



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ

**“Πρωτεομική ανάλυση στελεχών τρίχας σε ενεργό φάση  
αύξησης παιδιατρικών ασθενών με Διαβήτη τύπου 1”**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ: Μιχαλόπουλος Ιωάννης

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 19678181

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ, MD, PhD, PharmD, MSc

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

**ΑΘΗΝΑ 2024**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES

UNDERGRADUATE THESIS

TITLE

**“Proteomic analysis of hair shafts in active growth phase of  
pediatric patients with type 1 diabetes”**

CANDIDATE'S NAME: Michalopoulos Ioannis

CANDIDATE'S NUMBER: 19678181

SUPERVISOR: PAPANASTASIOU ANASTASIOS, MD, PhD, PharmD, MSc

ASSISTANT PROFESSOR IN THE DEPARTMENT OF BIOMEDICAL  
SCIENCES OF UNIVERSITY OF WEST ATTICA

**ATHENS 2024**





# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Πρωτεομική ανάλυση στελεχών τρίχας σε ενεργό φάση  
αύξησης παιδιατρικών ασθενών με διαβήτη τύπου 1”**

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ

Όνοματεπώνυμο	Βαθμίδα	Υπογραφή
1. Παπαναστασίου Αναστάσιος	Δ.Ε.Π., Επίκουρος Καθηγητής στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	
2. Νικόλαος Θαλασσινός	Δ.Ε.Π., Επίκουρος Καθηγητής στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	
3. Δημήτριος Χανιώτης	Δ.Ε.Π., Καθηγητής και Πρόεδρος του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών	



## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Μιχαλόπουλος Ιωάννης του Νικολάου, με αριθμό μητρώου 19678181 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΦΙΕΡΩΣΗ.....	IV
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	V
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ABBREVIATIONS.....	VIII
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	
<b>Κεφάλαιο 1. Πρωτεομική ανάλυση.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ορισμός και πεδία εφαρμογής.....	1
1.2 Βασικές αρχές πρωτεομικής.....	1
1.3 Μεθοδολογίες πρωτεομικής ανάλυσης.....	3
1.4 Προετοιμασία πρωτεϊνών για ανάλυση με φασματομετρία μάζας.....	3
1.5 Υγρή χρωματογραφία.....	6
1.6 Φασματομετρία μάζας.....	8
1.7 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.....	11
<b>Κεφάλαιο 2. Φυσιολογία της τρίχας.....</b>	<b>12</b>
2.1 Προέλευση και εξελικτικοί μηχανισμοί.....	12
2.2 Ποικιλομορφία και λειτουργίες της τρίχας.....	13
2.3 Σχηματισμός, ανάπτυξη και ωρίμανση του τριχικού θυλάκου.....	14
2.4 Δομή και σύνθεση του τριχικού στελέχους.....	17
2.5 Θυλακική δυναμική - κύκλος ανάπτυξης τρίχας.....	19
2.6 Πρωτεΐνες της τρίχας.....	21
<b>Κεφάλαιο 3. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1.....</b>	<b>24</b>
3.1 Ορισμός.....	24
3.2 Δομή και κύτταρα του παγκρέατος.....	24
3.3 Ινσουλίνη.....	25
3.4 Αυτοανοσία και προδιάθεση.....	27
3.5 Οι εντεροϊοί ως αιτιολογικός παράγοντας πρόκλησης ΣΔ1.....	30
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>32</b>
A. Επιλογή δειγμάτων - Προστασία δεδομένων.....	32
B. Εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια.....	32
Γ. Αναλυτική περιγραφή πειράματος.....	33
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>35</b>
1. Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	35
2. Ανάλυση ευρημάτων.....	36
3. Συζήτηση.....	40
4. Συμπεράσματα.....	43
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>44</b>

## ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Αφιερώνω αυτήν την πτυχιακή εργασία στους γονείς μου και την αδερφή μου, που με στήριξαν και με ενέπνευσαν με την αμέριστη αγάπη και υποστήριξή τους. Η αφιέρωση αυτή εκφράζει τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη για την αφοσίωσή τους και την ανεκτίμητη βοήθειά (ψυχολογική και οικονομική), που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της ακαδημαϊκής πορείας. Χωρίς την πίστη τους στις δυνατότητές μου, αυτή η πτυχιακή εργασία δεν θα γινόταν ποτέ πραγματικότητα.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο ανάλυσης μακρομορίων, του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ” σε συνεργασία με το Νοσοκομείο Παίδων “Η Αγία Σοφία”, κατά το έτος 2023.

Η ολοκλήρωση της προπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη υποστήριξη της Κα. Μαρτίνας Σαμιωτάκη, Ειδική Λειτουργική Επιστήμονας Α στο Ε.Κε.Β.Ε “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”. Της εκφράζω ένα βαθύ ευχαριστώ τόσο για την βοήθεια που μου προσέφερε, όσο και για την ευκαιρία που μου έδωσε να έρθω σε επαφή με τεχνολογίες και ερευνητικά πρωτόκολλα αιχμής, στον κλάδο της πρωτεομικής.

Χρυστάω, επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Νικόλα Νικολαΐδη, ακαδημαϊκό υπότροφο του τομέα Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Διαβήτη της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του ΕΚΠΑ της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» και του τομέα Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του ΙΙΒΕΑΑ, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, να αναλάβω την διεξαγωγή των πρωτεομικών πειραμάτων στα δείγματα του και να γίνω μέρος της έρευνας που πραγματοποιεί.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω βαθιά τον Κ. Αναστάσιο Παπαναστασίου, επίκουρο καθηγητή του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πα.Δ.Α, ο οποίος στάθηκε πολύτιμος αρωγός κατά τη διάρκεια εκπόνησης και ολοκλήρωσης της εργασίας αλλά και κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου, για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε.

Αθήνα, Ιούλιος, 2024

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ:** Μελέτες έχουν δείξει ότι η αυτοανοσία στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1) ξεκινάει αρκετό διάστημα πριν την εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων. Η τρίχα στον άνθρωπο επιμηκύνεται κατά 1 cm ανά μήνα. Κατά την ανάπτυξη της τρίχας ενσωματώνονται ποικίλα ενδογενή μόρια με αποτέλεσμα ένα δείγμα τρίχας να μπορεί να παρέχει ένα προφίλ σε πρωτεΐνες που αντανakλά την έκθεση της σε μήνες. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να ταυτοποιηθεί το πρωτεομικό προφίλ σε δείγματα τρίχας μήκους 1 cm σε κορίτσια με πρωτοδιάγνωστο ΣΔ1, καθώς και η ανίχνευση του πεπτιδίου C στα μη διαβητικά άτομα .

**ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ:** Τριάντα-δύο κορίτσια με πρωτοδιάγνωστο ΣΔ1 και τριάντα υγιή κορίτσια στρατολογήθηκαν με καταγραφή κλινικοεργαστηριακών δεδομένων. Τα δείγματα τριχών συλλέχθηκαν από την οπίσθια κορυφή του κρανίου με τη χρήση ψαλιδιού όσο το δυνατόν πλησιέστερα στη ρίζα της τρίχας και αποκόπησαν τα πρώτα 6 cm ανά 1 cm από κάθε κορίτσι. Οι πρωτεΐνες της τρίχας ανά εκατοστό απομονώθηκαν πιλοτικά για 36 δείγματα από 3 κορίτσια με ΣΔ1 και 3 υγιή κορίτσια. Η πέψη τους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Sp3. Τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματόμετρο μάζας Q Exactive HF-X για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους με το λογισμικό DIANN. Η στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τα λογισμικά Perseus και Metascape.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Ταυτοποιήθηκαν 1799 πρωτεΐνες από τα 36 δείγματα εκ των οποίων 346 πρωτεΐνες ήταν στατιστικώς σημαντικές. Σε όλα τα δείγματα μήκους 1 cm, οι ασθενείς με ΣΔ1 παρουσίασαν διαφορετική έκφραση στις πρωτεΐνες των κερατινών, της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (IGKC, IGHA1, IGHG1-3), του υποδοχέα των ιών coxsackie και αδενοϊού (CXADR) καθώς και σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με διάφορους μοριακούς μηχανισμούς της παθοφυσιολογίας του ΣΔ1. Δεν έγινε ανίχνευση του πεπτιδίου C, σε κανένα από τα δείγματα.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα έδειξαν διαφορές στο πρωτεομικό προφίλ των τριχών των κοριτσιών με ΣΔ1 σε σύγκριση με τα υγιή κορίτσια. Η μελέτη επιβεβαιώνει ότι η αυτοανοσία ξεκινάει τουλάχιστον 6 μήνες πριν την εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων.

# ABSTRACT

**INTRODUCTION-PURPOSE:** Studies have shown that autoimmunity in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) begins long before the onset of clinical manifestations. Human hair grows approximately 1 cm per month. During hair growth, various endogenous molecules are incorporated, resulting in a hair sample that can provide a protein profile reflecting exposure over months. The purpose of the present study is to identify the proteomic profile in 1 cm hair samples in girls with newly diagnosed T1DM, as well as the detection of C-peptide in non-diabetic individuals.

**MATERIAL-METHODS:** Thirty-two girls with newly diagnosed T1DM and thirty healthy girls were recruited, with clinical and laboratory data recorded. Hair samples were collected from the posterior vertex of the scalp using scissors as close to the root as possible, and the first 6 cm of hair was cut off in 1 cm segments from each girl. Hair proteins per centimeter were isolated in a pilot study for 36 samples from 3 girls with T1DM and 3 healthy girls. Their digestion was performed according to the Sp3 protocol. Peptides were separated by high-performance liquid chromatography coupled with a Q Exactive HF-X mass spectrometer for their identification and quantification using the DIANN software. Statistical and bioinformatic analysis of the data was performed using Perseus and Metascape software.

**RESULTS:** A total of 1799 proteins were identified from the 36 samples, of which 346 proteins were statistically significant. In all 1 cm length samples, patients with T1DM showed different expression in keratin proteins, the immunoglobulin family (IGKC, IGHA1, IGHG1-3), the coxsackie and adenovirus receptor (CXADR), as well as proteins related to various molecular mechanisms of the pathophysiology of T1DM. C-peptide was not detected in any of the samples.

**CONCLUSIONS:** Preliminary results showed differences in the proteomic profile of hair from girls with T1DM compared to healthy girls. The study confirms that autoimmunity begins at least 6 months before the onset of clinical manifestations

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ABBREVIATIONS

DTT	Dithiothreitol	διθειοθρεϊτόλη
IAA	Iodoacetamide	ιοντοακεταμίδιο
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
FASP	Filter-Aided Sample Preparation	Προετοιμασία δείγματος με τη βοήθεια φίλτρου
ESI	Electrospray ionization	Ιονισμός ηλεκτροψεκασμού
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization	εκρόφηση/ιονισμός λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα
T1D	Type 1 Diabetes	Διαβήτης Τύπου 1
NPLC	Normal-phase liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης
IEC	Ion exchange chromatography	χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
SEC	Size-exclusion chromatography	χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους
RPLC	Reversed-Phase Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης
TOF	Time-of-flight	Χρόνος πτήσης
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας
UniProt	Universal Protein Resource	Παγκόσμιος πόρος Πρωτεϊνών
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας
RefSeq	Reference Sequence	Ακολουθία αναφοράς

Ensembl	Ensembl genome database project	Βάση δεδομένων γονιδιώματος
SILAC	Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture	Σήμανση σταθερού ισοτόπου με αμινοξέα σε κυτταρική καλλιέργεια
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantitation	Ισοβαρικές ετικέτες για σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση
TMT	tandem mass tag	Διαδοχική ετικέτα μάζας
DIA	data-independent acquisition	Ανεξάρτητη Απόκτηση Δεδομένων
DDA	Data Dependent Acquisition	Απόκτηση Δεδομένων Βάσει Εξαρτήσεων
UV	Ultraviolet	Υπεριώδης ακτινοβολία
CTS	connective tissue sheath	περίβλημα συνδετικού ιστού
ORS	outer root sheath	εξωτερικό περίβλημα της ρίζας
IRS	inner root sheath	εσωτερικό περίβλημα της ρίζας
18-MEA	18-Methyl Eicosanoic Acid	18-Μεθυλ-εικοσανοϊκό Οξύ
KIFs	keratin intermediate filaments	ενδιάμεσα νημάτια κερατίνης
CMC	cytoplasmic membrane complex	σύμπλεγμα κυτταρικής μεμβράνης
KAPs	keratin associated proteins	πρωτεΐνες που σχετίζονται με κερατίνη
HSPs	high sulfur proteins	πρωτεΐνες υψηλής περιεκτικότητας σε θείο



UHSPs	ultra high sulfur proteins	πρωτεΐνες υψηλού θείου	εξαιρετικά
HTPs	high tyrosine proteins	πρωτεΐνες περιεκτικότητας τυροσίνη	υψηλής σε
HGTPS	high	πρωτεΐνες περιεκτικότητας τυροσίνη και γλυκίνη	υψηλής σε
IP	immunologically privileged sites	ανοσολογικά προνομιούχες θέσεις	





## Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# Κεφάλαιο 1. Πρωτεομική ανάλυση

## 1.1 Ορισμός και πεδία εφαρμογής

Ως πρωτεομική, ορίζεται το διεπιστημονικό πεδίο έρευνας που εστιάζει στον χαρακτηρισμό ολόκληρου του πρωτεώματος μιας κυτταρικής γραμμής, ενός ιστού ή οργανισμού. Περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση όλων των πρωτεϊνών σε ένα δεδομένο δείγμα, προσφέροντας τη δυνατότητα, εκτεταμένης μελέτης των δομών, των λειτουργιών, καθώς και των διάφορων τροποποιήσεων που υφίστανται τα πρωτεϊνικά μόρια. Το πεδίο της πρωτεομικής επεκτείνεται στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών, στην αποσαφήνιση των δυναμικών ρόλων αυτών σε διάφορες κυτταρικές οδούς και στην ανάλυση των τρισδιάστατων δομών τους. Αυτό το εύρος μελέτης περιλαμβάνει επίσης, τη σύγκριση του προφίλ των πρωτεϊνών υπό διαφορετικές βιολογικές συνθήκες, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν παθολογικές καταστάσεις και αναπτυξιακές διαδικασίες. Η κλινική πρωτεομική, ένα υποπεδίο της πρωτεομικής, εφαρμόζει την αποκτηθείσα γνώση σε πρακτικές εφαρμογές όπως η ανακάλυψη βιοδεικτών, η διάγνωση και η εξατομικευμένη ιατρική.

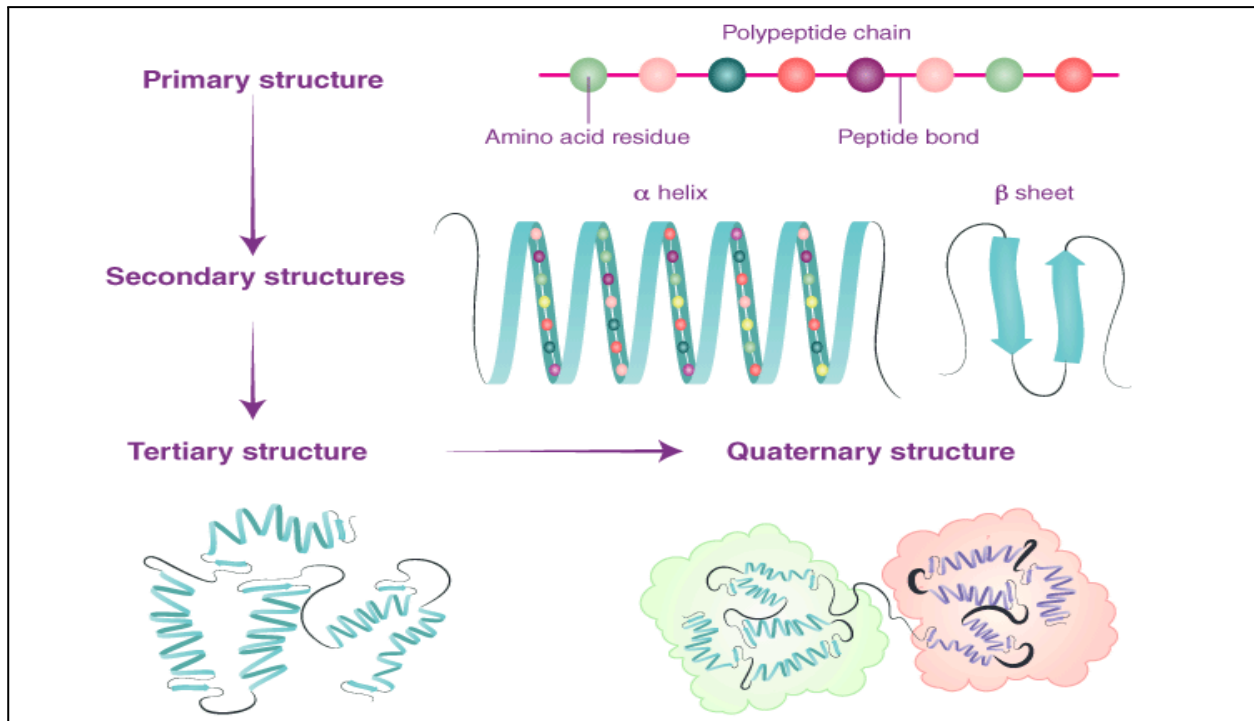
## 1.2 Βασικές αρχές πρωτεομικής

Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας χρησιμεύει ως το θεμελιώδες πλαίσιο για την κατανόηση της ροής της γενετικής πληροφορίας μέσα σε ένα βιολογικό σύστημα. Το DNA κωδικοποιεί τη γενετική πληροφορία, η οποία μεταγράφεται σε αγγελιοφόρο RNA (mRNA) κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Το mRNA στη συνέχεια λειτουργεί ως πρότυπο για τη διαδικασία της μετάφρασης, όπου οι πρωτεΐνες συντίθενται μέσω της συναρμολόγησης αμινοξέων. Οι πρωτεΐνες, ως τελικά προϊόντα αυτής της διαδοχικής ροής πληροφοριών, καθορίζουν τη κυτταρική δομή και λειτουργία.

Το πρωτεώμα είναι δυναμικό και αντανακλά το άμεσο περιβάλλον του κυτάρου. Σε απόκριση σε εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα, οι πρωτεΐνες μπορούν να συντεθούν ή να αποικοδομηθούν, να υποστούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ή μετατοπίσεις εντός του κυτάρου. Κατά συνέπεια, η μελέτη του πρωτεώματος ενός κυτάρου είναι παρόμοια με τη λήψη ενός «στιγμιότυπου» του περιβάλλοντος των πρωτεϊνών σε μια συγκεκριμένη στιγμή. Δεδομένου αυτών των δυναμικών αλλαγών, ένα μεμονωμένο γονιδίωμα μπορεί ενδεχομένως να δημιουργήσει έναν άπειρο αριθμό πρωτεωμάτων.

Τα αμινοξέα, αποτελούν οργανικές ενώσεις με διακριτές δομές, που χρησιμεύουν ως τα βασικά δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων καθορίζουν την δομή και την ακριβή λειτουργία τους. Τα διάφορα είδη αμινοξέων, μπορούν να συνδέονται μεταξύ τους μέσω σχηματισμού πεπτιδικού ή αμιδικού δεσμού. Αυτός ο δεσμός σχηματίζεται μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας (-COOH) ενός αμινοξέος και της αμινομάδας (-NH<sub>2</sub>) ενός άλλου αμινοξέος, με την εξάλειψη ενός μορίου νερού.

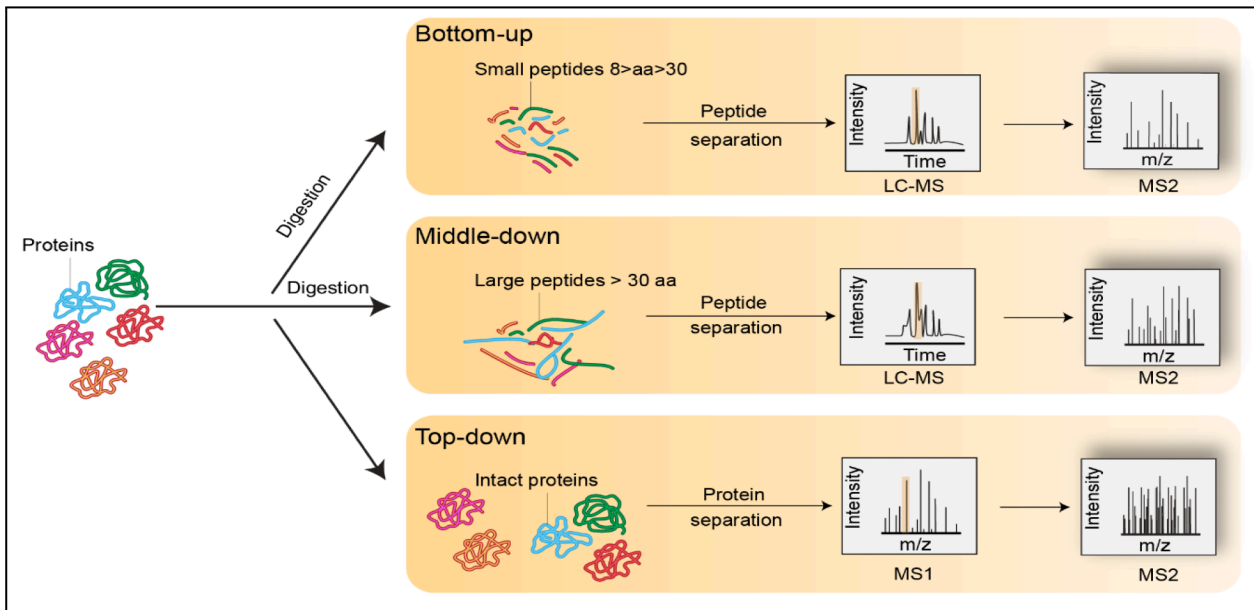
Έτσι προκύπτει η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης, η οποία αποτελείται από μια γραμμική αλληλουχία αμινοξέων που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς. Έπειτα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κοντινών αμινοξέων, οδηγούν σε αναδίπλωση της πρωτοταγούς δομής, σχηματίζοντας δομές που συμβάλλουν σημαντικά στη συνολική



**Εικόνα 1.** Βασική δομή πρωτεΐνης. (BYJU'S. Proteins: structure and functions)

σταθερότητα και το σχήμα της πρωτεΐνης. Οι πιο συχνά παρατηρούμενες δομές είναι η άλφα έλικα και η  $\beta$  - πτυχωτή επιφάνεια. Αυτές συνολικά συνιστούν τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης. Η τρισδιάστατη διάταξη ολόκληρης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας διαμορφώνεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων (-R) των αμινοξέων, τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, δισουλφιδικών γεφυρών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η τριτοταγής δομή, καθορίζει το συνολικό τρισδιάστατο σχήμα της πρωτεΐνης, και κατά συνέπεια, είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της. Σε πρωτεΐνες με πολλαπλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, εντοπίζεται και ένα ακόμη επίπεδο οργάνωσης, η τεταρτοταγής δομή, που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις αμινοξέων και σχηματισμό δεσμών μεταξύ των διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

### 1.3 Μεθοδολογίες πρωτεομικής ανάλυσης

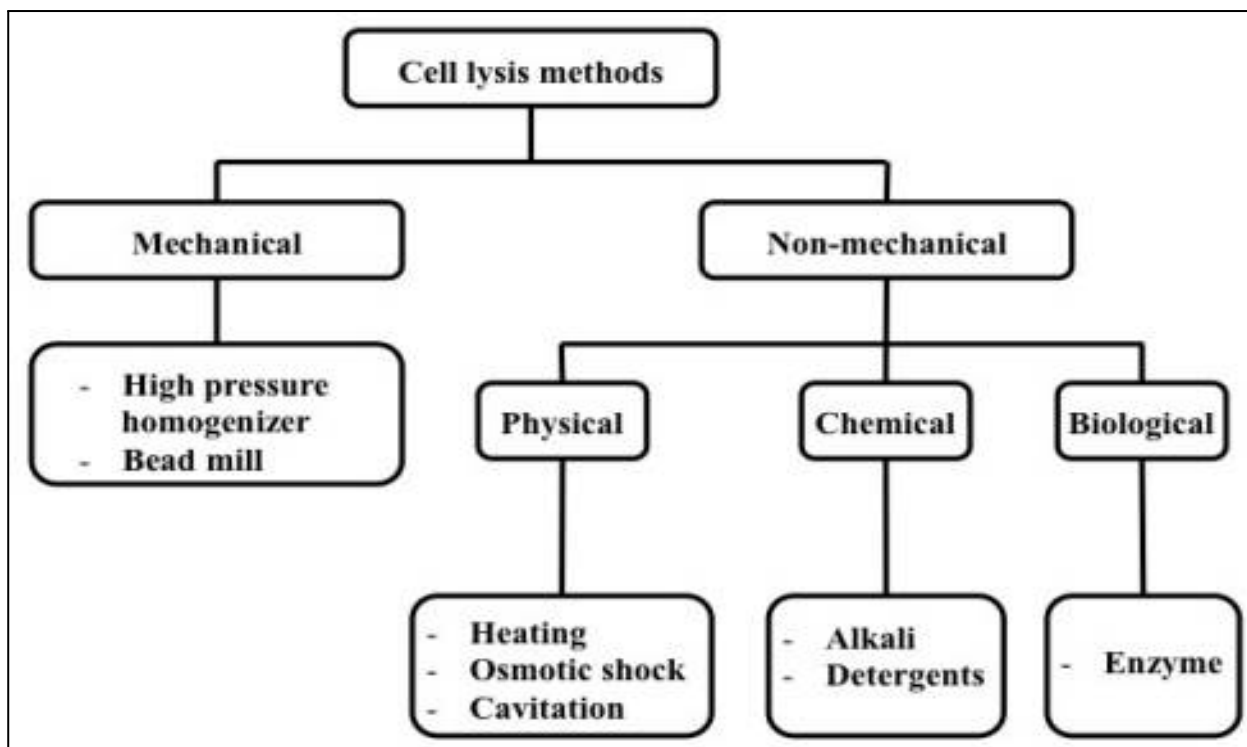


**Εικόνα 2.** Αναπαράσταση πειραμάτων φασματομετρίας μάζας bottom-up, middle-down, και top-down. (El Kennani, S.; Crespo, M.; Govin, J.; Pflieger, D. Proteomic Analysis of Histone Variants and Their PTMs: Strategies and Pitfalls. *Proteomes* **2018**, 6, 29.)

