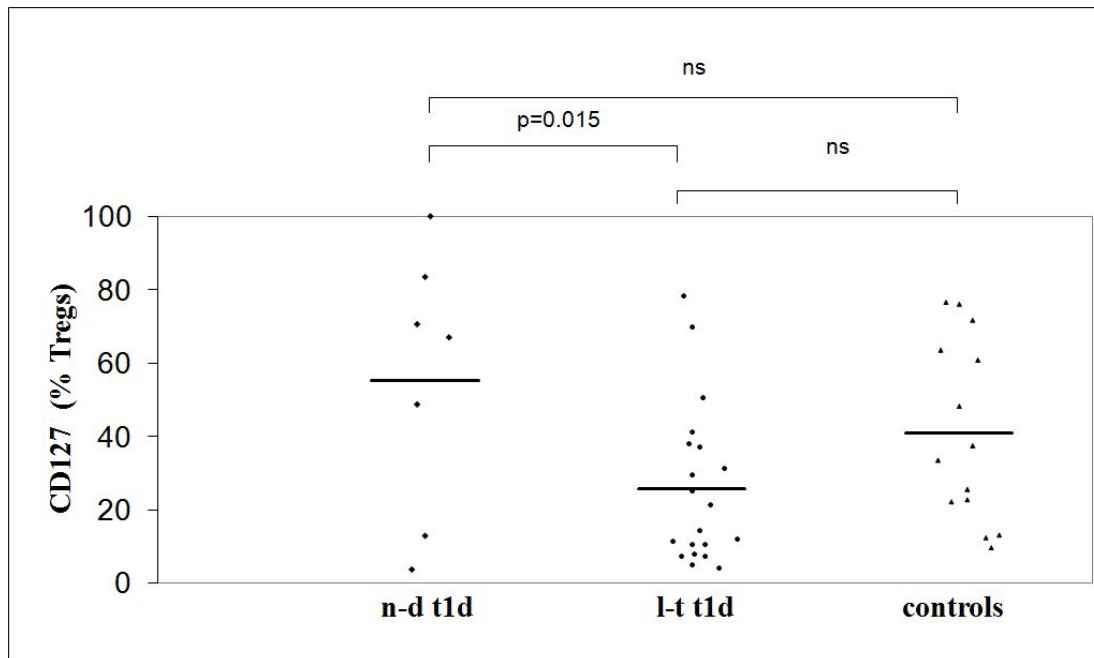
Εικ. 3.4 Οι μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα μεμβρανικής έκφρασης στα Tregs του μορίου CD95 (Fas) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες



Εικ. 3.5 Οι μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα μεμβρανικής έκφρασης στα Tregs του μορίου HLADR σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες

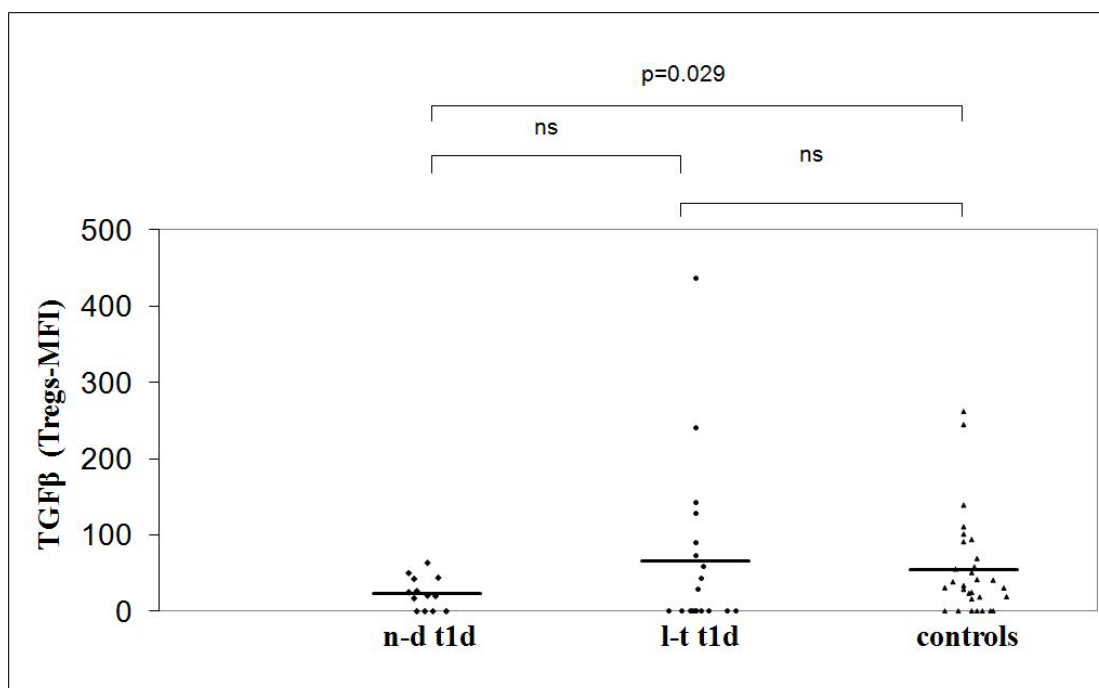


Εικ. 3.6 Μόλις ανιχνεύσιμη μεμβρανική έκφραση στα Tregs του παράγοντα TGFβ για την ομάδα των μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1

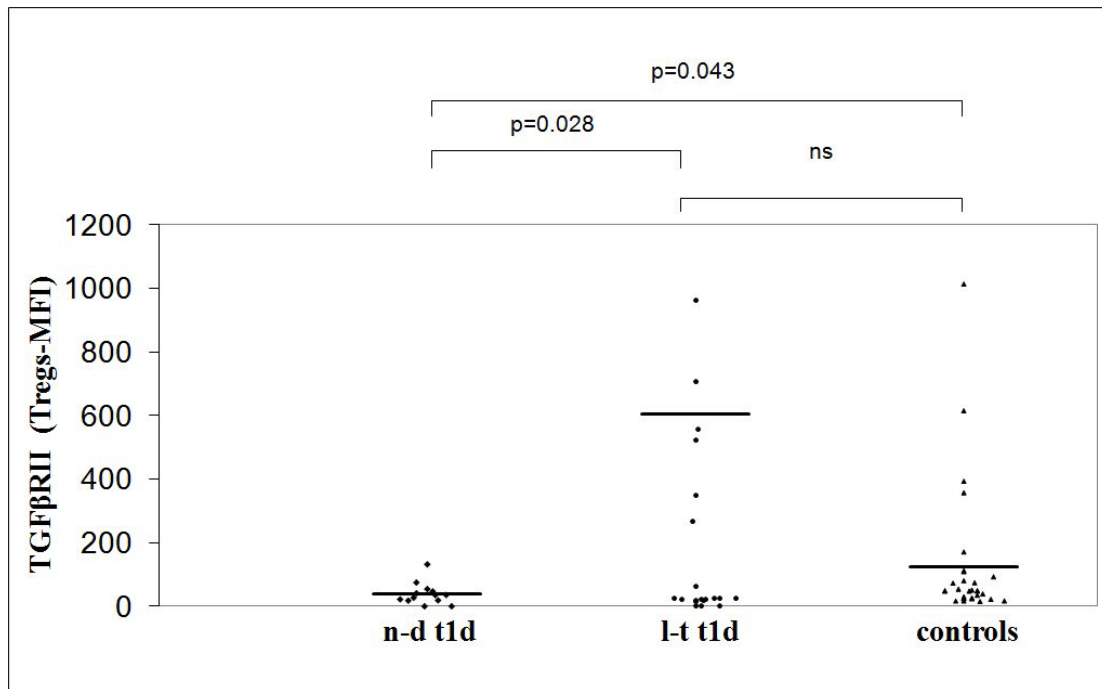


Εικ. 3.7 Η μεμβρανική έκφραση στα Tregs του μορίου CD127 παρουσιάζεται με χαμηλότερη συχνότητα για την ομάδα των μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1

Συζητώντας για διαφορές στο επίπεδο της μεμβρανικής ή ενδοκυττάριας έκφρασης μορίων, όπως αυτό εκφράζεται με τη μέση ένταση φθορισμού (MFI-Mean Fluorescence Intensity), παρατηρούμε μια σημαντική ελάττωση όσον αφορά τα μόρια TGFβ (Πίνακας 3.2, Εικ. 3.8) και TGFβRII (Πίνακας 3.2, Εικ. 3.9) στα Tregs νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών τύπου 1 σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Αντιθέτως, οι μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερο επίπεδο έκφρασης TGFβRII σε σύγκριση με τους νεοδιαγνωσθέντες, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά όταν συγκρίνονται με τους μάρτυρες.



Εικ. 3.8 Ελαττωμένα επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης του TGFβ στα Tregs νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1



Εικ. 3.9 Ελαττωμένα επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης του υποδοχέα TGFβRII στα Tregs νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1

3.3 Έκφραση Αυτοαντισωμάτων

Αυτοαντισώματα κατά GAD65 (GADA), IA-2 (IA-2A) και ινσουλίνης (IAA) ανιχνεύτηκαν στην πλειοψηφία των ορών των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (Πίνακας 3.3). Όλοι οι μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 είχαν αντισώματα κατά της ινσουλίνης, μάλλον κυρίως λόγω της χρόνιας ινσουλινοθεραπείας, ενώ περίπου 60% αυτών εμφάνισαν αντισώματα κατά GAD ή IA-2 και 38.1 % ήταν θετικοί και για τα δύο. Όσον αφορά τους μάρτυρες, ένα άτομο μόνο βρέθηκε θετικό για το anti-GAD65 αυτοαντίσωμα (14.5 U/ml), αλλά για κανένα άλλο αντινησιδιακό αντίσωμα σε επαναλαμβανόμενες δοκιμασίες. Το άτομο αυτό είναι απολύτως υγιές.

Πίνακας 3.3 Συχνότητα έκφρασης Αυτοαντισωμάτων

	GADA % (n)	IA-2A % (n)	IAA % (n)	0 Ab θετικά	1Ab θετικό	2 Ab θετικά	3 Ab θετικά
Μάρτυρες Σύνολο = 26 *	3.8 (1/26)	0 (0/26)	0 (0/26)	96.2 (25/26)	3.8 (1/26)	0 (0/26)	0 (0/26)
Νεοδιαγνωσθέντες διαβητικοί τύπου 1 Σύνολο = 13	61.5 (8/13)	46.2 (6/13)	23.1 (3/13)	23.1 (3/13)	30.8 (4/13)	38.5 (5/13)	7.7 (1/13)
Μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 Σύνολο = 21*	57.1 (12/21)	61.9 (13/21)	100 (21/21)	0 (0/21)	23.8 (5/21)	38.1 (8/21)	38.1 (8/21)

*Ο μικρότερος αριθμός οφείλεται στην ακαταλληλότητα κάποιων δειγμάτων

3.4 Συσχέτιση της συχνότητας και της έντασης έκφρασης των διαφόρων δεικτών των Tregs

Με τη χρήση του λογισμικού Statistical Package for Social Sciences Version 16.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία Pearson's συσχετίσεις για τη συχνότητα και την ένταση έκφρασης μεταξύ των διαφόρων μεμβρανικών και ενδοκυττάρων δεικτών, καθώς και μεταξύ των δεικτών αυτών και του ποσοστού εμφάνισης Tregs, της έκφρασης των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων και της ηλικίας των συμμετεχόντων στη μελέτη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνολικά στους πίνακες 3.4, 3.5, 3.6 και 3.7.

Στα Tregs των φυσιολογικών παρατηρούνται πολύ ισχυρές στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των συχνοτήτων έκφρασης των περισσότερων μορίων που σχετίζονται με την κατασταλτική λειτουργία των Tregs (CD122, CD152, HLA-DR, HLA-DQ, TGFβ, TGFβRII). Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι η συχνότητα έκφρασης των δεικτών CD152, HLA-DQ, TGFβRII και TGFβ σχετίζεται επίσης πολύ υψηλά με την έκφραση του υποδοχέα για την ινσοϋλίνη (CD220) (Πίνακες 3.4, 3.5, Εικ. 3.10-3.15). Στην περίπτωση των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 παρατηρούνται πιο αδύναμες συσχετίσεις που αφορούν και λιγότερες πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη λειτουργία των Tregs (κυρίως CD152, HLA-DR, HLA-DQ και TGFβRII), καθώς επίσης δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση με την έκφραση του CD220, που εμφανίζεται και σε μικρότερα ποσοστά και επίπεδα έκφρασης, μη στατιστικά όμως σημαντικά, σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Αξιοσημείωτη είναι η αρνητική συσχέτιση της συχνότητας έκφρασης του

μορίου CD27 με την ηλικία στους ασθενείς αυτούς (Πίνακες 3.4, 3.5, Εικ. 3.16). Στους μακράς διάρκειας διαβητικούς τύπου 1 ανευρίσκονται περισσότερες συσχετίσεις μεταξύ CD122, HLA-DR, HLA-DQ, FoxP3, και CD45RO, καθώς και με τον αποπτωτικό παράγοντα CD95. Φαίνεται επίσης ότι η συχνότητα του μορίου CD45RO συσχετίζεται με το CD27 που συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και την επιβίωση των B λεμφοκυττάρων μνήμης (Πίνακες 3.4, 3.5, Εικ. 3.17-3.20).

Περνώντας στις συσχετίσεις που αφορούν τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) των διαφόρων παραγόντων στα Tregs, στην περίπτωση της ομάδας των μαρτύρων παρατηρούνται αρκετές που όμως δεν δείχνουν να αφορούν τα ίδια μόρια με τη συχνότητα έκφρασης, με εξαίρεση την περίπτωση των TGFβRII και CD220. Είναι αξιοσημείωτη η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μέσης έντασης φθορισμού του CD28 και του ποσοστού εμφάνισης των Tregs ($p = 0.011$, $r = -0.459$), καθώς επίσης και η θετική συσχέτιση των MFIs του CD28 και HLA-DQ ($p = 0.005$, $r = 0.501$) (Πίνακες 3.6, 3.7). Στην περίπτωση των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών, ανευρίσκονται ισχυρότερες συσχετίσεις που αφορούν τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες της συχνότητας έκφρασης των διαφόρων δεικτών. Έτσι, οι υψηλότερες παρατηρούνται μεταξύ των CD45RO και CD122 ($p < 0.001$, $r = 0.977$), CD127 και CD152 ($p < 0.001$, $r = 0.964$), CD127 και CD122 ($p = 0.003$, $r = 0.957$) και ασθενέστερα μεταξύ CD95 MFI και CD27 MFI ($p < 0.009$, $r = 0.688$). Εξαιρετικού ενδιαφέροντος είναι η υψηλή συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού εμφάνισης των Tregs με τα επίπεδα έκφρασης του μορίου HLA-DQ. Επίσης, αυτές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 με τη μέση ένταση φθορισμού των CD45RO και CD122 στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (Πίνακες 3.6, 3.7, Εικ. 3.22-3.28). Στους μακράς διάρκειας ασθενείς οι συσχετίσεις των MFI για τον αποπτωτικό παράγοντα CD95 με τους παράγοντες CD122 και FoxP3 είναι αρνητικές (-0.625 and -0.580, αντίστοιχα), ενδεικτικές της ύπαρξης ρυθμιστικού μηχανισμού εξισορρόπησης μεταξύ απόπτωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αξιοσημείωτες είναι και οι υψηλές συσχετίσεις του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 με τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) για τα μόρια CD122 και TGFβ (Πίνακες 3.6, 3.7, Εικ. 3.29-3.30).

Πίνακας 3.4 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (p < 0.05) της συχνότητας έκφρασης σε μάρτυρες, νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας διαβητικούς τύπου 1

	IAA	Tregs	CD27	CD95	CD152 ic	Foxp3	CD127	CD45RO	CD122	CD152	CD220	HLADR	HLADQ	TGFβRII	TGFβ	Age
IAA									0.012							
Tregs													0.001			
CD27								0.031 0.014								0.001
CD95						<0.001		<0.001	<0.001			0.002	0.003	0.039		
CD152ic						0.001										
Foxp3				<0.001	0.001			0.009	0.025 <0.001				0.005			0.035
CD127					0.036				0.036 0.010	0.036			0.019			
CD45RO			0.031 0.014	<0.001		0.009			0.008			0.001	<0.001			0.016
CD122	0.012			<0.001		0.025	0.036					0.001	0.009	0.004		
CD152						<0.001	0.010	0.008		0.001		<0.001	0.009 0.003	0.001 0.019	<0.001	
CD220											<0.001		0.013	<0.001	<0.001	
HLADR									0.001				<0.001 0.019 0.007	0.007		
HLADQ		0.001		0.003		0.005	0.019	<0.001	0.009 0.001	0.009 0.003	0.013	<0.001 0.019 0.007		<0.001 0.008		
TGFβRII				0.039					0.004	0.001 0.019	<0.001	0.007	<0.001 0.008			
TGFβ										<0.001	<0.001					
Age			0.001			0.035		0.016								

Πίνακας 3.5 Επίπεδα συσχετίσεων (R coefficient) της συχνότητας έκφρασης σε μάρτυρες, νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας διαβητικούς τύπου 1

	IAA	Tregs	CD27	CD95	CD152 ic	Foxp3	CD127	CD45RO	CD122	CD152	CD220	HLADR	HLADQ	TGFβRI I	TGFβ	Age
IAA									0.561							
Tregs													0.641			
CD27								0.598 0.504								-0.811
CD95						0.907		0.703	0.708			0.611	0.588	0.577		
CD152ic						0.716										
Foxp3				0.907	0.716			0.571	0.558 0.757				0.607			-0.789
CD127									0.583 0.562	0.564			0.544			
CD45RO			0.598 0.504	0.703		0.571			0.535			0.645	0.724			0.650
CD122	0.561					0.558	0.583					0.568	0.478	0.519		
CD152			0.708			0.757	0.562	0.535		0.621			0.649			
CD220											0.904		0.468 0.761	0.583 0.637	0.799	
HLADR									0.621				0.663	0.498	0.711	0.814
HLADQ				0.611				0.645					0.661 0.639 0.544	0.479		
TGFβRII		0.641		0.588		0.607	0.544	0.724	0.649	0.468 0.761	0.498	0.661 0.639 0.544		0.747 0.697		
TGFβ				0.577					0.519	0.583 0.637	0.711	0.479	0.747 0.697			
Age			-0.811			-0.789		0.650								

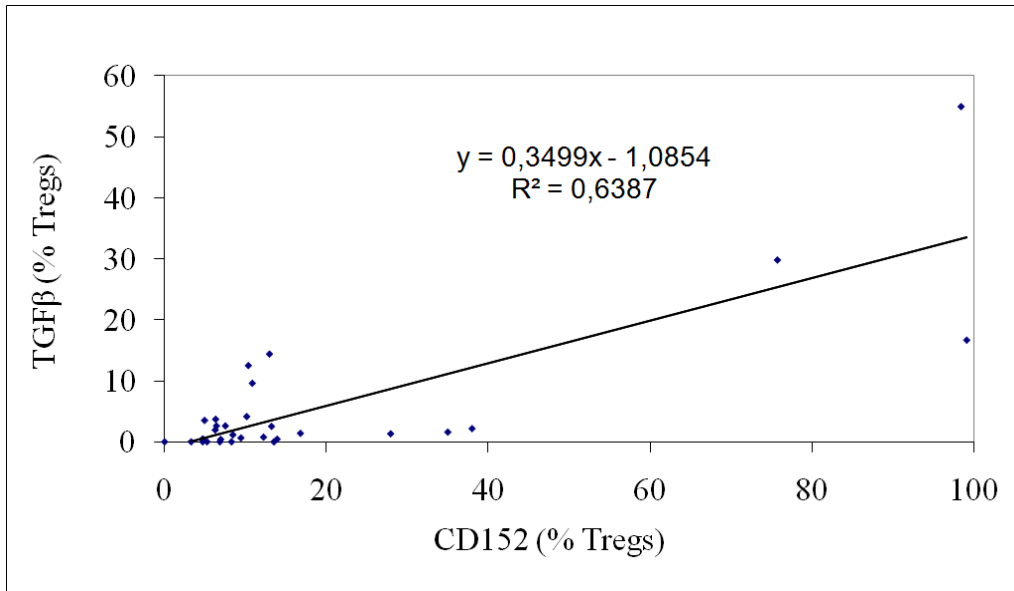
Πίνακας 3.6 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0.05$) της έντασης έκφρασης (MFI) σε **μάρτυρες, **νεοδιαγνωσθέντες** και **μακράς διάρκειας** διαβητικούς τύπου 1**

	IA-2	GADA	Tregs	CD28	CD27	CD95	CD152ic	Foxp3	CD127	CD45RO	CD122	CD152	CD220	HLADR	HLADQ	TGFβRII	TGFβ	Age
IA-2										0.013								
GADA										<0.001	<0.001						<0.001	
Tregs				0.011											0.016			
CD4			0.002 0.004	0.046 0.001		<0.001		0.010										
CD28			0.011		0.037				0.016			0.012			0.005			
CD27				0.037		0.009											0.002	
CD95					0.009			0.039 0.007			0.001							
CD152ic					0.009													0.006
Foxp3						0.039 0.007			0.040									
CD127								0.040			0.003	<0.001		<0.001				
CD45RO	0.013	<0.001		0.016							<0.001		0.038					
CD122		<0.001 <0.001				0.001			0.003	<0.001			0.050				0.001	
CD152				0.012					<0.001									
CD220										0.038	0.050				0.003	0.002		
HLADR									<0.001									
HLADQ			0.016	0.005									0.003					
TGFβRII													0.002					
TGFβ		<0.001			0.002					0.001								
Age							0.006											

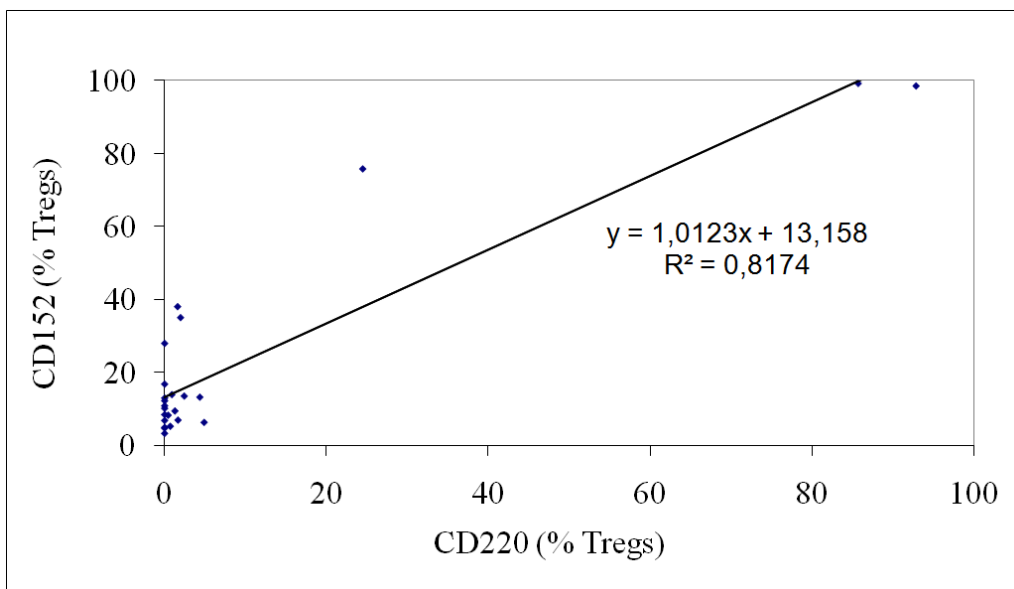
Πίνακας 3.7 Επίπεδα συσχετίσεων (R coefficient) της έντασης έκφρασης (MFI) σε μάρτυρες, νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας διαβητικούς τύπου 1