Η πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιεί δύο κύριες μεθοδολογίες, την top - down και την bottom - up. Στη top - down πρωτεομική ανάλυση, οι άθικτες πρωτεΐνες αναλύονται απευθείας, παρέχοντας μια ολοκληρωμένη εικόνα των πρωτεομορφών, συμπεριλαμβανομένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και δομικών παραλλαγών. Αντίθετα, η bottom - up ανάλυση, περιλαμβάνει την ενζυμική πέψη των πρωτεϊνών σε πεπτιδία πριν από την ανάλυση. Αυτή η μέθοδος, συχνά αποκαλείται ως shotgun proteomics, επιτρέπει την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση πεπτιδίων, προσφέροντας μια πιο ευρεία εικόνα του πρωτεώματος. Ενώ τα top-down proteomics υπερέχουν στην αποκάλυψη ανέπαφων μορφών πρωτεΐνης και δομικών λεπτομερειών, οι προσεγγίσεις bottom - up, παρέχουν τη δυνατότητα χειρισμού πολύπλοκων δειγμάτων, επιτρέποντας την αναγνώριση ενός ευρέος φάσματος πρωτεϊνών και καθιστώντας την ποσοτικοποίηση τους πιο εύκολη. Συμπερασματικά, η επιλογή μεταξύ αυτών των μεθόδων εξαρτάται από τους συγκεκριμένους στόχους της μελέτης, τη φύση του δείγματος και το επιθυμητό επίπεδο λεπτομέρειας σχετικά με τις μορφές και τις τροποποιήσεις των πρωτεϊνών.

### 1.4 Προετοιμασία πρωτεϊνών για ανάλυση με φασματομετρία μάζας

Η επιλογή των μεθόδων προετοιμασίας του δείγματος προς ανάλυση, εξαρτάται από παράγοντες, όπως η προέλευση, το μέγεθος και οι συγκεκριμένες τεχνικές μελέτης που θα εφαρμοστούν στη συνέχεια. Σε κάθε περίπτωση, η μέθοδος εκχύλισης που θα επιλεγεί είναι απαραίτητο να εμφανίζει αξιοπιστία και αναπαραγωγιμότητα.

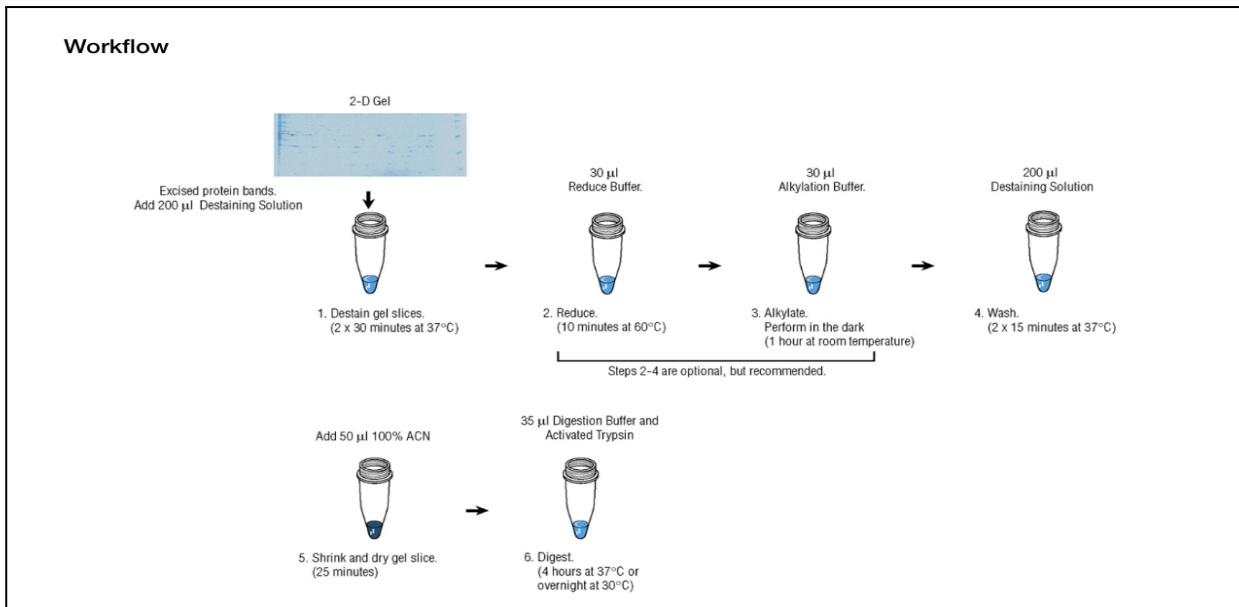


**Εικόνα 3.** Ταξινόμηση μεθόδων κυτταρικής λύσης. (Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* (Basel). 2017 Mar 8;8(3):83.

Ο πρωταρχικός στόχος είναι η λύση των κυττάρων, ώστε να απελευθερωθούν στο διάλυμα όλες οι υπάρχουσες πρωτεΐνες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω χημικής λύσης, η οποία χρησιμοποιεί απορρυπαντικά ή χαστροπικούς παράγοντες για να διαρρήξει τις κυτταρικές μεμβράνες, απελευθερώνοντας τις πρωτεΐνες στο διάλυμα. Ομοίως, η μηχανική διαταραχή καταστρέφει τη δομή των κυττάρων μέσω της χρήσης τεχνικών, όπως η υπερήχηση και η ομογενοποίηση.

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές για την απομόνωση και την προετοιμασία των πρωτεϊνών για επακόλουθη ανάλυση σε φασματογράφο μάζας. Κατά την τεχνική *in gel digestion*, οι πρωτεΐνες αρχικά υφίστανται διαχωρισμό σε γέλη πολυακρυλαμίδης, με βάση τις αρχές της ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, τα σημεία της γέλης, όπου έχουν μεταναστεύσει οι πρωτεΐνες, αποκόπτονται και τα πρωτεϊνικά μόρια αναμιγνύονται με DTT και αλκυλιωτικό παράγοντα (IAA), ώστε να διασπαστούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί και να αποφευχθεί ο επανασχηματισμός τους. Τα κομμάτια της γέλης επωάζονται στους 37°C με προσθήκη του ενζύμου θρυψίνη, το οποίο πέπτει τις πρωτεΐνες σε μικρότερα πεπτιδία. Ακολουθούν, βήματα καθαρισμού ώστε να απομακρυνθούν διάφορα συστατικά της γέλης και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της απομόνωσης. Τα πεπτιδία πλέον βρίσκονται ελεύθερα μέσα στο διάλυμα και μπορούν να προχωρήσουν για ανάλυση από τον φασματογράφο μάζας, χωρίς την ύπαρξη παρεμβαλλόμενων μορίων.

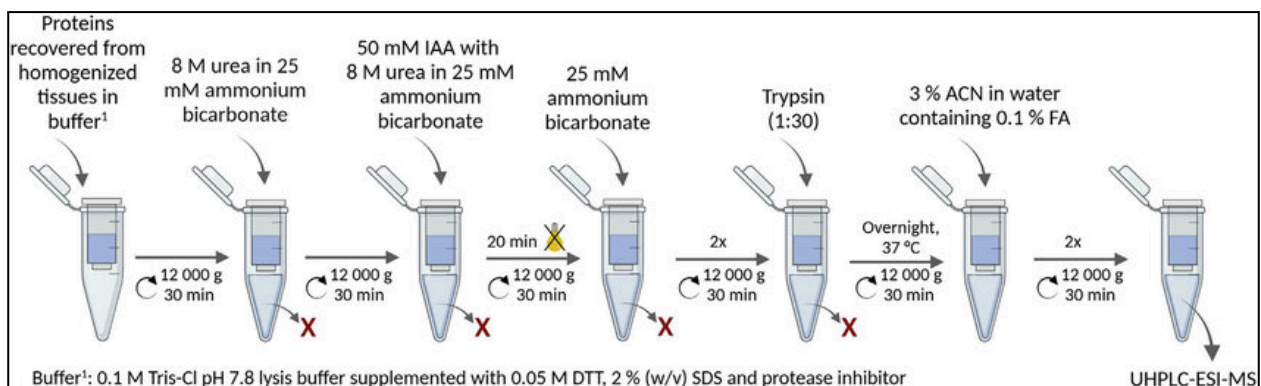




**Εικόνα 4.** Αναπαράσταση βημάτων στη μεθοδολογία in gel digestion. (Thermo Fisher Scientific. "Pierce™ In-Gel Tryptic Digestion Kit." Accessed [2024].)

Η προετοιμασία πρωτεϊνών in solution χρησιμοποιεί τις ίδιες αρχές με την in gel digestion, με τη διαφορά ότι στο αρχικό δείγμα πρέπει να πραγματοποιηθεί λύση του εκάστοτε υλικού (κύτταρα ή ιστός), ώστε οι πρωτεΐνες να εισέλθουν στο διαλυμα, με μια απο τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν. Συγκριτικά, με την in gel digestion προσφέρει καλύτερη ανάκτηση πεπτιδίων, καθώς αποφεύγονται πολλαπλά βήματα χειρισμού. Ωστόσο και οι δύο μέθοδοι συχνά εμπίπτουν σε σφάλματα όσον αφορά την πέψη των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα μη ακριβή φάσματα μάζας στο τέλος της ανάλυσης.

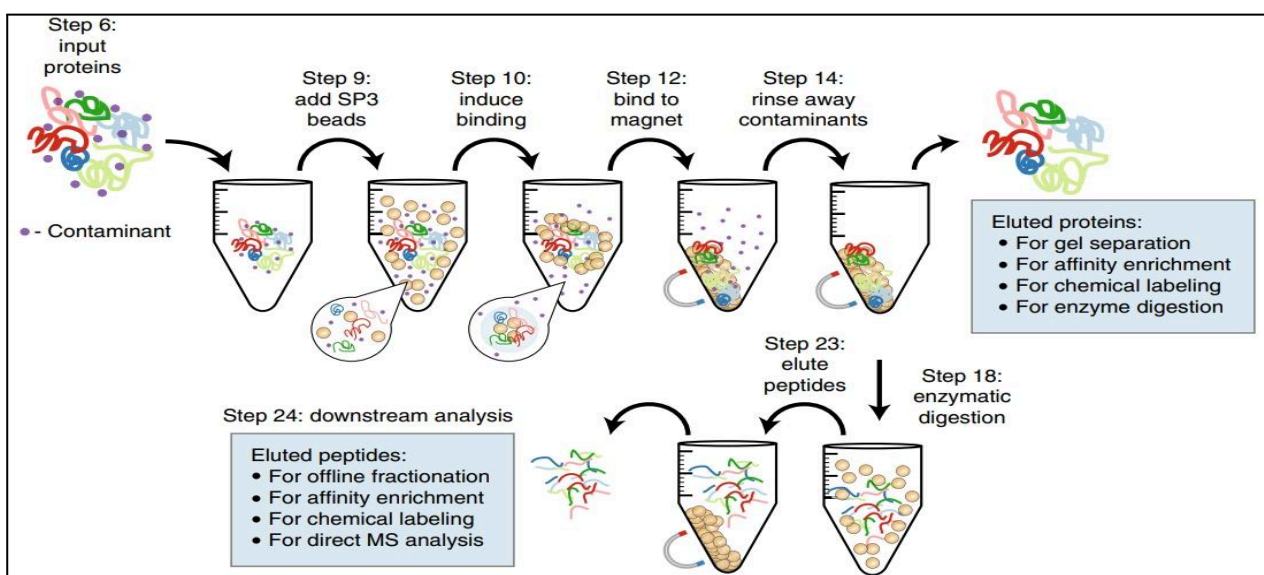
Η μέθοδος FASP, εφαρμόζεται σε μια φυγοκεντρική συσκευή φίλτρου επιτρέποντας σε μικρά μόρια και προσμίξεις να περάσουν, ενώ συγκρατεί τις πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες καθώς συγκρατούνται στο ειδικό φίλτρο, υφίστανται αλκυλίωση, καθαρισμό απο χρονοτροπικούς παράγοντες και τελικά πέψη εντός της μονάδας φίλτρου. Τα προκύπτοντα πεπτιδία συλλέγονται με φυγοκέντρηση, με



**Εικόνα 5.** Προετοιμασία δείγματος με τη βοήθεια φίλτρου.(Catia F. Marques et.al. "Optimized Protocol for Obtaining and Characterizing Primary Neuron-Enriched Cultures from Embryonic Chicken Brains."STAR Protocols, vol. 3, no. 4, 2022, p. 101753)

πρόσθετα βήματα πλύσης για μεγιστοποίηση της ανάκτησης και στη συνέχεια είναι έτοιμα για ανάλυση φασματομετρίας μάζας. Συνολικά, η FASP προσφέρει βελτιωμένη απόδοση πέψης, αποτελεσματική αφαίρεση ρύπων, υψηλή απόδοση και αναπαραγωγιμότητα πεπτιδίων.

Το πρωτόκολλο SP3 (Single-Pot, Solid-Phase-enhanced Sample Preparation) συνδυάζει πολλά βήματα προετοιμασίας δείγματος σε ένα ενιαίο πρωτόκολλο, εξαλείφοντας την ανάγκη για πολλαπλά βήματα χειρισμού, μειώνοντας τον κίνδυνο απώλειας ή επιμόλυνσης του δείγματος. Αξιοποιεί παραμαγνητικά σφαιρίδια για την δέσμευση πρωτεϊνών, επιτρέποντας μια πιο απλή και αναπαραγωγίμη ροή εργασίας. Διακρίνεται από τις εναλλακτικές μεθόδους, καθώς προσφέρει συμβατότητα με μια ποικιλία οργανικών διαλυτών. Αξίζει να σημειωθεί, πως η μέθοδος έχει σχεδιαστεί για να λειτουργεί αποτελεσματικά ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο δείγμα.

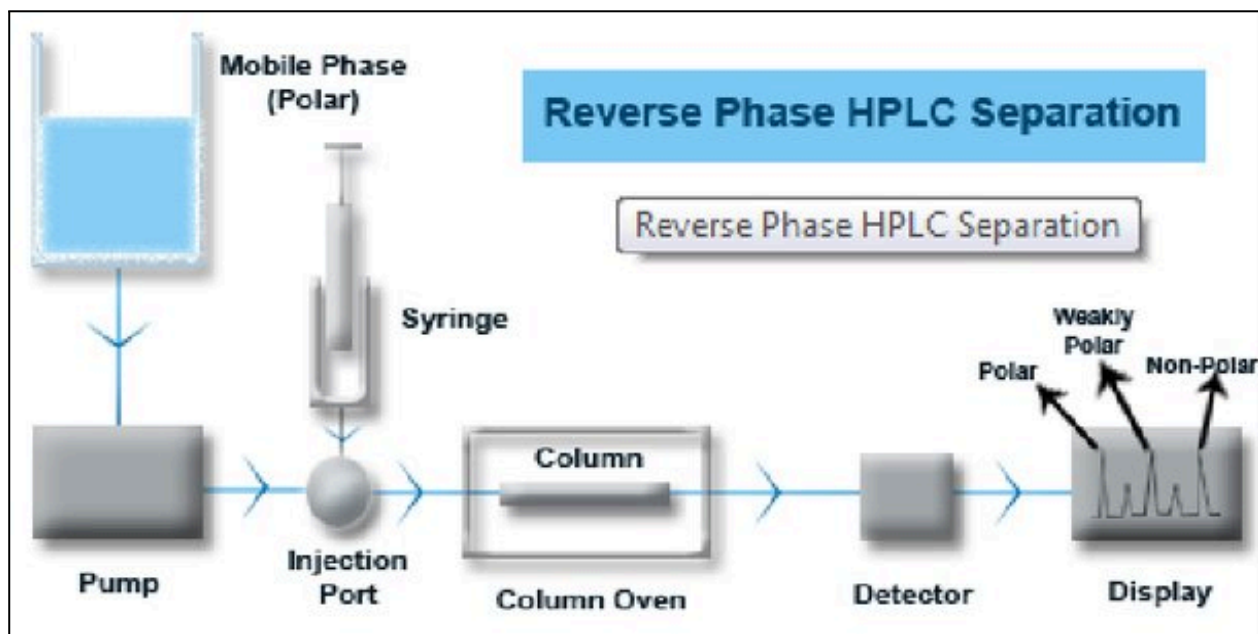


**Εικόνα 6.** Απομόνωση πεπτιδίων με τη μέθοδο των μαγνητικών σφαιριδίων. (Hughes, C.S., Moggridge, S., Müller, T. *et al.* Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc* 14, 2019 68–85.)

## 1.5 Υγρή χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία (LC) συνιστά ένα ισχυρό εργαλείο στην πρωτεομική ανάλυση, διευκολύνοντας τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών και πεπτιδίων μέσα σε πολύπλοκα δείγματα. Η αρχή διαχωρισμού βασίζεται στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως το μέγεθος, το φορτίο, η υδροφοβικότητα και η συγγένεια. Οι πρωτεΐνες, διαχωρίζονται με βάση τις αλληλεπιδράσεις τους με μια στατική φάση (στήλη) και μια κινητή φάση (διαλύτης). Η στήλη διαθέτει ένα υλικό που αλληλεπιδρά διαφορετικά με κάθε πεπτίδιο, επιτρέποντας τον διαχωρισμό τους. Ένας υγρός διαλύτης (κινητή φάση) αντλείται μέσω της στήλης, μεταφέροντας τα πεπτίδια και

διευκολύνοντας την έκλουσή τους με βάση τη συγγένειά τους για τη στατική φάση. Αυτά που εκλούνται σε μικρότερο χρόνο, εκφράζουν μικρότερη συγγένεια με την στατική φάση σε αντίθεση με εκείνα που εξάγονται από την στήλη σε μεγαλύτερο χρόνο.



**Εικόνα 7.** Σύστημα HPLC αντίστροφης φάσης όπου απεικονίζεται η αντλία, η θύρα έγχυσης, η στήλη, ο ανιχνευτής και ένα σύστημα ανάγνωσης (οθόνη). (Romanus Abia Development and validation of a novel method for serotonin and 5-hydroxyindole-acetic acid determination in plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry, thes 2014 May)

Υπάρχουν διάφοροι τύποι υγρής χρωματογραφίας. Η πιο κοινή είναι η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPLC), όπου η στατική φάση είναι πιο υδρόφοβη από την κινητή φάση, οδηγώντας στη συγκράτηση και τον διαχωρισμό των αναλυτών με βάση τα υδρόφοβα χαρακτηριστικά τους. Η στατική φάση τυπικά αποτελείται από υδρόφοβες αλκυλικές αλυσίδες προσαρτημένες στο υλικό υποστήριξης, όπως το C18. Το υδρόφοβο περιβάλλον διευκολύνει την κατακράτηση υδρόφοβων μορίων. Η κινητή φάση είναι συνήθως ένα μείγμα νερού και ενός οργανικού διαλύτη, όπως ακετονιτριλίου ή μεθανόλης. Η αναλογία του οργανικού διαλύτη αυξάνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας διαχωρισμού. Τα υδρόφοβα μόρια αλληλεπιδρούν πιο έντονα με την υδρόφοβη στατική φάση, με αποτέλεσμα πιο αργή έκλυση. Τα υδρόφιλα μόρια, όντας λιγότερο αλληλεπιδραστικά με τη στατική φάση, εκλούνται πιο γρήγορα.

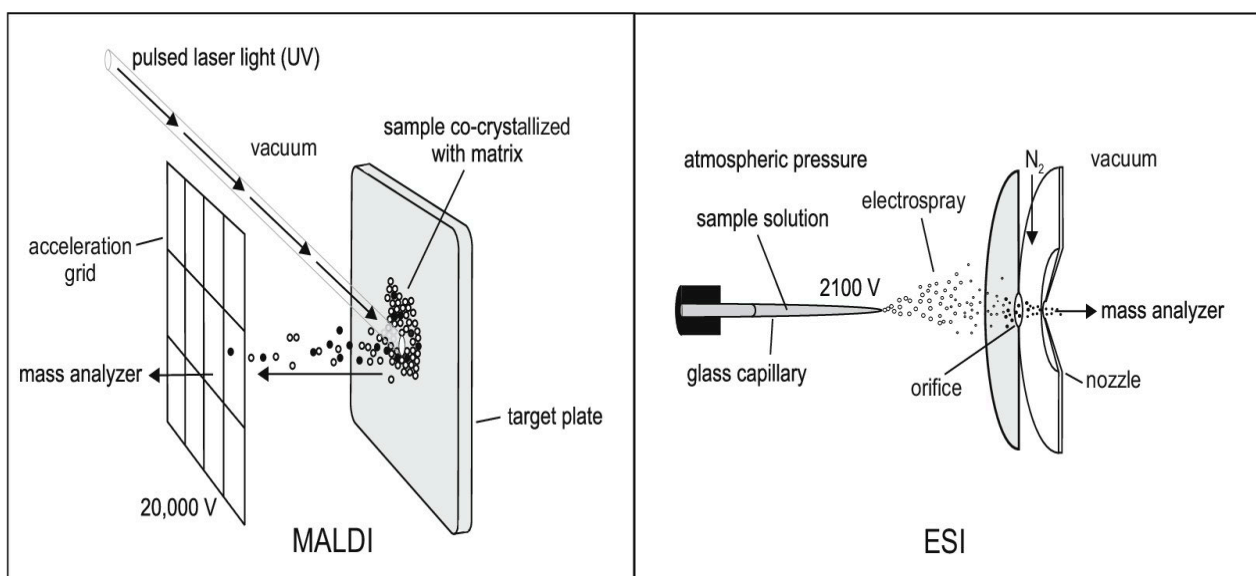
Άλλοι τύποι υγρής χρωματογραφίας, περιλαμβάνουν, υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης (NPLC), χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC), χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) και σύζευξη υγρής χρωματογραφίας -φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Στην (NPLC) η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή, η οποία είναι συνήθως ένας μη πολικός οργανικός διαλύτης όπως το εξάνιο και ο διαχωρισμός βασίζεται στη πολικότητα των ενώσεων. Στην (IEC), η στατική φάση αποτελείται από μια ρητίνη με φορτισμένες λειτουργικές ομάδες, είτε θετικά (κατιονανταλλαγή CEC) είτε αρνητικά (ανταλλαγή ανιόντων AEC), ενώ η κινητή φάση είναι ένα διάλυμα ηλεκτρολύτη

που μεταφέρει το δείγμα μέσω της στήλης. Στη (CEC), η στατική φάση είναι αρνητικά φορτισμένη, προσελκύοντας και διατηρώντας θετικά φορτισμένα μόρια, σε αντίθεση με την (AEC), όπου η στατική φάση είναι θετικά φορτισμένη, συγκρατώντας αρνητικά φορτισμένα μόρια. Τέλος, στη (SEC), η στατική φάση αποτελείται από πορώδη σφαιρίδια με μια σειρά μεγεθών πόρων, ενώ η κινητή φάση είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα ή ένας διαλύτης. Τα μεγαλύτερα μόρια, που δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους της στατικής φάσης, έχουν ταχύτερο ρυθμό ροής μέσω της στήλης και εκλούνται πρώτα, ενώ τα μικρότερα μόρια, ικανά να εισέλθουν στους πόρους, έχουν πιο αργό ρυθμό ροής και ουσιαστικά εκφράζουν μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης.

## 1.6 Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που επιτρέπει την αναγνώριση, τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των μορίων με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Δύο κοινές μέθοδοι ιονισμού στη φασματομετρία μάζας είναι η φασματομετρία μάζας με μηχανισμό ιονισμού εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενου από μήτρα (MALDI) και ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI).

Η τεχνική (MALDI), χρησιμοποιείται στη φασματομετρία μάζας για την ανάλυση μεγάλων βιομορίων όπως πρωτεΐνες και πεπτιδία. Η βασική αρχή περιλαμβάνει την ενσωμάτωση των μορίων της αναλυόμενης ουσίας σε μια κρυσταλλική μήτρα, η οποία στη συνέχεια ακτινοβολείται με λέιζερ. Η απορροφούμενη ενέργεια λέιζερ προκαλεί την εξάτμιση της μήτρας, δημιουργώντας ιόντα αέριας φάσης από τις ενσωματωμένες αναλυόμενες ουσίες. Η επιλογή της μήτρας είναι σημαντική και πρέπει να γίνεται προσεκτικά, καθώς είναι απαραίτητο να αποφεύγεται οποιαδήποτε παρεμβολή αυτής στο δείγμα προς ανάλυση, που μπορεί να περιπλέξει το φάσμα μάζας. Η μέθοδος MALDI είναι πιο



**Εικόνα 8.** Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων ιονισμού MALDI και ESI. (Sven Schuchardt et.al. Protein identification using mass spectrometry: A method overview, **2007**, Feb)

αποτελεσματική για στερεά ή ημιστερεά δείγματα και δεν συνίσταται για απευθείας ανάλυση υγρών.

Ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI), περιλαμβάνει τη δημιουργία φορτισμένων σταγονιδίων από ένα υγρό δείγμα, τα οποία στη συνέχεια υφίστανται διάλυση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιόντων αέριας φάσης. Το υγρό δείγμα εισάγεται στο φασματογράφο μάζας μέσω ενός τριχοειδούς, νεφελοποιημένο σε λεπτά σταγονίδια. Στη συνέχεια τα σταγονίδια φορτίζονται μέσω της εφαρμογής υψηλής τάσης, που οδηγεί στο σχηματισμό φορτισμένων σταγονιδίων αερολύματος. Καθώς τα φορτισμένα σταγονίδια κινούνται προς την είσοδο του φασματογράφου μάζας, πραγματοποιείται η εξάτμιση του διαλύτη, δημιουργώντας φορτισμένα ιόντα της αναλυόμενης ουσίας. Έπειτα, τα ιόντα, κατευθύνονται στο φασματογράφο για ανάλυση με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Η μέθοδος ESI είναι κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα αναλυτών, συμπεριλαμβανομένων πολικών και μη πολικών ενώσεων. Είναι αποτελεσματική για την ανάλυση υγρών δειγμάτων, καθιστώντας τη κατάλληλη για εφαρμογές υγρής χρωματογραφίας (LC-ESI-MS). Επιπρόσθετα, παρέχει υψηλή ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση ενώσεων χαμηλής συγκέντρωσης. Ωστόσο, για την επιτυχή ανάλυση απαιτείται προσεκτική προετοιμασία του δείγματος, για την αποφυγή αλάτων και προσμίξεων, που ενδέχεται να αποφράζουν τα πολύ λεπτά τριχοειδή και να μειώσουν σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου.