	IA-2	GADA	Tregs	CD28	CD27	CD95	CD152ic	Foxp3	CD127	CD45RO	CD122	CD152	CD220	HLADR	HLADQ	TGFβRII	TGFβ	Age
IA-2										-0.586								
GADA										0.897	0.941							
Tregs				- 0.549											0.649			
CD4			0.536 - 0.556	0.561 0.560		0.938		0.562										0.927
CD28			- 0.549		0.583				0.560			0.512			0.501			
CD27				0.583		0.688												0.553
CD95					0.688			-0.779 -0.580				-0.625						
CD152ic					-0.579													-0.583
Foxp3						-0.779 -0.580			0.535									
CD127								0.535						0.942				
CD45RO	-0.586	0.897		0.560							0.957	0.964						
CD122		0.941 0.731				-0.625			0.957	0.977			0.629					0.692
CD152				0.512					0.964									
CD220										0.629	0.600							
HLADR									0.942									
HLADQ				0.501														
TGFβRII																0.799 0.603		
TGFβ		0.927			0.553						0.692							
Age							-0.583											

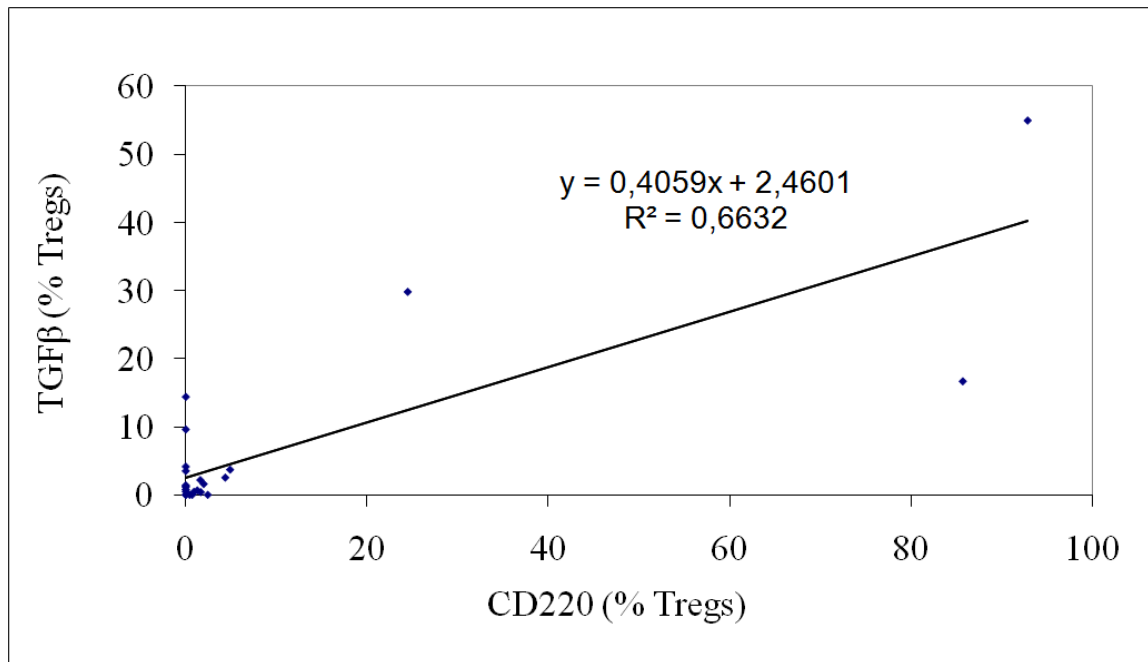
Στις εικόνες 3.10 ως 3.30 παρουσιάζονται με μορφή γραφήματος κάποιες από τις στατιστικά σημαντικές υψηλές συσχετίσεις στη συχνότητα και ένταση έκφρασης διαφόρων δεικτών των Tregs σε φυσιολογικούς μάρτυρες, νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, καθώς και μακράς διάρκειας διαβητικούς.



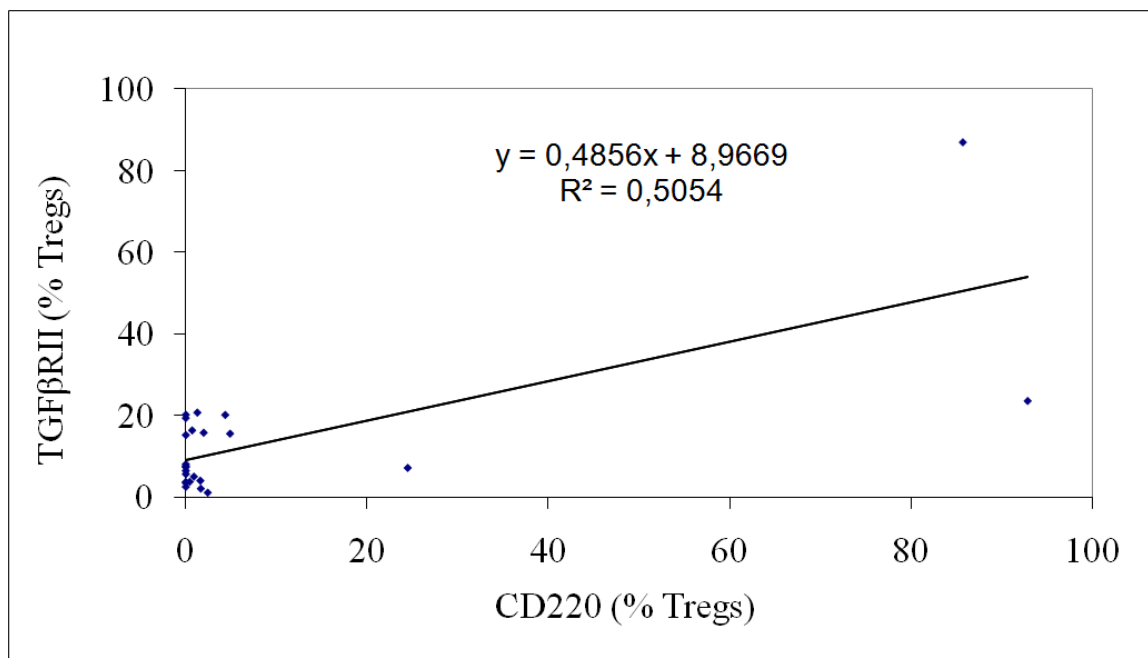
Εικ. 3.10 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD152 και TGFβ στα Tregs των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$, $r = 0.799$)



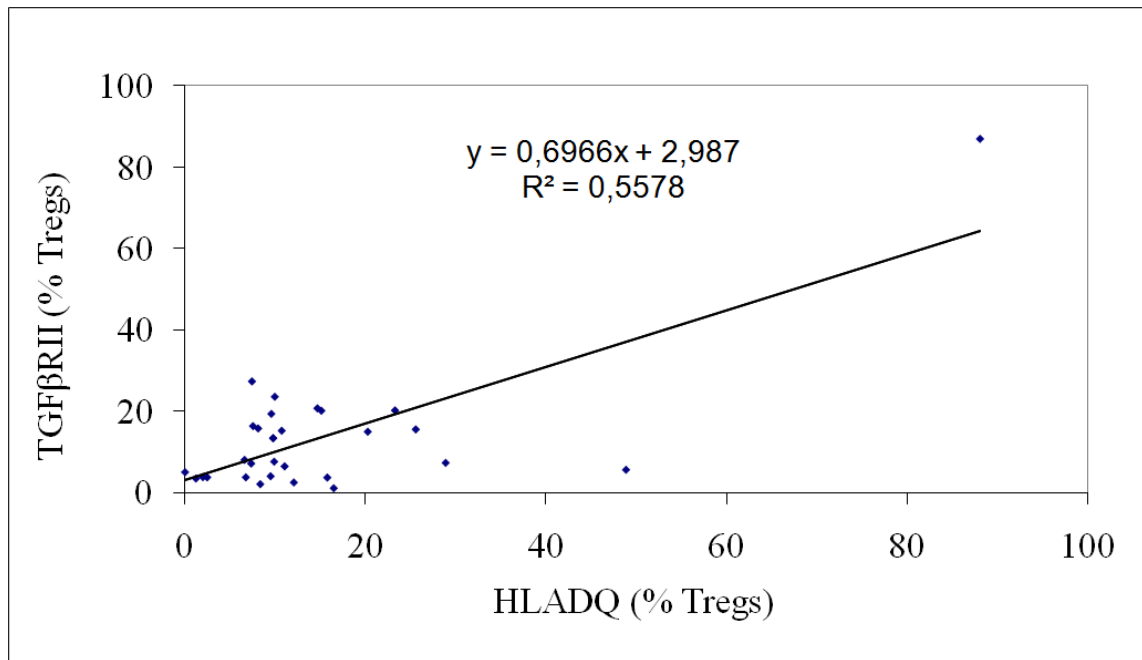
Εικ. 3.11 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD220 και CD152 στα Tregs των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$, $r = 0.904$)



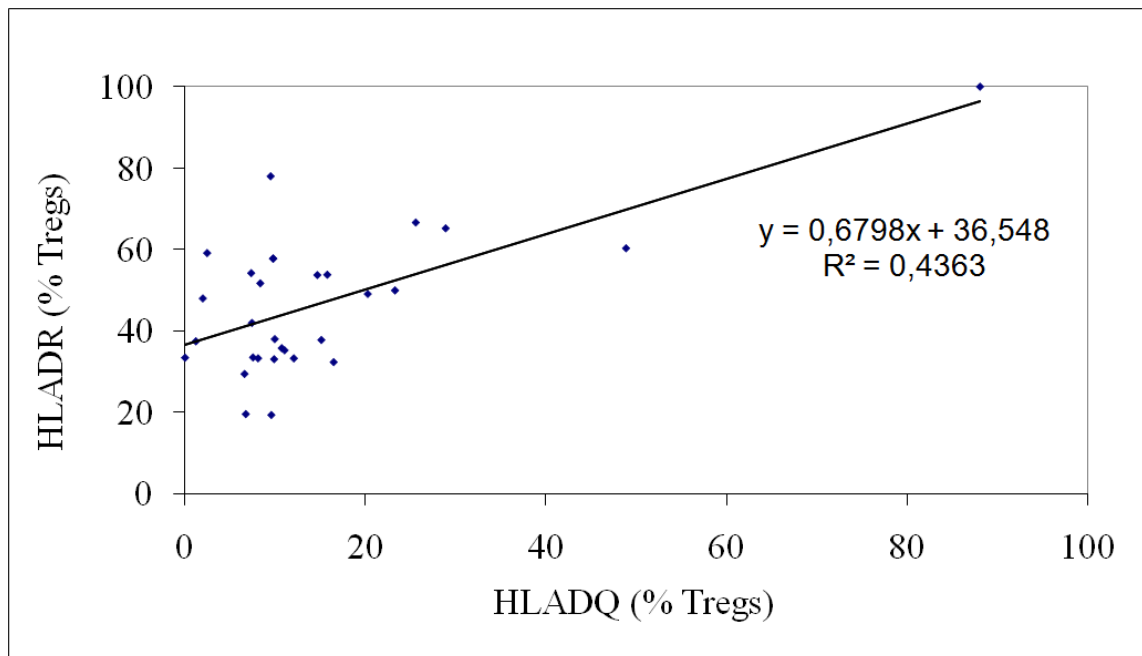
Εικ. 3.12 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD220 και TGFβ στα Tregs των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$, $r = 0.814$)



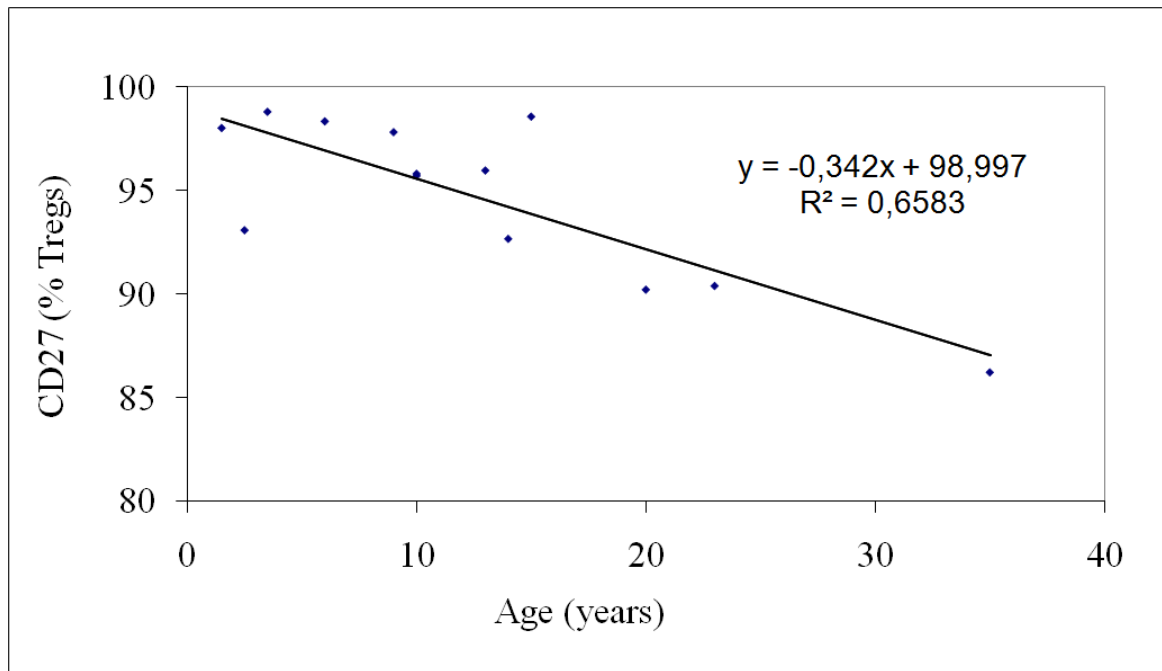
Εικ. 3.13 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD220 και TGFβRII στα Tregs των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$, $r = 0.711$)



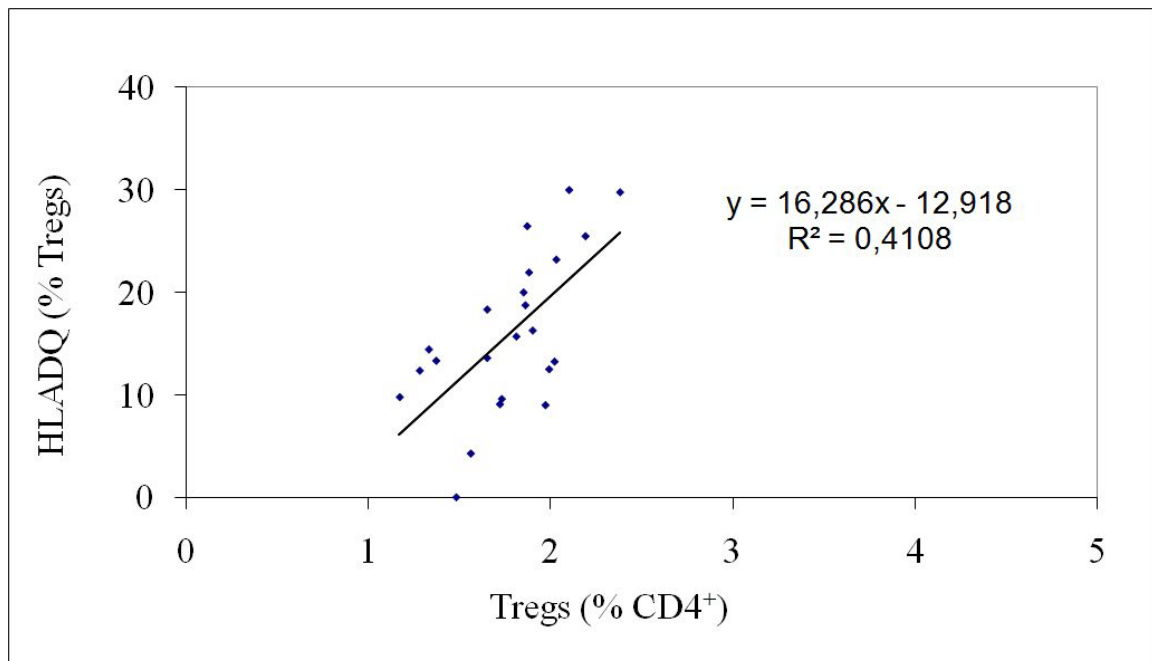
Εικ. 3.14 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων HLADQ και TGFβRII στα Tregs των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$, $r = 0.747$)



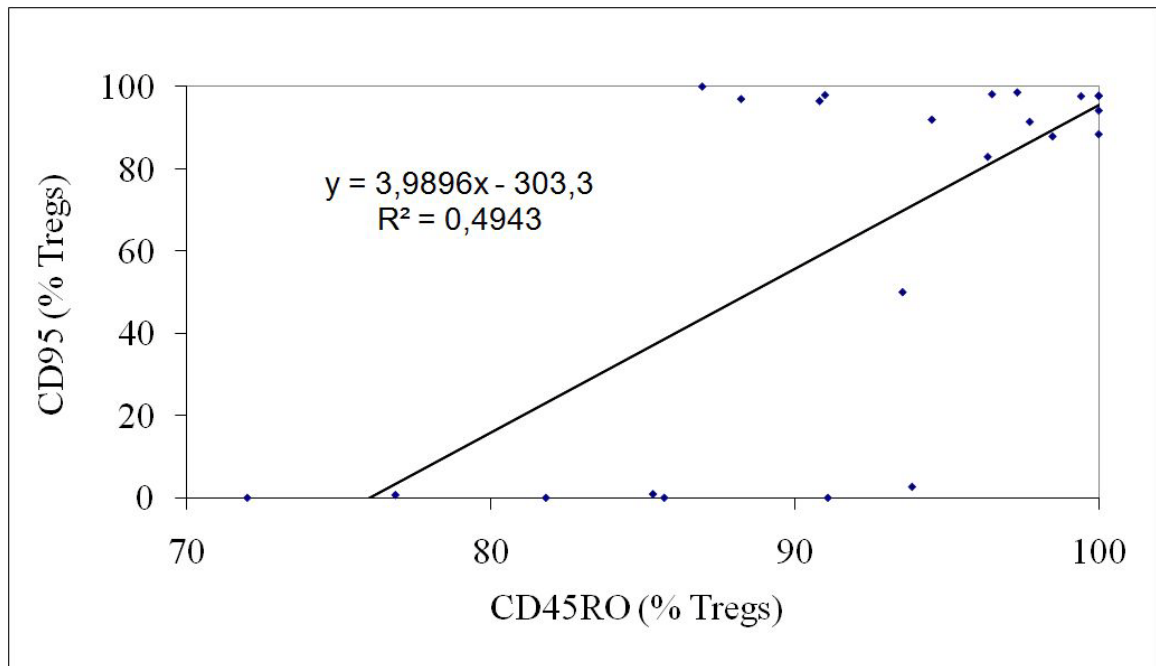
Εικ. 3.15 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων HLADQ και HLADR στα Tregs των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$, $r = 0.661$)



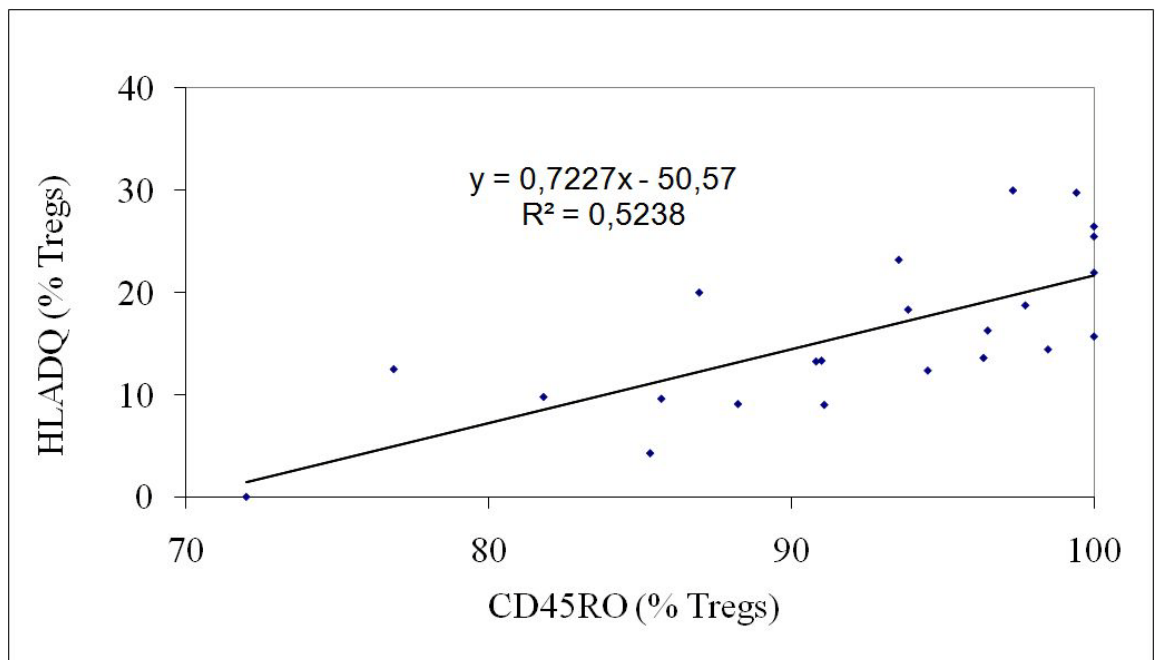
Εικ. 3.16 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης του μορίου CD27 στα Tregs των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 με την ηλικία τους ($p=0.001$, $r= -0.811$)



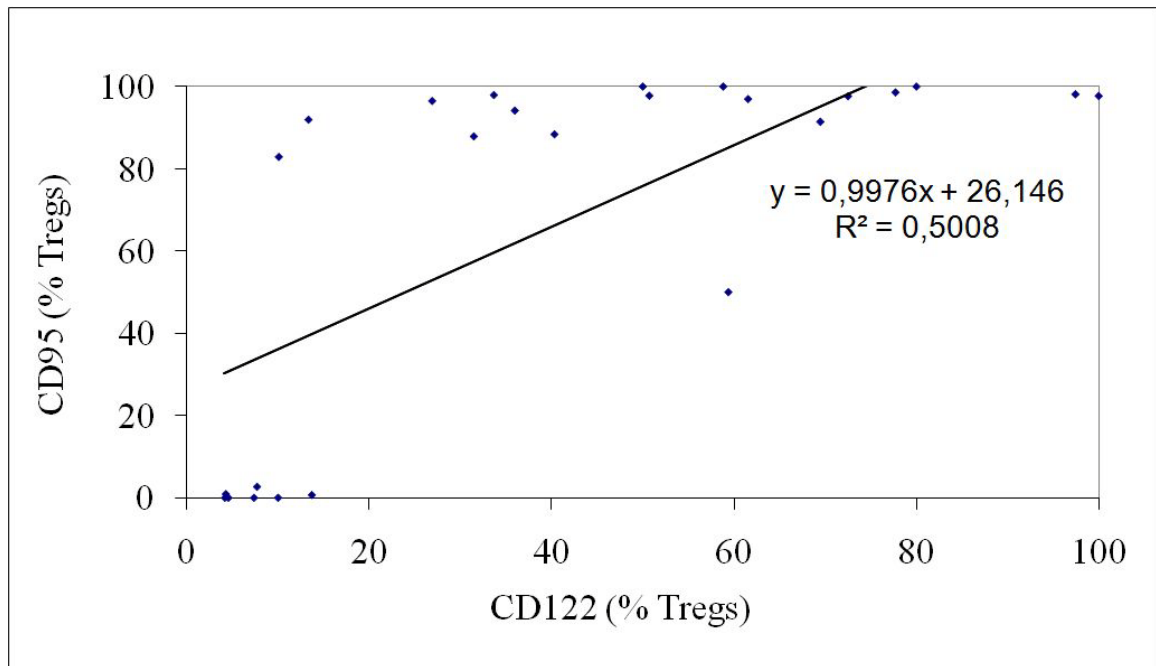
Εικ. 3.17 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων HLADQ στα Tregs των μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 με το ποσοστό εμφάνισής τους ($p=0.001$, $r=0.641$)