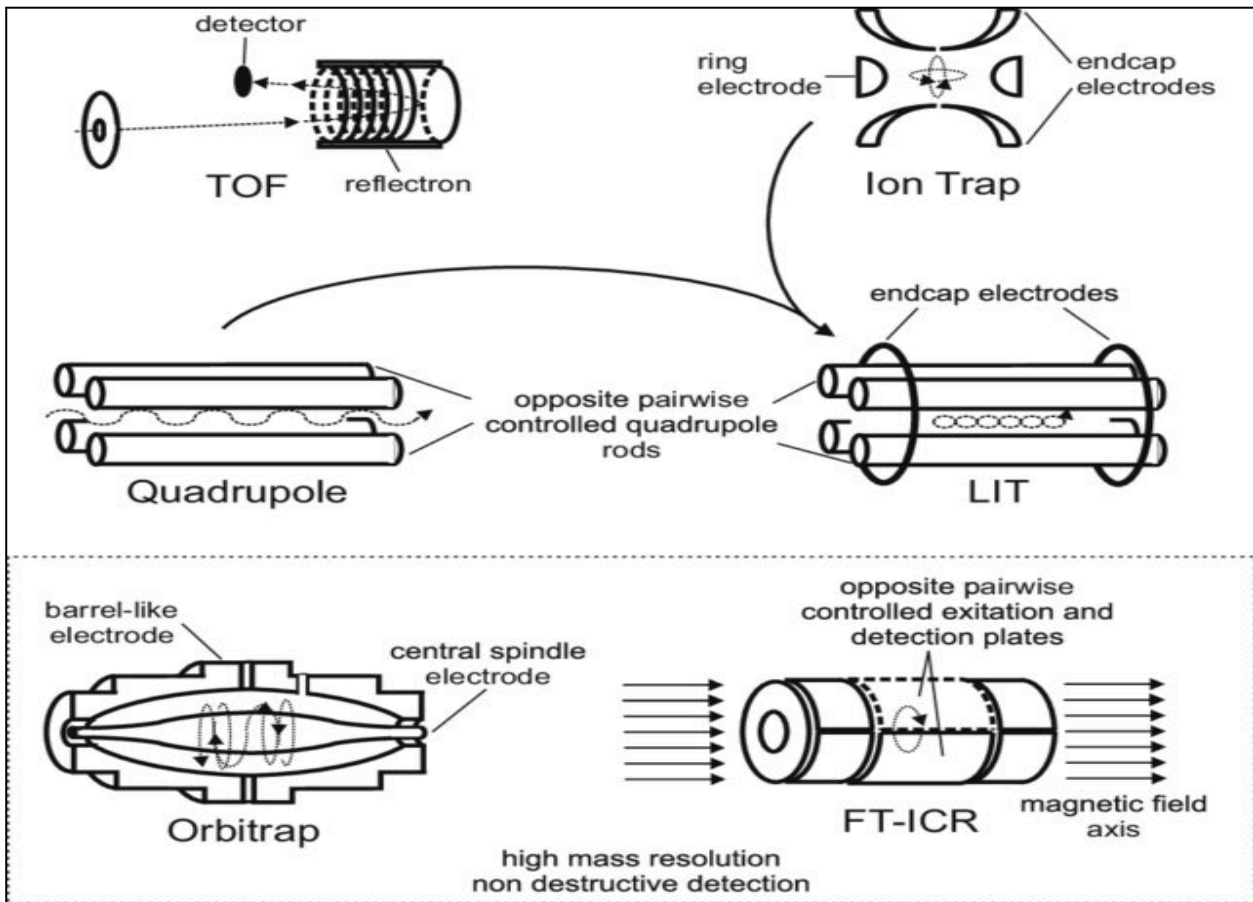
Το όργανο στο οποίο λαμβάνει χώρα η φασματομετρία μάζας, ονομάζεται φασματογράφος μάζας. Κάθε φασματογράφος, διαθέτει την δική του αρχιτεκτονική και τρόπο μέτρησης των ιόντων προς ανάλυση. Έτσι, διακρίνονται τρεις διαφορετικές αρχές λειτουργίας, αυτή του χρόνου πτήσης (TOF), της παγίδας ιόντων (Ion Trap) και της παγίδας τροχιάς (Orbitrap).

Η διαδικασία (TOF), ξεκινά με την εισαγωγή ιόντων στον αναλυτή μάζας μέσω των προαναφερθέντων μεθόδων MALDI ή ESI. Έπειτα, τα ιόντα επιταχύνονται με τη χρήση ηλεκτρικού πεδίου. Τα ιόντα ταξιδεύουν μέσω ενός σωλήνα πτήσης γεμάτο με κενό. Ο σωλήνας είναι σχεδιασμένος, ώστε να εξασφαλίζει ομοιόμορφη διαδρομή για ιόντα διαφορετικών μαζών, επιτρέποντάς τους να φτάσουν στον ανιχνευτή στο τέλος αυτού. Ο χρόνος πτήσης των ιόντων μετράται με ακρίβεια. Τα ελαφρύτερα ιόντα ταξιδεύουν γρηγορότερα και φτάνουν νωρίτερα στον ανιχνευτή, ενώ τα βαρύτερα ιόντα χρειάζονται περισσότερο χρόνο. Οι πληροφορίες του χρόνου πτήσης χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τον υπολογισμό του λόγου μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) των ιόντων.

Η παγίδα ιόντων (Ion Trap), παγιδεύει και ελέγχει ιόντα χρησιμοποιώντας ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία σε έναν τρισδιάστατο χώρο. Τα ιόντα περιορίζονται μέσα στην παγίδα και η συμπεριφορά τους καθορίζεται ρυθμίζοντας τα δυναμικά των ηλεκτροδίων της παγίδας. Η τάση εφαρμόζεται για να προκαλέσει ελεγχόμενες ταλαντώσεις των παγιδευμένων ιόντων. Ρυθμίζοντας τη τάση συγκεκριμένα ιόντα μπορούν να εκτιναχθούν επιλεκτικά για ανάλυση. Οι παγίδες ιόντων είναι ικανές να εκτελούν πολλαπλά στάδια φασματομετρίας μάζας (MS/MS), επιτρέποντας περαιτέρω



κατακερματισμό και λεπτομερή δομική ανάλυση. Στη συνέχεια ανιχνεύονται τα ιόντα που εκτινάσσονται και προσδιορίζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο. Στα αρνητικά του Ion



**Εικόνα 9.** Σχηματοποιημένοι τύποι αναλυτών μάζας. (Sven Schuchardt et.al. Protein identification using mass spectrometry: A method overview, 2007, Feb)

Trap, συγκαταλέγονται, οι χαμηλότερες ταχύτητες σάρωσης και η περιορισμένη χωρητικότητα αποθήκευσης ιόντων, παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητά για αναλύσεις υψηλής απόδοσης καθώς και την ευαισθησία σε σύνθετα δείγματα.

Οι φασματογράφοι τροχιάς (Orbitrap), αξιοποιούν την παγίδευση και την ταλάντωση των ιόντων σε ένα ηλεκτροστατικό πεδίο. Τα ιόντα όταν εισάγονται στον φασματογραφο, εγκλωβίζονται σε ένα κεντρικό ηλεκτροστατικό πεδίο που δημιουργείται μεταξύ του εξωτερικού κυλίνδρου και μιας κεντρικής ατράκτου και υποβάλλονται σε τροχιά γύρω από την κεντρική άτρακτο. Η ταλάντωση των ιόντων στις τροχιές τους επηρεάζεται από την αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Καθώς τα ιόντα περιφέρονται σε τροχιά, οι συχνότητές τους ανιχνεύονται από ένα σύνολο ηλεκτροδίων που περιβάλλουν την κεντρική άτρακτο. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier, για την μετατροπή της συχνότητας σε φάσμα μάζας.

Η σύζευξη υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (LC-MS), είναι μια ισχυρή υβριδική αναλυτική τεχνική, που προσφέρει βελτιωμένη ευαισθησία και ειδικότητα Ο

τύπος LC που επιλέγεται πραγματοποιείται, όπως προαναφέρθηκε, αλλά μετά τον διαχωρισμό, οι ενώσεις εισάγονται στον φασματογράφο μάζας για ιονισμό. Ο φασματογράφος μετρά την αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) των ιόντων, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με το μοριακό βάρος και τη δομή των πεπτιδίων προς ανάλυση. Το LC-MS χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών στην bottom - up πρωτεομική ανάλυση.

## 1.7 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Τα φάσματα μάζας που προκύπτουν αντιστοιχίζονται με μια βάση δεδομένων, η οποία περιέχει αλληλουχίες πρωτεϊνών που προέρχονται από τον υπό μελέτη οργανισμό ή από σχετικό οργανισμό αναφοράς. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες βάσεις δεδομένων περιλαμβάνουν τις UniProt, NCBI, RefSeq και Ensembl. Οι αλγόριθμοι αναζήτησης, συγκρίνουν τα πειραματικά φάσματα μάζας με τα θεωρητικά που παράγονται από αλληλουχίες πρωτεϊνών στη βάση δεδομένων, λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως η ακρίβεια της μάζας των πεπτιδίων, τα πρότυπα κατακερματισμού και η παρουσία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ο στόχος είναι να εντοπιστούν πεπτίδια που ταιριάζουν καλύτερα με τα πειραματικά δεδομένα. Κάθε ταυτοποιημένο φάσμα παρέχει στοιχεία για την παρουσία ενός συγκεκριμένου πεπτιδίου στο δείγμα. Τα αναγνωρισμένα πεπτίδια ομαδοποιούνται σε πρωτεϊνικές ομάδες με βάση τις κοινές πεπτιδικές αλληλουχίες. Οι αλγόριθμοι συναρμολογούν πρωτεϊνικές ομάδες λαμβάνοντας υπόψη όλα τα πεπτίδια που χαρτογραφούνται σε κάθε πρωτεΐνη. Πεπτίδια μοναδικά σε μία πρωτεΐνη παρέχουν ισχυρές ενδείξεις για την παρουσία της, ενώ τα πεπτίδια που μοιράζονται μεταξύ πολλών πρωτεϊνών απαιτούν προσεκτική εξέταση για την αποφυγή ψευδώς θετικών ταυτοποιήσεων. Για την αποφυγή αυτών μπορούν να εφαρμοστούν πρόσθετα βήματα φιλτραρίσματος για την αφαίρεση ταυτοποιήσεων χαμηλής εμπιστοσύνης, όπως πρωτεΐνες που υποστηρίζονται από λίγα μόνο πεπτίδια.

Υπάρχουν πολλές προσεγγίσεις για την εφαρμογή ποσοτικής πρωτεομικής. Η ποσοτική πρωτεομική βασισμένη σε ετικέτες (Label based quantitative proteomics), χρησιμοποιεί ισότοπα μόρια, με στόχο τη σήμανση των πεπτιδίων. Παραδείγματα περιλαμβάνουν σήμανση σταθερού ισότοπου με αμινοξέα σε κυτταροκαλλιέργεια (SILAC), ισοβαρικές ετικέτες για σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση (iTRAQ) και ετικέτες μάζας σε σειρά (TMT). Αυτές οι σημάνσεις επιτρέπουν την ακριβή ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών συγκρίνοντας τις εντάσεις των επισημασμένων πεπτιδίων σε φάσματα φασματομετρίας μάζας (MS). Αντιθέτως, η ποσοτική πρωτεομική χωρίς ετικέτες (Label free quantitative proteomics), δεν απαιτεί χημική επισήμανση των πρωτεϊνών. Βασίζεται, στη σύγκριση της αφθονίας των πεπτιδίων ή των φασματικών μετρήσεων σε διαφορετικά δείγματα. Τέλος, η μέθοδος DIA (Data Independent Acquisition), συλλέγει φάσματα κατακερματισμού για όλα τα πρόδρομα ιόντα μέσα σε προκαθορισμένα παράθυρα αναλογίας μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ), αντί να επιλέγει συγκεκριμένα ιόντα για κατακερματισμό όπως στην εξαρτώμενη από δεδομένα λήψη (Data Dependent Acquisition). Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση όλων των

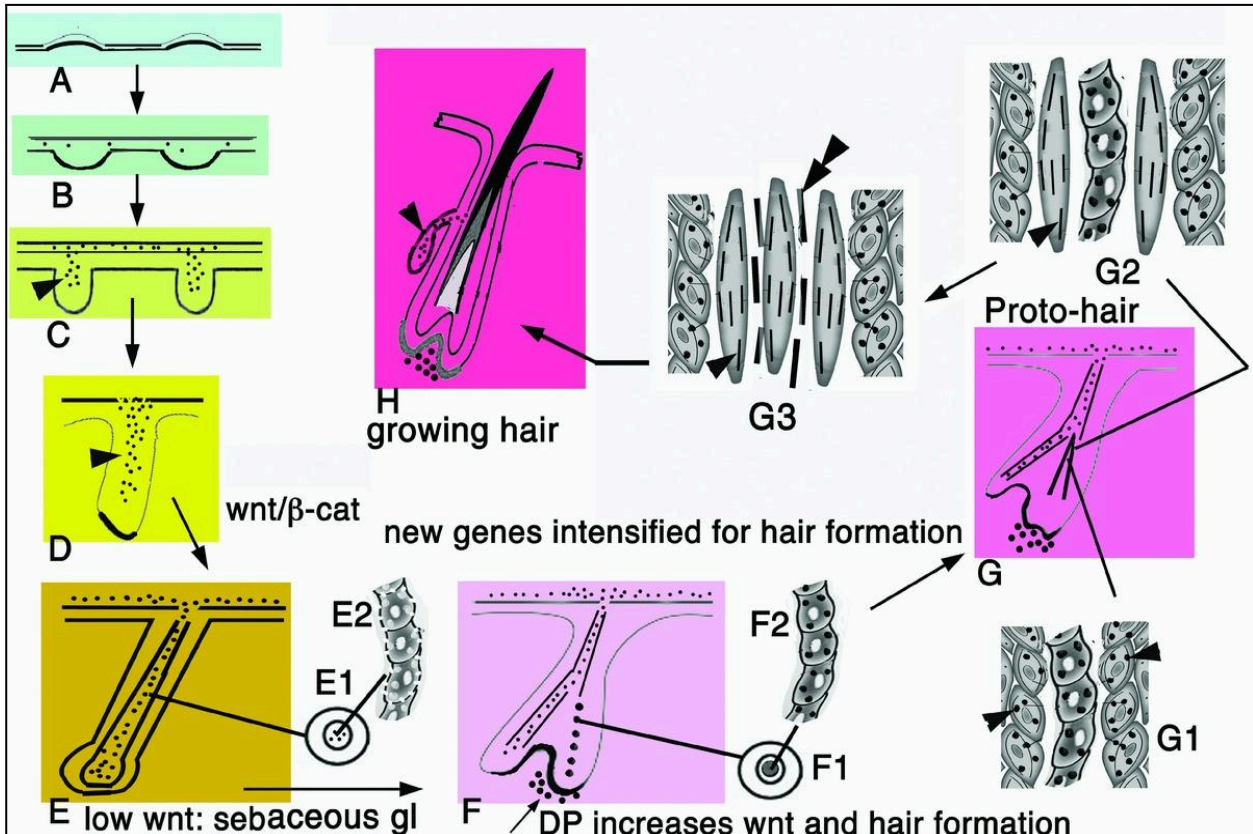
ανιχνεύσιμων πεπτιδίων σε ένα δείγμα, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη ακρίβεια ποσοτικού προσδιορισμού.

## Κεφάλαιο 2. Φυσιολογία της τρίχας

### 2.1 Προέλευση και εξελικτικοί μηχανισμοί

Η τρίχα, αποτελεί νηματοειδές βιοϋλικό που προέρχεται από τριχοθυλάκια του δέρματος και αποτελείται κυρίως από την πρωτεΐνη κερατίνη. Δομικά, αναδύεται από την επιφάνεια του δέρματος με μια σύνθεση τριών στρωμάτων: το εξωτερικό στρώμα, που καλείται επιδερμίδα, ακολουθούμενο από ένα ενδιάμεσο στρώμα, τον φλοιό και το μυελό που αποτελεί το εσωτερικό στρώμα.

Η εξέλιξη της τρίχας είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει γενετικούς, αναπτυξιακούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μέχρι σήμερα, δύο είναι οι κυρίαρχες θεωρίες για το πως προέκυψε εξελικτικά η εμφάνιση της τρίχας, ως ανατομική δομή. Η πρώτη, προτείνει ότι η τρίχα έχει εξελιχθεί από δομές που υπήρχαν στα συναψιδωτά, πρώιμα ερπετά που μοιάζουν με θηλαστικά, τα οποία πιθανώς διέθεταν εξειδικευμένα εξαρτήματα δέρματος στο περίβλημά τους, που μετασχηματίστηκαν σε τρίχα με την πάροδο του χρόνου.



**Εικόνα 10.** Σχηματική αναπαράσταση της υποθετικής εξέλιξης των τριχών από αδενικές δομές. (Dhouailly, D. "A new scenario for the evolutionary origin of hair, feather, and avian scales" 2009)



Η δεύτερη υποστηρίζει ότι η τρίχα εξελίχθηκε από αδενικές δομές, που ονομάζονται αδενικοί γόμφοι και παρήγαγαν μια βλεννώδη-λιπιδική έκκριση, η οποία ίσως συνέβαλε στη θερμορύθμιση. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, οι δομές αυτές άρχισαν να διευρύνονται καταλήγοντας στο διαχωρισμό του αδενικού γόμφου σε δύο μικρότερους. Ο πρώτος διατήρησε την εκκριτική δραστηριότητα, ενώ ο δεύτερος συνδέθηκε με δερματικούς ινοβλάστες. Αυτή η αλληλεπίδραση προτείνεται ότι προκάλεσε αυξημένη τοπική συγκέντρωση μορίων σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένης της βήτα-κατενίνης μέσω της οδού Wnt. Τα αυξημένα επίπεδα βήτα-κατενίνης έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των τριχοθυλακίων. Αντιθέτως όταν η δραστηριότητα της βήτα-κατενίνης μειώνεται ή αναστέλλεται, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη «γυμνού δέρματος», δηλαδή δέρματος που δεν έχει εξαρτήματα, όπως τρίχες και ιδρωτοποιούς αδένες. Κατά συνέπεια, πιθανώς ενεργοποιήθηκαν κερατογονικά γονίδια, με αποτέλεσμα η κερατινοποίηση να διεγερθεί περισσότερο από την παραγωγή λιπιδίων, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός κεντρικού αυλού (πρώιμος μυελός) συσσωρευμένων κυττάρων, που τελικά συγχωνεύθηκε με τον σημηματογενή αδενικό γόμφο. Περαιτέρω μεταπλαστικές διεργασίες διευκόλυναν την ανάπτυξη πρόσθετων κυκλικών στρωμάτων κερατινοκυττάρων, που περιείχαν εξειδικευμένες σκληρές κερατίνες και άλλες πρωτεΐνες, όπως τριχοϋαλίνη. Αυτός ο τύπος πρωτοτρίχας εξελίχθηκε, σε μια αναπτυσσόμενη συμπαγή ράβδο που διατρύπα την επιδερμική επιφάνεια, ενώ ο σημηματογόνος αδένας παρέμεινε τοποθετημένος δίπλα της, διαθέτοντας πλέον μικρότερο μέγεθος.

## 2.2 Ποικιλομορφία και λειτουργίες της τρίχας

Η τρίχα αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό ανατομικό χαρακτηριστικό που εντοπίζεται σε όλα τα είδη θηλαστικών, διακρίνοντάς τα από τα υπόλοιπα μέλη του ζωικού βασιλείου. Το δέρμα τους εμφανίζει τριχοφυΐα στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς του, με εξαιρέσεις που περιλαμβάνουν το πέλμα του ποδιού, την παλάμη του χεριού, την στοματική επιφάνεια του χείλους και συγκεκριμένες περιοχές των εξωτερικών γεννητικών οργάνων. Η κατανομή των ανθρώπινων τριχών ποικίλλει σημαντικά στις διάφορες περιοχές του σώματος. Σε μεγάλο μέρος της επιφάνειας του σώματος, η τριχοφυΐα χαρακτηρίζεται από ελάχιστα, σχεδόν άχρωμα μαλλιά. Αντίθετα, ορισμένες περιοχές όπως το τριχωτό της κεφαλής, οι βλεφαρίδες και τα φρύδια έχουν μακρύτερες, πιο πυκνές και έντονα χρωματισμένες τρίχες.

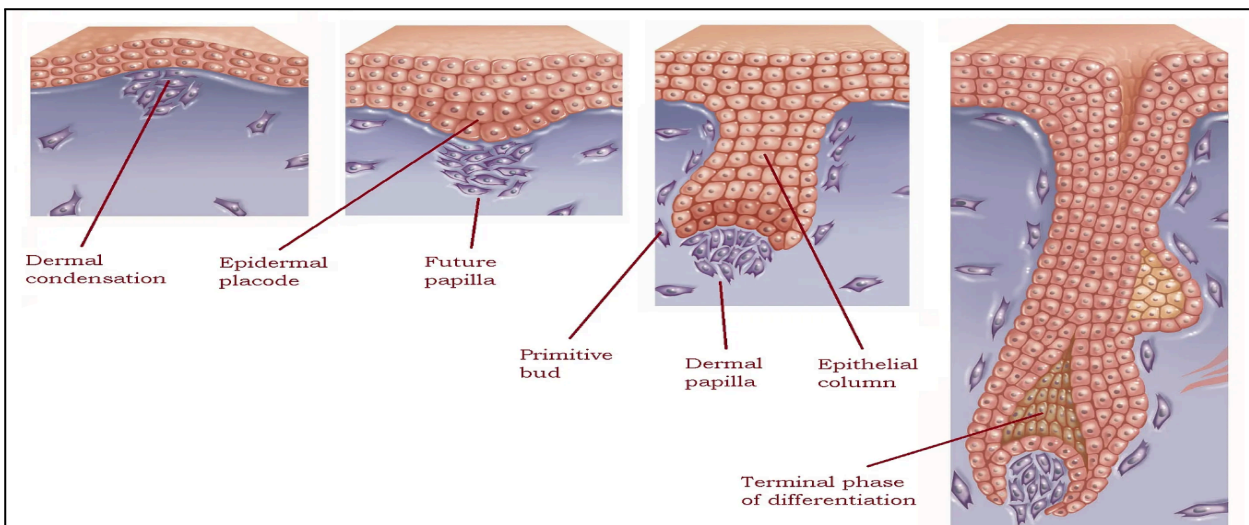
Οι πρωταρχικοί φυσιολογικοί ρόλοι περιλαμβάνουν, την προστασία του καληπτύριου συστήματος από μηχανικές βλάβες, καθώς και τη συμβολή στη διατήρηση της ομοιοθερμίας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν, η προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και η θερμορύθμιση. Οι τρίχες στο τριχωτό της κεφαλής λειτουργούν ως φυσικό αντηλιακό, συμβάλλοντας στην προστασία του υποκείμενου δέρματος από την επιβλαβή υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Οι λεπτές τρίχες στο δέρμα βοηθούν στη θερμορύθμιση. Όταν η θερμοκρασία του σώματος αυξάνεται, οι θύλακες των τριχών συστέλλονται, με αποτέλεσμα η τρίχα να βρίσκεται επίπεδη πάνω στο

δέρμα. Αυτό επιτρέπει στον ιδρώτα να εξατμίζεται πιο αποτελεσματικά, δροσίζοντας το δέρμα και συμβάλλοντας στη διατήρηση μιας σταθερής θερμοκρασίας σώματος σε ζεστές συνθήκες. Επιπρόσθετα, τα μαλλιά εκπληρώνουν αισθητηριακές λειτουργίες, ενισχύοντας την ικανότητα του δέρματος να αντιλαμβάνεται τα απτικά ερεθίσματα. Κάθε τριχικός θύλακος συνδέεται με νευρικές απολήξεις και η κίνηση της τρίχας μπορεί να προκαλέσει αισθητηριακές αποκρίσεις. Απόρροια αυτού είναι η αίσθηση της αφής, η εγρήγορση και η ενισχυμένη αντίληψη του περιβάλλοντα χώρου.

### 2.3 Σχηματισμός, ανάπτυξη και ωρίμανση του τριχικού θύλακου

Η θεμελιώδης προϋπόθεση για την έναρξη της ανάπτυξης των τριχοθυλακίων έγκειται στην σύνθετη μοριακή επικοινωνία μεταξύ της επιδερμικής στιβάδας και του υποκείμενου μεσεγχυματικού ιστού. Κατά την 10η εβδομάδα της κυήσεως τα μεσεγχυματικά κύτταρα αρχίζουν να αλληλεπιδρούν με τον επιδερμικό ιστό, οδηγώντας τελικά στον σχηματισμό δομών, που είναι γνωστές με τον όρο επιθηλιακό πλακώδες.

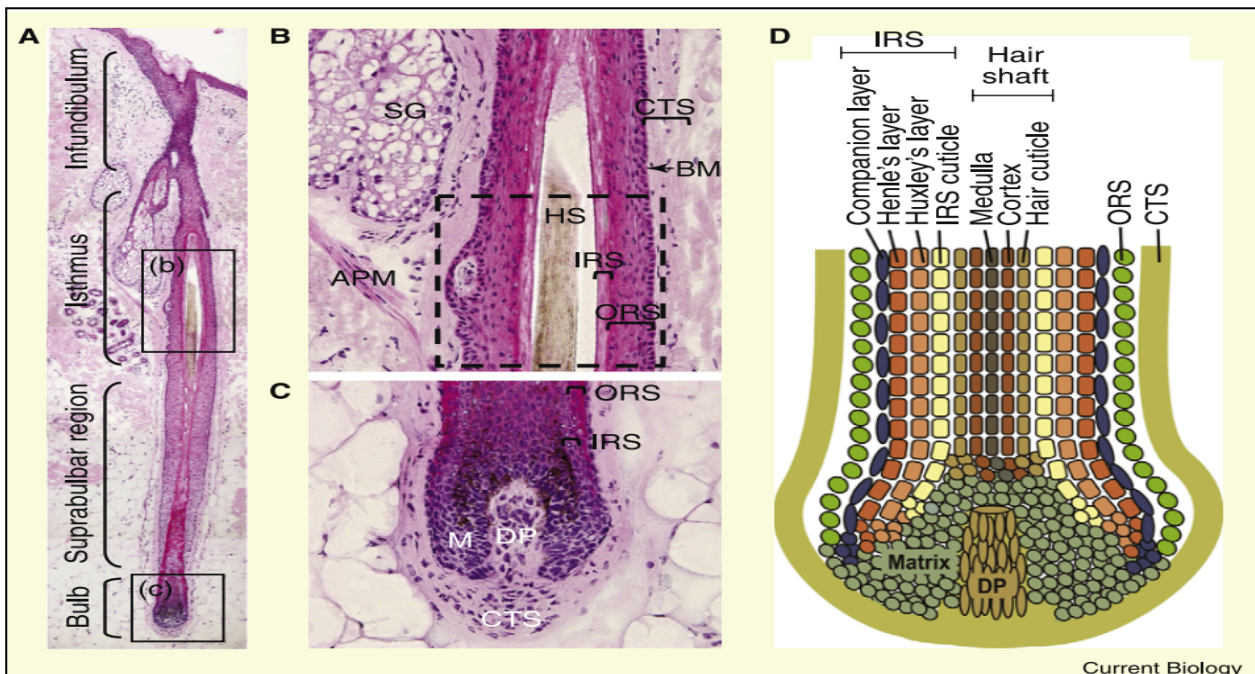
Το επιθηλιακό πλακώδες είναι μια μικρή πάχυνση της επιθηλιακής στιβάδας του δέρματος. Αντιπροσωπεύει το αρχικό στάδιο της ανάπτυξης των τριχοθυλακίων. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται μια ακανόνιστη ενεργοποίηση της σηματοδότησης Wnt/ $\beta$ -κατενίνης στην περιοχή του επιθηλίου. Τα κύτταρα που θα σχηματίσουν το πλακώδες, εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα Wnt, αναγκάζοντάς τα να υιοθετήσουν έναν όρθιο προσανατολισμό και να ξεκινήσουν μια φάση γρήγορου πολλαπλασιασμού, σχηματίζοντας την πρωτογενή καταβολή του τριχικού θύλακου. Τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν, συνθέτουν όλο το επιθηλιακό τμήμα αυτού. Επειτα, τα κερατινοκύτταρα επάγουν τη συσσώρευση μεσεγχυματικών κυττάρων, προς σχηματισμό ενός αθροίσματος, γνωστό ως χοριακό πύκνωμα. Αυτό μετέπειτα θα αποτελέσει την δερματική θηλή. Παράλληλα, το χοριακό πύκνωμα εκπέμπει συγκεκριμένα σήματα ανάπτυξης στον επιδερμικό ιστό, ενισχύοντας την περαιτέρω αύξηση του πλακώδους στο περιβάλλον του χορίου. Μέσω αυτής της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης επιτυγχάνεται η ωρίμανση και η διαφοροποίηση του θύλακα της τρίχας.



**Εικόνα 11.** Μοντέλο που αναπαριστά τον σχηματισμό των πρωτογενών τριχοθυλακίων.

Κατά την ωρίμανση των τριχοθυλακίων, ξεκινά η ανάπτυξη του βολβού. Ο βολβός αντιπροσωπεύει μια πυκνά συμπιεσμένη συσσωμάτωση επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλει το χοριακό πύκνωμα και συνιστά το κατώτερο μέρος του θύλακα. Χρησιμεύει ως το ενεργό σημείο για την παραγωγή της τρίχας, από το οποίο αναδύεται ο άξονας της. Περιλαμβάνει τη δερματική θηλή, μια δομή του στρώματος του δέρματος. Τα κύτταρα εντός της δερματικής θηλής είναι εξειδικευμένοι ινοβλάστες μεσεγχυματικής προέλευσης. Οι ινοβλάστες είναι απαραίτητοι για την πρόκληση σχηματισμού τριχοθυλακίων επηρεάζοντας την διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, οδηγώντας τα από την επιδερμική στην τριχοθυλακική ανάπτυξη.

Λειτουργικά χωρίζεται σε δύο μέρη, μια κατώτερη περιοχή που φιλοξενεί αδιαφοροποίητα κύτταρα και μια ανώτερη περιοχή που χαρακτηρίζεται από διαφοροποιημένα κύτταρα. Μια οριοθέτηση που εκτείνεται μέχρι το άκρο της μεγαλύτερης διαμέτρου του, γνωστή ως γραμμή Auber, χωρίζει αυτές τις δύο περιοχές. Στο κατώτερο τμήμα, βρίσκεται η μήτρα, το κέντρο βλάστησης του τριχοθυλακίου. Εκεί εντοπίζονται τα μητρικά κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από έντονη μιτωτική δραστηριότητα. Καθώς εξελίσσεται η διαφοροποίησή τους, σχηματίζονται κυτταρικές στήλες, οι οποίες απαρτίζουν όλα τα τμήματα του τριχικού θύλακου. Τα κύτταρα που προέρχονται από τη μήτρα μεταναστεύουν προς το ανώτερο τμήμα του βολβού, όπου αυξάνονται σε μέγεθος και λαμβάνουν κατακόρυφο προσανατολισμό. Έπειτα, υαλοποιούνται συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση της κερατίνης της τρίχας.



**Εικόνα 12.** Ιστομορφολογία του τριχοθυλακίου. (Marlon R. Schneider et.al. "The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan", 2009 Feb)

Το αρχικό επιθηλιακό πλακώδες, βαθαίνοντας στο χόριο οδηγεί σε διαστρωμάτωση του θύλακα. Αυτός ο μετασχηματισμός έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τουλάχιστον επτά

διακριτών στιβάδων επιθηλιακών κυττάρων που διατάσσονται παράλληλα. Ξεκινώντας από την εξώτατη περιοχή του τριχοθυλακίου, τα ιστολογικά συστατικά περιλαμβάνουν το περίβλημα του συνδετικού ιστού (CTS), το εξωτερικό περίβλημα της ρίζας (ORS), και το εσωτερικό περίβλημα της ρίζας (IRS).

Το CTS, που αποτελείται από κολλαγόνο και ελαστίνη, περιβάλλει τον θύλακα της τρίχας, παρέχοντας δομική υποστήριξη για την ανάπτυξη και τη συντήρησή του. Εμπλέκεται στη διευκόλυνση της παροχής αίματος στο θύλακα της τρίχας, διασφαλίζοντας την παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου που είναι απαραίτητα για τις μεταβολικές διεργασίες για την ανάπτυξη των τριχών.

Το ORS δημιουργεί δύο εμφανείς προεξοχές στην άνω περιοχή του, οι οποίες φιλοξενούν, τον σμηγματογόνο αδένα και την αποθήκη των βλαστοκυττάρων. Στην πρώτη τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα σμηγματογόνων αδένων. Αυτός ο τύπος αδένων είναι υπεύθυνος για την παραγωγή σμήγματος, μιας λιπαρής ουσίας που βοηθά στη λίπανση των μαλλιών και του δέρματος. Λίγο πιο κάτω από τον σμηγματογόνο αδένα σχηματίζεται η διόγκωση που φιλοξενεί αρχέγονα πολυδύναμα επιθηλιακά κύτταρα, που είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση και τη διατήρηση του θύλακα της τρίχας. Επιπρόσθετα, το εξόγκωμα αυτό αποτελεί την θέση προσφύσεως του ανελκτήρα μυ της τρίχας. Όταν συστέλλεται ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως χαμηλές θερμοκρασίες ή συναισθηματικές καταστάσεις, όπως ο φόβος ή ο ενθουσιασμός, αναγκάζει το θύλακα της τρίχας να ευθυγραμμίζεται με τον κατακόρυφο άξονα, με αποτέλεσμα οι τρίχες στην επιφάνεια του δέρματος να προσανατολίζονται σε όρθια θέση.

Το εσωτερικό περίβλημα της ρίζας (IRS), αποτελείται από 4 διαφορετικά στρώματα. Το συνοδευτικό στρώμα είναι μια εξειδικευμένη στιβάδα κυττάρων που βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά (companion layer) του IRS, σχηματίζοντας ένα στενά συνδεδεμένο στρώμα. Ακολουθούν, το στρώμα του Henle, το στρώμα του Huxley και το στρώμα της επιδερμίδας. Το στρώμα Henle είναι συνήθως ένα, ενώ το στρώμα Huxley μπορεί να είναι δύο ή ακόμα και τρία στρώματα σε μεγάλους θύλακες τρίχας. Τοποθετημένο γύρω από τον αναπτυσσόμενο άξονα της τρίχας, το IRS διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην υποστήριξη και την καθοδήγηση των αναπτυσσόμενων μαλλιών. Τα κύτταρα εντός του IRS παράγουν ενεργά βασικές πρωτεΐνες, όπως κερατίνες και τριχοϋαλίνη.

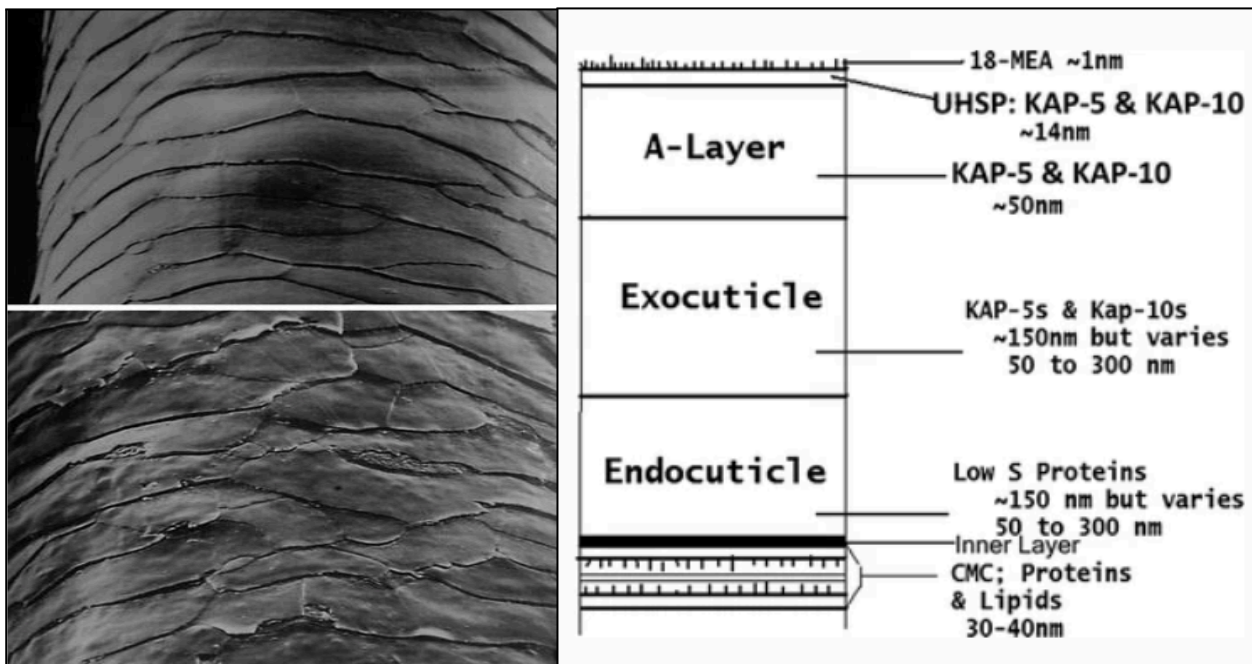
Ο άξονας ή στέλεχος της τρίχας είναι μια σύνθετη και εξειδικευμένη δομή, που αντιπροσωπεύει το τμήμα της τρίχας που ξεκινάει ακριβώς πάνω από τον βολβό μέχρι και το ορατό και εξωτερικό τμήμα της που αναδύεται από την επιφάνεια του δέρματος. Αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές, την υπερβολική περιοχή, τον ισθμό και τη περιοχή της χοάνης, η οποία φτάνει μέχρι και το άνοιγμα του τριχικού θυλάκου στην ανώτερη επιφάνεια της επιδερμίδας, λειτουργώντας ως οδηγός για τον αναδυόμενο άξονα της τρίχας. Η σύστασή του περιλαμβάνει κυρίως κερατίνη. Το στέλεχος τυπικά παρουσιάζει ένα κυλινδρικό και επίμηκες σχήμα. Μελέτες της μικροδομής της τρίχας



αποκαλύπτουν τρία κύρια στρώματα του κερατινοποιημένου στελέχους : το περιτρίχιο, το φλοιό και το μυελό.

## 2.4 Δομή και σύνθεση του τριχικού στελέχους

Το περιτρίχιο ή επιδερμίδιο, αποτελεί το εξώτατο στρώμα του άξονα της τρίχας και δομείται από 5 έως 10 επικαλυπτόμενα κερατινοποιημένα κύτταρα. Συνεισφέρει ως προστατευτικός φραγμός, προφυλάσσοντας τις ίνες της τρίχας τόσο από μηχανικές όσο και από περιβαλλοντικές βλάβες. Προέρχεται από την επιδερμίδα, η οποία συμβάλλει περίπου στο 10% του συνολικού όγκου των ινών τρίχας. Κάθε μεμονωμένο κύτταρο εμφανίζει μια πενταμερή δομή, με ευδιάκριτα στρώματα.



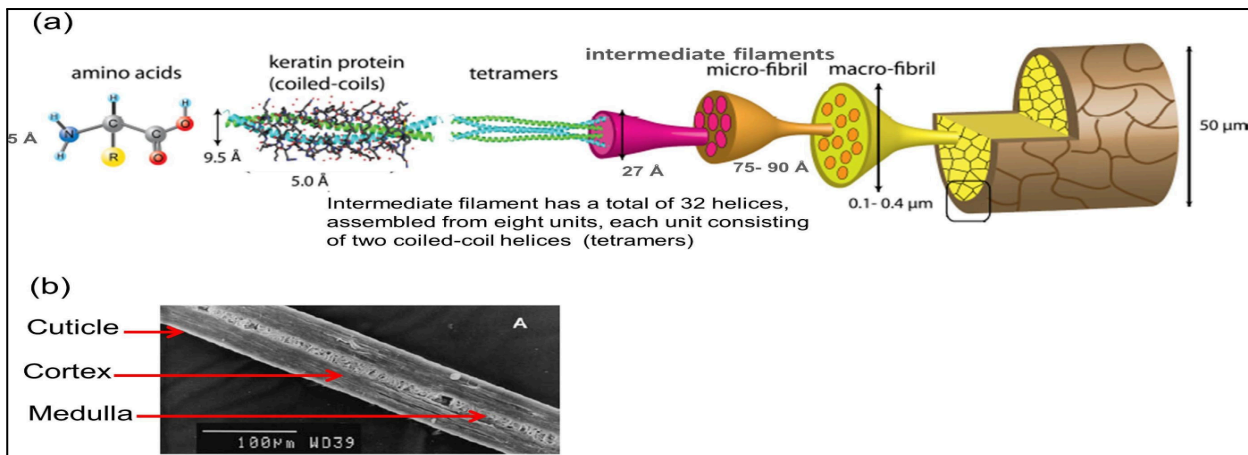
**Εικόνα 13.** Οργάνωση των στρωμάτων του περιτρίχιου. (Robbins, C.R. (2012). Morphological, Macromolecular Structure and Hair Growth. In: Chemical and Physical Behavior of Human Hair. Springer, Berlin, Heidelberg.)

Το εξωτερικό στρώμα αποτελείται κυρίως από λιπίδια και χαρακτηρίζεται από την παρουσία του 18-μεθυλ εικοσανοϊκού οξέος (18-MEA). Το 18-MEA παρέχει λίπανση στα μαλλιά, μειώνοντας την τριβή μεταξύ των μεμονωμένων κλώνων τρίχας και εμποδίζοντας τη τριβή μεταξύ τους. Δημιουργεί υδρόφοβο φράγμα στην επιφάνεια της τρίχας, συμβάλλοντας στην προστασία των μαλλιών από την υγρασία, την υπεριώδη ακτινοβολία και τους ρύπους. Συνδέεται κυρίως με πρωτεΐνες υψηλής περιεκτικότητας σε θείο (UHSF) που εντοπίζονται εντός της στιβάδας A υψηλής διασύνδεσης (A - layer), η οποία αποτελεί το επόμενο στρώμα του περιτρίχιου που είναι πλήρως κερατινοποιημένο. Ακριβώς κάτω από τη στιβάδα A, βρίσκεται το έξω-περιτρίχιο, που χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσα νημάτια κερατίνης (KIFs) και εξαιρετικά υψηλής περιεκτικότητας σε θείο και σε γλυκίνη-τυροσίνη (UHS/HGT) πρωτεΐνες. Η παρουσία των πρωτεϊνών αυτών, οδηγεί στην δημιουργία ενός δεύτερου κερατινοποιούμενου

δικτύου. Στη συνέχεια, το λιγότερο διασυνδεδεμένο ενδο-περιτρίχιο περιέχει σφαιρικές πρωτεΐνες. Συνορεύει με ένα μικρότερο, πλούσιο σε θείο εσωτερικό στρώμα, το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της μηχανικής άμυνας της ίνας της τρίχας. Αυτή η εσωτερική στιβάδα περιλαμβάνει κιτρουλινωμένη πρωτεΐνη S100A3, η οποία προσδίδει ακαμψία στο στρώμα, σχηματίζοντας ένα τετραμερές, το οποίο συνδέεται περαιτέρω με δεσμούς θείου και ισοπεπτιδίου. Η S100A3 είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει το ασβέστιο, το οποίο δρα ως συμπαράγοντας για την τρανσγλουταμίνωση, που καταλύει το σχηματισμό ισοπεπτιδικών δεσμών.

Απο τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι λαμβάνουν χώρα δύο διακριτές διεργασίες κερατινοποίησης εντός του επιδερμικού φραγμού της τρίχας. Τα εξωτερικά στρώματα Α υφίστανται κερατινοποίηση μέσω δεσμών θείου-θείου, ενώ τα εσωτερικά στρώματα υφίστανται κερατινοποίηση μέσω δεσμών ισοπεπτιδίου και θείου. Η διαφορά των μηχανισμών έγκειται στο γεγονός ότι οι κερατινοποιημένες στιβάδες με την μεσολάβηση ισοπεπτιδικών δεσμών είναι ευπαθείς σε υδρολυτικά ένζυμα. Τέλος η εσωτερική στιβάδα ενώνεται με μια δομή που αναφέρεται ως σύμπλοκο της κυτταρικής μεμβράνης (CMC) και συμβάλλει στην σύνδεση των κυττάρων του περιτρίχιου μεταξύ τους. Το CMC αποτελείται κυρίως από συνδετικές πρωτεΐνες και λιπίδια, ανάμεσα στα οποία, ανιχνεύεται και το 18-MEA.

Ο ώριμος φλοιός των ινών της ανθρώπινης τρίχας χαρακτηρίζεται από ατρακτοειδή κύτταρα μήκους 80  $\mu\text{m}$  - 115  $\mu\text{m}$  και αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό του στελέχους. Αυτά τα κύτταρα αποτελούνται από έναν αριθμό μακροινιδίων, τα οποία παρουσιάζουν πολυπλοκότητα και μοιράζονται παρόμοιες δευτερεύουσες δομές, που χαρακτηρίζονται από δεσμούς υδρογόνου  $\alpha$ -έλικας και δισουλφιδικούς δεσμούς, ενισχύοντας τις συνδέσεις τους με τη γύρω μήτρα. Δομική μονάδα ενός μεμονωμένου μακροινιδίου συνιστά το μικροινίδιο ή ενδιάμεσο νημάτιο, το οποίο με τη σειρά του δομείται από πρωτοινίδια. Ομοίως, κάθε πρωτοινίδιο συντίθεται από πρωτονημάτια, που αποτελούνται από κερατίνες που σχηματίζουν δομές  $\alpha$ -έλικας, έπειτα από την ανάπτυξη δισουλφιδικών, ιοντικών και δεσμών υδρογόνου. Τα κύτταρα του φλοιού διασυνδέονται με ένα σύμπλεγμα κυτταρικής μεμβράνης (CMC) για τη διασφάλιση της δομικής συνοχής.



**Εικόνα 14.** Μικροδομική σύνθεση στελέχους τρίχας. (Zhang Y, Alsop RJ, Soomro A, Yang F, Rheinstädter MC.2015.Effect of shampoo, conditioner and permanent waving on the molecular structure of human hair.)

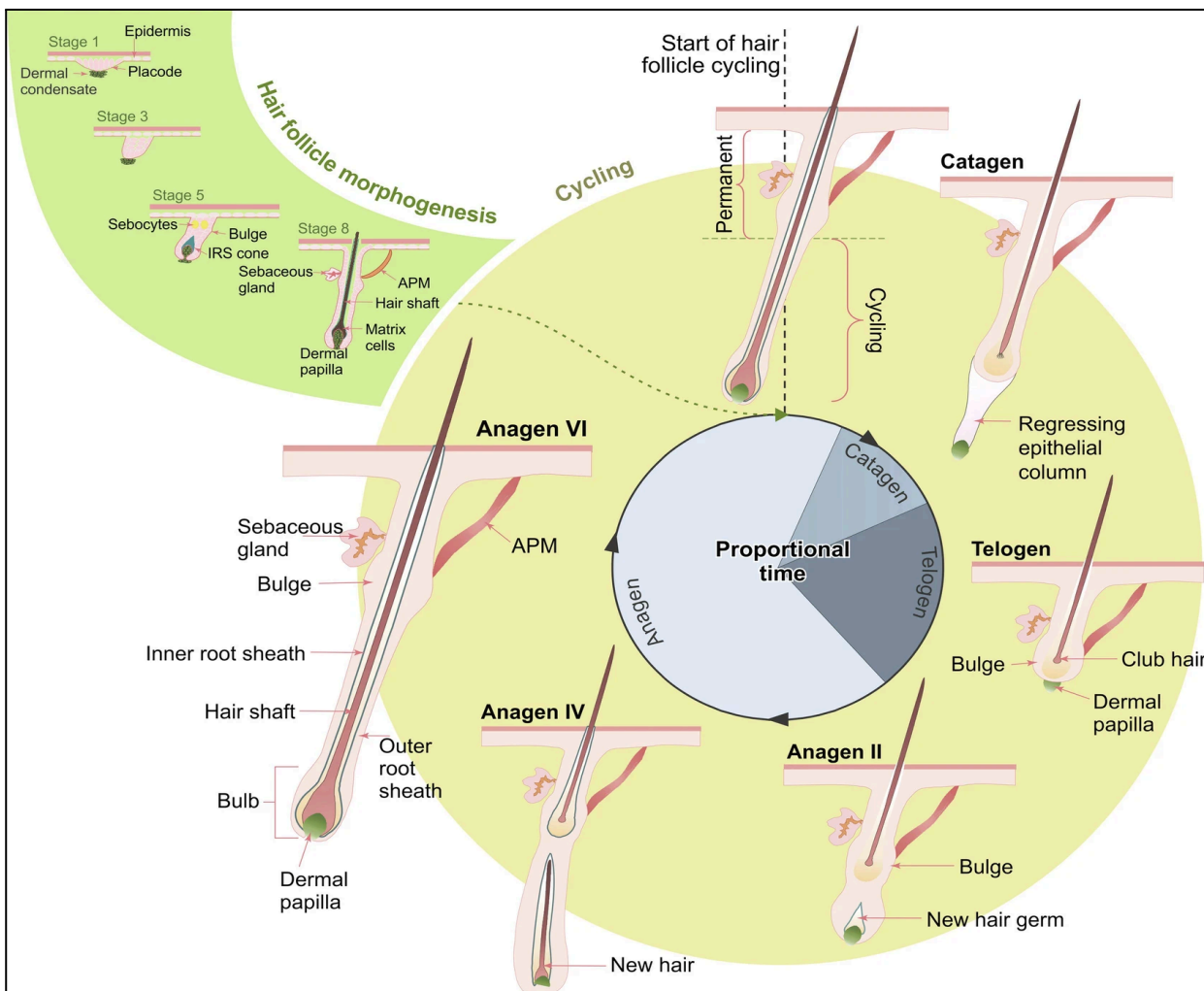
Ο μυελός εντοπίζεται στο κέντρο του άξονα της τρίχας. Τα χαρακτηριστικά του ποικίλλουν ανάλογα με τη διάμετρο της ίνας. Οι λεπτές τρίχες συνήθως αποτελούνται μόνο από το περιτρίχιο και τον φλοιό. Αντίθετα, σε πιο παχιές τρίχες, ο μυελός αποτελεί ένα σχετικά σημαντικό τμήμα της συνολικής μάζας της ίνας. Τα μυελικά κύτταρα, όταν υπάρχουν, συσσωρεύονται χαλαρά εντός του μυελού. Ο μυελός διακρίνεται για την υψηλή περιεκτικότητά του σε λιπίδια, συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέρη του τριχικού στελέχους. Είναι σχετικά ελλειπής σε δισουλφιδικούς δεσμούς, γεγονός που υποδηλώνει το πολύ μικρό ποσοστό πρωτεΐνης. Ωστόσο, σ' αυτό το μικρό ποσοστό εντοπίζεται, μια από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες που κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην οργάνωσή της δομής του, η τριχοϋαλίνη. Τα μόρια τριχοϋαλίνης συνδράμουν, στο σχηματισμό και τη σκλήρυνση του μυελού, μέσω πολυμερισμού με τη μεσολάβηση ισοπεπτιδικών δεσμών, οι οποίοι ενισχύουν την ακαμψία.

## 2.5 Θυλακική δυναμική - κύκλος ανάπτυξης τρίχας

Ο σχηματισμός μιας τρίχας προκύπτει από τις συνεργατικές δραστηριότητες πολλαπλών στρωμάτων κερατινοκυττάρων εντός του θύλακα. Η ανάπτυξη της τρίχας είναι μια δυναμική και κυκλική διαδικασία, που ρυθμίζεται από διάφορες ορμόνες και κυτοκίνες. Οι κυτοκίνες, καθοδηγούν το τριχοθυλάκιο μέσω απαραίτητων αλλαγών, διασφαλίζοντας ότι κάθε τρίχα υποβάλλεται σε διαφορετικά στάδια στον κύκλο ανάπτυξής της. Σε επίπεδο μεμονωμένου τριχοθυλακίου, εκτυλίσσεται ένας κυκλικός μετασχηματισμός, ο οποίος προχωρά σε τρία στάδια που χαρακτηρίζονται από σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία και τη μεταβολική δραστηριότητα. Ο κύκλος των τριχοθυλακίων περιλαμβάνει τρεις ευδιάκριτες φάσεις: τη φάση ανάπτυξης (anagen), τη μεταβατική φάση (catagen) και τη φάση ηρεμίας (telogen).