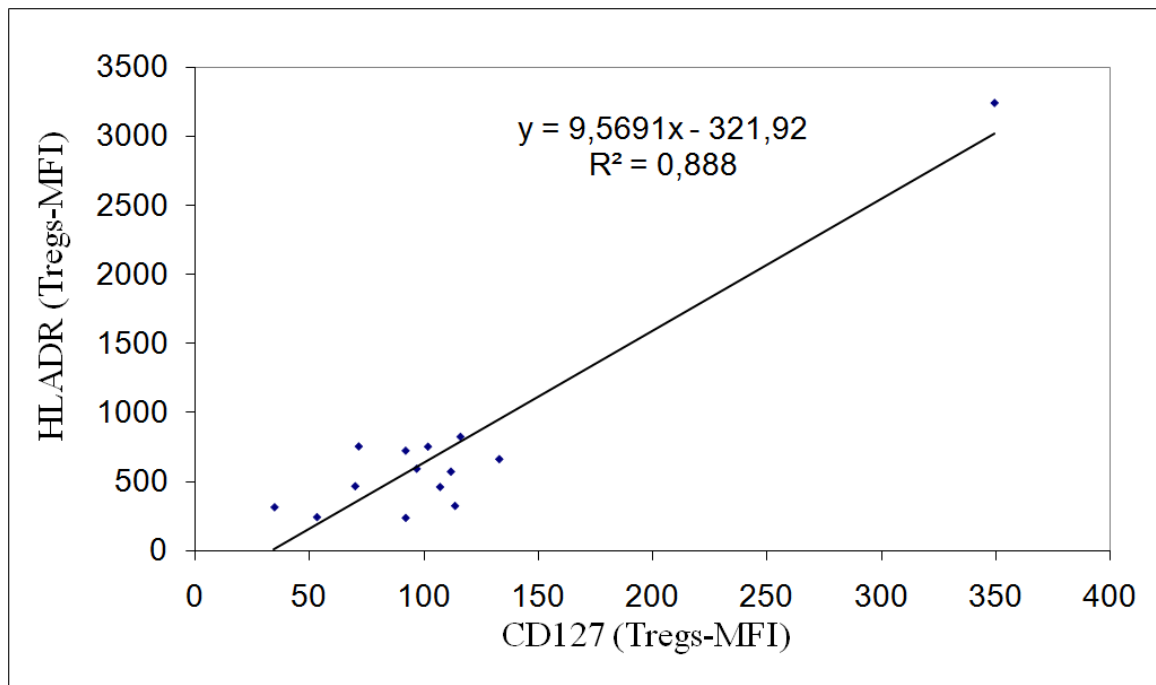
Εικ. 3.18 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD45RO και CD95 στα Tregs των μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p < 0.001$, $r = 0.703$)



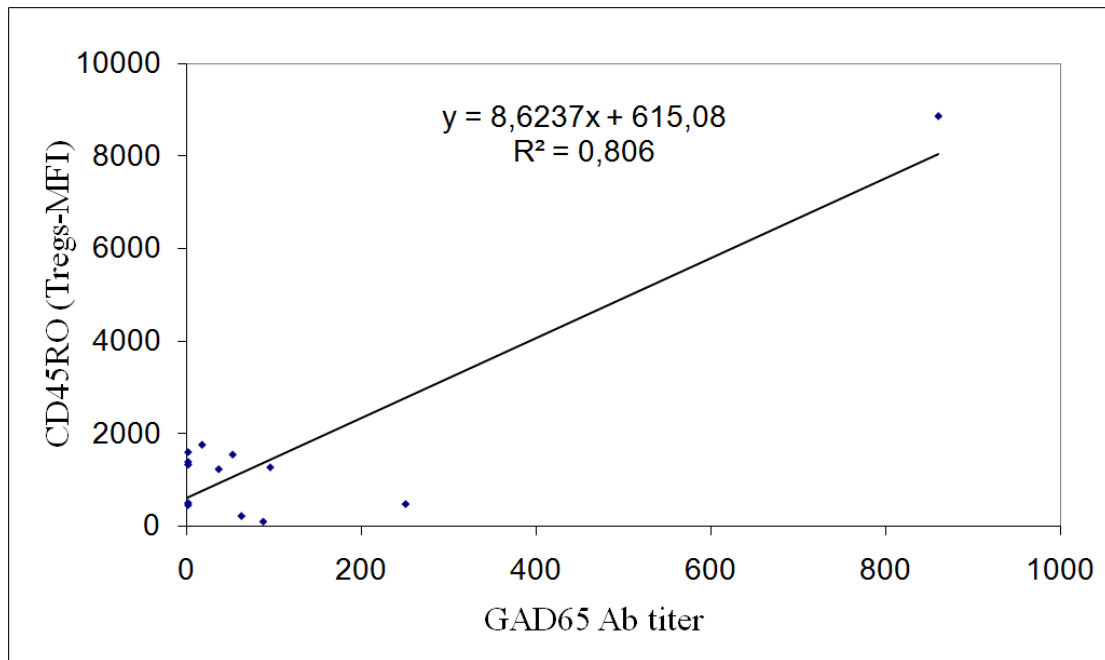
Εικ. 3.19 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD45RO και HLADQ στα Tregs των μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p < 0.001$, $r = 0.724$)



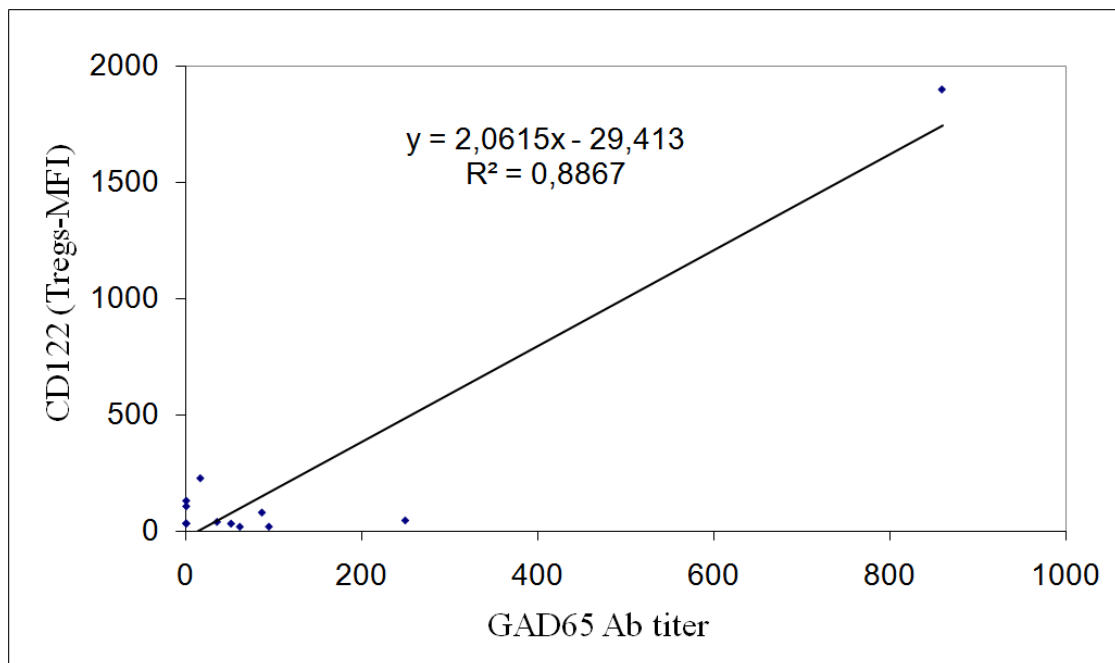
Εικ. 3.20 Διάγραμμα συσχέτισης της συχνότητας μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD122 και CD95 στα Tregs των μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p < 0.001$, $r = 0.708$)



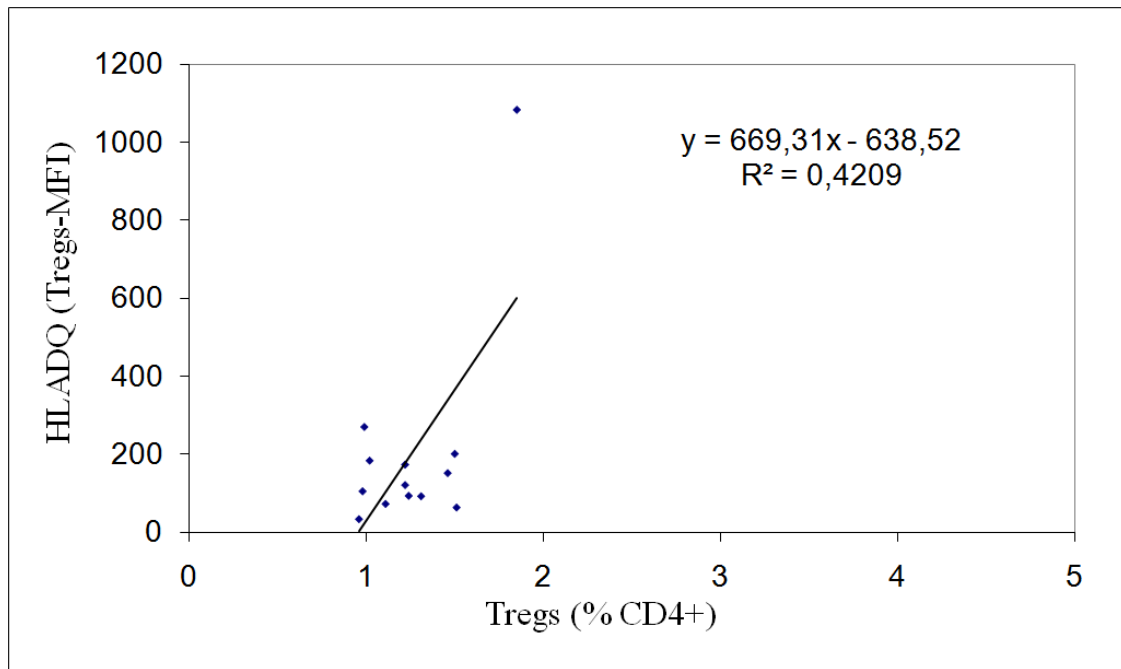
Εικ. 3.21 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD127 και HLADR στα Tregs των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$, $r = 0.942$)



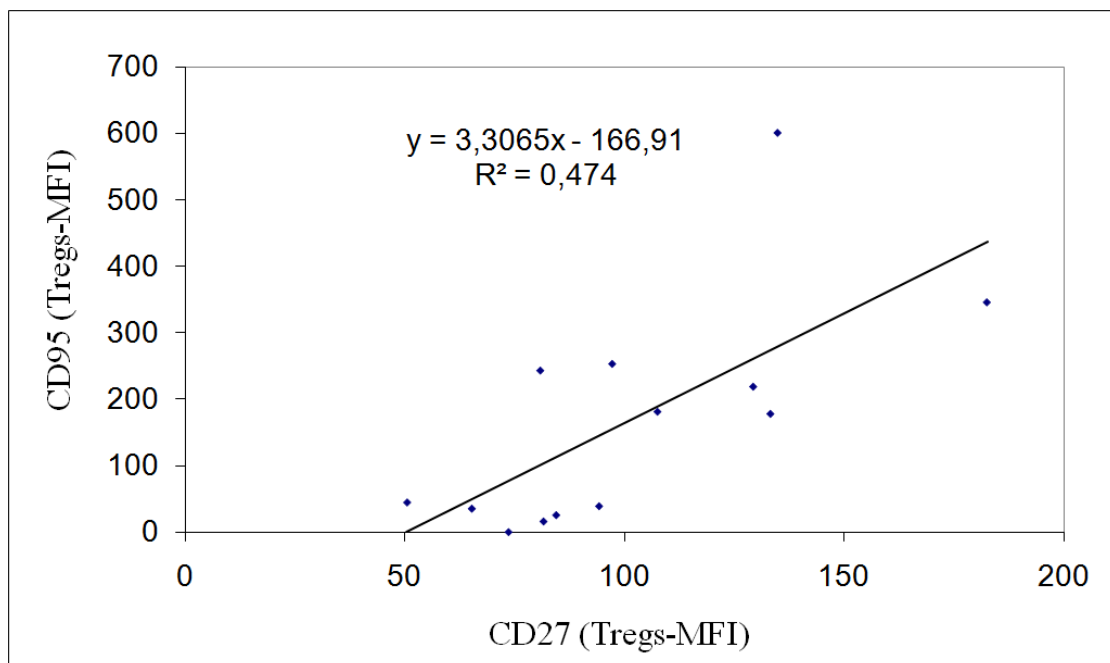
Εικ. 3.22 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης του μορίου CD45RO στα Tregs των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και του τίτλου αντισωμάτων κατά GAD65 ($p < 0.001$, $r = 0.897$)



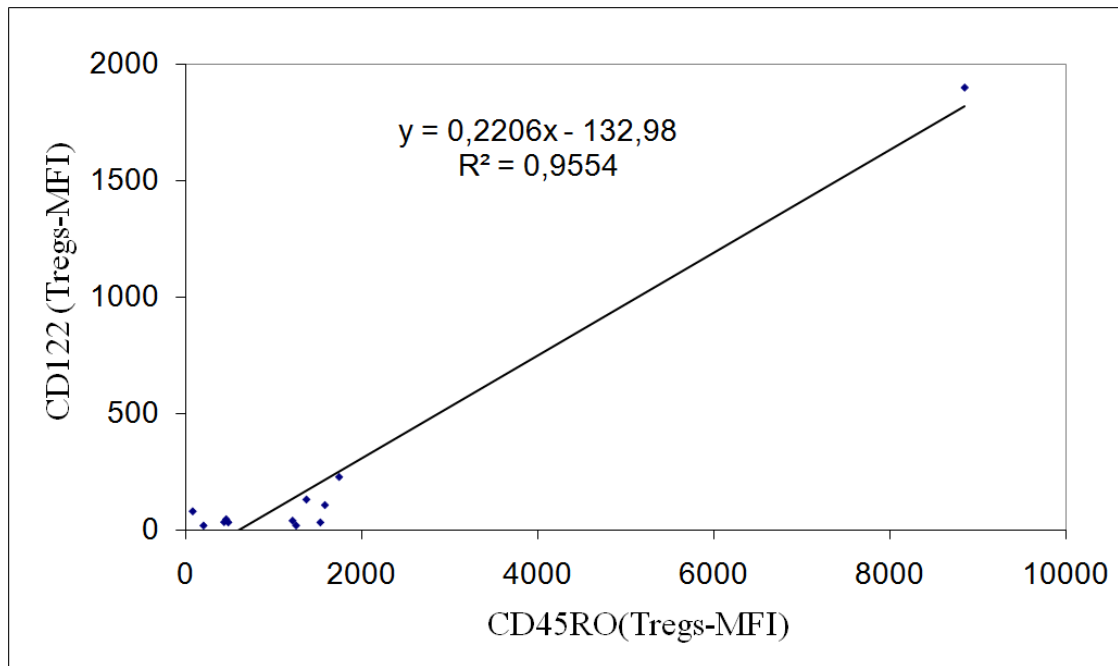
Εικ. 3.23 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης του μορίου CD122 στα Tregs των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και του τίτλου αντισωμάτων κατά GAD65 ($p < 0.001$, $r = 0.941$)



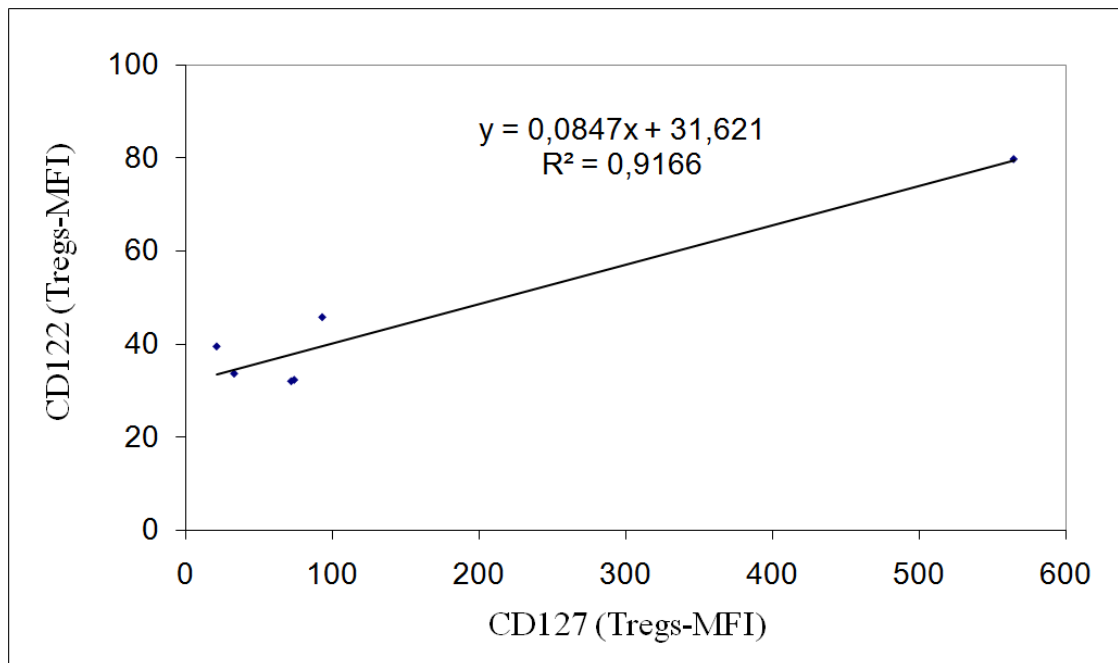
Εικ. 3.24 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης του μορίου HLADQ στα Tregs των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 με το ποσοστό εμφάνισής τους ($p=0.016$, $r=0.649$)



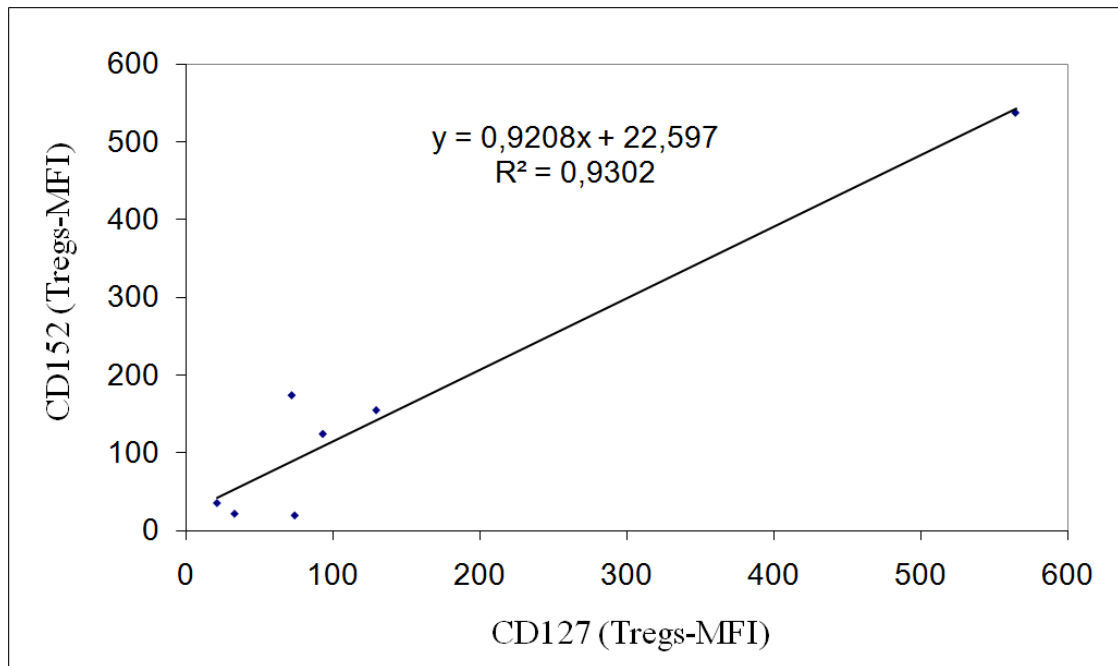
Εικ. 3.25 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD27 και CD95 στα Tregs των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p=0.009$, $r=0.688$)



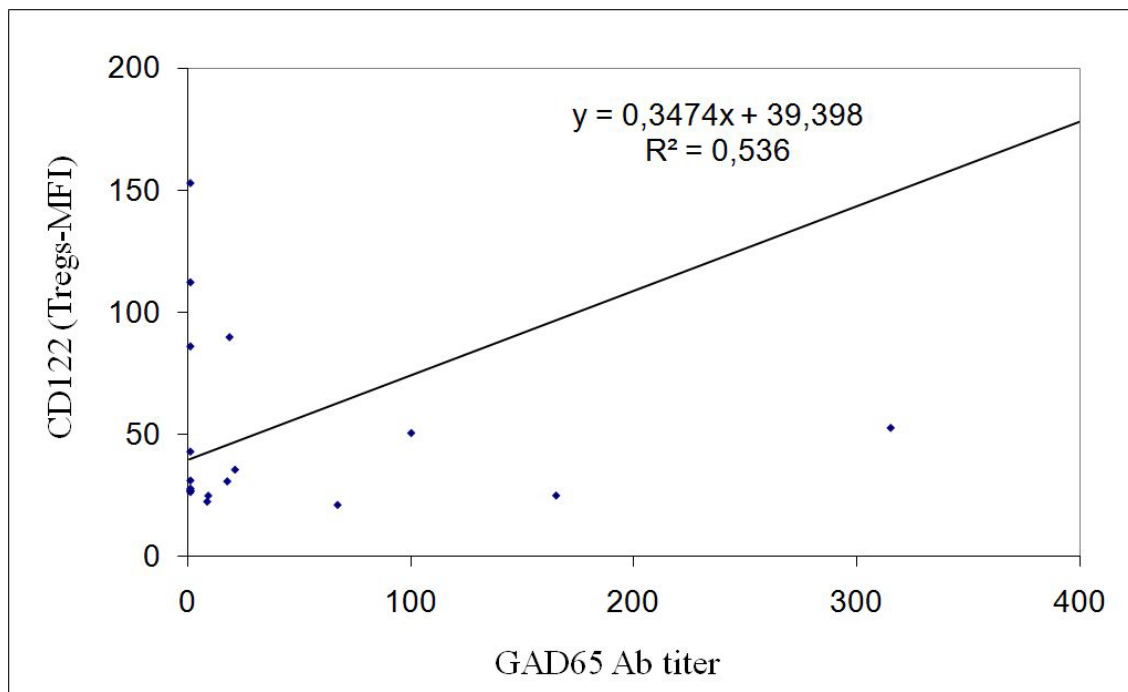
Εικ. 3.26 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD45RO και CD122 στα Tregs των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p < 0.001$, $r = 0.977$)



Εικ. 3.27 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD127 και CD122 στα Tregs των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p = 0.003$, $r = 0.957$)



Εικ. 3.28 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης των μορίων CD127 και CD152 στα Tregs των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p < 0.001$, $r = 0.964$)



Εικ. 3.29 Διάγραμμα συσχέτισης της έντασης μεμβρανικής έκφρασης του μορίου CD122 στα Tregs των μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και του τίτλου αντισωμάτων κατά GAD65 ($p < 0.001$, $r = 0.731$)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί ως τώρα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των ανθρώπινων Tregs είναι πολύ λίγες. Μάλιστα, σε όλες αυτές παρουσιάζονται αντιφατικά αποτελέσματα τόσο όσον αφορά το ποσοστό εμφάνισής τους όσο και την έκφραση διαφόρων παραγόντων σ'αυτά, όπως HLA-DR, CD45RO, CD122 και CD152 (μεμβρανικό και ενδοκυττάριο) (Baecher-Allan και συν. 2001, Dieckmann και συν. 2001, Stephens και συν. 2001, Jonuleit και συν. 2001, Battaglia και συν. 2003). Είναι σημαντικό όμως να τονιστεί ότι μόνο σε μία από τις μελέτες αυτές έγινε πραγματικός διαχωρισμός μεταξύ CD25^{high} Tregs και CD25^{low} Teff (Baecher-Allan και συν. 2001), ενώ σε όλες τις υπόλοιπες θεωρήθηκαν ως T ρυθμιστικά κύτταρα όλα τα CD4⁺CD25⁺ T λεμφοκύτταρα. Επίσης, η δική μας παρατήρηση ότι τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν υψηλά και σταθερά CD25 είναι στην πραγματικότητα χαμηλότερης έντασης έκφρασης για το CD4 (CD4^{dim}) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα Teff (CD25⁺) και Tn (CD25⁻) λεμφοκύτταρα, ενώ είναι προφανής σε μια σειρά από δημοσιεύσεις, τονίζεται σαφώς σε μία και μόνο πολύ πρόσφατη μελέτη (Mjösberg και συν 2009).