Η αναγενής φάση αντιπροσωπεύει μια περίοδο ενεργού πολλαπλασιασμού, που χαρακτηρίζεται από τη διεύρυνση του θύλακα της τρίχας, με αποκορύφωμα την παραγωγή μιας ίνας τρίχας και υποδιαιρείται σε έξι στάδια (I–VI). Κατά τη διάρκεια του σταδίου I, παρατηρείται πάχυνση και επιμήκυνση του κλώνου των επιδερμικών

κυττάρων μεταξύ της δερματικής θηλής και της ήδη υπάρχουσας τρίχας. Μεταβαίνοντας στα στάδια II και III οι δερματικοί ινοβλάστες στρωματοποιούνται, ξεκινώντας τον σχηματισμό της θηλής, η οποία μεγεθύνεται και περικλείεται μερικώς, από επιθηλιακά βλαστοκύτταρα της αναπτυσσόμενης μήτρας. Έτσι, σχηματίζεται ο μηχανισμός ελέγχου που υπαγορεύει τη σειρά των κυτταρικών γραμμών εντός του ελύτρου των ινών και της ρίζας. Ξεκινά ο σχηματισμός του εσωτερικού ελύτρου της ρίζας (IRS) και ταυτόχρονα η βάση του τριχοθυλακίου συνεχίζει την καθοδική ανάπτυξη της στο δέρμα. Κατά την εξέλιξη των σταδίων IV - VI αναπτύσσεται ο άξονας της τρίχας, που περιβάλλεται πλήρως και από τα τρία στρώματα του IRS (Henle, Huxley και επιδερμίδα), εκτείνεται μέχρι το μέσο του τριχοθυλακίου και τα μελανοκύτταρα εντός της μήτρας εμφανίζουν δραστηριότητα παραγωγής χρωστικής. Οι αναδυόμενες τρίχες, ενδέχεται να έρθουν σε επαφή με τις τρίχες, από τον προηγούμενο κύκλο. Η νέα τρίχα είτε θα εξωθήσει την παλιά και τελικά θα απορριφθεί από τον οργανισμό, είτε θα αρχίσει να αναπτύσσεται μαζί της. Περαιτέρω, στο στάδιο IV ο αναπτυσσόμενος άξονας της τρίχας και το IRS φτάνουν σε μια θέση ελαφρώς κάτω από το σημείο εισαγωγής του σημηματογόνου αδένου. Στο στάδιο V, η άκρη του στελέχους της τρίχας εισέρχεται τελικά στο κανάλι της τρίχας, με αποκορύφωμα την ανάδυση της από την επιδερμίδα στο στάδιο VI.



**Εικόνα 15.** Αναπαράσταση του κύκλου ανάπτυξης της τρίχας. (Marlon R. Schneider et.al. "The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan", 2009 Feb)



Η αρχική εκδήλωση της μεταβατικής φάσης περιλαμβάνει την σταδιακή αποστρωματοποίηση των ινοβλαστών από τη βασική μεμβράνη, που οριοθετεί τα κύτταρα των δερματικών θηλών από τα βλαστοκύτταρα που βρίσκονται στον βολβό. Κατά τα πρώιμα στάδια της, υπάρχει σημαντική μείωση στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων της μήτρας. Παράλληλα, τα μελανοκύτταρα παύουν να παράγουν μελανίνη και τόσο η δερματική θηλή, όσο και ο βολβός υφίστανται μείωση μεγέθους. Συνολικά, έχει επέλθει η ολοκλήρωση της παραγωγής του στελέχους της τρίχας. Καθώς η μεταβατική φάση εξελίσσεται, η απόπτωση των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα το τριχοθυλάκιο να συστέλλεται και να αποσύρεται, αφήνοντας τελικά πίσω του μια σφαιρική δερματική θηλή στον υποδόριο ιστό. Επιπρόσθετα, παύει η παραγωγή τριχοϋαλίνης και τρανσγλουταμινάσης από τα επιθηλιακά κύτταρα.

Κατά τη διάρκεια της φάσης ηρεμίας, η οποία διαδέχεται την μεταβατική, το τριχοθυλάκιο υφίσταται μείωση μεγέθους, φτάνοντας τις μικρότερες διαστάσεις του. Ένα συμπαγές σύμπλεγμα δερματικών ινοβλαστών και υπολειμμάτων της δερματικής θηλής, βρίσκεται ακριβώς κάτω από τον βολβό. Ο βολβός περιέχει έναν πληθυσμό επιθηλιακών βλαστοκυττάρων. Η θηλή είναι φτωχή σε μήτρα και οι ινοβλάστες της εμφανίζουν ελάχιστο κυτταρόπλασμα. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν περιορισμένη ή καθόλου σύνθεση DNA-RNA, με αποτέλεσμα μια πλήρως κερατινοποιημένη και άτονη τρίχα. Ωστόσο, παρατηρείται σύνθεση της πρωτεΐνης κερατίνη 14 (K14), η οποία συνδράμει στην αγκίστρωση της ίνας. Η λειτουργία αγκίστρωσης της K14 βοηθά να διασφαλιστεί ότι τα μαλλιά παραμένουν σταθερά στη θέση τους εντός του θύλακα, παρόλο που δεν αναπτύσσονται ενεργά. Ο μηχανισμός αυτός θεωρείται απαραίτητος για τη διατήρηση της δομής του θύλακα της τρίχας και την υποστήριξη της μετάβασης μεταξύ της φάσης ηρεμίας και της επακόλουθης φάσης ανάπτυξης όταν ο θύλακας της τρίχας γίνει ξανά ενεργός. Καθώς ολοκληρώνεται αυτό το στάδιο, τα μαλλιά υφίστανται πτώση (εξωγενής φάση). Πλέον, ο θύλακας μπορεί να επανεκκινήσει τη φάση ανάπτυξης, διεγείροντας τα βλαστοκύτταρα του βολβού.

## 2.6 Πρωτεΐνες της τρίχας

Η ανθρώπινη τρίχα αποτελείται από πολλά είδη πρωτεϊνών που συμβάλλουν στη διαμόρφωση της δομικής ακεραιότητας και ανθεκτικότητάς της. Στις κυριότερες εξ αυτών περιλαμβάνονται, κερατίνες, πρωτεΐνες που σχετίζονται με κερατίνη (KAP), πρωτεΐνες υψηλής περιεκτικότητας σε θείο (HSP), πρωτεΐνες εξαιρετικά υψηλού θείου (UHSP), πρωτεΐνες υψηλής περιεκτικότητας σε τυροσίνη (HTPs), πρωτεΐνες υψηλής περιεκτικότητας σε τυροσίνη και γλυκίνη (HGTPs) και τριχοϋαλίνη.

Οι κερατίνες είναι οι δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το πλαίσιο των κερατινοποιημένων ιστών. Είναι ινώδεις πρωτεΐνες που αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία της τρίχας, των νυχιών καθώς και του εξωτερικού στρώματος του δέρματος. Αποτελούν, ένα τύπο πρωτεΐνης ενδιάμεσου νήματος (IF). Οι κύριες λειτουργίες που επιτελούν σχετίζονται με την κυτταροσκελετική υποστήριξη εντός του στελέχους της

τρίχας, την ευλυγισία που επιτρέπει στα μαλλιά να λυγίζουν και να τεντώνονται χωρίς να σπάνε εύκολα παρέχοντας ελαστικότητα, αποτρέποντας τη φθορά και γενικά την δομική προστασία και ακεραιότητα.

Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Αυτές που περιέχουν υψηλότερη αναλογία όξινων αμινοξέων (τύπου I), όπως ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ συμβάλλουν σε ένα συνολικό αρνητικό φορτίο και θεωρούνται οξίνες. Αντιθέτως, οι εκείνες με περισσότερα βασικά αμινοξέα (τύπου II), όπως λυσίνη και αργινίνη διαθέτουν συνολικό θετικό φορτίο και θεωρούνται βασεόφιλες. Οι κερατίνες τύπου I κατηγοριοποιούνται ως όξινες και παρουσιάζουν αμινοξική αλληλουχία μήκους από 403 έως 471 κατάλοιπα. Οι κερατίνες με αμινοξέα ουδέτερα και βασικά κατατάσσονται στις τύπου II κερατίνες και εμφανίζουν ένα εύρος μήκους από 479 έως 507 κατάλοιπα. Η συμπληρωματική αλληλεπίδραση μεταξύ κερατινών Τύπου I και Τύπου II σχηματίζει ετεροδιμερή, δημιουργώντας τα ενδιάμεσα νήματα.

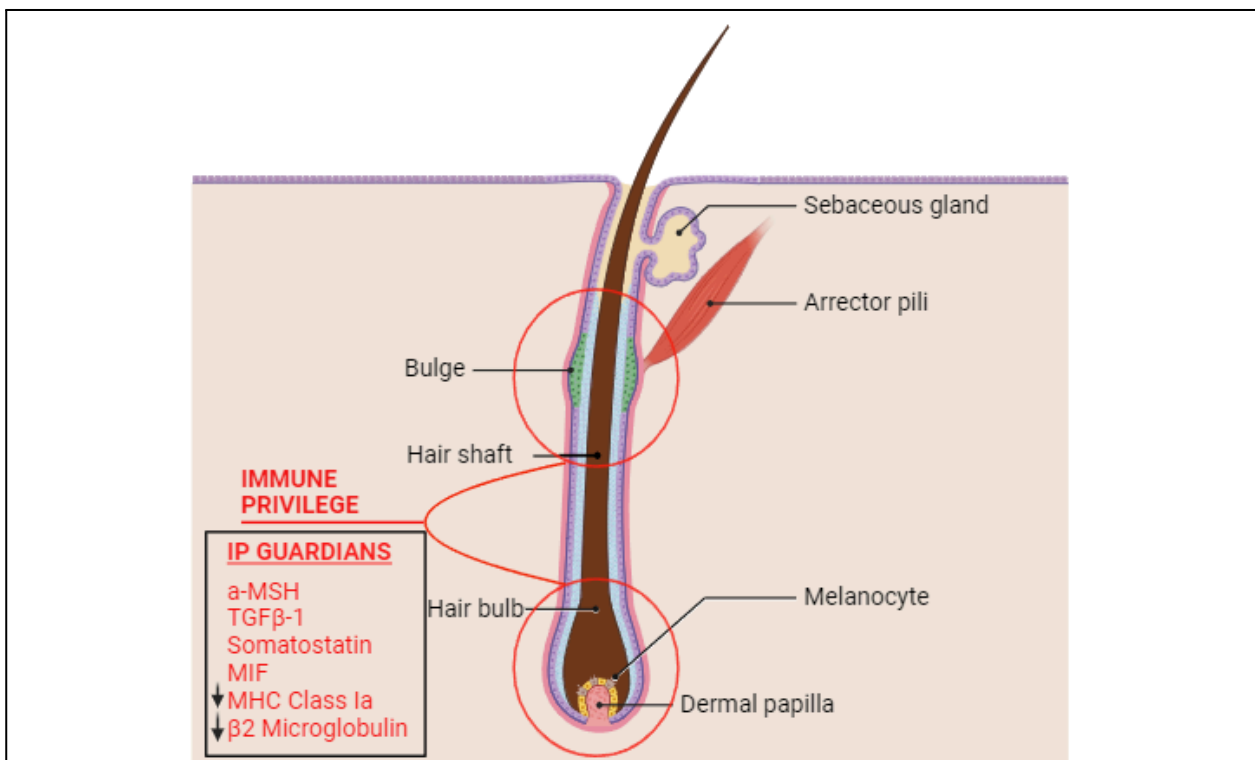
Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την κερατίνη (KAPs) δεν είναι οι ίδιες δομικές πρωτεΐνες αλλά λειτουργούν σε συνδυασμό με τις κερατίνες, παίζοντας ρυθμιστικό ρόλο στην οργάνωση και λειτουργία αυτών, μέσω της συμμετοχής τους σε διαδικασίες, όπως η διασύνδεση και η σταθεροποίηση των ινών κερατίνης. Πάνω από 80 διαφορετικές KAPs, καθορίζουν την παραγωγή της τρίχας. Η περιεκτικότητα σε κυστίνη, χαρακτηριστικό των KAPs, ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών οικογενειών, επηρεάζοντας τα φυσικά χαρακτηριστικά της προκύπτουσας τρίχας.

Οι KAPs περιλαμβάνουν μια ποικιλία υποοικογενειών, η καθεμία με ξεχωριστές λειτουργίες και χαρακτηριστικά. Έτσι, διακρίνονται 3 κατηγορίες KAPs. Πρωτεΐνες που εμφανίζουν επίπεδα κυστεΐνης κάτω από 30 moles%, ανήκουν στην κατηγορία των KAPs HSP. Είναι σημαντικές για το σχηματισμό άκαμπτων και ανθεκτικών δομών κερατίνης. Οι πλούσιες σε κυστεΐνη περιοχές που περιέχουν, διευκολύνουν το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, που συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα των κερατινοποιημένων δομών. Πρωτεΐνες με περιεκτικότητα σε κυστεΐνη που υπερβαίνει τα 30 moles%, UHSP. Οι συγκεκριμένες, συνδράμουν στη σκλήρυνση συγκεκριμένων κερατινοποιημένων δομών. Τέλος, η τρίτη κατηγορία των KAPs, περιλαμβάνει πρωτεΐνες τυροσίνης υψηλής γλυκίνης (HGTPs). Η περιεκτικότητα σε γλυκίνη κυμαίνεται από 22 έως 37 moles%, ενώ η περιεκτικότητα σε τυροσίνη παρουσιάζει μεταβλητότητα μεταξύ 12 και 28 moles%. Οι ακριβείς λειτουργίες τους δεν είναι καλά καθορισμένες αλλά η αφθονία τους και η ειδική σύνθεση αμινοξέων υποδηλώνουν ρόλους που συμβάλλουν στις μηχανικές ιδιότητες, στην ευελιξία και την ελαστικότητα της κερατίνης.

Η τριχοϋαλίνη είναι μια κοκκώδης, πρωτεϊνική ουσία που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του εσωτερικού περιβλήματος της ρίζας (IRS). Συνιστά πρωτεΐνη που παράγεται κατά την ανάπτυξη της τρίχας και είναι ανιχνεύσιμη στη μήτρα του φλοιού και στο μυελό των πλήρως σχηματισμένων ινών τρίχας. Αποτελεί μέλος των πρωτεϊνών S100, μια οικογένεια πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, που χαρακτηρίζονται από δύο θέσεις δέσμευσης ασβεστίου. Είναι μονομερής πρωτεΐνη αποτελούμενη από 1943

αμινοξέα, εμφανίζει μια επιμήκη μονόκλωνη άλφα-έλικα, που αποδίδεται στην ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητά της σε φορτισμένα κατάλοιπα.

Όσον αφορά τη συμβολή της στη δομική σύνθεση της τρίχας, έχει την δυνατότητα να σχηματίζει ισοπεπτιδικούς δεσμούς, οι οποίοι ενισχύουν τη σταθεροποίηση του κεροτινοποιημένου ιστού. Αυτοί οι δεσμοί σχηματίζονται μέσω μιας διαδικασίας μετα-μεταφραστικής τροποποίησης όπου η αργινίνη μετατρέπεται σε κιτροουλίνη, από το ένζυμο πεπτιδυλική απαμινάση της αργινίνης. Έπειτα, μετά την κιτροουλίωση, η τριχοϋαλίνη αποτελεί υπόστρωμα για τις τρανσγλουταμινάσες, που καταλύουν τη δημιουργία ισοπεπτιδικών δεσμών μεταξύ των καταλοίπων λυσίνης και κιτροουλίνης εντός της πρωτεϊνικής δομής.



**Εικόνα 16.** Το ανοσολογικό προνόμιο το τριχοθυλακίου. (Μιχαλόπουλος Ιωάννης. 2024. BioRender)

Τα τριχοθυλάκια, παρόλο που αποτελούν αναπόσπαστο μέρος του δέρματος, έχουν μοναδικά ανοσολογικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην προστασία και στη διατήρησή τους. Θεωρούνται ανοσολογικά προνομιούχες θέσεις (IP), το οποίο συνεπάγεται ότι είναι λιγότερο επιρρεπείς σε φλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη. Η έλλειψη ή η χαμηλή έκφραση μορίων κλάσης Ia του κλασικού μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στους θύλακες των τριχών βοηθά στην απομόνωση αυτοαντιγόνων και αναστέλλει την παρουσίασή τους στα CD8<sup>+</sup> T κυτταροτοξικά κύτταρα. Τα μόρια του συστήματος HLA, μπορεί να εμπλέκονται στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων και στη μείωση των αποκρίσεων των φυσικών κυττάρων φονέων. Η τοπική παραγωγή ανοσοκατασταλτικών μορίων, δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον που αναστέλλει τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Παραδείγματα ανοσοκατασταλτικών περιλαμβάνουν τον μετασχηματιστικό αυξητικό

παράγοντα-β (TGF-β), την ορμόνη διέγερσης άλφα-μελανοκυττάρων (α-MSH) και την ιντερλευκίνη-10. Επιπρόσθετα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, σε ανοσολογικά προνομιούχες θέσεις μπορεί να είναι λειτουργικά εξασθενημένα. Η εξασθενημένη λειτουργία των APCs συμβάλλει στη μειωμένη ικανότητα παρουσίασης αντιγόνων στα T κύτταρα, εμποδίζοντας την έναρξη των ανοσολογικών αποκρίσεων. Η απουσία λεμφαγγείων στους θύλακες των τριχών και η παρουσία ειδικών φραγμών εξωκυτταρικής μήτρας εμποδίζουν τη διακίνηση των ανοσοκυττάρων.

## Κεφάλαιο 3. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1

### 3.1 Ορισμός

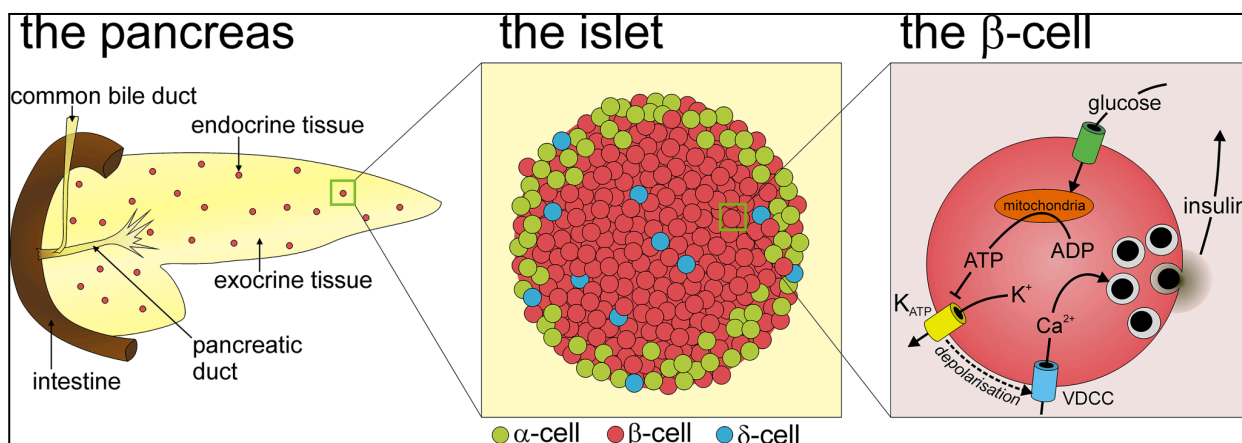
Ο σακχαρώδης διαβήτης συνιστά ομάδα μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα για παρατεταμένη περίοδο. Το αυξημένο σάκχαρο στο αίμα είναι αποτέλεσμα της ανεπαρκούς παραγωγής ινσουλίνης, της αναποτελεσματικής χρήσης ινσουλίνης ή και των δύο. Ο διαβήτης τύπου 1 (T1D) είναι μια αυτοάνοση κατάσταση, όπου το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται κατά λάθος και καταστρέφει τα βήτα κύτταρα του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη. Ως αποτέλεσμα, το σώμα δεν μπορεί να παράγει ινσουλίνη.

Η ακριβής αιτία της αυτοάνοσης απόκρισης δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες συνεισφέρουν στη πρόκλησή της. Τα άτομα με ΣΔ1 εξαρτώνται πλήρως από εξωτερικές πηγές ινσουλίνης για την επιβίωση. Επηρεάζει περίπου το 5-10% του παγκόσμιου διαβητικού πληθυσμού, με επιπολασμό που εκτείνεται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, αν και εκδηλώνεται κυρίως στην παιδική και εφηβική ηλικία.

### 3.2 Δομή και κύτταρα του παγκρέατος

Το πάγκρεας είναι ένα ζωτικό όργανο με ενδοκρινείς και εξωκρινείς λειτουργίες, που κατέχει καθοριστικό ρόλο στην πέψη και στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Έχει μια ξεχωριστή ανατομική δομή που μπορεί να χωριστεί ευρέως σε τρεις κύριες περιοχές: τη κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Η κεφαλή αντιπροσωπεύει το δεξιότερο μέρος του παγκρέατος και βρίσκεται μέσα στην καμπύλη του δωδεκαδακτύλου, του πρώτου τμήματος του λεπτού εντέρου. Συνδέεται με το σώμα, το οποίο αποτελεί το κεντρικό και μεγαλύτερο μέρος του οργάνου. Αυτό εντοπίζεται πίσω από το στομάχι και μπροστά από τη σπονδυλική στήλη. Η ουρά είναι το αριστερό μέρος του παγκρέατος και εμφανίζει μια σταδιακή λέπτυνση προς τον σπλήνα. Διάσπαρτα σε όλο το πάγκρεας υπάρχουν συστάδες κυττάρων, γνωστές ως νησίδες Langerhans, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στην ουρά του οργάνου. Αυτές οι νησίδες περιέχουν διαφορετικούς τύπους ενδοκρινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των άλφα κυττάρων, των βήτα κυττάρων και των κυττάρων δέλτα.

Τα βήτα κύτταρα είναι υπεύθυνα για τη παραγωγή και έκκριση της ινσουλίνης, ορμόνη που αποτελεί κύριο ρυθμιστή των επιπέδων σακχάρου στο αίμα. Η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα, προάγοντας τη χρήση της για ενέργεια ή αποθήκευση στο ήπαρ και τους μύες. Τα βήτα κύτταρα απελευθερώνουν ινσουλίνη ως απόκριση σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης. Αυτό συμβαίνει συνήθως μετά την κατανάλωση υδατανθράκων, οι οποίοι διασπώνται σε γλυκόζη κατά την πέψη. Η ινσουλίνη καταστέλλει την παραγωγή γλυκόζης καθώς και την απελευθέρωση από το ήπαρ στην κυκλοφορία του αίματος, αποτρέποντας την υπερβολική αύξηση της. Σε αντίθεση με την γλυκαγόνη, αναστέλλει τη λιπόλυση μειώνοντας την απελευθέρωση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία του αίματος, προάγοντας τη χρήση της γλυκόζης ως κύρια πηγή ενέργειας. Επιπλέον, ενισχύει τη σύνθεση πρωτεϊνών διευκολύνοντας την πρόσληψη αμινοξέων στα κύτταρα. Με αυτό το τρόπο, υποστηρίζει επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, διάφορες μεταβολικές διεργασίες, την ανάπτυξη και διατήρηση διαφόρων ιστών στο σώμα.



**Εικόνα 17.** Αναπαράσταση των ενδοκρινικών κυττάρων του παγκρέατος. (Patrick E MacDonald, Patrick Rorsman, "Oscillations, Intercellular Coupling, and Insulin Secretion in Pancreatic  $\beta$  Cells", 2006, Feb)

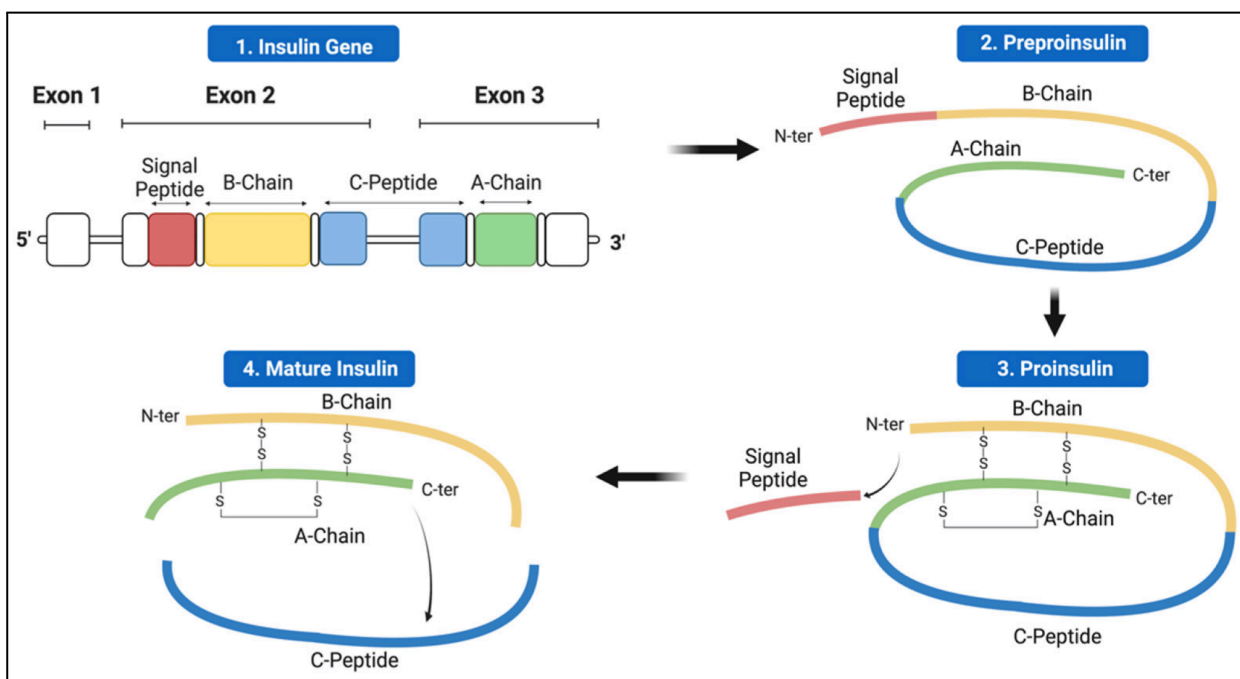
Τα άλφα κύτταρα παράγουν και απελευθερώνουν γλυκαγόνη, μια ορμόνη που αυξάνει τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Η γλυκαγόνη διεγείρει το ήπαρ, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται γλυκογονόλυση, να μετατρέψει το αποθηκευμένο γλυκογόνο σε γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Τα δέλτα κύτταρα παράγουν σωματοστατίνη, η οποία ρυθμίζει την απελευθέρωση τόσο της ινσουλίνης όσο και της γλυκαγόνης. Ρυθμίζοντας την έκκριση τους, βοηθά στη διατήρηση μιας ελεγχόμενης απόκρισης στις αλλαγές του σακχάρου του αίματος.