Αυτός λοιπόν ο πληθυσμός των ανθρώπινων CD4^{dim}CD25^{high} T λεμφοκυττάρων, που αποτελεί αναμφισβήτητα πληθυσμό T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs), ανευρέθη και διαχωρίστηκε στα δείγματα όλων των συμμετεχόντων στη μελέτη μας. Αποτελεί δε κυτταρικό πληθυσμό που διαφαίνεται και σε άλλες μελέτες που εξετάζουν Tregs σε διαβητικούς τύπου 1 και φυσιολογικούς μάρτυρες (Lindley και συν. 2005, Brusko και συν. 2005, Putnam και συν. 2005, Brusko και συν. 2007). Διαχωρίσαμε επίσης τα κύτταρα αυτά από τα υπόλοιπα CD4⁺CD25⁺ T λεμφοκύτταρα και επειδή τα τελευταία παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση των περισσότερων δεικτών που έχουν συνδεθεί με την κατασταλτική λειτουργία των Tregs, ικανές να τα διαχωρίσουν ασφαλώς από τα αληθή Tregs. Επιπρόσθετα, στον κυτταρικό αυτό πληθυσμό επιβεβαιώθηκε και η χαμηλή ως ελάχιστη έκφραση του CD127 (CD127^{dim/-}) στην περίπτωση των υγιών εθελοντών που μάλιστα φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση των διαβητικών τύπου 1. Συνεπώς, ο αυστηρά καθορισμένος T λεμφοκυτταρικός πληθυσμός που παρουσιάζουμε στη μελέτη μας αποτελεί με όσο μεγαλύτερη ακρίβεια γίνεται αληθή πληθυσμό T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs). Η προσέγγισή μας δεν μπορεί να αποκλείσει ότι κάποια μικρά ποσοστά Tregs βρίσκονται εκτός του δικού μας πληθυσμού, αυτά όμως από τις μέχρι τώρα αναλύσεις δεν μπορεί να είναι αξιοσημείωτα. Έτσι, οποιαδήποτε

ποσοτική και ποιοτική σύγκριση των κυττάρων αυτών μεταξύ ομάδων ατόμων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σωστή βάση.

Η μελέτη μας καταλήγει σε αποτελέσματα εκ των οποίων αρκετά είναι αντίθετα με αποτελέσματα άλλων εργασιών που σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά των Tregs σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Kukreja και συν. 2002, Lindley και συν. 2005, Brusko και συν. 2005, Putnam και συν. 2005, Tree και συν. 2006, Brusko και συν. 2007). Εξετάζοντας τους λόγους αυτών των διαφορών μπορούμε να σημειώσουμε κατ' αρχάς ότι στη μελέτη μας καθώς και σε δύο μόνο προηγούμενες της ίδιας ερευνητικής ομάδας η επώαση των αντισωμάτων έγινε σε ολικό περιφερικό φλεβικό αίμα (Brusko και συν. 2005, Brusko και συν. 2007), ενώ σε όλες τις υπόλοιπες τα κύτταρα απομονώθηκαν με Ficoll-Hyraque και ακολούθησε στη συνέχεια η επώαση με τα αντίστοιχα αντισώματα (Kukreja και συν. 2002, Lindley και συν. 2005, Tree και συν. 2006). Δεύτερο σημαντικό λόγο αποτελεί ο διαφορετικός ορισμός του πληθυσμού των Tregs από μελέτη σε μελέτη: α) Σε κάποιες θεωρούνται ως Tregs όλα τα $CD4^+CD25^+$ λεμφοκύτταρα (Kukreja και συν. 2002, Lindley και συν. 2005, Brusko και συν. 2005) β) σε άλλες αυτά που περιλαμβάνονται στο κορυφαίο 2 %, όσον αφορά έκφραση του CD25, των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων (Putnam και συν. 2005), γ) ενώ σε κάποιες άλλες όλα τα $CD25^+FoxP3^+$ λεμφοκύτταρα (Brusko και συν. 2007). Σε όλες όμως αυτές τις περιπτώσεις επιλέγονται σίγουρα λανθασμένα κάθε φορά λεμφοκύτταρα ως T ρυθμιστικά. Στην πρώτη περιλαμβάνονται σίγουρα και Teff, ενώ στη δεύτερη είτε μόνο κάποια από τα συνολικά Tregs ή και Teff μαζί ανάλογα με το πραγματικό ποσοστό των αληθινών Tregs στο συγκεκριμένο άτομο. Όσον αφορά την τελευταία προσέγγιση, δεν λαμβάνεται υπόψη το γεγονός της ύπαρξης $CD3^+CD8^+FoxP3^+$ λεμφοκυττάρων που ονομάζονται συχνά CD8-Tregs. (Bisikirska και συν. 2005) καθώς επίσης και των $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ λεμφοκυττάρων που δεν αποτελούν Tregs (Gavin και συν. 2006). Έτσι, υπάρχει ο κίνδυνος υποεκτίμησης ή υπερεκτίμησης των μετρούμενων $CD4^+$ Tregs, καθώς σε φυσιολογικούς μάρτυρες υπάρχουν $CD8^+CD25^{high}$ ρυθμιστικά κύτταρα, τα οποία πιθανώς είναι ελαττωμένα στους ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (Bisikirska και συν. 2005, James και συν. 2007, Andersen και συν. 2009). Με αυτό τον τρόπο είναι εύκολο να υπολογίσει κανείς λιγότερα $CD4^+CD25^{high}$ Tregs σε υγιείς και περισσότερα σε διαβητικούς τύπου 1.

Επομένως, οι διαφορές στα ευρήματα μεταξύ της δικής μας μελέτης και των προηγούμενων για το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 είναι συνέπεια της διαφορετικής προσέγγισης του πληθυσμού των Tregs, αν αναλογισθεί κιόλας κανείς ότι οι περισσότερες από τις προηγούμενες εργασίες διενεργήθηκαν όταν σημαντικά αντισώματα για τον διαχωρισμό τους (π.χ. CD127, FoxP3) ή δεν ήταν διαθέσιμα ή δεν είχε καταδειχθεί ακόμη η χρησιμότητά τους (Liu και συν. 2006, Seddiki και συν. 2006, Roncador και συν. 2005, Godfrey και συν. 2005). Σε μια πρόσφατη ερευνητική μελέτη, στην οποία τα ανθρώπινα CD4⁺ Tregs διαχωρίζονται με βάση την έκφραση των μεμβρανικών μορίων CD45RA και CD25, φάνηκε ότι αληθής κατασταλτικές ιδιότητες παρουσιάζουν μόνο τα CD4⁺CD45RA⁻CD25^{high}FoxP3^{high} λεμφοκύτταρα, που ονομάστηκαν από τους συγγραφείς *ενεργοποιημένα* Tregs, σε αντίθεση με τα CD4⁺CD45RA⁺CD25⁺FoxP3^{low} λεμφοκύτταρα που ονομάστηκαν *σε ηρεμία* Tregs (Miyara και συν. 2009). Καθώς η περιφερική έκφραση των CD45RO και CD45RA είναι αμοιβαία αποκλειστική, δηλαδή η έκφραση του ενός αναιρεί την έκφραση του άλλου, μπορούμε να πούμε ότι με τη δική μας μεθοδολογία διαχωρισμού στην ομάδα των Tregs περιλαμβάνονται όλα τα κύτταρα του πρώτου πληθυσμού και ένα μικρό τμήμα του δεύτερου. Είναι αξιοσημείωτο ότι στα κυτταρογράμματα CD4/FoxP3 αυτής της μελέτης φαίνεται καθαρά ότι το κορυφαίο τμήμα του πληθυσμού όσον αφορά την έκφραση του FoxP3 είναι ενδιάμεσης έντασης έκφρασης για το CD4 (CD4^{dim}), γεγονός απόλυτα συμβατό με τα δικά μας ευρήματα.

Ακολουθώντας λοιπόν την περιγραφείσα μεθοδολογία, ανακοινώνουμε για πρώτη φορά στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό εμφάνισης των Tregs (ως ποσοστό των CD4⁺) λεμφοκυττάρων μεταξύ νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, μακράς διάρκειας διαβητικών και φυσιολογικών μαρτύρων. Παρατηρείται ότι η στατιστικά σημαντική ποσοτική ανεπάρκεια των CD4^{dim}CD25^{high} Tregs στους νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς τύπου 1 μόνο μερικώς διορθώνεται με την παρέλευση του χρόνου. Σε μια προηγούμενη μελέτη φάνηκε ότι το ποσοστό εμφάνισης των CD4⁺CD25⁺ εξαρτάται (σε χαμηλό βέβαια βαθμό) από την ηλικία του ατόμου, είτε είναι διαβητικός τύπου 1 είτε υγιής εθελοντής (Brusko και συν. 2005). Στη δική μας μελέτη παρατηρούμε μια μικρή συσχέτιση με την ηλικία του ποσοτού εμφάνισης αυτών των CD4⁺CD25⁺ λεμφοκυττάρων (δηλαδή πραγματικά Tregs + Teff) μόνο στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p < 0.001$, $r = 0.869$). Δεν βρίσκουμε το ίδιο για τα

CD4^{dim}CD25^{high} Treg, ενώ αντίθετα παρατηρείται περίπου ίδια συσχέτιση του ποσοστού των Teff με την ηλικία στους ασθενείς αυτούς, γεγονός απόλυτα δικαιολογημένο αν αναλογισθεί κανείς ότι τα Teff λεμφοκύτταρα είναι περίπου 10 φορές περισσότερα από τα Tregs στο περιφερικό αίμα κάθε ατόμου. Επομένως, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό εμφάνισης των Tregs μεταξύ διαβητικών τύπου 1 και φυσιολογικών μαρτύρων που αναδεικνύονται από τη μελέτη μας δεν μπορούν να επηρεάζονται από την ηλικία των συμμετεχόντων.

Τέτοιες στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό εμφάνισης των Tregs μεταξύ ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και υγιών εθελοντών ρίχνουν νέο φως στην παθογένεση της νόσου. Παρατηρούμε ποσοτική ανεπάρκεια των Tregs κατά την έναρξη του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, ενώ σε ασθενείς με μεγαλύτερη διάρκεια νόσου το φαινόμενο αντισταθμίζεται εν μέρει με ποσοστά που είναι μεν υψηλότερα, δεν φτάνουν όμως αυτά των υγιών εθελοντών. Σκόπιμα στη μελέτη μας δρομολογήσαμε φυσιολογικούς μάρτυρες που δεν έχουν κανένα συγγενή πρώτου ή δευτέρου βαθμού με αυτοάνοσο νόσημα, καθώς πολλές ασθένειες με αυτοάνοση αιτιολογία έχουν συνδεθεί με ανεπάρκεια ή δυσλειτουργία των Tregs, καθώς επίσης και με γενετικές μεταλλάξεις γονιδιακών τόπων που είναι σημαντικοί για τη λειτουργία των Tregs (π.χ. CD25, CD152) (Ueda και συν. 2003, Chikuma και συν. 2007, Anjos και συν. 2004, Lowe και συν. 2007). Στο σύνδρομο IPEX, που συνοδεύεται από απόλυτη ανεπάρκεια των Tregs, ο νεογνικός Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 αποτελεί μία από τις συνηθέστερες εκδηλώσεις ακόμα και σε άτομα που φέρουν τα προστατευτικά για τη νόσο HLA-DQ γονίδια (Chatila και συν. 2000, Ziegler και συν. 2006). Είναι ακόμη εκπληκτική η περίπτωση ενός 18μηνου αγοριού με σύνδρομο IPEX και συνοδό νεογνικό Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 που υπεβλήθη σε θεραπευτική μεταμόσχευση μυελού των οστών και ανέκτησε μερικώς μερική λειτουργία των β νησιδιοκυττάρων του ενδοκρινούς παγκρέατος, μιας και η απαιτούμενες δόσεις της χορηγούμενης ινσουλίνης μειώθηκαν δραματικά (Rao και συν. 2007). Είναι προφανές ότι τα Tregs συμμετέχουν δραστικά στην περιφερική ανοχή που αφορά τα β νησιδιοκύτταρα και τα αντιγόνα τους και οποιαδήποτε ανεπάρκειά τους επηρεάζει τη διαδικασία αυτή δραστικά.

Επίσης αδυναμία όλων των μελετών που αφορούν τα Tregs στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 με εξαίρεση μία (Lindley και συν. 2005), που ωστόσο λαμβάνει το σύνολο των CD4⁺CD25⁺ T λεμφοκυττάρων ως Tregs αποτελεί το γεγονός ότι δεν

υπάρχει καμία HLA-DR/DQ αντιστοίχιση ασθενών και μαρτύρων. Καθώς τα αντιγόνα HLA-DR/DQ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των Tregs στο θύμο και στην περιφέρεια (Ziegler και συν. 2006, Kim και συν. 2007) και όλα τα γενετικώς συσχετιζόμενα με το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 τάξης II αλληλόμορφα MHC στον Καυκάσιο πληθυσμό είναι αποκλειστικά $\beta 57Asp^-$ (Todd και συν. 1987, Thorsby και συν. 1993, Moustakas και συν. 2002), αυτό μπορεί να σημαίνει πιο αδύναμες τριμερείς αλληλεπιδράσεις (TCR-MHC-πεπτίδιο) και συνεπώς μικρότερο ποσοστό κυττάρων στο θύμο που επιλέγονται ως Tregs (Chatila και συν. 2000, Hori και συν. 2003, Hsieh και συν. 2004). Καμία μελέτη συσχέτισης του ποσοστού εμφάνισης των Tregs με τα διάφορα αλληλόμορφα MHC II σε υγιείς πληθυσμούς δεν έχει πραγματοποιηθεί. Θα ήταν πολύ χρήσιμη ώστε να αποδειχθεί ή να απορριφθεί η υπόθεση αυτή. Όσον αφορά τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη μας, όπως συμβαίνει για όλους τους διαβητικούς τύπου 1 ελληνικής καταγωγής, είναι HLA-DR3/DQ2 και/ή HLA-DR4/DQ8 (Hermann και συν. 2004).

Η σπουδαιότητα της παρατήρησής μας ότι τα Tregs είναι στην πραγματικότητα χαμηλότερης έντασης έκφρασης για το CD4 ($CD4^{dim}$) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα Teff και Tn λεμφοκύτταρα δεν μπορεί να αξιολογηθεί πλήρως προς το παρόν. Το μόριο CD4 είναι πολύ σημαντικό για τη μεταβίβαση σήματος μέσω εξωκυττάρων δεσμών επαφής τόσο στην εγγύς T μεμβρανική ζώνη όσο και στις $\alpha_2\beta_2$ δομικές περιοχές των τάξης II μορίων MHC (König και συν. 1995, Mallaun και συν. 2008). Καθώς η πυκνότητα των αλυσίδων $\alpha\beta$ των υποδοχέων TCR στα Tregs είναι σχεδόν πανομοιότυπη με αυτή που παρουσιάζουν τα Teff και τα Tn λεμφοκύτταρα σε κάθε άτομο, παρατηρείται συνεπώς χαμηλότερη αναλογία CD4/TCR μορίων στα Tregs σε σύγκριση με τα υπόλοιπα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα (Teff και Tn). Είναι λοιπόν πιθανό ότι τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του CD4 στα Tregs είναι ένας από τους σημαντικούς λόγους της καθυστερημένης και διαταραγμένης σε σχέση με τα Teff μεταφοράς σήματος από τα λεμφοκύτταρα αυτά (Tsang και συν. 2006, Carson και συν. 2007).

Περνώντας στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των $CD4^{dim}CD25^{high}$ Tregs όπως προκύπτουν από τη μελέτη μας με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, παρατηρούμε ότι καθολικά είναι $CD4^{dim}CD25^{high}CD28^+CD27^+CD45RO^+CD127^{dim}/FoxP3^+$ T κύτταρα που εκφράζουν επίσης σε ποικίλη έκταση και άλλους δείκτες όπως CD95, CD122, CD152 (μεμβρανικό και ενδοκυττάριο), CD220, HLA-DR (περίπου 50 %

των κυττάρων), HLA-DQ, TGFβ, and TGFβRII. Η δική μας είναι η πρώτη μελέτη που ρητά αποδεικνύει την παρουσία των μορίων TGFβRII, HLA-DQ και CD220 στη μεμβρανική επιφάνεια των Tregs. Αν και η παρουσία του υποδοχέα TGFβRII θα μπορούσε να συναχθεί από την πολυσυζητημένη άμεση δράση του προσδέτη του (TGFβ) στα Tregs (Chen και συν. 2003, Nakamura και συν. 2004, Ostroukhova και συν. 2006, Li και συν. 2006, Li και συν. 2007, Pesu και συν. 2008), η έκφραση των δεικτών HLA-DQ και CD220 αποτελεί εντελώς νέο εύρημα που δεν έχει φανεί ούτε σε πειραματικές μελέτες σε ποντίκια σχετικά με το φαινότυπο των Tregs σ' αυτά (Gavin και συν. 2007). Αξίζει να τονίσουμε ότι το μόριο CD122 αποτελεί την αλυσίδα β του υποδοχέα για την IL-2 και μαζί με το CD25 (αλυσίδα α του υποδοχέα για την IL-2) συμμετέχουν στο σχηματισμό του τριμερούς υποδοχέα IL-2Rαβγ_c (Stauber και συν. 2006). Το γεγονός ότι στη μελέτη μας ανευρίσκονται και τα δυο σε επίπεδα τουλάχιστον διπλάσια στα Tregs σε σύγκριση με τα Teff, εξασφαλίζει την πρόσδεση σ' αυτά όλης της διαθέσιμης IL-2 που παράγεται από τα Teff και αποδεικνύει την αναγκαιότητα της ιντερλευκίνης αυτής για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των Tregs. Καθώς η έκφραση της αλυσίδας γ_c (CD132) είναι ομοιόμορφη σε όλα τα T λεμφοκύτταρα και η Μέση Ένταση Φθορισμού (MFI) της IL-2Rβ (CD122) είναι ίση περίπου σε Tregs και Teff, συμπεραίνουμε ότι τα Teff του περιφερικού αίματος βρίσκονται σε πλεονεκτική θέση όσον αφορά την πρόσδεση της IL-2, μιας και αυτά μπορούν και την παράγουν επίσης. Από την άλλη, τα τριπλάσια ή και τετραπλάσια επίπεδα του CD25 στη μεμβράνη των Tregs ίσως είναι αυτά που επιτρέπουν στα τελευταία την πρόσδεση της IL-2, αρκεί βέβαια να είναι διαθέσιμα τα τριμερή IL-2Rαβγ_c.

Εκτός από τη σημαντική ποσοτική ανεπάρκεια των Tregs τόσο στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 όσο και στους μακράς διάρκειας διαβητικούς σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες, παρατηρούμε επίσης σημαντικές ποιοτικές διαφορές στο φαινότυπό τους μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας καταδεικνύουν στατιστικά σημαντικά αυξημένη ή μειωμένη συχνότητα και ένταση έκφρασης μιας σειράς μορίων στην επιφάνεια ή στο κυτταρόπλασμα των Tregs μεταξύ διαβητικών τύπου 1 και υγιών εθελοντών. Όσον αφορά τους νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς τύπου 1, φαίνεται ότι εμφανίζουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης για τον TGFβ, καθώς και τον υποδοχέα του (TGFβRII) σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Τέτοια χαμηλή πυκνότητα

μεμβρανικής έκφρασης ενός από τους πιο πολυσυζητημένους ως μεσολαβητή της ρυθμιστικής λειτουργίας των Tregs και του υποδοχέα του (Chen και συν. 2003, Nakamura και συν. 2004, Ostroukhova και συν. 2006, Li και συν. 2006, Li και συν. 2007, Pesu και συν. 2008) μπορεί να αποτελεί, σε συνδυασμό με τα χαμηλά ποσοστά εμφάνισής τους ένας από τους κύριους λόγους της διαταραγμένης καταστολής της ανοσιακής απάντησης στους διαβητικούς. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η δική μας είναι η πρώτη μελέτη που ρητά αποδεικνύει την παρουσία του μορίου TGFβRII στη μεμβρανική επιφάνεια των Tregs. Το γεγονός αυτό παραπέμπει σαφώς στο γεγονός ότι ο TGFβ λειτουργεί όχι μόνο ως μέσο της ρυθμιστικής τους δράσης, αλλά μπορεί να αποτελεί και παράγοντα επιρροής άλλων κυττάρων ή ακόμα και των ίδιων σ'αυτά μέσω του υποδοχέα του. Έτσι το σύστημα TGFβ-TGFβRII διαφαίνεται σημαντικό όχι μόνο για την κατασταλτική δράση των Tregs, αλλά για τη γενικότερη αλληλεπίδρασή τους με τα άλλα ανοσοκύτταρα και αφορά έτσι πιθανώς και την ίδια τους την επιβίωση. Οι νεοδιαγνωσθέντες διαβητικοί τύπου 1 δε παρουσιάζουν λιγότερα μόρια ανά κύτταρο στον ήδη μειωμένο αριθμό των Tregs τους, τόσο του κατασταλτικού αυτού παράγοντα όσο και του υποδοχέα τους, οπότε το ανοσολογικό κύκλωμα απόκρισης σ'αυτούς διαφαίνεται διαταραγμένο σε πολλαπλά επίπεδα. Η πρόσφατη ανακάλυψη του μορίου GARP (LRRC32) ως του υποδοχέα για την πρόδρομη μορφή του TGFβ και του συνδεδεμένου πεπτιδίου της ανενεργού (πρόδρομης) μορφής του (Latency Associated Peptide, LAP) στα Tregs προσδίδει άλλη διάσταση στον τρόπο δράσης του TGFβ, η οποία και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (Stockis και συν. 2009, Tran και συν. 2009, Wang και συν. 2009).