### 3.3 Ινσουλίνη

Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Αποτελεί πεπτιδική ορμόνη που δομείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την Α και τη Β, που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Το γονίδιο της ινσουλίνης στον άνθρωπο, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11. Αρχικά, πραγματοποιείται η μεταγραφή του γονιδίου σε ένα μόριο αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Το γονίδιο της ανθρώπινης ινσουλίνης αποτελείται από εξόνια και ιντρόνια. Η αρχική μεταγραφή του γονιδίου παράγει ένα

πρόδρομο mRNA (προ-mRNA) που περιλαμβάνει τόσο εξωνικές όσο και ιντρονικές αλληλουχίες. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας γνωστής ως μάτισμα RNA, τα ιντρόνια αποκόπτονται και τα εξώνια ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν το ώριμο mRNA, το οποίο χρησιμεύει ως πρότυπο για τη σύνθεση πρωτεϊνών.

Το αρχικό προϊόν της μετάφρασης είναι ένα μόριο προ-προϊνσουλίνης, το οποίο αποτελείται από ένα πεπτίδιο σήματος και την πολυπεπτιδική αλυσίδα της ινσουλίνης. Ένα πεπτίδιο σήματος είναι μια σύντομη αλληλουχία αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο (NH<sub>2</sub>-) μιας πρωτεΐνης και αναλαμβάνει την καθοδήγηση της πρωτεΐνης στη σωστή κυτταρική της θέση. Συγκεκριμένα, η προ-προϊνσουλίνη κατευθύνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), όπου λαμβάνουν χώρα μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Το πεπτίδιο σήματος αποκόπτεται, με αποτέλεσμα το σχηματισμό προϊνσουλίνης. Έπειτα, η προϊνσουλίνη υφίσταται αναδίπλωση, όπου σχηματίζονται δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ συγκεκριμένων καταλοίπων κυστεΐνης, δημιουργώντας τη χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή της ινσουλίνης.



**Εικόνα 18.** Ροή βιοσύνθεσης ινσουλίνης. (Ataie-Ashtiani, S.; Forbes, B. A Review of the Biosynthesis and Structural Implications of Insulin Gene Mutations Linked to Human Disease. *Cells* **2023**, *12*, 1008.)

Ακολουθεί η μεταφορά της στη συσκευή Golgi, όπου η προϊνσουλίνη υφίσταται ενζυμική διάσπαση από τις προορμονικές κονβερτάσες. Αυτή η διάσπαση αφαιρεί ένα ενδιάμεσο τμήμα 31 αμινοξέων, το οποίο καλείται C - πεπτίδιο και συνδέει τις αλυσίδες A και B, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ώριμης ινσουλίνης. Το C-πεπτίδιο απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος σε ισομοριακές ποσότητες με την ινσουλίνη. Ενώ το ίδιο το πεπτίδιο C δεν έχει γνωστή φυσιολογική λειτουργία, η μέτρησή του στο αίμα μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης ενδογενούς έκκρισης ινσουλίνης στα άτομα, καθώς αυτό έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από την ινσουλίνη. Το πλέον ώριμο μόριο της ινσουλίνης



συσκευάζεται σε εκκριτικά κοκκία, τα οποία είναι κυστίδια αποθήκευσης μέσα στα βήτα κύτταρα. Η συνολική διαδικασία της βιοσύνθεσης της ινσουλίνης ελέγχεται αυστηρά, ωστόσο σε περιπτώσεις απορρύθμισης μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές όπως ο σακχαρώδης διαβήτης.

Η απελευθέρωση ινσουλίνης πυροδοτείται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Όταν η γλυκόζη εισέρχεται στα βήτα κύτταρα μέσω μεταφορέων γλυκόζης, υφίσταται μεταβολισμό, με επακόλουθο την αύξηση της αναλογίας ATP/ADP. Η αυξημένη παραγωγή ATP οδηγεί στο κλείσιμο των ευαίσθητων στο ATP καναλιών καλίου (KATP) στη μεμβράνη των βήτα κυττάρων. Το κλείσιμο των καναλιών KATP εμποδίζει την εκροή ιόντων καλίου (K<sup>+</sup>) από το κύτταρο. Αυτό οδηγεί σε συσσώρευση θετικού φορτίου (κατιόντα) μέσα στο κύτταρο, προκαλώντας εκπόλωση της μεμβράνης. Η εκπόλωση της μεμβράνης, οδηγεί στο άνοιγμα των καναλιών ασβεστίου που καλύπτονται από τάση (VGCC). Το αυξημένο ενδοκυτταρικό ασβέστιο πυροδοτεί τη σύντηξη των κοκκίων ινσουλίνης με την κυτταρική μεμβράνη και την απελευθέρωση τους στην κυκλοφορία του αίματος.

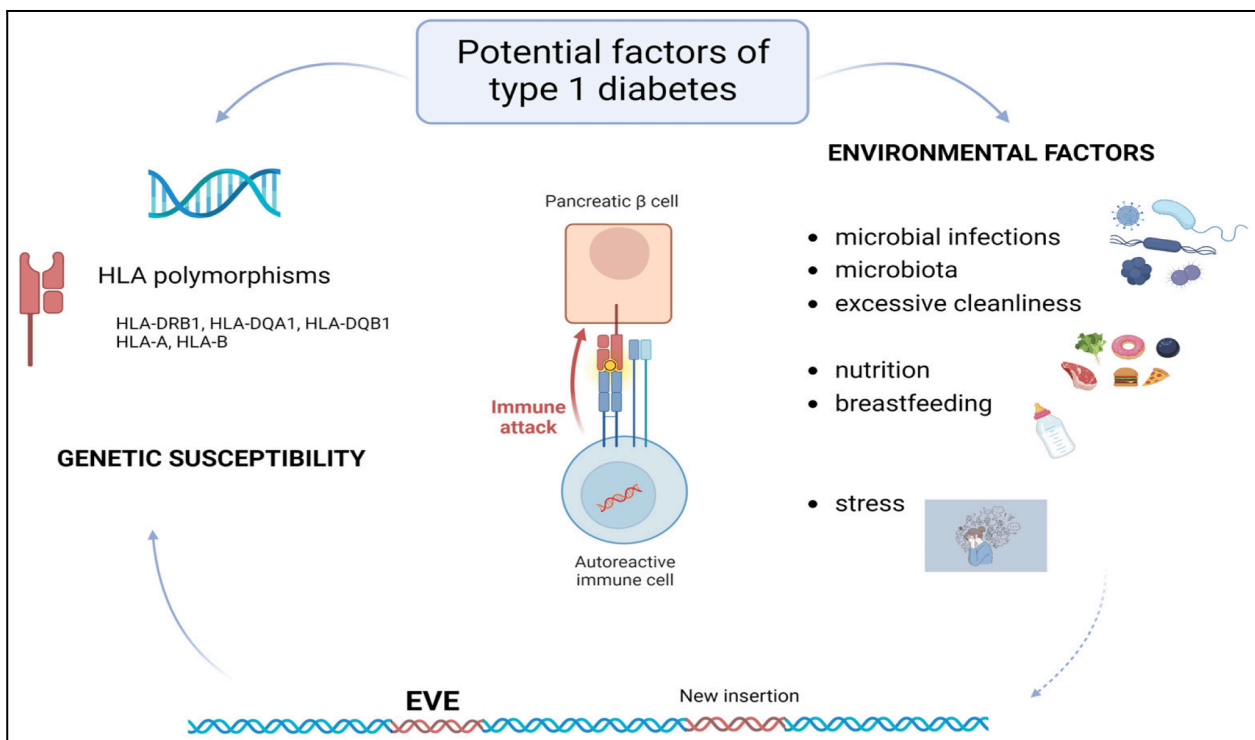
### 3.4 Αυτοανοσία και προδιάθεση

Η καταστροφή των βήτα κυττάρων προκαλείται από το ενεργοποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα που παράγει αυτοαντισώματα, συμπεριλαμβανομένων αντισωμάτων κατά της ινσουλίνης και έναντι άλλων συστατικών των βήτα κυττάρων, όπως η αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD). Η ειδική στόχευση της ινσουλίνης έχει άμεσες επιπτώσεις στην ομοίωση της γλυκόζης. Τα αυτοαντισώματα στοχεύουν τα κύτταρα, σημαδεύοντάς τα για καταστροφή. Αφού συνδεθούν με τα βήτα κύτταρα, ενεργοποιούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ιδιαίτερα τα Τ λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα, τα οποία διεισδύουν στις νησίδες Langerhans. Τα διεισδυτικά ανοσοκύτταρα αναγνωρίζουν τα βήτα κύτταρα ως ξένα, πυροδοτώντας μια φλεγμονώδη απόκριση. Συγκεκριμένα, απελευθερώνουν κυτταροτοξικές ουσίες, όπως κυτοκίνες και ελεύθερες ρίζες. Οι κυτταροτοξικές επιδράσεις και η φλεγμονή προκαλούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) στα βήτα κύτταρα. Καθώς τα κύτταρα καταστρέφονται, προοδευτικά η παραγωγή ινσουλίνης μειώνεται. Η ανεπάρκεια ινσουλίνης οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Οι πάσχοντες εμφανίζουν συμπτώματα υπεργλυκαιμίας, όπως αυξημένη δίψα, πείνα, συχνουρία, απώλεια βάρους και κόπωση.

Τα γονίδια HLA-DQ και HLA-DR, μέρος του συστήματος HLA, εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 6 και κατέχουν κεντρικούς ρόλους στην παθογένεση του T1D. Κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παρουσίαση αντιγόνων στα ανοσοκύτταρα, ιδιαίτερα στα Τ κύτταρα. Σε άτομα με γενετική προδιάθεση για T1D, διαφορετικοί συνδυασμοί αλληλόμορφων των γονιδίων αυτών, όπως τα DQ2, DQ8, DR3 και DR4, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔ1. Αυτά τα αλληλόμορφα επάγουν την ανάπτυξη ανοσοαπόκρισης Th1, που χαρακτηρίζεται από την



ενεργοποίηση προφλεγμονωδών T κυττάρων. Τα CD4+ T κύτταρα που αναγνωρίζουν αντιγόνα των βήτα κυττάρων στο πλαίσιο συγκεκριμένων αλληλομόρφων HLA ξεκινούν μια ανοσοαπόκριση έναντι αυτών. Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές συμβάλλουν στην καταστροφή των βήτα κυττάρων και στη διακοπή της φυσιολογικής έκκρισης ινσουλίνης. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΣΔ1 και ο βαθμός της ανοσολογικής απόκρισης, μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία ορισμένων αλληλόμορφων HLA σε ετερόζυγη ή ομόζυγη κατάσταση. Οι γενετικοί τύποι των γονιδίων HLA εμφανίζουν ένα φαινόμενο που ονομάζεται ανισοροπία σύνδεσης, όπου τα αλληλόμορφα σε αυτούς τους τύπους στο ίδιο χρωμόσωμα, κληρονομούνται μαζί συχνότερα από ό,τι αναμένεται από την τυχαία κατανομή τους στους γαμέτες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη μετάδοση συγκεκριμένων συνδυασμών αλληλόμορφων HLA μεταξύ των γενεών, επηρεάζοντας τα οικογενειακά πρότυπα κινδύνου. Άτομα με συγγενή πρώτου βαθμού με ΣΔ1 έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν την πάθηση. Ο κίνδυνος είναι υψηλότερος όταν και οι δύο γονείς έχουν T1D σε σύγκριση με όταν επηρεάζεται μόνο ο ένας γονέας.



**Εικόνα 19.** Αιτιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την πρόκληση ΣΔ1. (Štangar, A.; Kovač, J.; Šket, R.; Tesovnik, T.; Zajec, A.; Čugalj Kern, B.; Jenko Bizjan, B.; Battelino, T.; Dovč, K. Contribution of Retrotransposons to the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Challenges in Analysis Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3104)

Εκτός από τα γονίδια HLA, τα μη HLA γονίδια συμβάλλουν επίσης σημαντικά στη συνολική γενετική πρόκληση της νόσου. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ανοσολογικής ρύθμισης, της λειτουργίας των βήτα κυττάρων και των οδών σηματοδότησης. Τα μη HLA γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού είναι ζωτικής σημασίας για τον προσδιορισμό της ισορροπίας μεταξύ της ανοσολογικής ανοχής και της αυτοανοσίας. Παραλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των T κυττάρων, τη

σηματοδότηση κυτοκινών και τη λειτουργία των ανοσοκυττάρων εμπλέκονται στην απορρύθμιση που παρατηρείται στον διαβήτη. Επιπρόσθετα, ενδογενή ιικά στοιχεία (EVEs) τα οποία εμφανίζουν χρόνια έκφραση, υποβοηθούν την ανάπτυξη αυτοανοσίας μέσω μηχανισμών όπως ο μοριακός μιμητισμός, η ανοσοενεργοποίηση, η μεταλλαξογένεση εισαγωγής και οι επιγενετικές τροποποιήσεις. Τέλος, παραλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με τις οδούς σηματοδότησης της ινσουλίνης και την ανάπτυξη των βήτα κυττάρων μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα των βήτα κυττάρων να ανταποκρίνονται στα μεταβαλλόμενα επίπεδα γλυκόζης.

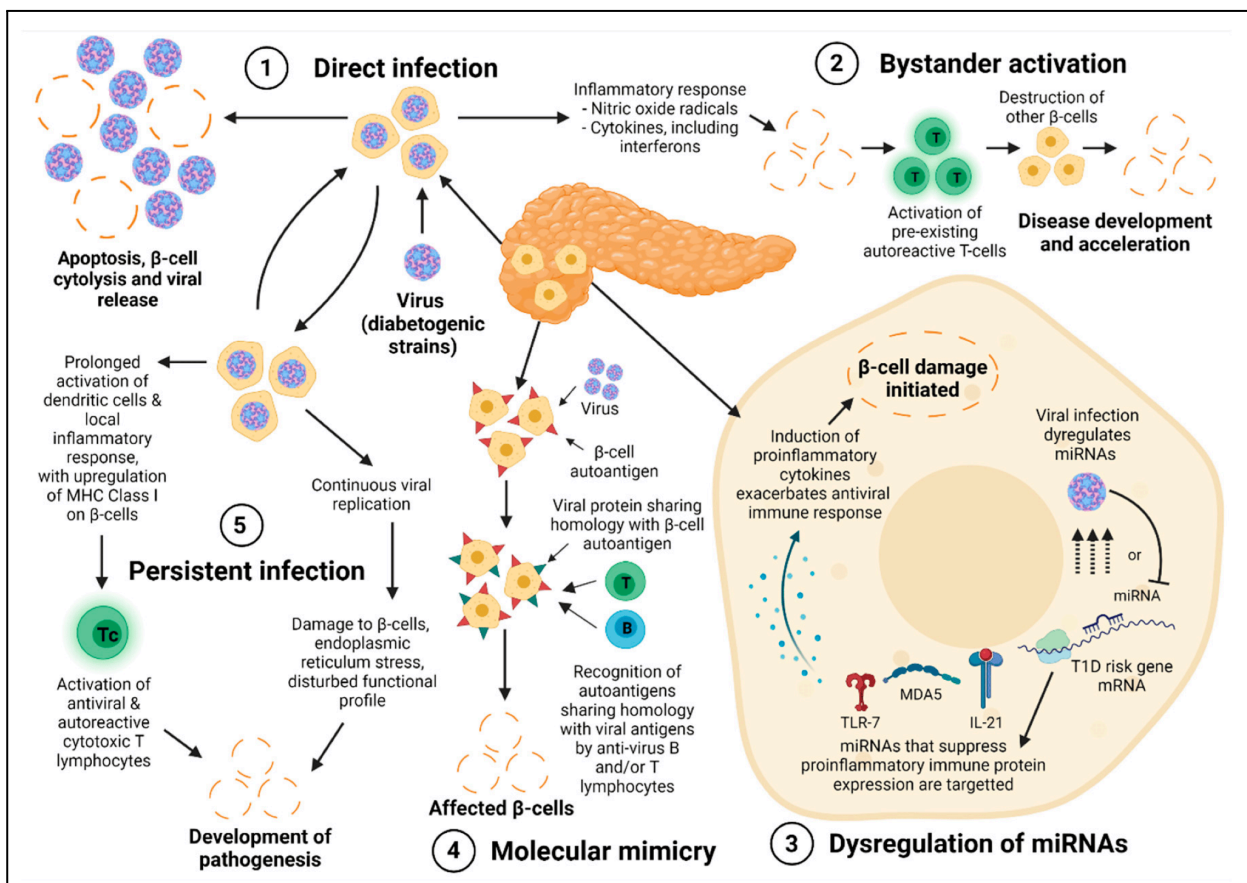
Οι ιντερλευκίνες, συμπεριλαμβανομένων των IL-2, IL-12, IL-1β και IL-6 ενισχύουν την ανοσοαπόκριση και διευκολύνουν τη στρατολόγηση των ανοσοκυττάρων στις νησίδες του παγκρέατος. Οι ιντερφερόνες, ιδιαίτερα η IFN-γ, μπορούν να παραχθούν από τα διηθητικά ανοσοκύτταρα. Η IFN-γ επάγει την απόπτωση των βήτα κυττάρων και συμβάλλει στο φλεγμονώδες περιβάλλον. Οι χημειοκίνες, προσελκύουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο σημείο της φλεγμονής και υποστηρίζουν την διήθηση αυτών στον ιστό.

Ο χρόνος εισαγωγής των στερεών τροφών και του αγελαδινού γάλακτος στη διατροφή ενός βρέφους εμπλέκεται στον κίνδυνο εμφάνισης Διαβήτη Τύπου 1. Η πρώιμη έκθεση σε διατροφικά αντιγόνα, ιδιαίτερα εκείνα που βρίσκονται στο αγελαδινό γάλα, κατά την κρίσιμη περίοδο μετάβασης από τον αποκλειστικό θηλασμό σε στερεές τροφές μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοση απόκριση σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος, συμπεριλαμβανομένης της βήτα-λακτοσφαιρίνης και της καζεΐνης, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εσφαλμένη αναγνώριση και απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αντίθετα, ο θηλασμός ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα, παρέχοντας βιοενεργά συστατικά όπως αντισώματα, ανοσοκύτταρα, λακτοφερρίνη και ολιγοσακχαρίτες που υποστηρίζουν την ανοσολογική ανοχή και την υγεία των β κυττάρων. Ο παρατεταμένος θηλασμός σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ΣΔ1, προσφέροντας διαρκή ανοσολογική υποστήριξη κατά την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι μητρικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της διατροφής κατά τον θηλασμό, συμβάλλουν επίσης, με τον θηλασμό να επηρεάζει θετικά την ορμονική και μεταβολική ισορροπία του βρέφους, δυνητικά μετριάζοντας τον κίνδυνο ΣΔ1.

Η έκθεση σε χημικούς παράγοντες, όπως ορισμένα φυτοφάρμακα και αγροχημικά που χρησιμοποιούνται στη γεωργία, έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ΣΔ1. Τα νιτρικά και τα νιτρώδη, που βρίσκονται σε λιπάσματα και επεξεργασμένα τρόφιμα, καθώς και χημικές ουσίες που διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα (EDCs), όπως η δισφαινόλη Α (BPA) και οι φθαλικές ενώσεις, μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία του παγκρέατος και τα βήτα κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη. Βιομηχανικοί ρύποι όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB) και οι διοξίνες μπορεί επίσης να αυξήσουν τον κίνδυνο T1D, ενδεχομένως μέσω της επιρροής τους στο ανοσοποιητικό σύστημα.

### 3.5 Οι εντεροϊοί ως αιτιολογικούς παράγοντας πρόκλησης ΣΔ1

Οι ιογενείς λοιμώξεις, ιδιαίτερα αυτές που προκαλούν οι εντεροϊοί, έχουν ενοχοποιηθεί ως πιθανοί παράγοντες πρόκλησης διαβήτη τύπου 1. Αυτοί οι ιοί, συμπεριλαμβανομένων των ιών coxsackie, παρουσιάζουν τροπισμό για το πάγκρεας, με άμεση κυτταροτοξική επίδραση στα βήτα κύτταρα. Η κυτταροτοξικότητα συμβάλλει στην αυτοάνοση απόκριση που παρατηρείται στο ΣΔ1. Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με τρεις βασικούς μηχανισμούς: άμεσες παθογόνες επιδράσεις σε μολυσμένα βήτα κύτταρα, έμμεσες επιδράσεις που προκύπτουν από αντιικές ανοσολογικές αποκρίσεις και πιθανή μίμηση επιτόπου που οδηγεί σε αυτοάνοσες αντιδράσεις.



**Εικόνα 20.** Πιθανοί μηχανισμοί για την πρόκληση αυτοανασίας από ιούς. (Isaacs, S.R.; Foskett, D.B.; Maxwell, A.J.; Ward, E.J.; Faulkner, C.L.; Luo, J.Y.X.; Rawlinson, W.D.; Craig, M.E.; Kim, K.W. Viruses and Type 1 Diabetes: From Enteroviruses to the Virome. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1519.)

Οι άμεσες και έμμεσες παθογόνες επιδράσεις της λοίμωξης από τον ιό Coxsackie B (CVB) επικεντρώνονται γύρω από την καταστροφή των β-κυττάρων. Στοχεύοντας αυτά τα κύτταρα, ο CVB εισέρχεται μέσω της δέσμευσης στην ειδική ισομορφή του υποδοχέα του ιού coxsackie και του αδενοϊού (CAR). Μόλις εισέλθει, ακολουθεί η αντιγραφή του ιού, αυξάνοντας το ιικό φορτίο και επάγοντας λύση των βήτα κυττάρων, οδηγώντας τα σε νέκρωση. Συγκεκριμένα, η παρουσία ενδιάμεσων δίκλωνων RNA (dsRNA) κατά τη διάρκεια της αντιγραφής CVB ενεργοποιεί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs), συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα 3 (TLR3), του γονιδίου I που επάγεται από το

ρετινοϊκό οξύ (RIG-I) και του MDA5/IFIH1, πυροδοτώντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, ιδίως ιντερφερονών τύπου I (IFN). Αυτό δημιουργεί ένα προφλεγμονώδες περιβάλλον, με τα βήτα κύτταρα να ανταποκρίνονται εκφράζοντας IFN για να περιορίσουν την αντιγραφή του ιού. Παραδόξως, αυτή η ανοσοαπόκριση ενισχύει επίσης την απόπτωση των λειτουργικών βήτα κυττάρων. Η λοίμωξη από CVB προκαλεί στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και ενεργοποιεί την απόκριση της ξεδιπλωμένης πρωτεΐνης (UPR), δυνητικά οδηγώντας σε απόπτωση λόγω επίμονου στρες. Επιπλέον, ο CVB διαταράσσει τη φυσαλιδώδη διακίνηση και την αυτοφαγία στα βήτα κύτταρα, επηρεάζοντας τη σύνθεση, την έκκριση και την αποθήκευση ινσουλίνης. Οι αλλαγές στα μονοπάτια επεξεργασίας και παρουσίας αντιγόνου αυξάνουν την ορατότητα των β-κυττάρων σε CD8+ T κύτταρα.

Η μίμηση επιτόπου στο πλαίσιο της λοίμωξης από τον ιό Coxsackie B (CVB) και του ΣΔ1 υπογραμμίζει την ύπαρξη δομικής ομοιότητας μεταξύ ιικών συστατικών και αυτο-αντιγόνων, ιδιαίτερα εκείνων που βρίσκονται στα βήτα κύτταρα. Αυτό το φαινόμενο υποδηλώνει ότι η ανοσολογική απόκριση, που αρχικά στρεφόταν κατά του ιού, μπορεί να στοχεύει εσφαλμένα τα βήτα κύτταρα λόγω κοινών δομικών χαρακτηριστικών. Αυτό αποκτά σημασία ιδιαίτερα σε ευάλωτες περιόδους, όπως οι ιογενείς λοιμώξεις της πρώιμης παιδικής ηλικίας, όπου η μίμηση του επιτόπου μπορεί να διαταράξει τους μηχανισμούς ανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος, με συνέπεια την πρόκληση ΣΔ1.

## Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### A. Επιλογή δειγμάτων - Προστασία δεδομένων

Τριάντα δύο κορίτσια που διαγνώστηκαν πρόσφατα με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1 (ΣΔ1) και τριάντα υγιή, έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη. Ελήφθησαν δείγματα μαλλιών από την οπίσθια κορυφή του τριχωτού της κεφαλής χρησιμοποιώντας ψαλίδι, κόβοντας όσο το δυνατόν πιο κοντά στη ρίζα της τρίχας. Για το πιλοτικό πείραμα, απομονώθηκαν πρωτεΐνες προκαταρκτικά για 36 δείγματα, που περιελάμβαναν 3 κορίτσια με ΣΔ1 και 3 υγιή. Κάθε τρίχα, κόπηκε σε έξι (6) μικρότερα τμήματα, καθένα από τα οποία έχει μήκος ένα (1) εκατοστό.

Τα κριτήρια επιλογής, περιλαμβάνουν την εύρεση ατόμων που διαγνώστηκαν με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1, υγιή άτομα χωρίς εμφάνιση της νόσου, που αποτελούν τον πληθυσμό ελέγχου και διαθεσιμότητα ιστορικού για καταγραφή κλινικών δεδομένων. Είναι σημαντικό, να μην προυπάρχουν ιατρικές καταστάσεις ή θεραπείες που μπορεί να επηρεάσουν τους στόχους της μελέτης, όπως για παράδειγμα προηγούμενο ιστορικό σημαντικών διαταραχών του τριχωτού της κεφαλής.