Από την άλλη, το ποσοστό των Tregs που εκφράζουν CD27 στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Αν αναλογισθεί κανείς ότι το CD27 συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, η διαφορά αυτή είναι ενδεικτική μιας προσπάθειας πολλαπλασιασμού και αύξησης του αριθμού των Tregs ως αντιρρόπηση στη μεγάλη ελάττωσή τους κατά την έναρξη της νόσου. Με βάση τη γνωστή βιβλιογραφία, είναι η πρώτη φορά που αναγνωρίζεται το μόριο CD27 στη μεμβράνη Tregs περιφερικού αίματος τόσο διαβητικών τύπου 1 όσο και υγιών. Η θετική συσχέτιση των επιπέδων μεμβρανικής έκφρασης του CD27 με το CD95 (Fas) στα Tregs νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1

είναι πιθανώς ενδεικτική ενός κύκλου πολλαπλασιασμού και απόπτωσης στον οποίο βρίσκονται τα σε έτσι κι αλλιώς χαμηλό αριθμό κύτταρα αυτά.

Οι ασθενείς με μακρά διάρκεια νόσου επίσης παρουσιάζουν σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό των Tregs έκφραση του CD27 σε σχέση με τους υγιείς, ασθενώς λιγότερο δε από τους νεοδιαγνωσθέντες. Ακόμη, σ' αυτή την ομάδα ασθενών ο συνδυασμός της απουσίας σχεδόν του παράγοντα TGFβ στην επιφάνεια των Tregs, τα αυξημένα όμως επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του (TGFβRII), καθώς και η αυξημένη συχνότητα έκφρασης του τάξης II μορίου ιστοσυμβατότητας HLA-DR και του αποπτωτικού μορίου CD95 είναι συμβατά με δύο παράλληλες διεργασίες, της απόπτωσης από τη μια και της αναγέννησης από την άλλη των Tregs. Παρατηρείται μάλιστα ισχυρή συσχέτιση στην ομάδα αυτή μεταξύ της συχνότητας έκφρασης του παράγοντα HLA-DR και CD95. Μια άλλη ερευνητική ομάδα, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς αποπτωτικούς δείκτες (YOPRO1 και 7ADD), απέδειξε ότι τα CD4⁺CD25^{high} Tregs νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών τύπου 1 καθώς και συγγενών τους υψηλού κινδύνου για τη νόσο (με θετικά 2 ή περισσότερα αυτοαντισώματα) παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση για απόπτωση από εκείνα υγιών μαρτύρων, υποδηλώνοντας ότι η απόπτωση των Tregs αποτελεί φαινόμενο στενά συνδεδεμένο με την παθογένεση της νόσου (Glisic-Milosavljevic και συν. 2007). Επιβεβαίωσαν δε τα αποτελέσματά τους με μια δοκιμασία θετικότητας για την Caspase 3. Είναι όμως πολύ δύσκολο να συγκριθούν τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης με τα δικά μας μιας και δεν εξετάστηκε ο αποπτωτικός παράγοντας CD95 (fas). Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε πρόσφατα σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, συγγενείς τους με θετικά αυτοαντισώματα για τη νόσο αλλά ακόμα και φυσιολογικούς μάρτυρες ότι τα υψηλού κινδύνου για το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 HLA-DQ αλληλόμορφα συσχετίζονται με αυξημένο ρυθμό απόπτωσης των CD4⁺CD25^{+/high} Tregs (Glisic και συν. 2009). Καθώς οι συμμετέχοντες στη μελέτη μας είναι ελληνικής καταγωγής και η μεγάλη πλειοψηφία τους είναι γενετικά HLA-DQ2⁺ ή/και HLA-DQ8⁺, όπως συμβαίνει με όλους σχεδόν τους Καυκάσιους, μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η ίδια συσχέτιση της αποπτωτικής τάσης των CD4⁺CD25^{+/high} Tregs διαφαίνεται και μέσα από τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης.

Θεωρούμε εξαιρετικά εντυπωσιακές τις συσχετίσεις που προέκυψαν στη μελέτη μας όσον αφορά τη συχνότητα έκφρασης στα Tregs παραγόντων που σχετίζονται με

τη ρυθμιστική λειτουργία τους (CD122, CD152, HLA-DR, TGFβRII, TGFβ) (Baecher-Allan και συν. 2001, Shevach και συν. 2004, Baecher-Allan και συν. 2005), καθώς και δύο νέων -CD220 (InsR) και HLA-DQ- που για πρώτη φορά αναφέρονται. Τα αποτελέσματά μας διέπονται από υψηλά συσχετιζόμενη και συνδυασμένη έκφραση ρυθμιστικών παραγόντων στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα (για CD152) των Tregs του περιφερικού αίματος. Παρατηρούνται επίσης, αν και λιγότερες, υψηλές συσχετίσεις κι όσον αφορά τη μέση ένταση φθορισμού, δηλαδή το επίπεδο έκφρασης ανά κύτταρο τέτοιων παραγόντων, όπως CD220 και TGFβRII. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι πολλά από τα μόρια αυτά κωδικεύονται από γονίδια που έχουν συνδεθεί με ευπάθεια ή προστασία για τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (CD152, HLA-DR, HLA-DQ) ή λειτουργούν ως υποδοχείς γονιδιακών προϊόντων που επίσης έχουν συνδεθεί με τη νόσο (CD220 για την ινσουλίνη) (Anjos και συν. 2004).

Ο παράγοντας HLA-DQ, κύριος γενετικός τόπος σχετικός με το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, θεωρείται γενικότερα κατασταλτικός παράγοντας στις T κυτταρικές απαντήσεις χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος του στην αλληλουχία των σχετικών μοριακών γεγονότων και μηχανισμών που συμμετέχει (Hirayama και συν. 1987). Όσον αφορά το άλλο μόριο ιστοσυμβατότητας τάξης II, το HLA-DR, έχει ήδη παρατηρηθεί η έκφρασή του στη μεμβράνη των μισών περίπου Tregs και μάλιστα έχει προταθεί ότι τους προσδίδει πολύ μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα σε σύγκριση με εκείνα που δεν το εκφράζουν (HLA-DR⁻ Tregs) (Baecher-Allan και συν. 2006). Η παρατηρούμενη αρνητική συσχέτιση του επιπέδου της έκφρασης του CD28 με το ποσοστό εμφάνισης των Tregs στους φυσιολογικούς μάρτυρες, καθώς επίσης και η θετική συσχέτιση των επιπέδων του ίδιου μορίου με τον HLA-DQ είναι ενδεικτικές της εμπλοκής των CD28 και HLA-DQ στην παραγωγή των Tregs στους υγιείς. Πράγματι ο δείκτης CD28 έχει αποδειχθεί απαραίτητο συστατικό για την *in-vivo* και *in-vitro* παραγωγή, επιβίωση και ομοιόσταση των Tregs στα ποντίκια, ενώ λείπουν από τη διεθνή βιβλιογραφία αντίστοιχα πειράματα με ανθρώπινα κύτταρα (Boden και συν. 2003, Tang και συν. 2003, Brusko και συν. 2008). Στην περίπτωση των πειραματικών μοντέλων των ποντικών φαίνεται ότι για την παραγωγή των Tregs στην περιφέρεια απαιτούνται εξίσου τόσο μόρια TCR όσο και CD28, άρα η αρνητική συσχέτιση του ποσοστού εμφάνισης των Tregs στο περιφερικό αίμα των υγιών εθελοντών με το επίπεδο

έκφρασης του CD28 μπορεί να είναι συνεπής με τα πειραματικά αυτά δεδομένα (Kim και συν. 2006, Josefowicz και συν. 2009). Φαίνεται λοιπόν ότι η έκφραση του παράγοντα HLA-DQ στη μεμβράνη των Tregs, που για πρώτη φορά παρουσιάζεται στη μελέτη μας, έχει εξαιρετική σημασία όσον αφορά τη ρυθμιστική τους δράση.

Ο υποδοχέας για την ινσουλίνη, που αντιπροσωπεύει το μόριο CD220, αποτελεί παράγοντα του οποίου η έκφραση είχε αναζητηθεί ως τώρα κυρίως στην μεμβράνη των μονοκυττάρων και εξαιρετικά σπάνια με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (Beck-Nielsen και συν. 1977, Brown και συν. 1983). Στη μελέτη μας, ο δείκτης αυτός ανευρίσκεται επίσης και στα T λεμφοκύτταρα και μάλιστα σε υψηλότερη συχνότητα έκφρασης στα Tregs παρά στα υπόλοιπα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα (Teff). Η πιθανότητα της συμμετοχής της ινσουλίνης στις ρυθμιστικές λειτουργίες των Tregs φαντάζει πραγματικά προκλητική και ενδιαφέρουσα, αν αναλογισθεί κανείς κιόλας ότι Tregs υγιών μπορεί να εκφράζουν CD220 in vivo στην περιοχή την ανοσολογικής αντίδρασης σε υψηλότερα επίπεδα συχνότητας και έντασης από αυτά που παρατηρούνται στο περιφερικό αίμα, όπως αποδείχθηκε ότι συμβαίνει και με άλλους παράγοντες, π.χ. HLA-DR, CTLA-4, TGFβ σε συνθήκες ex-vivo για πολλαπλασιασμένα ανθρώπινα Tregs (Putnam και συν. 2009). Οι τελευταίοι μήνες της προδιαβητικής φάσης χαρακτηρίζονται από σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης, όπως αποδεικνύεται από τα αυξανόμενα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) (Cahill και McDevitt 1981, Lernmark και συν. 1984, Devendra και συν. 2001, Daneman 2006). Επομένως, μέσω του υποδοχέα για την ινσουλίνη (CD220), η ανεπάρκεια αυτή θα μπορούσε να επηρεάσει την παραγωγή και ρυθμιστική λειτουργία των Tregs σε άτομα που βρίσκονται σ' αυτή τη φάση, συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξη της νόσου.

Στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 οι αντίστοιχες συσχετίσεις μεταξύ της συχνότητας έκφρασης των παραγόντων CD152, HLA-DR, HLA-DQ, TGFβRII που εμφανίζονται στα Tregs και σχετίζονται με τη ρυθμιστική λειτουργία τους είναι και λιγότερες και στατιστικά ασθενέστερες σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Το γεγονός αυτό δεν είναι παρά απόλυτα ενδεικτικό μιας κατάστασης αταξίας στην παραγωγή και επιβίωση των Tregs στους ασθενείς αυτούς. Όμως, πολύ ισχυρές θετικές συσχετίσεις προκύπτουν μεταξύ των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 στον ορό αυτών των ασθενών με τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) για τους δείκτες CD45RO και CD122, γεγονός που αξίζει

προσοχής μιας και τα αυτοαντισώματα κατά GAD65 είναι δείκτες καλά καθιερωμένοι στην πραγματικότητα της νόσου. Επίσης παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις για τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) μεταξύ του CD127 και των CD122 και CD152. Εξαιρετικού ενδιαφέροντος αποτελεί η ισχυρή συσχέτιση του ποσοστού εμφάνισης των Tregs στους νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς τύπου 1 με το επίπεδο έκφρασης του μορίου HLA-DQ ανά κύτταρο (MFI). Έτσι, είναι φανερό ότι ο ρόλος του HLA-DQ στην παραγωγή των Tregs στους ασθενείς αυτούς λαμβάνει ιδιαίτερη σημασία και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Επομένως, πέρα από τη σημαντική ποσοτική ανεπάρκεια των Tregs που παρουσιάζεται στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες παρατηρείται επίσης και μια σαφής ελάττωση στο επίπεδο της συντονισμένης έκφρασης των περισσότερων παραγόντων επιφανείας τους που σχετίζονται με τη ρυθμιστική τους δράση.

Στην ομάδα των μακράς διάρκειας διαβητικών τύπου 1, αν και δεν παρατηρείται η τόσο υψηλά συσχετιζόμενη και συνδυασμένη έκφραση παραγόντων των Tregs με ρυθμιστικές ιδιότητες όπως στους μάρτυρες, πολύ σημαντικές συσχετίσεις παρατηρούνται κυρίως μεταξύ των μορίων CD45RO, CD95, CD122, HLA-DQ και FoxP3. Ακόμα, η σπουδαιότητα του παράγοντα HLA-DQ στην παραγωγή των Tregs είναι επίσης εμφανής και εδώ, μιας και το ποσοστό εμφάνισής τους σχετίζεται ισχυρά και στατιστικά σημαντικά με τη συχνότητα έκφρασης του HLA-DQ στη μεμβράνη τους. Τα αποτελέσματα αυτά της μελέτης μας είναι συμβατά με έναν κύκλο απόπτωσης και αναγέννησης των Tregs στους ασθενείς αυτούς, κατά τον οποίο ο αιτιολογικός παράγοντας της δραματικής ελάττωσης του αριθμού τους κατά την έναρξη της νόσου μερικώς αντισταθμίζεται με νέες προσπάθειες παραγωγής τους στη συνέχεια. Είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται συσχέτιση της συχνότητας και του επιπέδου έκφρασης διαφόρων παραγόντων των ανθρώπινων και όχι μόνο Tregs. Φυσικά, η στατιστική αυτή ανάλυση δεν υποκαθιστά σε καμιά περίπτωση τη μελέτη συνδυασμένης έκφρασης μορίων σε επίπεδο κυττάρου. Όμως, τέτοια δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης της έκφρασης 7 για παράδειγμα τέτοιων μορίων (CD122, CD152, CD220, TGFβ, TGFβRII, HLA-DR, HLA-DQ) στα Tregs δεν υπάρχει ως τώρα, ακόμα και με τη χρήση του πιο σύγχρονου κυτταρομετρητή ροής. Προς το παρόν, ίσως μόνο μια μελέτη που θα έχει ως βάση τον διαχωρισμό και την απομόνωση ανθρωπίνων Tregs και στη συνέχεια την επώαση τους με

επικαλυπτόμενες ομάδες αντισωμάτων θα μπορούσε να είναι πιο διαφωτιστική για το επίπεδο της συσχέτισης και της συνεργασίας τέτοιων παραγόντων, καθώς και το ρόλο τους στην παραγωγή, την επιβίωση και τη λειτουργία των Tregs.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας τα κυριότερα σημεία που προκύπτουν από τη μελέτη μας:

Ο αυστηρά καθορισμένος T λεμφοκυτταρικός πληθυσμός που παρουσιάζουμε αποτελεί με όσο μεγαλύτερη ακρίβεια γίνεται αληθή πληθυσμό T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs), ως $CD4^{dim}CD25^{high}$, μιας και έχει όλα τα χαρακτηριστικά ($CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}CD127^{dim/-}$) που παρατηρήθηκαν ως ειδικά από άλλους ερευνητές και επιπλέον περιλαμβάνει και όλα τα κύτταρα με την υψηλότερη έκφραση CD25. Η προσέγγισή μας δεν μπορεί να αποκλείσει ότι κάποια μικρά ποσοστά Tregs βρίσκονται εκτός του δικού μας πληθυσμού, αυτά όμως από τις μέχρι τώρα αναλύσεις δεν μπορεί να είναι αξιοσημείωτα. Έτσι, οποιαδήποτε ποσοτική και ποιοτική σύγκριση των κυττάρων αυτών μεταξύ ομάδων ατόμων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σωστή βάση.

Οι ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένο αριθμό Tregs (ως ποσοστό των $CD4^{+}$ T κυττάρων) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των Tregs παρατηρείται επίσης και μεταξύ των μακράς διάρκειας διαβητικών τύπου 1 και των φυσιολογικών μαρτύρων. Η διαφορά παραμένει στατιστικά σημαντική κι όταν συγκρίνουμε τον αριθμό των Tregs μεταξύ νεοδιαγνωσθέντων και μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Οι διαφορές αυτές είναι εντυπωσιακές και δείχνουν ότι η κλινική έναρξη της νόσου χαρακτηρίζεται από σημαντικά μειωμένο ποσοστό Tregs σε σχέση με τους υγιείς. Φαίνεται ότι με την πάροδο του χρόνου πραγματοποιείται μια προσπάθεια αύξησης του αριθμού τους (φαινόμενο επανάκαμψης-rebound), που επιτυγχάνεται εν μέρει μόνον, αφού οι μακράς διάρκειας διαβητικοί έχουν μεν μεγαλύτερο ποσοστό Tregs από τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς όχι όμως τέτοιο όπως οι υγιείς μάρτυρες.

Όλοι οι δείκτες που μελετήθηκαν ανευρέθηκαν στην μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα των Tregs τόσο στους ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας) όσο και στους υγιείς εθελοντές που συμμετείχαν ως μάρτυρες. Παρατηρούμε επίσης μεμβρανική έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν για πρώτη φορά από εμάς στα Tregs ανθρώπινου περιφερικού αίματος (CD27, CD28, CD95, CD220, HLA-DQ, TGFβ, TGFβRII).

Όσον αφορά τους νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς τύπου 1 φαίνεται ότι εμφανίζουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του TGFβ, καθώς και του υποδοχέα του (TGFβRII) σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Τέτοια χαμηλή πυκνότητα μεμβρανικής

έκφρασης ενός από τους πιο πολυσυζητημένους ως μεσολαβητή της ρυθμιστικής λειτουργίας των Tregs και του υποδοχέα του μπορεί να αποτελεί σε συνδυασμό με τους χαμηλούς αριθμούς εμφάνισής τους ένας από τους κύριους λόγους της διαταραγμένης καταστολής της ανοσιακής απάντησης στους διαβητικούς. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η δική μας είναι η πρώτη μελέτη που ρητά αποδεικνύει την παρουσία του μορίου TGFβRII στη μεμβρανική επιφάνεια των Tregs. Το γεγονός αυτό παραπέμπει σαφώς στο γεγονός ότι ο TGFβ λειτουργεί όχι μόνον ως μέσο της ρυθμιστικής τους δράσης, αλλά μπορεί να αποτελεί και παράγοντα επιρροής επί άλλων κυττάρων ή ακόμα και των ίδιων Tregs μέσω του υποδοχέα του. Έτσι, το σύστημα TGFβ-TGFβRII διαφαίνεται σημαντικό όχι μόνο για την κατασταλτική δράση των Tregs, αλλά για τη γενικό κρη αλληλεπίδρασή το η με τα άλλα ανοσοκύτταρα και αφορά έτσι πιθανώς και την ίδια τους την επιβίωση. Οι νεοδιαγνωσθέντες διαβητικοί τύπου 1 δε παρουσιάζουν λιγότερα μόρια ανά κύτταρο στον ήδη μειωμένο αριθμό των Tregs τους, τόσο του κατασταλτικού αυτού παράγοντα όσο και του υποδοχέα τους, οπότε το ανοσολογικό κύκλωμα απόκρισης σε αυτούς φαίνεται διαταραγμένο σε πολλαπλά επίπεδα. Η πρόσφατη ανακάλυψη του μορίου GARP (LRRC32) ως του υποδοχέα για την πρόδρομη μορφή του TGFβ και του συνδεδεμένου πεπτιδίου της ανενεργού (πρόδρομης) μορφής του (Latency Associated Peptide, LAP) στα Tregs προσδίδει άλλη διάσταση στον τρόπο δράσης του TGFβ, η οποία και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Από την άλλη, το ποσοστό των Tregs που εκφράζουν CD27 στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Αν αναλογισθεί κανείς ότι το CD27 συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, η διαφορά αυτή είναι ενδεικτική μιας προσπάθειας πολλαπλασιασμού και αύξησης του αριθμού των Tregs ως αντιρρόπηση στη μεγάλη ελάττωσή τους κατά την έναρξη της νόσου. Η θετική συσχέτιση των επιπέδων μεμβρανικής έκφρασης του CD27 με το CD95 (Fas) στα Tregs νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 είναι πιθανώς ενδεικτική ενός κύκλου πολλαπλασιασμού και απόπτωσης στον οποίο βρίσκονται τα σε έτσι κι αλλιώς χαμηλό αριθμό κύτταρα αυτά.

Οι ασθενείς με μακρά διάρκεια νόσου επίσης παρουσιάζουν σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό των Tregs έκφραση του CD27 σε σχέση με τους υγιείς, λίγο λιγότερο δε από τους νεοδιαγνωσθέντες. Ακόμη, σ' αυτή την ομάδα

ασθενών ο συνδυασμός της απουσίας σχεδόν του παράγοντα TGFβ στην επιφάνεια των Tregs, τα αυξημένα όμως επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του (TGFβRII), καθώς και η αυξημένη συχνότητα έκφρασης του τάξης II μορίου ιστοσυμβατότητας HLA-DR και του αποπτωτικού μορίου CD95 είναι συμβατά με δύο παράλληλες διαδικασίες, της απόπτωσης από τη μια και της αναγέννησης από την άλλη των Tregs. Παρατηρείται μάλιστα ισχυρή συσχέτιση στην ομάδα αυτή μεταξύ της συχνότητας έκφρασης του παράγοντα HLA-DR και CD95.

Θεωρούμε εξαιρετικά εντυπωσιακές τις συσχετίσεις που προέκυψαν στη μελέτη μας όσον αφορά τη συχνότητα έκφρασης στα Tregs των φυσιολογικών μαρτύρων παραγόντων που σχετίζονται με τη ρυθμιστική λειτουργία τους (CD122, CD152, HLA-DR, TGFβRII, TGFβ, CD220 και HLA-DQ). Τα αποτελέσματά μας διέπονται από υψηλά συσχετιζόμενη και συνδυασμένη έκφραση ρυθμιστικών παραγόντων στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα των Tregs του περιφερικού αίματος. Παρατηρούνται επίσης, αν και λιγότερες, υψηλές συσχετίσεις κι όσον αφορά τη μέση ένταση φθορισμού, δηλαδή το επίπεδο έκφρασης ανά κύτταρο τέτοιων παραγόντων, όπως CD220 και TGFβRII. Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι πολλά από τα μόρια αυτά κωδικοούνται από γονίδια που έχουν συνδεθεί με προδιάθεση ή προστασία για τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (CD152, HLA-DR, HLA-DQ) ή λειτουργούν ως υποδοχείς γονιδιακών προϊόντων που επίσης έχουν συνδεθεί με τη νόσο (CD220, για την ινσουλίνη).

Στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 οι αντίστοιχες συσχετίσεις μεταξύ της συχνότητας έκφρασης των παραγόντων που εμφανίζονται στα Tregs και σχετίζονται με τη ρυθμιστική λειτουργία τους είναι και λιγότερες και στατιστικά ασθενέστερες σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Το γεγονός αυτό δεν είναι παρά απόλυτα ενδεικτικό μιας κατάστασης αταξίας στην παραγωγή και επιβίωση των Tregs στους ασθενείς αυτούς. Στην ομάδα των μακράς διάρκειας διαβητικών τύπου 1, δεν παρατηρείται επίσης η τόσο υψηλά συσχετιζόμενη και συνδυασμένη έκφραση παραγόντων των Tregs με ρυθμιστικές ιδιότητες όπως στους μάρτυρες, όμως πολύ περισσότερες και σημαντικότερες συσχετίσεις ανευρίσκονται μεταξύ συγκεκριμένων μορίων (CD45RO, CD95, CD122, HLA-DQ και FoxP3) σε σύγκριση με την ομάδα των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών. Επομένως, πέρα από τη σημαντική ποσοτική ανεπάρκεια των Tregs που παρουσιάζεται στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου σε σύγκριση με τους

φυσιολογικούς μάρτυρες παρατηρείται επίσης και μια σαφής ελάττωση στο επίπεδο της συντονισμένης έκφρασης των περισσότερων παραγόντων επιφανείας τους που σχετίζονται με τη ρυθμιστική τους δράση, με έκδηλη την προσπάθεια διόρθωσης του φαινομένου κατά την πορεία της νόσου.

Σε όλες τις μελλοντικές μελέτες ανοσοπαρέμβασης για την αποτροπή ή την θεραπεία του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 θα πρέπει να παρακολουθείται στενά τόσο το επίπεδο των Tregs όσο και η έκφραση των διάφορων σημαντικών μορίων για τη λειτουργία αυτών των κυττάρων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 είναι γνωστή η αυτοάνοση αιτιολογία της νόσου χωρίς να είναι γνωστή η ακριβής αλληλουχία των μοριακών γεγονότων και μηχανισμών που οδηγούν στην ειδική και αποκλειστική καταστροφή των β νησιδιοκυττάρων του ενδοκρινούς παγκρέατος. Τα τελευταία χρόνια έχει καταδειχθεί ότι στο κύκλωμα της ανοσοαπόκρισης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ο υποπληθυσμός των T ρυθμιστικών (Tregs) λεμφοκυττάρων (πρώην κατασταλτικών).

Βασικό ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηριστικό των Tregs είναι η σταθερή επιφανειακή έκφραση της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-2 (CD25). Το CD25 είναι δείκτης ενεργοποίησης όλων των T κυττάρων. Η διαφορά είναι ότι η έκφραση του CD25 στα ενεργοποιημένα T κύτταρα είναι παροδική και χαμηλού βαθμού (CD25^{low}), ενώ στα Tregs είναι σταθερή και υψηλή (CD25^{high}). Ειδικός λειτουργικός δείκτης των Tregs είναι ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3 (forkhead box P3) που εκφράζεται ενδοκυττάρια κι έτσι για την ανίχνευσή του απαιτείται σταθεροποίηση και διαπερατοποίηση των κυττάρων στη συνέχεια. Επίσης, ειδικό ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηριστικό τους αποτελεί η χαμηλή έκφραση της αλυσίδας α του υποδοχέα για την IL-7 (CD127). Εκτός από τα τρία αυτά ειδικά ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά για την αναγνώρισή τους έχουν περιγραφεί κι άλλοι δείκτες που εκφράζονται στη μεμβράνη τους, όπως τα μόρια CD38, CD103, CD134 (OX-40L), GITR καθώς και σε χαμηλή συγκέντρωση τα μόρια CD45RB και CD45RC.

Τα Tregs καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την εκκριτική δραστηριότητα των CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων, καθώς και την κυτταρολυτική δράση των τελευταίων. Η παρουσία IL-2 φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την πλήρη εκδήλωση του φαινομένου, μιας και ασθενής κατασταλτική δράση μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και απουσία της IL-2. Η κατασταλτική τους λειτουργία αυτή ασκείται μέσω άμεσης διακυτταρικής επαφής και φαίνεται ότι δεν μεσολαβείται από διαλυτούς παράγοντες (κυτταροκίνες). Γενικά, η ενεργοποίηση και κατασταλτική δράση των Tregs ακολουθεί αυτή των Teffectors και χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκφραση παραγόντων ενεργοποίησης που ανευρίσκονται στα Teffectors και από την άλλη συσσώρευση κατασταλτικών μορίων ενδοκυττάρια, μεμβρανικά και εξωκυττάρια. (cAMP, CTLA-4, HLA-DQ, TGF β , αδενosίνη), μέσω των οποίων επιδρούν σε T κύτταρα αλλά και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Από τις κυτταροκίνες που έχουν προταθεί ως διαμεσολαβητές της κατασταλτικής δράσης των Tregs, αν και για την

IL-10 έχει μάλλον αποκλειστεί ένας τέτοιος ρόλος, δεν έχει συμβεί το ίδιο και για τον TGFβ (Transforming Growth Factor β), ειδικά τη μεμβρανική μορφή του (mTGFβ).

Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 η πρώτη εργασία σχετική με Tregs ανέδειξε μειωμένα ποσοστά του CD4⁺CD25⁺ πληθυσμού των T λεμφοκυττάρων σε μικρής ηλικίας νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς σε σύγκριση με μεγαλύτερους σε ηλικία φυσιολογικούς μάρτυρες. Μελέτες με νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς τύπου 1 που ακολούθησαν δεν κατέληξαν σε τέτοιες παρατηρήσεις, ακόμα κι όταν πραγματοποιήθηκε κάποιος διαχωρισμός μεταξύ CD4⁺CD25⁺ (Teffectors) και CD4⁺CD25^{high} (Tregs). Σε μια μεταανάλυση που περιέλαβε τις εργασίες αυτές τονίστηκε ότι οι διαφορές στο διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών ήταν ένα πρόβλημα κι ότι η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν ασφαλές κριτήριο χαρακτηρισμού των Tregs, αν και έγινε σαφές ότι σε χαμηλότερα επίπεδα μπορεί να εκφράζεται παροδικά και σε ενεργοποιημένα Teff λεμφοκύτταρα. Βέβαια, μια μεταγενέστερη μελέτη που συμπεριέλαβε σαν ρυθμιστικά όλα τα T λεμφοκύτταρα που εξέφραζαν FoxP3 δεν ανέδειξε διαφορές στα ποσοστά αυτών των κυττάρων μεταξύ ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και φυσιολογικών μαρτύρων. Σε μια άλλη εργασία βρέθηκε ότι Tregs νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση για απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) σε σύγκριση με τα Tregs φυσιολογικών ή και διαβητικών με μακρά διάρκεια νόσου. Επιπρόσθετα, η ίδια εργασία έδειξε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο αριθμό Tregs στο περιφερικό αίμα διαβητικών 18 μήνες μετά από σύντομη θεραπεία με anti-CD3 λίγο μετά τη διάγνωση γεγονός που συνόδευε την παρατηρούμενη ελάττωση των απαιτήσεων για ινσουλίνη από τη μια και τα υψηλότερα επίπεδα C πεπτιδίου από την άλλη.

Πειραματικές μελέτες που έγιναν και σε διαβητικά ποντίκια NOD έχουν δείξει ότι η εξέλιξη του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 εξαρτάται από τη λεπτή ισορροπία μεταξύ των Teff και των Tregs τόσο εντός των εγγύς λεμφαδένων όσο και εντός του παγκρεατικού ιστού. Μετά την εμφάνιση της νόσου, η κατάσταση της αυτοανοσίας εξελίσσεται καθώς το ποσοστό των Teff προς τα Tregs συνεχώς αυξάνεται. Από την άλλη, φάνηκε ότι ο παράγοντας TGFβ μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού των Tregs στο σημείο της βλάβης είτε μέσω επαγωγής της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 σε Teff κύτταρα ή μέσω πολλαπλασιασμού των ήδη υπάρχοντων Tregs. Αποδείχθηκε ότι μια παροδική έγχυση TGFβ στα παγκρεατικά

νησιδιοκύτταρα NOD ποντικών κατά την αρχική προδιαβητική φάση είναι ικανή να αναστείλει την έναρξη της νόσου, διεγείροντας παράλληλα την αύξηση των Tregs.

Σκοπός: Η μελέτη των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των Tregs σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής.

Υλικά και μέθοδοι: Στη μελέτη συμμετείχαν 13 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (9 άρρενες και 4 θήλειες) μέσης ηλικίας 12.5 ± 9.4 ετών, 26 ασθενείς με μακρά διάρκεια Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (12 άρρενες και 14 θήλειες) μέσης ηλικίας 26.7 ± 9.2 ετών και με μέση διάρκεια νόσου τα 11.6 ± 7.4 έτη (από 2 ως 25 έτη) και 32 εθελοντές υγιείς μάρτυρες (13 άρρενες και 19 θήλειες) με μέση ηλικία τα 25.3 ± 11 έτη που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν ελληνικής καταγωγής και κάτοικοι της ευρύτερης περιοχής της Ηπείρου. Τα άτομα αυτά δεν ελάμβαναν καμιά φαρμακευτική αγωγή, δεν έπασχαν τα ίδια από οποιοδήποτε αυτοάνοσο νόσημα και ούτε είχαν κανέναν πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενή με αυτοάνοσο νόσημα. Επίσης, άτομα με υποψία λοίμωξης ή όποιας μορφής φλεγμονής αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Η μελέτη έχει εγκριθεί από την επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και καθ' όλη τη διάρκειά της τηρήθηκαν αυστηρά οι όροι της συνθήκης του Helsinki.

Η λήψη φλεβικού αίματος γινόταν το πρωί (από τις 9:00 ως τις 10:00 π.μ.) από νηστικούς ασθενείς και μάρτυρες μετά από φυσιολογικό ύπνο. Τα δείγματα αίματος αποθηκεύονταν σε σωληνάρια γενικής αίματος της BD Vacutainer (BD, Plymouth, UK). Η επεξεργασία των κυττάρων για κυτταρομετρία ροής ξεκινούσε το αργότερο μέσα σε 10 λεπτά από τη λήψη του αίματος. Επίσης, επαρκής ποσότητα αίματος τοποθετούνταν σε σωληνάρια Wasserman της BD (BD Vacutainer SST II Advance) και στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν στις 3.000 rpm για 10 λεπτά. Ο υπερκείμενος ορός αφαιρούνταν με σιφόνιο αναρρόφησης και αποθηκεύονταν σε σωληνάρια Eppendorf των 2 ml στους -20°C για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια στην εκτέλεση των μεθόδων ELISA και RIA για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων.

Τα παρακάτω μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριόχρωμα χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των αντίστοιχων δεικτών με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής τριπλού φθορισμού : leucogate® CD45/CD14 (κλώνοι 2D1 και MOP9 αντίστοιχα), isotype control γ_1/γ_{2a} -FITC και -PE (κλώνοι X39, X40), CD4-PerCP (κλώνος SK3), CD25 -FITC ή -PE (κλώνος 2A3), CD127-PE (κλώνος Hil-

7R-M21), FoxP3-FITC (κλώνος PCH101) (eBioscience, San Diego, CA, USA), TGFβRII-FITC (κλώνος 25508.111; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) και TGFβ-PE (κλώνος TB21; IQ Products, Groningen, NL).

Χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης Cell Quest (Becton Dickinson) τουλάχιστον 10,000 CD4⁺ λεμφοκύτταρα συμπεριελήφθησαν για την ανάλυση των χαρακτηριστικών των Tregs. Ο διαχωρισμός των Tregs (CD4^{dim}CD25^{high}) από τα Teff (CD4⁺CD25⁺) έγινε με βάση την υψηλότερη έκφραση του CD25 και την χαμηλότερη έκφραση CD4 από τα Tregs. Επιβεβαιώθηκε δε από την υψηλότερη έκφραση του FoxP3 και τη χαμηλότερη μεμβρανική έκφραση του CD127 (αλυσίδα *α* του υποδοχέα για την IL-7) στα Tregs σε σύγκριση με τα Teff. Η έκφραση των δεικτών παρουσιάζεται με τη μορφή κατανομής συχνοτήτων, ιστογραμμάτων δηλαδή στα οποία στον άξονα X φαίνεται η ένταση φθορισμού και στον άξονα Y ο αριθμός των κυττάρων. Ορίζεται στο 99.5 % της έκφρασης του αρνητικού μάρτυρα το σημείο πέραν του οποίου θεωρείται αληθώς θετική η έκφραση των διαφόρων δεικτών.

Οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά των GAD65 (GADA) και IA-2 (IA-2A) καθορίστηκαν με τη μέθοδο της ELISA. Θετικοί θεωρήθηκαν οι οροί με συγκέντρωση >5 U/ml. Οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της ινσουλίνης (IAA) καθορίστηκαν με τη μέθοδο της RIA. Θετικοί θεωρήθηκαν οι οροί με συγκέντρωση >0.80 RU.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Statistical Package for Social Sciences Version 16.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (mean) ± σταθερά απόκλιση (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 τη δοκιμασία Pearson's. 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).

Αποτελέσματα: Σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών και μαρτύρων που συμμετείχαν στη μελέτη παρατηρήθηκε στα κυτταρογράμματα CD4/CD25 μια συνεχής κατανομή CD4⁺ λεμφοκυττάρων από CD25⁻ σε CD25⁺ και CD25^{high}. Έτσι, με βάση την υψηλότερη έκφραση για το CD25 και τη χαμηλότερη ένταση έκφρασης για το CD4 πραγματοποιήθηκε ένας πρώτος διαχωρισμός μεταξύ Tregs και Teff. Στη συνέχεια, αναλύσαμε διαδοχικές υποομάδες CD4⁺CD25⁺ λεμφοκυττάρων σε ασθενείς και

μάρτυρες ξεκινώντας από τα κύτταρα με υψηλότερη έκφραση για CD25 (CD25^{high}), με σκοπό να αναδειχθούν τυχόν σημαντικές διαφορές και να καθοριστεί με όσο μεγαλύτερη ακρίβεια η χρυσή τομή διαχωρισμού Tregs από Teff. Παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες ατόμων ότι η μετάβαση από Tregs σε Teff συνοδεύεται από μεγάλες διαφορές στην έκφραση των δεικτών: CD127, CD122, CD152, HLA-DR, HLA-DQ, CD27, TGFβRII, and FoxP3. Εκτός από τους δείκτες CD127 και TGFβRII, για όλους τους υπόλοιπους παρατηρείται μεγαλύτερη συχνότητα έκφρασης στα Tregs σε σύγκριση με τα Teff. Επομένως, ο κυτταρικός πληθυσμός που καθορίσαμε ως Tregs έχει όλα τα χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν ως ειδικά από άλλους ερευνητές (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺CD127^{dim/-}) και επιπλέον παρουσιάζει και την υψηλότερη έκφραση για το CD25.

Οι ασθενείς με Σακχαρώδη διαβητη τύπου 1 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένο αριθμό Tregs (ως ποσοστό των CD4⁺ T κυττάρων) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες: 1.259 ± 0.264 % vs 3.047 ± 0.264 % αντίστοιχα ($p < 0.001$). Στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των αριθμό Tregs παρατηρείται επίσης και μεταξύ των μακράς διάρκειας διαβητικών τύπου 1 και των φυσιολογικών μαρτύρων: 1.748 ± 0.308 % vs 3.047 ± 0.264 % αντίστοιχα ($p < 0.001$). Η διαφορά παραμένει στατιστικά σημαντική κι όταν συγκρίνουμε τον αριθμό των Tregs μεταξύ νεοδιαγνωσθέντων και μακράς διάρκειας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ($p < 0.001$). Οι διαφορές αυτές είναι εντυπωσιακές και δείχνουν ότι η κλινική έναρξη της νόσου χαρακτηρίζεται από σημαντικά μειωμένο ποσοστό Tregs σε σχέση με τους υγιείς. Φαίνεται ότι με την πάροδο του χρόνου πραγματοποιείται μια προσπάθεια αύξησης του αριθμού τους (φαινόμενο επανάκαμψης-rebound), που επιτυγχάνεται εν μέρει μόνο αφού οι μακράς διάρκειας διαβητικοί έχουν μεν περισσότερα Tregs από τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς όχι όμως τόσα όσα οι υγιείς μάρτυρες.

Όλοι οι δείκτες που μελετήθηκαν ανευρέθηκαν στην μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα των Tregs τόσο στους ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας) όσο και στους υγιείς εθελοντές που συμμετείχαν ως μάρτυρες. Παρατηρούμε επίσης μεμβρανική έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν για πρώτη φορά από εμάς στα Tregs ανθρώπινου περιφερικού αίματος (CD27, CD28, CD95, CD220, HLA-DQ, TGFβ, TGFβRII). Περνώντας σε σαφείς φαινοτυπικές διαφορές των Tregs μεταξύ διαβητικών τύπου 1 και φυσιολογικών μαρτύρων, είναι αξιοσημείωτη η πολύ υψηλότερη συχνότητα

έκφρασης του CD27 σε νεοδιαγνωσθέντες και μακράς διάρκειας ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ακόμα, οι μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα έκφρασης των μορίων CD95 και HLA-DR, καθώς και μόλις ανιχνεύσιμη έκφραση του παράγοντα TGFβ σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών μαρτύρων. Επίσης, σημαντικά ελαττωμένη συχνότητα έκφρασης του CD127 σε σύγκριση με την ομάδα των νεοδιαγνωσθέντων. Συζητώντας για διαφορές στο επίπεδο της μεμβρανικής ή ενδοκυττάριας έκφρασης μορίων, όπως αυτό εκφράζεται με τη μέση ένταση φθορισμού, παρατηρούμε μια σημαντική ελάττωση όσον αφορά τα μόρια TGFβ και TGFβRII στα Tregs νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών τύπου 1 σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Αντιθέτως, οι μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερο επίπεδο έκφρασης TGFβRII σε σύγκριση με τους νεοδιαγνωσθέντες, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά όταν συγκρίνονται με τους μάρτυρες. Αυτοαντισώματα κατά GAD65, IA-2 και ινσουλίνης ανιχνεύτηκαν στην πλειοψηφία των ορών των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Όλοι οι μακράς διάρκειας διαβητικοί τύπου 1 είχαν αντισώματα κατά της ινσουλίνης, μάλλον κυρίως λόγω της χρόνιας ινσουλινοθεραπείας, ενώ περίπου 60 % αυτών εμφάνισαν αντισώματα κατά GAD65 ή IA-2 και 38.1 % ήταν θετικοί και για τα δύο. Όσον αφορά τους μάρτυρες, ένα άτομο μόνο βρέθηκε θετικό για το anti-GAD65 αυτοαντίσωμα (14.5 U/ml), αλλά για κανένα άλλο αντινησιδιακό αντίσωμα σε επαναλαμβανόμενες δοκιμασίες. Το άτομο αυτό είναι απολύτως υγιές.

Με τη χρήση του λογισμικού SPSS ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία Pearson's συσχετίσεις για τη συχνότητα και την ένταση έκφρασης μεταξύ των διαφόρων μεμβρανικών και ενδοκυττάρια δεικτών, καθώς και μεταξύ των δεικτών αυτών και του ποσοστού εμφάνισης Tregs, της έκφρασης των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων και της ηλικίας των συμμετεχόντων στη μελέτη. Στα Tregs των φυσιολογικών παρατηρούνται πολύ ισχυρές στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των συχνοτήτων έκφρασης των περισσότερων μορίων που σχετίζονται με την κατασταλτική λειτουργία των Tregs (CD122, CD152, HLA-DR, HLA-DQ, TGFβ, TGFβRII). Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι η συχνότητα έκφρασης των δεικτών CD152, HLA-DQ, TGFβRII και TGFβ σχετίζεται επίσης πολύ υψηλά με την έκφραση το υπο φάσμα για την ινσουλίνη (CD220). Στην περίπτωση των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 παρατηρούνται πιο

αδύναμες συσχετίσεις που αφορούν και λιγότερες πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη λειτουργία των Tregs (κυρίως CD152, HLA-DR, HLA-DQ και TGFβRII), καθώς επίσης δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση με την έκφραση του CD220. Στους μακράς διάρκειας διαβητικούς τύπου 1 ανευρίσκονται περισσότερες συσχετίσεις μεταξύ CD122, HLA-DR, HLA-DQ, FoxP3, και CD45RO, καθώς και με τον αποπτωτικό παράγοντα CD95. Φαίνεται επίσης ότι η συχνότητα του μορίου CD45RO συσχετίζεται με το CD27 που συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων.

Περνώντας στις συσχετίσεις που αφορούν τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) των διαφόρων παραγόντων στα Tregs, στην περίπτωση της ομάδας των μαρτύρων παρατηρούνται αρκετές που όμως δεν δείχνουν να αφορούν τα ίδια μόρια με τη συχνότητα έκφρασης, με εξαίρεση την περίπτωση των TGFβRII και CD220. Είναι εντυπωσιακή στους μάρτυρες η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μέσης έντασης φθορισμού του CD28 και του ποσοστού εμφάνισης των Tregs, καθώς επίσης και η θετική συσχέτιση των MFIs του CD28 και HLA-DQ. Στην περίπτωση των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών, εξαιρετικού ενδιαφέροντος είναι η υψηλή συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού εμφάνισης των Tregs με τα επίπεδα έκφρασης του μορίου HLA-DQ. Επίσης, αυτές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά GAD65 με τη μέση ένταση φθορισμού των CD45RO και CD122. Στους μακράς διάρκειας ασθενείς οι συσχετίσεις των MFI για τον αποπτωτικό παράγοντα CD95 με τους παράγοντες CD122 και FoxP3 είναι αρνητικές, ενδεικτικές της ύπαρξης ρυθμιστικού μηχανισμού εξισορρόπησης μεταξύ απόπτωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Συμπεράσματα: Ο αυστηρά καθορισμένος T λεμφοκυτταρικός πληθυσμός που παρουσιάζουμε (CD4^{dim}CD25^{high}) αποτελεί με όσο μεγαλύτερη ακρίβεια γίνεται αληθή πληθυσμό Tregs. Έτσι, οποιαδήποτε ποσοτική και ποιοτική σύγκριση των κυττάρων αυτών μεταξύ ομάδων ατόμων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σωστή βάση.

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό εμφάνισης των Tregs μεταξύ νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, μακράς διάρκειας διαβητικών και φυσιολογικών μαρτύρων. Η σημαντική ποσοτική αυτή ανεπάρκεια των Tregs στους νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς τύπου 1 μόνο μερικώς διορθώνεται με την παρέλευση του χρόνου.

Όλοι οι δείκτες που μελετήθηκαν ανευρέθηκαν στην μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα των Tregs τόσο στους ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 όσο και στους υγιείς εθελοντές που συμμετείχαν ως μάρτυρες. Παρατηρούμε επίσης μεμβρανική έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν για πρώτη φορά από εμάς στα Tregs ανθρώπινου περιφερικού αίματος (CD27, CD28, CD95, CD220, HLA-DQ, TGFβ, TGFβRII).

Οι νεοδιαγνωσθέντες διαβητικούς τύπου 1 εμφανίζουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης για τον TGFβ, καθώς και τον υποδοχέα του σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Τέτοια χαμηλή πυκνότητα μεμβρανικής έκφρασης ενός από τους πιο πολυσυζητημένους σαν μεσολαβητή της ρυθμιστικής λειτουργίας των Tregs και του υποδοχέα του μπορεί να αποτελεί σε συνδυασμό με τους χαμηλούς αριθμούς εμφάνισής τους ένας από τους κύριους λόγους της διαταραγμένης καταστολής της ανοσιακής απάντησης στους διαβητικούς. Από την άλλη, το ποσοστό των Tregs που εκφράζουν CD27 είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Το CD27 συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και η διαφορά αυτή είναι ενδεικτική μιας προσπάθειας πολλαπλασιασμού και αύξησης του αριθμού των Tregs ως αντιρρόπηση στη μεγάλη ελάττωσή τους κατά την έναρξη της νόσου.