Η έρευνα που περιγράφεται στην παρούσα πτυχιακή εργασία έχει εγκριθεί από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου Παίδων “Η Αγία Σοφία” και έχει λάβει αριθμό πρωτοκόλλου 16828/07.09.2021.

### B. Εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια

Για την απομόνωση των πεπτιδίων από τα δείγματα τρίχας, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά.

- a. Ethanol (ET-OH) gradient for HPLC από την εταιρεία Honeywell. Διάλυμα καθαρής αιθανόλης (100%), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή διαλύματος 80% αιθανόλης μετά από αραίωση με απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O). Αυτά τα δύο διαλύματα συμβάλλουν στη δέσμευση των πρωτεϊνών στα μαγνητικά σφαιρίδια.
- b. Acetonitrile gradient for HPLC από την εταιρεία Honeywell. Το ακετονιτρίλιο χρησιμοποιείται για την δέσμευση των πεπτιδίων στα μαγνητικά σφαιρίδια στη 2η μέρα εφαρμογής του πρωτοκόλλου SP3 και ως διαλύτης για την κινητή φάση κατά την ανίχνευση των πεπτιδίων με τη μεθοδολογία LC - MS.
- c. Water LC-MS Grade από την εταιρεία Honeywell. Απιονισμένο νερό για την παρασκευή διαλυμάτων και την εκχύλιση των πεπτιδίων στο τελευταίο στάδιο του πρωτοκόλλου Sp3.
- d. MagReSyn Carboxyl από την εταιρεία Resyn Biosciences. Το συγκεκριμένο αναλώσιμο αποτελεί ένα μαγνητικό πολυμερικό στήριγμα μικροσωματιδίων σχεδιασμένο για ομοιοπολική ακινητοποίηση συνδετών που περιέχουν

- πρωτοταγή αμίνη, όπως οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια. Περιλαμβάνει τη χρήση δύο διαφορετικών πυκνών αρχικών διαλυμάτων (beads 1 - beads 2 solution), από τα οποία χρειάζονται 100μL. Ακολουθούν δύο βήματα πλυσίματος των μαγνητικών σφαιριδίων με 1000 μL dH<sub>2</sub>O και τελικά αραίωση τους με 800μL dH<sub>2</sub>O για τη παρασκευή του τελικού διαλύματος ( 1000 μL).
- e. Trypsin/Lys-C Protease Mix. Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση που διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς ειδικά στο καρβοξυλικό άκρο (-COOH) των καταλοίπων λυσίνης (K) και αργινίνης (R), εκτός εάν κάποιο από αυτά ακολουθείται από το αμινοξύ προλίνη (P). Η rLysC είναι μια άλλη πρωτεάση που διασπά ειδικά τους πεπτιδικούς δεσμούς στην καρβοξυλική πλευρά των καταλοίπων λυσίνης (K), με τη διαφορά ότι σε σχέση με τη θρυψίνη, καταλύει τη διάσπαση δεσμού ανεξάρτητα από τη παρουσία προλίνης. Τα πεπτίδια που σχηματίζονται έχουν μήκος 7 έως 30 αμινοξέα.
  - f. Glu-C Endoproteinase. Το Glu-C είναι μια ενδοπρωτεϊνάση που διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυλικό άκρο των καταλοίπων γλουταμικού οξέος (E). Χρησιμοποιήθηκε για την πέψη πρωτεϊνών με στόχο την εύρεση του πεπτιδίου C.
  - g. PepSep C18 25cm X 75μm, 1.9μm. Στήλη υγρής χρωματογραφίας (LC) αντίστροφης φάσης, για τον διαχωρισμό των πεπτιδίων κατά την ανάλυση LC-MS.
  - h. DTT. Αναγωγικός παράγοντας που χρησιμεύει για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες.
  - i. TEAB. Χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικός παράγοντας στα πρωτόκολλα εκχύλισης και πέψης πρωτεϊνών.
  - j. IAA, Χρησιμοποιείται για την τροποποίηση ομάδων θειόλης (-SH) καταλοίπων κυστεΐνης στις πρωτεΐνες. Σε συνδυασμό με το DTT αποτρέπουν τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Η χρήση του πρέπει να γίνεται σε σκοτεινό μέρος, καθώς αποτελεί φωτοευαίσθητη ουσία.

## Γ. Αναλυτική περιγραφή πειράματος

### Ημέρα 1 πειραματικού πρωτοκόλλου

Κατά την έναρξη του πιλοτικού πειράματος έγινε κοπή με ψαλίδι της τρίχας των 6 κοριτσιών, σε τμήματα μήκους ένα (1) εκατοστό. Οι αρχικές ίνες τρίχας, διέθεταν συνολικό μήκος έξι (6) εκατοστά, οπότε προκύπτουν 36 δείγματα. Κάθε τμήμα ενός εκατοστού τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό eppendorf. Επειτα, έγινε παρασκευή διαλύματος Lysis buffer, για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και την εξαγωγή κυτταρικών συστατικών, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και οργανίδια. Για τη δημιουργία ενός (1)mL διαλύματος λύσης, χρειάζονται 100μL DTT (1M), 100μL Trypsin/TEAB (1M), 400μL SDS (10%) και 400μL dH<sub>2</sub>O. Δεδομένου ότι σε κάθε eppendorf πρέπει να προστεθούν 100μL, ο τελικός όγκος του διαλύματος, το οποίο φτιάχτηκε σε περίσσεια, ήταν 4mL.



Μετά την προσθήκη του διαλύματος λύσης σε κάθε erpendorf, ακολούθησε θέρμανση στους 99°C για 5 λεπτά με τη χρήση ThermoMixer και επώαση στο σύστημα παραγωγής υπερήχων (sonicator), για άλλα 15 λεπτά. Τα βήματα αυτά επαναλήφθηκαν και δεύτερη φορά. Η υψηλή θερμοκρασία αυξάνει τη δραστηριότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων που υπάρχουν στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, προάγοντας τη διάσπαση των κυτταρικών δομών και διευκολύνοντας τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών. Η υπερήχηση περιλαμβάνει τη χρήση ηχητικών κυμάτων υψηλής συχνότητας για τη μηχανική διάσπαση κυττάρων και ιστών. Η υπερήχηση βοηθά στη διείσδυση του διαλύματος λύσης στο δείγμα, εξασφαλίζοντας πλήρη κάλυψη και αλληλεπίδραση με τα ενδοκυτταρικά συστατικά.

Στο τέλος της παραπάνω διαδικασίας οι πρωτεΐνες έχουν εισέλθει στο διάλυμα. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την απομόνωση τους από τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος λύσης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (17.000g) για 15 λεπτά, με στόχο την απομάκρυνση των πιο πυκνών προσμίξεων και την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο υπερκείμενο. Έπειτα, όγκος ίσος με 70  $\mu\text{L}$  από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf. Σ αυτό προστέθηκαν 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων και 80  $\mu\text{L}$  αιθανόλης 100%. Ακολουθεί ανάδευση κάθε erpendorf με το σύστημα vortex και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά την επώαση, οι πρωτεΐνες έχουν αλληλεπιδράσει και δεσμευτεί από τα καρβοξυλιωμένα μαγνητικά σφαιρίδια. Κάθε erpendorf τοποθετείται σε μαγνητικό στατώ, όπου τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται και ο οργανικός διαλύτης (αιθανόλη) μπορεί να αφαιρεθεί, ενώ οι πρωτεΐνες παραμένουν άθικτες πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια. Έπειτα, γίνεται πλύση των σφαιριδίων με 80% αιθανόλη, προκειμένου να απομακρυνθούν διάφορες προσμίξεις οι οποίες δεν αφαιρέθηκαν με την φυγοκέντρηση. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Μετά το τελευταίο στάδιο πλουσίματος γίνεται προσθήκη 30  $\mu\text{L}$  IAA σε κάθε erpendorf, ανάδευση με vortex για επαναδιαλυτοποίηση του συστήματος μαγνητικών σφαιριδίων - πρωτεϊνών και επώαση σε σκοτεινό μέρος για 15 λεπτά.

Πλέον οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μειωμένη κατάσταση και ελεύθερες στο υπερκείμενο, όποτε χρειάζεται προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη για να μεσολαβήσει την δέσμευσή τους στα μαγνητικά σφαιρίδια ξανά. Χρησιμοποιείται ACN (200  $\mu\text{L}$  σε κάθε erpendorf) και ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά. Το τελικό βήμα για την πρώτη μέρα του πειράματος περιλαμβάνει την ενζυμική πέψη των πρωτεϊνών. Με το μαγνητικό στατώ αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 30  $\mu\text{L}$  Trypsin/rLysC buffer. Προκειμένου να δράσει σωστά το ένζυμο κάθε erpendorf επωάζεται στους 37°C μέχρι την επόμενη μέρα, καθώς παράλληλα αναδεύεται.

## Ημέρα 2 πειραματικού πρωτοκόλλου

Κατά την έναρξη της δεύτερης μέρας τα επωαζόμενα δείγματα αφαιρούνται, υφίστανται φυγοκέντρηση (17.000g) για 5 λεπτά και υπερήχηση για άλλα 2 λεπτά, με στόχο να αποδεσμευτούν πλήρως από τα μαγνητικά σφαιρίδια τα πεπτίδια που έχουν προκύψει από τη πέψη. Έπειτα, μέσω του μαγνητικού στατώ αφαιρείται το υπερκείμενο (30μL) αλλά δεν απορρίπτεται και μεταφέρεται σε νέο erpendorf. Σε αυτό προστίθενται 1 mL ACN και 20 μL beads και το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι τα πεπτίδια έχουν δεσμευτεί στα σφαιρίδια. Εφαρμόζονται δύο στάδια πλουσίματος με ACN με τη χρήση του ειδικού στατώ, για την απομάκρυνση υπολειμμάτων από τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν στο τέλος της πρώτης ημέρας.

Μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου από το τελευταίο στάδιο πλουσίματος, προστίθενται 100 μL dH<sub>2</sub>O. Το νερό αποδεσμεύει τα πεπτίδια από τα μαγνητικά σφαιρίδια και τα αφήνει ελεύθερα στο διάλυμα. Ακολουθεί αναδευση στο Vortex και ξανά με τη χρήση μαγνητικού στατώ απομακρύνουμε τα 100μL που περιέχουν πλέον τα πεπτίδια σε ειδικό δοχείο, για φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο κενού αέρος, μέχρι το νερό να εξατμιστεί.

Μετά την εξάτμιση προστίθενται 15 μL buffer A (80% ACN) και ακολουθεί υπερήχηση για 5 λεπτά ώστε τα πεπτίδια που έχουν κολλήσει στα τοιχώματα να βρεθούν όλα στο διάλυμα. Από τα 15 μL χρησιμοποιούνται 2 μL για έλεγχο της συγκέντρωσης των πεπτιδίων με το σύστημα Nanodrop. Εφόσον η συγκέντρωση επιβεβαιώνει την ύπαρξη μετρήσιμης ποσότητας πεπτιδίων, τα υπόλοιπα 13 μL χρησιμοποιούνται για ανάλυση στον φασματογράφο μάζας.

Ο φασματογράφος θα ανιχνεύσει όλα τα υπάρχοντα πεπτίδια και στη συνέχεια με τη χρήση ειδικών λογισμικών (DIA-NN και Perseus), σχηματίζονται οι πληροφορίες για τις πρωτεΐνες που τελικά εντοπίζονται στο στέλεχος της τρίχας.

Για την ανίχνευση του πεπτιδίου C, χρησιμοποιήθηκε ακριβώς το ίδιο πρωτόκολλο με τη μόνη διαφορά, ότι αντί για το ένζυμο Try στο δείγμα προστέθηκε το Glu-C. Η αλληλουχία του πεπτιδίου C είναι EAEDPQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ και δεν πέπτει από την θρυψίνη αφού δεν ανευρίσκονται αμινοξέα K και R.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Σκοπός διπλωματικής εργασίας

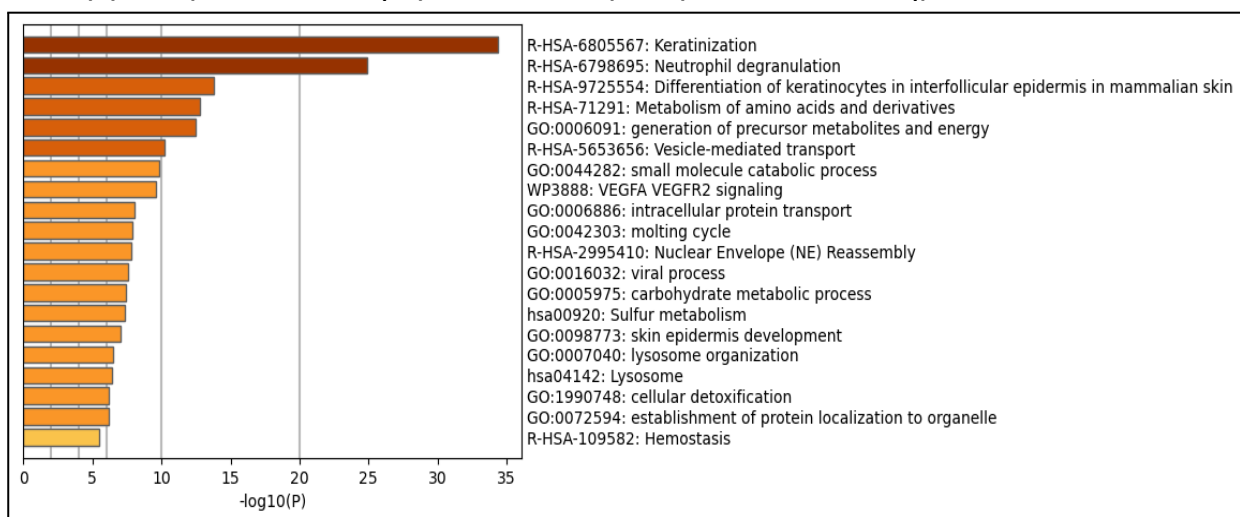
Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας, αποτελεί η διερεύνηση των πρωτεϊνών της τρίχας σε ασθενείς με ΣΔ1, μέσω εφαρμογής του πρωτοκόλλου απομόνωσης πρωτεϊνών SP3 σε συνδυασμό με την αναλυτική τεχνική φασματομετρίας μάζας, με

στόχο να χρησιμεύσουν ως πιθανοί βιοδείκτες που αντανakλούν αλλαγές που σχετίζονται με τη νόσο. Στο πλαίσιο της αυτοάνοσης διαταραχής του διαβήτη τύπου 1, με την ανάλυση του πρωτεώματος της τρίχας, επιδιώκεται ο εντοπισμός πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ανοσολογική ενεργοποίηση, τη φλεγμονή και άλλα μοριακά συμβάντα που συνδέονται με τις αυτοάνοσες αποκρίσεις. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια εντοπισμού του πεπτιδίου C, με στόχο την επιβεβαίωση της ύπαρξης ή μη ενεργής έκκρισης ινσουλίνης.

## 2. Ανάλυση ευρημάτων

Μόλις ολοκληρώθηκε η ανάλυση των δειγμάτων στον φασματογράφο μάζας, δημιουργήθηκαν αρχεία ακατέργαστων δεδομένων που περιείχαν φασματικές πληροφορίες. Συγκεκριμένα, για κάθε πεπτιδίο που ανιχνεύτηκε, καταγράφηκε η έντασή του και σχηματίστηκε ένα φάσμα μάζας. Έπειτα, οι εντάσεις των πεπτιδίων αντιστοιχίστηκαν με δεδομένα γνωστών πεπτιδίων από ήδη υπάρχουσες βιβλιοθήκες φασμάτων. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν ένα αρχείο της μορφής .txt και περιελάμβανε εντάσεις πεπτιδίου/πρωτεΐνης, ταυτοποιήσεις και άλλες σχετικές μετρήσεις.

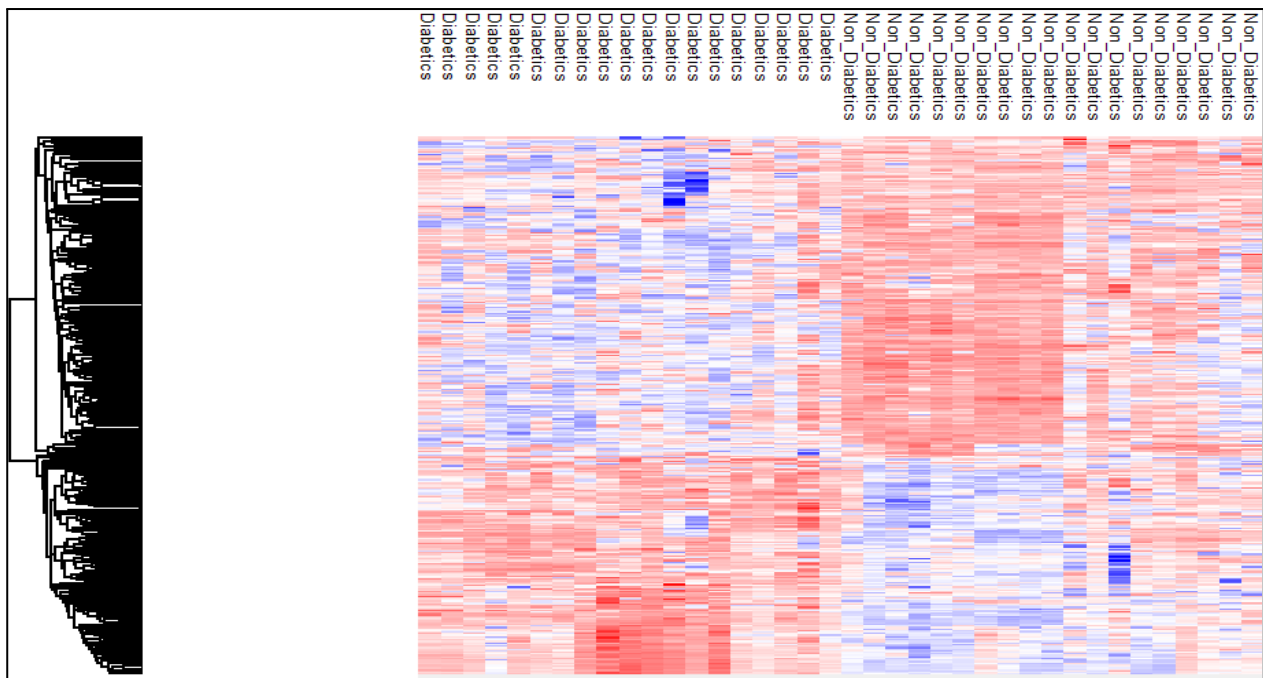
Εισάγοντας το αρχείο αυτό στο λογισμικό Perseus, επιβεβαιώνεται η ανίχνευση 1.799 μοναδικών πρωτεϊνών. Από αυτές, μόνο οι 346 εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα, δηλαδή διαφορετικά επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στα διαβητικά και φυσιολογικά κορίτσια. Πραγματοποιώντας enrichment analysis (ανάλυση εμπλουτισμού) με τη χρήση του λογισμικού Metascape (εικόνα 21), με στόχο τον προσδιορισμό βιολογικών λειτουργιών, μονοπατιών ή όρων που υπερεκπροσωπούνται σημαντικά από το σύνολο



**Εικόνα 21.** Γράφημα ράβδων των 346 στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών.

των 346 πρωτεϊνών, λαμβάνουμε ποικίλες βιολογικές λειτουργίες, με τις περισσότερες να σχετίζονται με την κερατινοποίηση, τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα, την ανοσολογική απόκριση και με οδούς ιογενούς μόλυνσης.

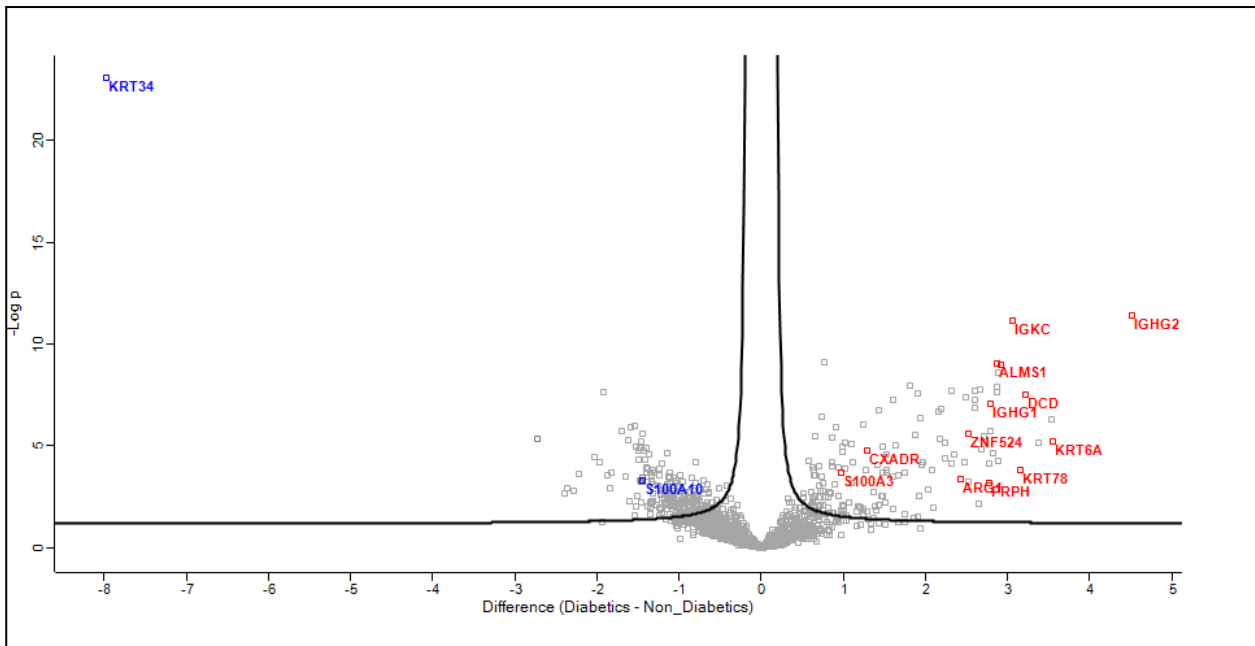
Οι διαφορές στην έκφραση και συγκεκριμένα η αύξηση ή η μείωση των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο πληθυσμών, παρουσιάζονται στην εικόνα 22.



**Εικόνα 22.** Θερμικός χάρτης των 346 στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται πρωτεΐνες με χαμηλή έκφραση, ενώ με κόκκινο πρωτεΐνες και υψηλή έκφραση.

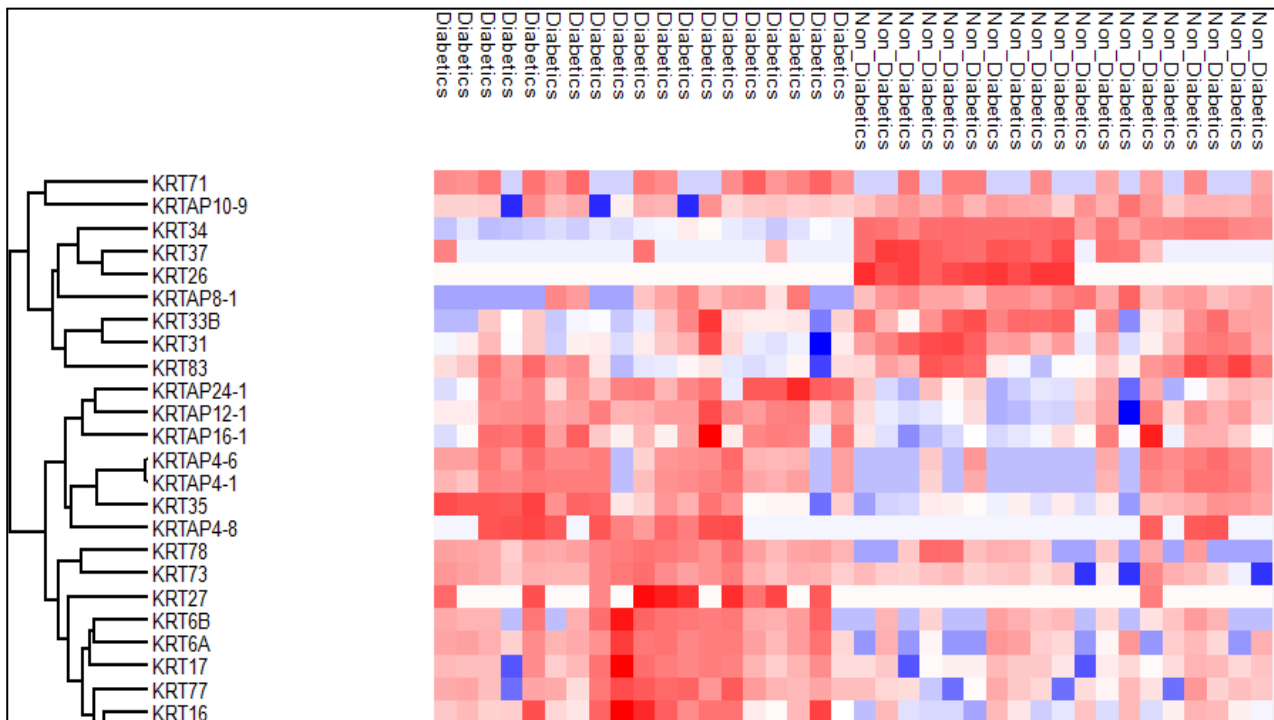
Προκειμένου να εντοπιστούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με το Διαβήτη τύπου 1, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο λογισμικό για τη δημιουργία ενός Volcano plot. Αναζητώντας πρωτεΐνες με τη λέξη κλειδί “Diabetes”, λαμβάνουμε τις πρωτεΐνες που απεικονίζονται στην εικόνα 24.

Απο τις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά διαφορετική έκφραση μεταξύ των διαβητικών και μη διαβητικών ατόμων και παράλληλα μπορούν να συσχετιστούν με την ανάπτυξη του ΣΔ1 ξεχωρίζουν οι κερατίνες, η ALMS-1, ο CXADR, οι πρωτεΐνες της οικογένειας S100A, η ARG-1, η περιφερίνη (PRPH), η DMRT2, και οι ανοσοσφαιρίνες.