Οι ασθενείς με μακρά διάρκεια νόσου επίσης παρουσιάζουν σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό των Tregs έκφραση του CD27 σε σχέση με τους υγιείς, ασθενώς λιγότερο δε από τους νεοδιαγνωσθέντες. Ακόμη, σ' αυτή την ομάδα ασθενών ο συνδυασμός της απουσίας σχεδόν του παράγοντα TGFβ στην επιφάνεια των Tregs, τα αυξημένα όμως επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του (TGFβRII), καθώς και η αυξημένη συχνότητα έκφρασης του τάξης II μορίου ιστοσυμβατότητας HLA-DR και του αποπτωτικού μορίου CD95 είναι συμβατά με δύο παράλληλες διαδικασίες, της απόπτωσης από τη μια και της αναγέννησης από την άλλη των Tregs.

Τέλος, η υψηλά συσχετιζόμενη και συνδυασμένη έκφραση ρυθμιστικών παραγόντων στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα των Tregs του περιφερικού αίματος που παρατηρείται στους μάρτυρες είναι σαφώς διαταραγμένη στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου, με έκδηλη την προσπάθεια διόρθωσης του φαινομένου κατά την πορεία της νόσου.

Σε όλες τις μελλοντικές μελέτες ανοσοπαρέμβασης για την αποτροπή ή την θεραπεία του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 θα πρέπει να παρακολουθείται στενά τόσο το επίπεδο των Tregs όσο και η έκφραση των διάφορων σημαντικών μορίων για τη λειτουργία αυτών των κυττάρων.

UNIVERSITY OF IOANNINA
MEDICAL SCHOOL
DEPARTMENT OF ENDOCRINOLOGY

**STUDY OF IMMUNOREGULATION
IN TYPE 1 DIABETES**

STAVROULA A. PASCHOU, MD

DOCTORAL THESIS
ABSTRACT

IOANNINA 2010

Introduction: Type 1 diabetes results from autoimmune self-destruction of the pancreatic β (beta) cells, leading to absolute insulin deficiency and requiring life-long insulin treatment. This autoimmune reaction is triggered by environmental factors in genetically-predisposed individuals. Although recent knowledge has contributed to our understanding of the autoimmune pathogenesis of type 1 diabetes, there remains no unifying theory of disease causation. However, it is accepted that autoimmune disease in general results from the dysregulation of the basic processes designed to maintain self-tolerance.

Over the past few years, there has been a steadily increasing interest in regulatory T lymphocytes, exhibiting several of the properties of the previously studied suppressor T cells. The definition of human Tregs is still under discussion and no definite set of unique surface markers is currently agreed upon. The high constitutive surface expression of the IL-2 receptor alpha chain (CD25) is generally considered as a characteristic feature of the majority of human Tregs and regulatory activity is enriched in CD4⁺ T cells expressing the highest levels of CD25 (CD4⁺CD25^{high}) T cells. A considerable number of other surface markers have been reported to be expressed on human Tregs, such as CTLA-4 (CD152), CD62L (L-selectin), glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor (GITR), TGF β , CD95 and PD-L1. Recent studies have demonstrated that down-regulation of the IL-7 receptor α chain (CD127) distinguishes Treg cells from activated T cells, facilitating the functional characterization of a more representative population. Intracellular expression of the FoxP3 protein is the hallmark of Tregs, as the presence of this protein is necessary for their development. FoxP3 is a member of the forkhead or winged helix family of transcription factors, and the respective gene is located on chromosome X. FoxP3⁻ mice have the *scurfy* phenotype, characterized by massive lymphoproliferation, autoimmunity and death in the second to third month of life. In humans, mutations in the FoxP3 gene lead to the IPEX (immune deficiency-polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked) syndrome; this is characterized by total absence of Tregs, food allergy, enteropathy, eczema and polyendocrinopathy, including neonatal type 1 diabetes, and less often autoimmune thyroid disease.

The main role of Tregs, as documented thus far, is in immune surveillance of all tissues, from skin to parenchyma, and their localization to all areas where an immune reaction is taking place, in lymphoid as well as non-lymphoid tissues. Their action

seems to be contact-dependent. The activation of Tregs *in vivo* follows that of T effectors, which secrete IL-2 upon activation; Tregs have an absolute requirement for this cytokine, which they cannot produce, in order to divide. The functional program of Tregs consists of deactivation of the pathways found in T effectors, and up-regulation of pathways that accumulate suppressive molecules in the cytoplasm (cAMP), or on their cell membrane (CTLA-4, HLA-DQ, TGF β) and extracellular space of Tregs (adenosine, after conversion of extracellular ATP via Treg-membrane bound exonucleases CD73 and CD39).

Most of the insight on the role of Tregs in the pathogenesis of type 1 diabetes has been based on research in experimental animals. In the NOD mouse model various defects have been noted in the Treg compartment, which was mostly defined as the CD4⁺CD25⁺ cells. In particular, it appears that there is a progressive decline of Treg function, as well as age-dependent resistance of Teff cells to the action of Tregs. It seems that the defective production of IL-2 by Teff and the diminished expression of CD25 and Bcl-2 on Tregs in the infiltrated mouse islets are instrumental in the generation of disease. Remarkably, no such immune derangement was seen in pancreatic lymph nodes. Conflicting findings have been reported for Tregs in human t1d using peripheral blood cells from patients and controls. For example, one study found significantly diminished percent of Tregs in young (<14 years old) newly-diagnosed and older long-standing type 1 diabetics compared to controls. Yet, two other studies reported no differences in percent of Tregs, but in their suppressor function, in newly-diagnosed and long-standing type 1 diabetes patients. All three of these studies defined Tregs as CD4⁺CD25⁺ cells. A fourth study could find neither a numerical nor a functional defect in Tregs (defined as CD4⁺CD25^{high} cells) from type 1 diabetes patients with > 5 years of disease. A joint study from two of these groups could not detect any differences in the expression of FoxP3 in Tregs (CD4⁺CD25⁺) of diabetics and controls. In a mini-meta-analysis comparing these studies, the differences in testing for suppressor activity were pointed out and it was recommended that the expression of Foxp3 should be used as a criterion for Treg identification.

Objective: The aim of our study was to investigate the various features of Tregs (CD4⁺CD25^{high} T cells) in newly-diagnosed and long-term t1d patients as well as controls, using flow cytometry.

Materials and methods: 13 newly-diagnosed and 26 long-standing patients with type 1 diabetes, and 32 healthy controls participated in the study, after informed consent. All participants were of Hellenic origin from the region of Epirus, Greece. The study was approved by the ethical committee of the University Hospital of Ioannina. The terms of the Helsinki Declaration for use of patient material were followed throughout the study.

Blood was drawn from 13 consecutive newly-diagnosed patients (9M/4F, ages 12.5 ± 9.4 years) at the second week after diagnosis, with their glucose levels controlled by insulin therapy at the time of blood collection. The long-standing patients (12 M/14 F, ages 26.7 ± 9.2 years) had mean disease duration of 11.6 ± 7.4 years (range 2-25 years). Mean HbA1c levels of long-term t1d patients were 7.4 ± 0.43 % (range 6.9-8.4 %). Only one long-term patient was on any medication besides insulin (atorvastatin, 10 mg/day to control cholesterol levels). The healthy controls (13 M/19 F, ages 25.3 ± 11 years), who participated in the study, had no first or second degree relatives suffering from any autoimmune disease, and were not taking any medication at the time of the study.

Peripheral venous blood was obtained from all patients and controls in the morning (between 9:00 and 10:00 h). All individuals with suspicion of infection or inflammation, were excluded from the study. Flow cytometry experiments were performed within 10 min of blood collection.

The analysis was performed in whole blood samples and the monoclonal antibodies (MAB) were titrated according to manufacturer's instructions. The following fluorescein isothiocyanate- (FITC), phycoerythrin- (PE), and peridinin chlorophyll protein- (PerCP) conjugated anti-human monoclonal antibodies were used: leucogate® CD45/CD14 (clones 2D1, and MOP9 respectively), isotype control γ_1/γ_{2a} –FITC and –PE labelled (clones X39, X40), CD4-PerCP (clone SK3), CD25 –FITC or –PE (clone 2A3), CD27-FITC (clone M-T271), CD28-FITC (clone CD28.2), CD45RO-FITC (clone UCL1), CD95-PE (clone DX2), CD122-FITC (clone TU27), CD127-PE (clone Hil-7R-M21), CD152-PE (clone BNI3, membrane and intracellular), CD220-PE (clone 3B6/IR), HLA-DR-FITC (clone L243), HLA-DQ-FITC (clone SK10), all purchased from BD Biosciences (BD Pharmingen, Mountainview, CA, USA), FoxP3-FITC (clone PCH101) from eBioscience (San Diego, CA, USA), TGF β RII-FITC (clone 25508.111; R&D Systems, Minneapolis,

MN, USA) and TGF β -PE (clone TB21; IQ Products, Groningen, NL). The lots for each of monoclonal antibodies used in our study were the same. The flow cytometer was calibrated prior to performing every single assay. For the detection of intracellular molecules (CD152ic, FoxP3), FACS permeabilization solution (Becton Dickinson) was added after the addition and washing of the CD4/CD25 surface antibodies.

Using FACScan (Becton Dickinson) and the appropriate software (Cell Quest, Becton Dickinson), the population of lymphocytes was identified from CD4-PerCP and side scatter characteristics on dot plot profiles. For the investigation of the characteristics of Tregs, at least 10,000 CD4⁺ lymphocytes were gated and triple colour flow cytometry was performed. The cut-off line between Tregs (CD4^{dim}CD25^{high}) and Teff (CD4⁺CD25⁺) was decided from the CD4/CD25 dot plots (lower CD4 expression combined with higher CD25 expression on Tregs). Negative control fluorescence was set at the 99.5 % mark of the fluorescence from the isotype control mAb. Data collected are reported as either percentage of positive cells for each specific marker, and Mean Fluorescence Intensity (MFI) values for the particular marker.

Autoantibodies to human glutamic acid decarboxylase (GAD65), and islet antigen (IA-2) were determined via the certified ELISA of RSR (Cardiff, UK) according to the manufacturer's instructions. All sera scoring over 5 U/ml were considered positive for either of these two auto-antigens. Autoantibodies to insulin were performed in a liquid phase RIA, with any value over 0.80 RU considered as positive. Sera from patients and controls were stored frozen (-20 °C) in small aliquots until use.

All calculations were performed using SPSS for Windows, Version 16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Results are expressed as mean \pm SD. To compare the means among different groups of cells we used the two-tailed Student's *t* tests, where a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The Pearson's test for correlations of various parameters was used, reporting, in most cases, correlations found significant with $p < 0.02$, for higher stringency. All these correlations reported had correlation coefficients, *r*, shown in the respective graphs, and statistically significant at $p < 0.01$.

Results: In all cases examined, there was almost a continuum of cells from CD25⁺ to CD25^{high} ones. We thus sought to separate Tregs from Teff, based on the level of

CD4 expression, and demarkating the line of separation of the two populations as clearly as possible. In turn, we analysed successive segments of CD4⁺CD25⁺ populations starting from the highest CD25-expressing one, in order to see if there were any important differences among such segments, in normals as well as t1d patients. Remarkably, we found that for all populations in going from Tregs to Teff there was a sharp difference in the frequency of expression of seven cell surface markers and one cytoplasmic, i.e. CD127, CD122, CD152, HLA-DR, HLA-DQ, CD27, TGFβRII, and FoxP3. Except for CD127 and TGFβRII, in all markers there is a significantly higher frequency of expression in Tregs compared to Teff. So, The well-defined population of CD4⁺CD25^{high} lymphocytes we present are true Tregs, and a quantitative comparison of these cells in various populations is possible.

Newly-diagnosed type 1 diabetics have a statistically significant lower percent of Tregs (as percent of total CD4⁺ T cells) compared to controls: 1.259 ± 0.264 % vs 3.047 ± 0.264 % respectively, ($p < 0.001$). There is also a highly statistically significant difference in the Tregs of long standing type 1 diabetes patients compared to controls: 1.748 ± 0.308 % vs 3.047 ± 0.264 % respectively, ($p < 0.001$). This difference is also highly statistically significant between newly-diagnosed and long term patients ($p < 0.001$). The change is remarkable in that it shows that the clinical onset of type 1 diabetes is marked by a distinctive lower frequency of Tregs, compared to controls. This lower frequency is partly made-up in long-term patients suggesting a “rebound phenomenon”, yet to a significantly lower frequency when compared to controls.

All markers tested for, are found on the membrane or in the cytoplasm of Tregs from type 1 diabetics (newly-diagnosed and long-standing), as well as normal controls. We find significant surface expression of all markers tested, as well as the markers tested only by us on human Tregs in peripheral blood (CD27, CD28, CD95, CD220, HLA-DQ, TGFβ, TGFβRII). Turning to the distinct characteristics of the Tregs in controls versus newly-diagnosed type 1 diabetic patients we note that there is a significantly higher frequency of expression of CD27, in newly-diagnosed and long-term t1d patients compared to controls. Long-term patients show also significantly higher frequency of expression of CD95 and HLA-DR, but a significantly decreased frequency of CD127 expression, compared to newly-diagnosed patients, and hardly detectable expression of TGFβ, compared to controls. When we turn to possible

differences in the level of expression of these membrane or intracellular markers we find a significant decrease in the level of expression of membrane TGF β and TGF β RII in Tregs from newly-diagnosed patients compared to controls. By contrast, long-term t1d patients have a significantly higher level of expression of TGF β RII compared to newly-diagnosed patients, yet insignificantly so when compared to controls.

Autoantibodies to GAD65, IA-2 and insulin were detected in the majority of sera from newly-diagnosed t1d patients. All long-term patients had autoantibodies to insulin, most probably because of insulin treatment, and ca. 60 % of them had autoantibodies to either GAD65 or IA-2 with 38.1 % being positive for both of these specificities. One control person was detected as positive for anti-GAD65 antibodies (14.5 U/ml), but not for any other anti-islet antibodies, on repeated testing; this person is healthy and has shown no symptoms of prediabetes.

Using the SPSS statistical package we have checked for Pearson's cross-correlations of the frequency and intensity of cell surface and intra-cytoplasmic markers of Tregs, as well as of these markers with percent of Tregs, the various islet autoantibodies and age of subjects. Interestingly, in Tregs from controls there appear highly statistically significant positive correlations in the frequencies of most proteins related to the suppressive function of Tregs (CD122, CD152, HLA-DR, HLA-DQ, TGF β , TGF β RII). Remarkably, the expression of CD152, HLA-DQ, TGF β RII, and TGF β is also highly correlated to CD220, the insulin receptor. When examining such correlations in the Tregs of newly-diagnosed t1d patients we find weakened correlations and involving fewer proteins related to Treg function (essentially CD152, HLA-DR, HLA-DQ and TGF β RII), but no correlation to the expression of CD220. By contrast, long-term t1d patients show most cross-correlations with CD122, HLA-DR, HLA-DQ, FoxP3, and CD45RO, as well as the apoptosis-related protein CD95; the expression of CD45RO also correlates with the expression of the cell proliferation-related protein CD27. Turning to correlations of the MFIs, we notice several for the various proteins, yet in controls most of them show no match with the correlations in the frequency of expression, with the exception of the MFIs of TGF β RII and CD220. It is remarkable that in the controls there is a negative correlation between the MFI of CD28 expression and the percent of Tregs, as well as the positive correlation of the MFIs of CD28 and HLA-DQ. In patients, most of the

correlations in MFIs are likewise scattered as with the correlations of frequencies of expression. Of particular interest are the highly correlated Treg percentages to the HLA-DQ level, and the titer of GAD65 autoantibodies to the MFIs of CD45RO and CD122, in newly-diagnosed t1d. Likewise, in long-term patients the correlations of CD95 MFI with CD122 and FoxP3 MFIs are negative, indicative of an apoptosis-proliferation counter-regulation.

Conclusions: The well-defined population of CD4⁺CD25^{high} lymphocytes we present are true Tregs, and a quantitative comparison of these cells in various populations is possible.

We document first a very significant difference in Tregs between newly-diagnosed patients, long-term t1d patients, and controls. This great deficiency in Tregs in newly-diagnosed patients is only partly corrected in long-term patients.

All markers tested for, are found on the membrane or in the cytoplasm of Tregs from type 1 diabetics (newly-diagnosed and long-standing), as well as normal controls. We find significant surface expression of all markers tested, as well as the markers tested only by us on human Tregs in peripheral blood (CD27, CD28, CD95, CD220, HLA-DQ, TGF β , TGF β RII).

A compounding factor in the Tregs of newly-diagnosed patients is the significantly lower level of the MFI of TGF β and TGF β RII compared to controls. Such a lower level of one of the main effector molecules and its receptor on Tregs may be one of the main reasons for decreased immune suppression of Tregs from newly-diagnosed patients. On the other hand, the higher percent of Tregs expressing CD27, are indicative of Treg proliferation counterbalancing the effect of the sharp decrease in the percent of Tregs.

Long-term t1d patients also exhibit a higher frequency of expression of the proliferation-associated molecule CD27 in their Tregs. Yet, the combination of near absence of membrane TGF β in the Tregs of these patients, increased level of expression of TGF β RII, as well as increased frequency of expression of HLA-DR and CD95 are consistent with two parallel processes of Tregs: generation and apoptosis.

The identification of several new correlations in the expression of such proteins - important for Treg function- that are absent in newly-diagnosed patients and changed in focus in long-term ones is consistent with an active mechanism disrupting the integrity of the Treg population because of an on-going autoimmune disease.

ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Several novel characteristics of Treg cells in newly-diagnosed type 1 diabetics and controls: preliminary results

S. A. Paschou, G. Vartholomatos, L. Dova, N. Kolaitis, E. Giotaki, A. Tsatsoulis, G.K. Papadopoulos

Diabetologia (2006); 49: Suppl 1(S1-S755): S 279

- Newly-diagnosed type 1 diabetic patients have distinct differences in the number and cell surface markers (TGF β , InsR) of regulatory T (Tregs) and effector T (Teff) lymphocytes compared to controls

S. A. Paschou, G. Vartholomatos, L. Dova, N. Kolaitis, E. Giotaki, A. Tsatsoulis, G.K. Papadopoulos

Diabetologia (2007); 50: Suppl 1(S1-S538): S 193

- Distinctive differences in the phenotypic characteristics of Tregs of newly diagnosed type 1 diabetics, long-standing patients, relatives and controls

S. A. Paschou, G. Vartholomatos, L. Dova, N. Kolaitis, E. Giotaki, A. Tsatsoulis, G.K. Papadopoulos

Diabetologia (2008); 51: Suppl 1(S1-S588): S 238

- The monocytes of type 1 diabetic patients (newly-diagnosed and long-standing) express significantly lower intensity of cell membrane HLA-DQ molecules compared to controls, while in long standing patients very few monocytes express the surface markers CD122 (IL-2R β) and CD152 (CTLA-4)

S. A. Paschou, A. Petsiou, K. Hatzigianni, E. Giotaki, N. Kolaitis, G. Vartholomatos, A. Tsatsoulis, G.K. Papadopoulos

Diabetologia (2009); 52: Suppl 1(S1-S550): S 195

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 1994. Major Histocompatibility Complex, *Cellular and Molecular Immunology*, 2nd edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia 96-114
- Anastasiadou V, Spyropoulou M, Delis D, Khalil I, Lepage V, Papanicolaou M, Varla M, Stavropoulou A, Bartsocas CS. 1993. Genetic predisposition and IDDM in Greece. *Genet Couns* 4:181-185
- Andersen, M. H., R. B.Sørensen, M. K. Brimnes, I. M. Svane, J. C. Becker, and P. t. Straten. 2009. Identification of heme oxygenase-1-specific regulatory CD8+ T cells in cancer patients. *J Clin Invest*, in press, doi:10.1172/JCI38739
- Anjos, S., and C. Polychronakos. 2004. Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. *Mol. Gen. Metab.* 81: 187-195
- Apostolou I, von Boehmer H 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199:1401-1408
- Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollman E et al 2007. Selection of FoxP3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nature Immunol* 8:351-357
- Baecher-Allan, C., E. Wolf, and D. A. Hafler. 2005. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Clin. Immunol.* 115: 10-18
- Baecher-Allan, C., E. Wolf, and D. A. Hafler. 2006. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J. Immunol.* 176: 4622- 4631
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler. 2001. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167: 1245-1253
- Barnes MJ, Krebs P, Harris N, Eidenschenk C, Gonzalez-Quintial R, et al. 2009. Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery. *PLoS Biol* 7:3
- Battaglia, A., G. Ferrandina, A. Buzzonetti, P. Malinconico, F. Legge, V. Salutari, G. Scambia, and A. Fattorossi. 2003. Lymphocyte populations in human lymph nodes. Alterations in CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell phenotype and T-cell receptor Vbeta repertoire. *Immunology* 110: 304-312
- Beck-Nielsen, H., O. Pedersen, K. Kragballe, and N. S. Sorensen. 1977. The monocyte as a model for the study of insulin receptors in man. *Diabetologia* 13: 563-569

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL 2002. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-507

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of Foxp3. *Nature Genet* 27:20-21

Bisikirska, B., J. Colgan, J. Luban et al. 2005. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* 115: 2904-2913

Bjorkman PJ, Saper Ma, Samraoui B et al 1987. Structure of the human class I HLA-A2 *Nature* 329: 506-512.

Bluestone J, Tang Q 2005. How do CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 17:1-5

Bluestone JA 2005 Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nature Rev Immunol* 5:343-349

Boden, E., Q. Tang, H. Bour-Jordan, and J. A. Bluestone. 2003. The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Novartis Found. Symp.* 252: 55-63; discussion 63-66

Bodmer J, Marsh S, Albert E et al 1996. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 49: 297-321

Bondinas, G.P., Moustakas, A.K., Papadopoulos, G.K. 2007 The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. *Immunogenetics* 59: 539-553

Bopp, T., C. Becker, M. Klein et al 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 204: 1303-1310

Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantin, R. Giometto, S. Höpner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Röttschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110: 1225-1232

Bottazzo, G. F., B. M. Dean, J. M. McNally, E. H. Mackay, P. G. Swift, and D. R. Gamble. 1985. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N. Engl. J. Med.* 313: 353-360

Bour-Jordan H, Salomon BL, Thompson HL, Szot GL, Bernhard MR, Bluestone JA 2004. Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells. *J Clin Invest* 114:979-987

- Brown, T.J., L. Ercolani, and B. H. Ginsberg. 1983. Properties and regulation of the T lymphocyte insulin receptor. *J. Recept. Res.* 3: 481-494
- Brusko, T. M., A. L. Putnam, and J. A. Bluestone. 2008. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol. Rev.* 223: 371-390
- Brusko, T.M., C. H. Wasserfall, K. McGail, R. Schatz, H. L. Viener et al 2007. No alterations in the frequency of FoxP3+ regulatory T cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 56: 604-612
- Brusko, T.M., C. H. Wasserfall, M. J. Clare-Salzler, D. A. et al 2005. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4⁺CD25⁺ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 1407-1414
- Cabrera O., Dora M. Berman, Norma S. Kenyon, Camillo Ricordi, Per-Olof Berggren, Alejandro Caicedo 2005. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function *PNAS* 103(9): 2334-2339
- Cahill, G. F. Jr., and H. O. McDevitt. 1981. Insulin-dependent diabetes mellitus: the initial lesion. *N. Engl. J. Med.* 304: 1454-1465
- Cambell RD, Townsdale J 1993. Map of the Human MHC *Immunol Today* 14: 349-352
- Cao, D., V. Malmstrom, C. Baecher-Allan, D. Hafler, and L. Klareskong. 2003. Isolation and functional characterization of regulatory CD4⁺CD25^{bright} T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. immunol.* 33: 215-223
- Carson, B.D., and S. Ziegler. 2007. Impaired T cell receptor signaling in Foxp3+ CD4 T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1103: 167-178
- Chapman HA 1998. Endosomal proteolysis and MHC class II function *Curr Opin Immunol* 5: 35-44
- Chatenoud L, Bluestone JA 2007. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nature Rev Immunol* 7:622-632
- Chatila, T. A., F. Blaeser, N. Ho, H. M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, and A.M. Bowcock. 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 106: R75-R81
- Chen, W., and S. M. Wahl. 2003. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev.*14: 85-89
- Chikuma, S., and J. A. Bluestone. 2007. Expression of CTLA-4 and FOXP3 in cis protects from lethal lymphoproliferative disease. *Eur. J. Immunol.* 37: 1285-2289

- Coyle AJ & Gutierrez-Ramos JC 2004. The role of ICOS and other costimulatory molecules in allergy and asthma. *Curr Op Immunol* 14: 779
- Cucca F, Lampis R, Congia M et al 2001. A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. *Hum Mol Genet* 10: 2025-2037
- Cudworth AG, Woodrow JC 1975. Evidence for HLA-linked genes in juvenile diabetes mellitus. *Br Med J* 3: 133-135
- Daneman, D. 2006. Type 1 diabetes. *The Lancet* 367: 847-858
- Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW 2004. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J Immunol* 172:5967-5972
- Davies JL, Kawaguchi Y, Bennet St et al 1994. A genome wide research for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371: 130-136.
- Dausset J, Svejgaard A.1977. HLA and diseases, Copenhagen Munksgaard
- De Kleer, I. M., L. R. Wedderburn, L. S. Taams, A. Patel, H. Varsani, M. Klein, W. de Jager, G. Pugayung, F. Giannoni, G. Rijkers, S. Albani, W. Kuis, and B. Prakken. 2004. CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J. Immunol.* 172: 6435-43
- Dejaco, C., C. Duftner, B. Grubeck-Loebenstein, M. Schirmer. 2005. Imbalance of T regulatory cells in human diseases. *Immunology* 117: 289-300
- De Oliviera Db, Harfouch-Hammoud E, Otto H et al 2000. Structural analysis of two HLA-DR presented autoantigenic epitopes: crucial role of peripheral but not central peptide residues for T-cell receptor recognition. *Mol Immunol* 37: 813-825
- Devendra, D., E. Liu, and G. S. Eisenbarth. 2004. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 328: 750-754
- Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193:1303-1310
- Donner H, Rau H, Walfish PG et al 1997. CTLA-4 alanine 17 confers genetic susceptibility to Grave's disease and to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 143-146
- Dorf ME, Benacerraf B 1984. Suppressor cells and immunoregulation. *Annu Rev Immunol* 2:127-157
- Durinovic-Bello I, Boehm BO, Ziegler AG 2002. Predominantly recognized proinsulin T helper cell epitopes in individuals with and without islet cell autoimmunity. *J Autoimmunity* 18: 55-66

Earle KE, Tang Q, Zhou X, Liu W, Bonyhadi ML, Bluestone JA 2005. In vitro expanded human regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol* 115:3-9

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg D, Mauri C 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J Exp Med* 200:277-285

Elfving, A. M., B. A. Lindberg, L. Nyström, G. Sundkvist, Å. Lernmark, S. A. Ivarsson, and DISS Study Group. 2003. Islet autoantibodies in cord blood from patients who developed type 1 diabetes mellitus at 15-30 years of age. *Autoimmunity* 36: 227-231

Floess S, Freyer J, Siewert C et al 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biology* 7:169-178

Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. et al 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biology* 7: 169-178

Fontenot JD, Rudensky AY 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead transcription factor FoxP3. *Nature Immunol* 6:331-337.

Foulis, A. L., C. N. Liddle, M. A. Farquharson, J. A. Richmond, and R. S. Weir. 1986. The histopathology of the pancreas in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 29: 267-274

Fountoulakis S., G. Vartholomatos, N. Kolaitis, S. Frillingos, G. Philippou, and A. Tsatsoulis 2008. HLA-DR expressing peripheral T regulatory cells in newly diagnosed patients with different forms of autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 18: 1195-1200

Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB (2007) Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant* 7:1722-1732

Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY 2007. FoxP3 dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445:771-775

Gavin, M.A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. et al 2006. Single cell analysis of normal and FoxP3 mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *P.N.A.S. USA* 103: 6659-6664

Germain RM 2001. The T-cell receptor for antigen: signaling and ligand discrimination. *J Biol Chem* 276:35223-35226

Gershon RK, Kondo K 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of the thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723-735

Glisic, S., M. Klinker, J. Waukau, P. Jailwala, S. Jana, J. Basken, T. Wang, R. Alemzadeh, W. Hagopian, and S. Ghosh. 2009. Genetic association of HLA-DQB1 with CD4⁺ CD25^{high} T-cell apoptosis in type 1 diabetes. *Genes Immun* 10: 334-340

Glisic-Milosavljevic, S., J. Waukau, P. Jailwala, S. Jana, R. Alemzadeh, W. Hagopian, and S. Ghosh. 2007. At-risk and recent-onset type 1 diabetic subjects have increased apoptosis in the CD4⁺CD25^{high} T-cell fraction. *PLoS ONE* 2: 146

Godfrey, W.R., D. J. Spoden, Y. G. Ge, S. R. Baker, B. Liu, B. L. Levine, C. H. June, B. R. Blazar, and S. B. Porter. 2005. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105: 750-758

Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002; 195: 1641-1646

Green EA, Choi Y, Flavell RA 2002. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 16:183-191

Greenspan FS & Gardner DG, 2007. Basic and Clinical Endocrinology, 8th edition Lange

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F et al 2002 CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3:1097-1101

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ 2004 Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589-601

Guo J et al 2001. Stimulatory effects of B7-related protein-1 on cellular and humoral immune responses in mice *J immunol* 166: 5578

Hanninen, A., S. Jalkanen, M. Salmi, S. Toikkanen, G. Nikolakaros, and O. Simell. 1992. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 90: 1901-1910

Haribhai, D., W. Lin, L. M. Relland, N. Truong, C. B. Williams, and T. A. Chatila. 2007. Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J. Immunol.* 178: 2961-2972

Harrison TR, Εσωτερική Παθολογία, 2005. 16^η Έκδοση, Εκδόσεις Παρισσιάνου

Hashimoto L, Habita C, Beressi JP et al 1994. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* 371: 161-164

Hermann, R., C. S. Bartsocas, G. Soltész, A. Vazeou, P. Paschou, E. Bozas, A. Malamitsi-Puchner, O. Simell, M. Knip, and J. Ilonen. 2004. Genetic screening for individuals at high risk for type 1 diabetes in the general population using HLA Class II alleles as disease markers. A comparison between three European populations with variable rates of disease incidence. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 20: 322-329

Hirayama, K., S. Matsushita, I. Kikuchi, M. Iuchi, N. Ohta, and T. Sasazuki .1987. HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans. *Nature* 327: 426-430

Hoffmann HJ, Malling TM, Topcu A, Ryder LP, Nielsen KR, Varming K, Dahl R, Omland O, Sigsgaard T. 2007. CD4^{dim}CD25^{bright} Treg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytometry A.*, 71:371-378

Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061

Hsieh, C.S., Y. Liang, A. J. Tzgnik, S. G. Self, D. Liggitt, and A. Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 21: 267-277

Huan J, Culbertson N, Spencer L et al 2005. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 81:45-52

James, E.A., and W. W Kwok. 2007. CD8⁺ suppressor-mediated regulation of human CD4⁺ T cell responses to glutamic acid decarboxylase 65. *Eur. J. Immunol.* 37: 78-86

Janeway CA Jr., Travers P, Walport M, Shlomchik MJ 2005. Immunobiology 6th ed., Garland Science, London, New York

Jiang H, Chess L 2004. An intergrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 114: 1198-208

Jonuleit H., E. Smidtt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk 2001. Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193:1285-1294

Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: Dinstict subsets and their interrelations. 2003 *J Immunol*, 6323-7

Josefowicz, S. Z., and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30: 616-625

Kekalainen E, Tuovinen H, Joensuu J et al 2007. A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Immunol* 178:1208-1215

- Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007; 8: 191-197
- Kim JM, Rudensky A. 2006. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* 212: 86-98
- Kim, J. M., J. P. Rasmussen, and A. Y. Rudensky. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* 8: 191-197
- Klein J 1982. The Major Histocompatibility Complex, Immunology, New York, Wiley, 270-309
- König, R., X. Shen, and R.N. Germain. 1995. Involvement of both major histocompatibility complex class II α and β chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerisation in T lymphocyte activation. *J Exp Med* 182: 779-787
- Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blanc N, Kalden JR, Lorenz HM 2004. Defective suppressor function of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 199:1285-1291
- Kuby J 1997. Immunobiology 3rd edition, Freeman and Company, New York, 288-305, 380-396
- Kukreja, A., G. Cost, J. Marker, C. Zhang, Z. Sun, K. Lin-Su, S. Ten, M. Sanz, M. Exley, B. Wilson, S. Porcelli, and N. Maclaren. 2002. Multiple immunoregulatory defects in type 1 diabetes. *J. Clin. Invest* 109: 131-140
- Lan R, Ansari A, Lian Z-X, Gershwin ME 2005. Regulatory T cells: Development, function and role in autoimmunity *Autoimmun Rev* 4: 351-63
- Lawson, J. M., J. Tremble, C. Dayan, H. Beyan, R. D. Leslie, M. Peakman, and T. I. Tree. 2008. Increased resistance to CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 154: 353-359
- Lehner PJ, Cresswell P 1996. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 10: 93-102
- Lernmark, Å., S. Baekkeskov, T. Dyrberg, I. Gerling, B. Marner, G. K. Papadopoulos, A. Svenningsen, C. Binder, M. Christy, J. Nerup, and T. Mandrup-Poulsen. 1984. The pathogenesis of Type I diabetes mellitus. In *Endocrinology 1984*, Lebric F. and Proulx L., eds, pp.92-96, Elsevier, Amsterdam, 1984
- Li, M.O., Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A. K. Robertson, and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 99-146
- Li, M.O., Y. Y. Wan, and R. A. Flavell. 2007. T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1-and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26: 579-591

- Lindley, S., C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman M, and T. I. M. Tree. 2005. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92-99
- Liu, W., A. L. Putnam, X.Y. Zhou et al 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *J. Exp. Med.* 203: 1701-1711.
- Lowe, C.E., J. D. Cooper, T. Brusko, N. M. Walker, D. J. Smyth, R. Bailey, K. Bourget, V. Plagnol, S. Field, M. Atkinson, D. G. Clayton, L. S. Wicker, and J. A. Todd. 2007. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 39: 1074-1082
- Ludewig B, Odermatt B, Landmann S, Hengartner H, Zinkernagel RM 1998. Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med* 188:1493-1501
- Luther C, Poeschel S, Varga M, Melms A, Tolosa E 2005. Decreased frequency of intrathymic regulatory T cells in patients with myasthenia-associated thymoma. *J Neuroimmunol* 164:124-128
- Makita, S., T. Kanai, S. Oshima, K. Uraushikara, T. Totsuka, T. Sawada, T. Nakamura, K. Koganei, T. Fukushima, and M. Watanabe. 2004. CD4⁺CD25^{bright} T cells in human lamina propria as regulatory cells. *J. Immunol.* 172: 3119-3130
- Mallaun M., D. Naeher, M. A. Daniels, P. P. Yachi, B. Hausmann, I. F. Luescher, N. R. Gascoigne, and E. Palmer. 2008. The T cell receptor's alpha-chain connecting peptide motif promotes close approximation of the CD8 coreceptor allowing efficient signal initiation. *J Immunol.* 180: 8211-8221
- Mein CA, Esposito L, Dunn MG et al 1998. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in family from the United Kingdom. *Nature Genetics* 19: 297-300
- Mellanby RJ, Koonce CH, Monti A, Phillips JM, Cooke A, Bikoff EK 2006. Loss of invariant chain protects nonobese diabetic mice against type 1 diabetes. *J Immunol* 177:7588-7598
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochoy, and S. Sakaguchi. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30: 899-911
- Mjösberg, J., J. Svensson, E. Johansson, L. Hellström, R. Casas, M. C. Jenmalm, R. Boij, L. Matthiesen, J.-I. Jönsson, G. Berg, and J. Ernerudh. 2009. Systemic reduction of functionally suppressive CD4^{dim}CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17β-estradiol. *J Immunol* 183: 759-769

- Mossman KD, Campi G, Groves JT, Dustin ML 2005. Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science* 310:1191-1193
- Moustakas AK, Routsias J, Papadopoulos GK 2000. Modelling of the MHC II allele I-A^{g7} of NOD mouse: pH-dependent changes in specificity at pockets 9 and 6 explain several of the unique properties of this molecule. *Diabetologia* 43:609-624
- Moustakas, A. K., and G. K. Papadopoulos. 2002. Molecular properties of HLA-DQ alleles conferring susceptibility to or protection from IDDM: keys to the fate of beta cells. *Am J Medical Genetics* 115: 37-47
- Munn DH, Sharma MD, Lee JR et al 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-diogenase. *Science* 297:1867-1870
- Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J. Exp. Med.* 194: 629-644
- Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF β 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol.* 172: 834–842
- Narendran P, Neale AM, Lee BH, Ngui K, Steptoe RJ, Morahan G, Madsen O, Dromey JA, Jensen KP, Harrison LC (2006) Proinsulin is encoded by an RNA splice variant in human blood myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16430-16435
- Ochado JC, Yopp AC, Yang Y et al 2005. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 174:6993-7005
- Ostroukhova, M., Z. Qi, T. B. Oriss, B. Dixon-McCarthy, P. Ray, and A. Ray. 2006. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J. Clin. Invest.* 116: 996-1004
- Pani MA, Van Autreve J, Van Der Auwera BJ et al 2002. Non-transmitted maternal HLA-DQ2 or DQ8 alleles and the risk of type 1 diabetes in offspring. *Diabetologia* 45: 1340-1343
- Peluso I, Fantini MC, Fina D, et al 2007. IL-21 counteracts the regulatory T Cell-mediated suppression of human CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 178: 732-739
- Pesu, M., W. T. Watford, L. Wei, L. Xu, I. Fuss, W. Strober, J. Andersson, E. M. Shevach, M. Quezado, N. Bouladoux, A. Roebroek, Y. Belkaid, J. Creemers, and J. J. O' Shea. 2008. T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature* 455: 246-250
- Peterson P, Nagamine K, Scott H, Heino M, Kudoh J, Shimizu N, Antonarakis SE, Krohn KJ (1998) APECED: a monogenic autoimmune disease providing new clues to self-tolerance. *Immunol Today* 19:384-386

Piccirilo C, Shevach E 2004. Naturally occurring CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance 2004. *Sem Immunol* 16: 81-88

Piccirilo C, Thornton AM 2004. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *Trends Immunol* 25: 374-80

Primo ME, Klinke S, Sica MP, Goldbaum FA, Jakoncic J, Poskus E, 2008. Structure of the mature ectodomain of the human receptor type protein tyrosine phosphatase IA-2. *J Biol Chem.* 283(8):4674-81.

Pugliese A, Brown D, Garza D, Murchison D, Zeller M, Redondo MJ, Diez J, Eisenbarth GS, Patel DD, Ricordi C 2001. Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs. *J Clin Invest.* 107: 555-564. *Erratum ibid* 2006, 116: 548

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A et al 1997. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nature Genetics* 15: 293-297.

Putnam A. L., T. M. Brusko, M. R. Lee, W. Liu, G. L. Szot, T. Ghosh, M. A. Atkinson, and J.A. Bluestone. 2009. Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 58: 652-662.

Putnam, A.L., F. Vendrame, F. Dotta, and P. A. Gottlieb. 2005. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J. Autoimm.* 24: 55-62

Pyzik M, Piccirillo CA 2007 TGF-β1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4⁺ T cell subsets. *J Leuk Biol* 82:335-46

Rahmati K, Lernmark Å., Becker C, Foltyn-Zadura A, Larsson K, Ivarsson SA, and Törn C. 2008. A comparison of serum and EDTA plasma in the measurement of glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GADA) and autoantibodies to islet antigen-2 (IA-2A) using the RSR radioimmunoassay (RIA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits. *Clin Lab* 54: 227-235

Rammensee HG, Falk K, Rotzchke O 1993. MHC molecules as peptide receptors *Curr Opin Immunol* 5: 35-44

Rao, A., N. Kamani, A. Filipovich, S. M. Lee, S. M. Davies, J. Dalal, and S. Shenoy. 2007. Successful bone marrow transplantation for IPEX syndrome following reduced intensity conditioning. *Blood* 109: 383-385

Reng Y, Laouar Y, Li M, Green EA, Flavell RA 2004 TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4572-4577

Roncador, G., P. J. Brown, L. Maestre, S. Hue, J. L. Martínez-Torrecuadrada, K. L. Ling, S. Pratap, C. Toms, B. C. Fox, V. Cerundolo, F. Powrie, and A. H. Banham.

2005. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur. J. Immunol.* 35: 1681-1691

Roza I & Nurieva T 2005. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7 interaction *Clin Immunol* 115:19

Sakaguchi S 2006 Regulatory T cells: Meden Agan. *Immunol Rev* 212:5-7

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda.1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells IL-2 receptor α -chains (CD25). *J. Immunol.* 155:1151-1164

Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, and T. Nomura. 2008. On regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-787

Salomon B, Bluestone JA 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19: 225-252

Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440

Samy ET, Parker LA, Sharp CP, Tung KSK 2005 Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the regional lymph node. *J Exp Med* 202:771-781

Saoudi, A., B. Seddon, D. Fowell, and D. Mason. 1996. The thymus contains a high frequency of cells that prevent autoimmune diabetes on transfer into prediabetic recipients. *J. Exp. Med.* 184: 2393-2398

Seddiki, N., B. Santner-Nanar, J. Martinson, J. Zaundres, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kalleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of IL-2 and Il-7 receptors discriminates between regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203: 1693-1700

Shevach, E. M. 2004. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthr. Rheum.* 50: 2721-2724

Stauber, D.J., E. W. Debler, P. A. Horton, K. A. Smith, and I. A. Wilson. 2006. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 103: 2788-2793

Steinman, L. 2007. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T-cell mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13: 139-145, *Erratum on p.* 385

Stephens, LA, Mottet C, Mason D, Powrie F 2001. Human CD4⁺CD25⁺ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 31:1247-1254

Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F et al 1999. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 286:1957-1959

Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. 2009. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol* 39 (12):3315-22

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303-310

Tang Q, Adams JY, Tooley AJ et al 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nature Immunol* 7:83-92

Tang, Q., J. Y. Adams, C. Penaranda, K. Melli, E. Piaggio, E. Sgouroudis, C. A. Piccirillo, B. L. Salomon, and J. A. Bluestone. 2008. Central role of defective Interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 28: 87-97

Tang, Q., K. J. Henriksen, E. K. Boden, A. J. Tooley, J. Ye, S. K. Subudhi, X. X. Zheng, T. B. Strom, and J. A. Bluestone. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 171: 3348-3352

Tector M, Khatri BO, Kozinski K, Dennert K, Oaks MK. 2009. Biochemical analysis of CTLA-4 immunoreactive material from human blood. *BMC Immunol.* 10:51

Thorsby, E., and K. S. Rønningen. 1993. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36: 371-377

Todd, J. A., J. I. Bell, and H. O. McDevitt. 1987. HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329: 554-604

Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. 2009 GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11; 106 (32):13445-50

Trajkovski M, Mziaut H, Ouwendijk J, Knoch KP, Solimena M. 2004. Nuclear translocation of an ICA512 cytosolic fragment couples granule exocytosis and insulin expression in {beta}-cells. *J Cell Biol.* 167(6):1063-74

Tree, T. I. M., B. O. Roep, and M. Peakman. 2006. A mini meta-analysis of studies on CD4⁺CD25⁺⁺ T cells in human type 1 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1079: 9-18

Tsang, J. Y., N. O. Camara, E. Eren, H. Schneider, C. Rudd, G. Lombardi, and R. Lechler. 2006. Treg delayed signaling compared to Teff. Altered proximal T cell receptor (TCR) signaling in human CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 80: 145-151

Ueda, H., J. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. Hunter, A. N. Smith, G. Di Genova, M. H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R. C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H. E. Rance, V. Everett, L. J. Smink, A. C. Lam, H. J. Cordell, N. M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J. F. Hess, M. L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadi, R. Nithyanathan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K. M. Gillespie, D. E. Undlien, K. S. Rønningen, C. Guja, C. Ionescu-Tîrgoviște, D. A. Savage, A. P. Maxwell, D. J. Carson, C. C. Patterson, J. A. Franklyn, D. G. Clayton, L. B. Peterson, L. S. Wicker, J. A. Todd, and S. C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene *CTLA4* with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423: 506-511

Uno, S., A. Imagawa, K. Okita, K. Sayama, M. Moriwaki, H. Iwahashi, K. Yamagata, S. Tamura, Y. Matsuzawa, T. Hanafusa, J. Miyagawa, and I. Shimomura. 2007. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 50: 596-601

Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, et al 1997. Insulin expression in human thymus is modulated by *INS VNTR* alleles at the *IDDM2* locus. *Nature Genetics* 15:289-292

Verbsky JW 2007. Therapeutic use of regulatory T cells. *Curr Opin Rheum* 19:252-258

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199:971-979

Wan, L.Y., and R. A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445: 766-769

Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. 2009. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11; 106(32): 13439-44

Wei-Kang, S., Y. Quin-Wei, and B. Lin-Pin. 1993. Biological characterisation of a monoclonal antibody TB21 against human transforming growth factor-beta. *Acta Biol. Exper. Sinica* 26: 41-150

Wulffraat NM, de Kleer IM, Prakken B 2006. Refractory juvenile idiopathic arthritis: using autologous stem cell transplantation as a treatment strategy. *Exp Rev Mol Med* 8:1-11

Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P et al 2007. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nature Genetics* 39:329-337

You, S., M. Belghith, S. Cobbold, M. A. Alyanakian, C. Gouarin, S. Barriot, C. Garcia, H. Waldmann, J. F. Bach, and L. Chatenoud. 2005. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes* 54: 1415-1422

You, S., S. Candon, C. Kuhn, J.F. Bach, and L. Chatenoud. 2008. CD3 antibodies as unique tools to restore self-tolerance in established autoimmunity: their mode of action and clinical application in type 1 diabetes. *Adv Immunol* 100: 13-37

Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu T-T, Gavin MA, Rudensky AY 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936-940

Zheng Y, Rudensky AY 2007. FoxP3 and control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunol* 8:457-462

Ziegler, S.F. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annual Review of Immunology* 24: 209-226

Βαρθολομάτος Γεώργιος 2007. Κυτταρομετρία Ροής: Αρχές και Κλινικοερευνητικές Εφαρμογές της (Για τους ειδικευόμενους γιατρούς στη Βιοπαθολογία και Αιματολογία)