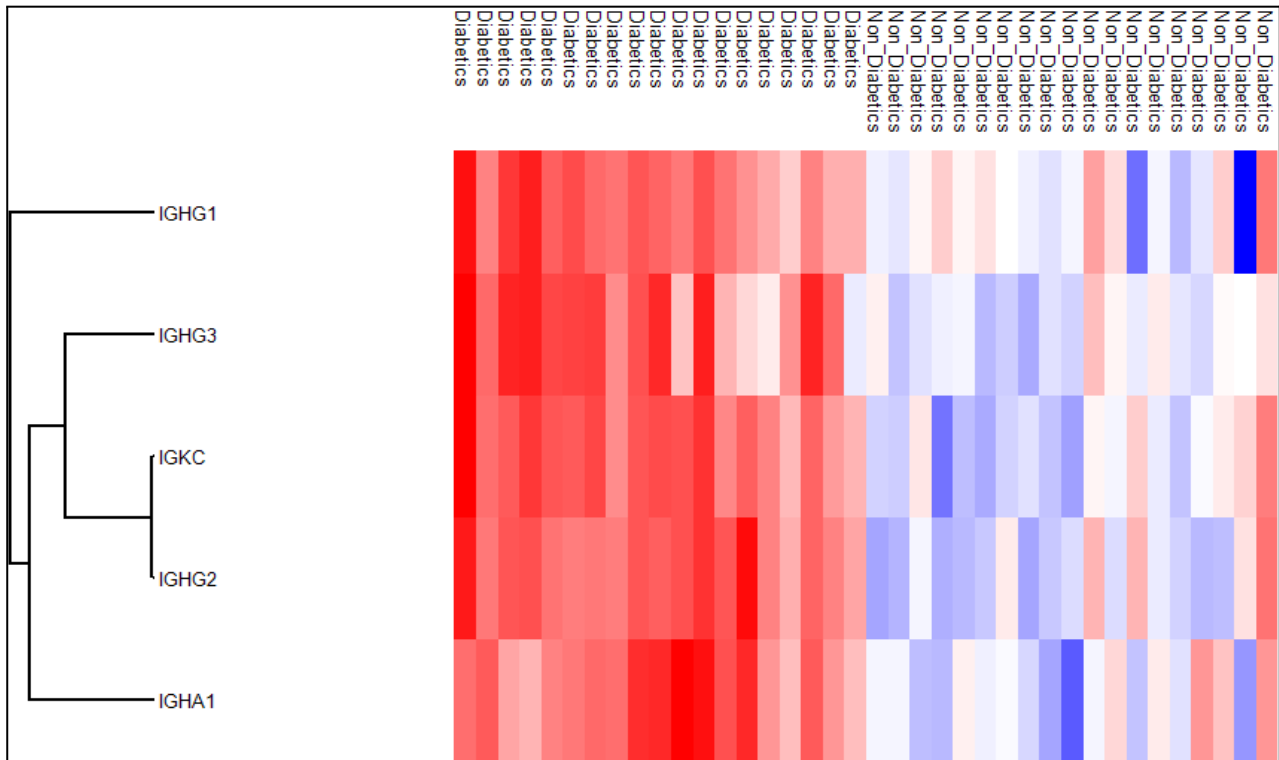
**Εικόνα 23.** Volcano Plot. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στα δεξιά του διαγράμματος έχουν αυξημένη έκφραση στα διαβητικά άτομα και αυτές που βρίσκονται αριστερά χαμηλότερη, σε σύγκριση με τα μη διαβητικά άτομα.

Η εύρεση της κερατινοποίησης, στο σύνολο των δεδομένων, επιβεβαιώνει την παρουσία κερατίνης και πρωτεϊνών που σχετίζονται με κερατίνη (KAPs), πράγμα που επικυρώνει την πειραματική προσέγγιση, καθώς πραγματοποιήθηκε επιτυχής απομόνωση και εντοπισμός των πιο βασικών δομικών συστατικών των τριχών. Επιπλέον, παρατηρείται διαφορετική έκφραση κερατίνης μεταξύ των διαβητικών και μη διαβητικών ατόμων.



**Εικόνα 24.** Θερμικός χάρτης που απεικονίζει τις διαφορές στην έκφραση των κερατινών και των σχετιζόμενων με κερατίνη πρωτεϊνών.

Η αυξημένη έκφραση ανοσοσφαιρινών στα διαβητικά άτομα υποδηλώνει πιθανότατα μια ενεργή ανοσοαπόκριση. Μάλιστα αυτή εμφανίζεται καθόλη τη διάρκεια των έξι μηνών, πράγμα που ίσως να υποδεικνύει συνεχιζόμενη ανοσοποιητική δραστηριότητα και φλεγμονή, χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στην εξέλιξη της νόσου του ΣΔ1.



**Εικόνα 25.** Θερμικός χάρτης όπου αναπαρίστανται η σημαντικά αυξημένη έκφραση ανοσοσφαιρινών στα διαβητικά άτομα.

Το πεπτιδίο C στο παρόν πείραμα δεν ανιχνεύτηκε στα μη διαβητικά άτομα, πράγμα που μπορεί να οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων, όπως η χαμηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης ή σε κάποιο σφάλμα κατά την διενέργεια του πειράματος. Δεδομένου ότι το δείγμα είναι μικρό για να εξαγάγουμε συμπεράσματα για τον ευρύτερο πληθυσμό, συνίσταται η επανάληψη του συγκεκριμένου πειράματος με επαρκή αριθμό δειγμάτων, με στόχο την αποσαφήνιση της ύπαρξης ή μη του πεπτιδίου C στη τρίχα του ανθρώπου.

### 3. Συζήτηση

Οι κερατίνες εκτός απο δομικό συστατικό της τρίχας, συμβάλλουν στο σχηματισμό του κυτταροσκελετού των κυττάρων. Μελέτες, έχουν συσχετίσει αρκετές πρωτεΐνες κερατίνης με παθολογικές καταστάσεις, όπως ο ΣΔ1. Οι κερατίνες ενδιάμεσου νήματος, όπως η κερατίνη 8 (K8), είναι αναπόσπαστο κομμάτι της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος, επηρεάζοντας τη ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα, τη στόχευση πρωτεϊνών, τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και την περιεκτικότητα σε ινσουλίνη (C.M. ALAM et.al. 2018). Τα μειωμένα επίπεδα K8 αυξάνουν την ευαισθησία στον διαβήτη, υπογραμμίζοντας τη σημασία των κερατινών στις αποκρίσεις στρες των β-κυττάρων και στη συνολική υγεία του παγκρέατος. Ταυτόχρονα υπάρχουν ευρήματα, όπου αναφέρουν αυξημένη έκφραση άλλων κερατινών όπως η K7 (Alam, C.M. et.al. 2022). Πιθανώς η υπερέκφραση ορισμένων κερατινών να αποτελεί απόκριση στο στρες των β-κυττάρων, υποδηλώνοντας προστατευτικό ρόλο κατά της ανάπτυξης διαβήτη. Ωστόσο, δεν υπάρχει άμεση απόδειξη που να συνδέει τις K34, K6A και K78, που ανιχνεύτηκαν στο παρόν πείραμα, με αυτές τις διεργασίες στα β-κύτταρα. Δεδομένου ότι αρκετές κερατίνες επηρεάζουν την ανθεκτικότητα των β-κυττάρων και την εξέλιξη του διαβήτη, είναι εύλογο ότι και άλλες πιθανότατα να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νόσου. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο οι αλλαγές στην έκφραση κερατινών στα β-κύτταρα μπορεί να αποτυπώνονται στην έκφραση αυτών στη τρίχα. Ίσως, οι συστηματικές επιδράσεις του διαβήτη (φλεγμονή, ορμονικές αλλαγές, μεταβολικές διαταραχές) να επηρεάζουν έμμεσα την έκφραση της κερατίνης στη τρίχα. Επομένως, απαιτείται περισσότερη έρευνα για να προσδιοριστεί ο ειδικός ρόλος του κερατινών που εντοπίστηκαν, στη λειτουργία των β-κυττάρων και η πιθανή εμπλοκή τους στο διαβήτη.

Οι ανοσοσφαιρίνες, ως βασικά συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, διεκπεραιώνουν τον εντοπισμό και την εξουδετέρωση των παθογόνων. Η υπερέκφραση των IgA και IgG που παρατηρείται στα διαβητικά κορίτσια, θα μπορούσε να υποδεικνύει μια υποκείμενη χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση, ένα κοινό χαρακτηριστικό του διαβήτη (Ardawi et.al.). Τα αυξημένα επίπεδα ακόμη θα μπορούσαν να είναι μια αντισταθμιστική απάντηση στο αυξημένο οξειδωτικό στρες και τη κυτταρική βλάβη λόγω των υψηλών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια αυτής της ανοσοαπόκρισης μπορούν να διαταράξουν τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, αλλάζοντας ενδεχομένως την έκφραση δομικών πρωτεϊνών όπως οι κερατίνες.

Ο ιός Coxsackie, όπως προαναφέρθηκε έχει συσχετιστεί με την προσβολή των β-κυττάρων του παγκρέατος και την πρόκληση ΣΔ1. Η αυξημένη έκφραση του CXADR μόνο στα διαβητικά άτομα, επιβεβαιώνει την μόλυνση απο τον ιό και ενισχύει τις επικρατούσες θεωρίες και πειράματα που προτείνουν τον Coxsackie ως αιτιολογικό παράγοντα ΣΔ1. Τα αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα πιθανώς, αυξάνουν την



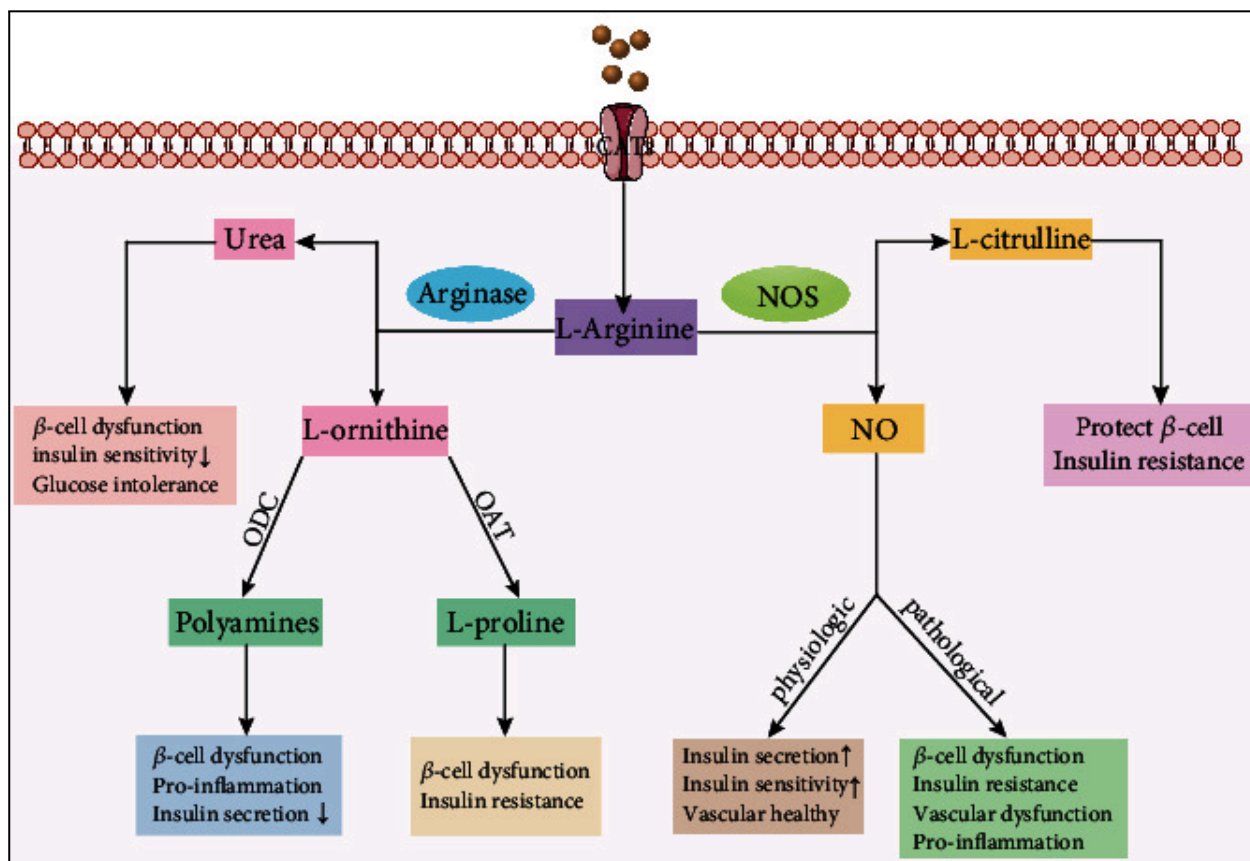
ευαισθησία των β-κυττάρων σε λοίμωξη από CVB, οδηγώντας δυνητικά σε αυξημένο θάνατο βήτα κυττάρων είτε άμεσα μέσω ιικής κυτταροτοξικότητας είτε έμμεσα μέσω μηχανισμών που διαμεσολαβούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Αν και ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών της οικογένειας S100A στην παθογένεια του ΣΔ1 δεν είναι πλήρως κατανοητός, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την συμβολή τους στην εξέλιξη της νόσου. Η κύρια λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών είναι η δέσμευση του ασβεστίου. Ωστόσο έχουν συσχετιστεί και με τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της απόπτωσης και της φλεγμονής μέσω αλληλεπιδράσεων με μια ποικιλία πρωτεϊνών-στόχων, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων, κυτταροσκελετικών υπομονάδων, υποδοχέων και παραγόντων μεταγραφής. Με βάση τους Zimmer DB et.al., ο διαβήτης τύπου 1 προκαλεί ανομοιόμορφα αποτελέσματα στην έκφραση των S100A στους διάφορους ιστούς. Σε μερικούς αυξάνει σημαντικά μέχρι και στο διπλάσιο της φυσιολογικής τους έκφρασης ενώ σε άλλους παρατηρείται μείωση της σύνθεσής τους. Επιπρόσθετα, παρουσιάζονται αλλαγές και στις λειτουργικές τους αλληλεπιδράσεις εντός των κυττάρων. Στη τρίχα των διαβητικών κοριτσιών, εντοπίστηκε αυξημένη έκφραση των S100A3, S100A6, S100A9 και S100A11 και μείωση σύνθεσης S100A10. Παρα την ελλιπή βιβλιογραφία, για τους μοριακούς μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκονται οι S100A στο πλαίσιο του ΣΔ1, από τα αποτελέσματα του πειράματος διαπιστώνεται η συσχέτιση τους και αποτελεί σημείο αναφοράς για μελλοντική έρευνα.

Η πρωτεΐνη ALMS-1 αποτελεί βασικό συστατικό των κεντροσωμάτων και των βλεφαρίδων των κυττάρων αλλά εμπλέκεται και σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η μεταφορά μορίων, όπως η γλυκόζη (May Sanyouga et.al 2013). Ειδικότερα, μεταλλάξεις στο γονίδιο που τη κωδικοποιεί μπορούν να οδηγήσουν σε δυσλειτουργικές βλεφαρίδες με αποτέλεσμα την μη ομαλή λειτουργία των παγκρεατικών β-κυττάρων, την ανεπαρκή παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης συμβάλλοντας στην ανάπτυξη διαβήτη. Ακόμη, η αυξημένη συγκέντρωση σακχάρου που παρατηρείται στον ΣΔ1 και το μεταβολικό στρες, μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικές αποκρίσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία των βλεφαρίδων. Η αυξημένη έκφραση της ALMS-1, θα μπορούσε να είναι μια προσαρμοστική απόκριση για τη διατήρηση της κυτταρικής λειτουργίας και την εξουδετέρωση του μεταβολικού στρες.

Η αργινάση 1 (ARG1) είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στον κύκλο της ουρίας, μια μεταβολική οδό που μετατρέπει την αμμωνία σε ουρία, η οποία στη συνέχεια μπορεί να αποβληθεί από το σώμα. Συγκεκριμένα, η ARG1 καταλύει την υδρόλυση της L-αργινίνης σε L-ορνιθίνη και σε ουρία (Ren Y et.al.). Οι φυσιολογικές λειτουργίες της περιλαμβάνουν την αποτοξίνωση του οργανισμού, τη ρύθμιση των επιπέδων L-αργινίνης που εμπλέκεται σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες, τη παραγωγή πολυαμινών, οι οποίες είναι χρήσιμες για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων και τη ρύθμιση των επιπέδων του μονοξειδίου του αζώτου (NO).

Η υπερέκφρασή της έχει τόσο θετικά όσο και αρνητικά αποτελέσματα, ανάλογα με το συγκεκριμένο ιστό και τις εμπλεκόμενες οδούς. Στα μακροφάγα αναστέλλει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, οι οποίες μπορεί να είναι ευεργετικές στη μείωση της χρόνιας φλεγμονής που σχετίζεται με τον διαβήτη. Εμμεσα, ίσως συμβάλλει μέσω της ελεγχόμενης μειωμένης έκφρασής της, στην προστασία των β-κυττάρων μέσω παραγωγής NO και L-κιτρουλίνης από την συνθάση του νιτρικού οξειδίου (NOS).



**Εικόνα 26.** Μεταβολισμός της L-αργινίνης από την ARG-1 και την NOS και οι επιπτώσεις των προϊόντων στην λειτουργία των β-κυττάρων. (Ren Y, Li Z, Li W, Fan X, Han F, Huang Y, Yu Y, Qian L, Xiong Y. Arginase: Biological and Therapeutic Implications in Diabetes Mellitus and Its Complications. Oxid Med Cell Longev. 2022 Oct)

Η αργινάση 1 ανταγωνίζεται την συνθάση του νιτρικού οξειδίου για το κοινό τους υπόστρωμα, την L-αργινίνη. Η μη ελεγχόμενη αύξηση ARG1 προκαλεί τη μη δέσμευση της ενδοθηλιακής NOS (e-NOS) στο υπόστρωμα L-αργινίνη, που περιορίζει την παραγωγή NO και ενισχύει την παραγωγή ROS, με αποτέλεσμα διαβητική αγγειακή δυσλειτουργία (Beleznai T et.al.). Επιπρόσθετα, τα αυξημένα επίπεδα μπορούν να προάγουν τη δυσλειτουργία των β-κυττάρων μέσω του μεταβολισμού των πολυαμινών.

Όταν τα β-κύτταρα εκτίθενται σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-1 και η IFN-γ, η έκφραση της NOS αυξάνεται. Τα υψηλά επίπεδα NO μπορεί να οδηγήσουν σε νιτροζωτικό στρες, το οποίο βλάπτει τα κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των β-κυττάρων και την απόπτωση. Η ARG-1 ανταγωνίζεται τη NOS για την L-αργινίνη,

μειώνοντας τη διαθεσιμότητα αυτού του υποστρώματος για παραγωγή NO. Ωστόσο, σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, η ανοδική ρύθμιση της ARG1 μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία στο μεταβολισμό της L-αργινίνης, καθώς το φλεγμονώδες περιβάλλον συνήθως οδηγεί σε καθαρή αύξηση της παραγωγής NO λόγω της επίμονης επαγωγής iNOS.

Συνολικά, ενώ η ανοδική ρύθμιση του ARG1 έχει κάποιους προστατευτικούς ρόλους, η συνολική επίδρασή της στο πλαίσιο του διαβήτη είναι σε μεγάλο βαθμό αρνητική. Η ενσωμάτωση της πρωτεΐνης στη τρίχα, πιθανότατα να πραγματοποιείται μέσω υπερέκφρασης της στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων από τα οποία μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, φτάνει στα τριχοειδή των τριχοθυλακίων και εγκαθίσταται στον άξονα της αναπτυσσόμενης τρίχας.

Η περιφερίνη (PRPH) είναι μια πρωτεΐνη ενδιάμεσου νήματος, που βρίσκεται κυρίως στους νευρώνες του περιφερικού νευρικού συστήματος. Ανήκει στην ίδια οικογένεια πρωτεϊνών με τα νευροϊνίδια και τη βιμεντίνη. Εμπλέκεται στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των νευρώνων και σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αξονικής μεταφοράς και της ανάπτυξης νευριτών. Οι Boitard C et.al, σε πειράματά τους ανίχνευσαν την περιφερίνη και σε κύτταρα που εκκρίνουν ινσουλίνη. Οι Todd M, Doran et.al., ανακάλυψαν ότι μια φωσφορυλιωμένη μορφή περιφερίνης, αναγνωρίζεται από αυτοαντισώματα σε σημαντικό ποσοστό ασθενών ΣΔ1 (72%). Στη τρίχα των διαβητικών ανιχνεύτηκε η περιφερίνη και συγκεκριμένα παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.

#### 4. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της έρευνας, επιβεβαιώνουν τη χρήση της τρίχας ως ανθρώπινο δείγμα για μελέτη πρωτεϊνών καθώς και την εύρεση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον ΣΔ1. Ακόμη γίνεται ευδιάκριτο το διαφορετικό πρωτεωμικό προφίλ μεταξύ πασχόντων και υγιών ατόμων, πράγμα που ενθαρρύνει την περαιτέρω έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο. Ωστόσο, παρα τα θετικά συμπεράσματα, πρέπει να αναγνωριστούν και οι περιορισμοί του πιλοτικού πειράματος, όπως ο μικρός αριθμός δειγμάτων και η συμμετοχή μόνο ενός φύλου (κορίτσια). Για την ενίσχυση της εγκυρότητας και της γενίκευσης των αποτελεσμάτων στον πληθυσμό, χρειάζεται μια μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη κοόρτη, με στόχο ευρήματα με κλινική και διαγνωστική αξία.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alibardi, L. (2012) 'Perspectives on Hair Evolution Based on Some Comparative Studies on Vertebrate Cornification', *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 318(5). Available at: <https://doi.org/10.1002/jez.b.22447>
2. Loussouarn, G., Lozano, I., Panhard, S., Collaudin, C., El Rawadi, C., and Genain, G. (2016) 'Diversity in human hair growth, diameter, colour and shape. An in vivo study on young adults from 24 different ethnic groups observed in the five continents', *European Journal of Dermatology*, 26(2), pp. 144-154. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2726>
3. Dhouailly, D. (2009) 'A new scenario for the evolutionary origin of hair, feather, and avian scales', *Journal of Anatomy*, 214(4), pp. 407-644.
4. Mettrie, R. de la, et al. (2007) 'Shape variability and classification of human hair: A worldwide approach', *Human Biology*, 79(3), pp. 265-281. Available at: <https://doi.org/10.1353/hub.2007.0045>.
5. Histology of skin and hair follicle. (2006) *Med Sci (Paris)*, 22(2), pp. 131-137. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2006222131>.
6. Schneider, M. R., Schmidt-Ullrich, R., & Paus, R. (2009). The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Current Biology*. Elsevier. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.005>
7. Buffoli, B., Rinaldi, F., Labanca, M., Sorbellini, E., Trink, A., Guanziroli, E., Rezzani, R., & Rodella, L. F. (2014). The human hair: from anatomy to physiology. *International Journal of Dermatology*, 53(3), 263-396, e158-e239. <https://doi.org/10.1111/ijd.12339>
8. Breakspear, S., Ivanov, D. A., Noecker, B., Popescu, C., & Rosenthal, M. (2022). Cuticle – Designed by nature for the sake of the hair. *International Journal of Cosmetic Science*, 44(3), i-iv, 271-402. <https://doi.org/10.1111/ics.12840>
9. Fraser, R. D. B., & Parry, D. A. D. (2018). Structural Hierarchy of Trichocyte Keratin Intermediate Filaments. In J. Plowman, D. Harland, & S. Deb-Choudhury (Eds.), *The Hair Fibre: Proteins, Structure and*

- Development* (Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1054, pp. 99-126). Springer, Singapore.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-8195-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8195-8_6)
10. Plowman, J. E., & Harland, D. P. (2018). Fibre Ultrastructure. In J. Plowman, D. Harland, & S. Deb-Choudhury (Eds.), *The Hair Fibre: Proteins, Structure and Development* (Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1054, pp. 1-18). Springer, Singapore.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-8195-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8195-8_1)
  11. Sperling, L. C. (1991). Hair anatomy for the clinician. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(1 Pt 1), 1-17.  
[https://doi.org/10.1016/0190-9622\(91\)70001-P](https://doi.org/10.1016/0190-9622(91)70001-P)
  12. Martino, P. A., Heitman, N., & Rendl, M. (2021). The dermal sheath: An emerging component of the hair follicle stem cell niche. *Stem Cells*, 30(4), 512-521. <https://doi.org/10.1002/stem.3365>
  13. Hashimoto, K. (1988). The structure of human hair. *Clinics in Dermatology*, 6(4), 7-21. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(88\)90060-0](https://doi.org/10.1016/0738-081X(88)90060-0)
  14. Andl, T., Zhou, L., & Zhang, Y. (2023). The dermal papilla dilemma and potential breakthroughs in bioengineering hair follicles. *Cell and Tissue Research*, 391(2), 221-233. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03730-w>
  15. Manabe, M., & O'Guin, W. M. (1992). Keratohyalin, trichohyalin and keratohyalin-trichohyalin hybrid granules: An overview. *The Journal of Dermatology*, 19(11), 641-920.
  16. Plowman, J. E. (2018). Diversity of Trichocyte Keratins and Keratin Associated Proteins. In J. Plowman, D. Harland, & S. Deb-Choudhury (Eds.), *The Hair Fibre: Proteins, Structure and Development* (Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1054). Springer, Singapore.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-8195-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8195-8_3)
  17. Rogers, G. E., Harding, H. W. J., & Llewellyn-Smith, I. J. (1977). The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 495(1), 159-175.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2795\(77\)90250-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90250-1)

18. Steinert, P. M., Parry, D. A. D., & Marekov, L. N. (2003). Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle MULTIPLE CROSS-BRIDGING ROLES IN THE INNER ROOT SHEATH. *Journal of Biological Chemistry*. Retrieved from <https://doi.org/10.1074/jbc.R300029200>
19. Baka, Z., György, B., Géher, P., Buzás, E. I., Falus, A., & Nagy, G. (2012). Citrullination under physiological and pathological conditions. *Joint Bone Spine*, 79(5), 431-436. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.01.008>
20. Botchkarev, V. A., & Paus, R. (2003). Molecular biology of hair morphogenesis: Development and cycling. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 298B(1), 164-180. <https://doi.org/10.1002/jez.b.33>
21. Houschyar, K. S., Borrelli, M. R., Tapking, C., Popp, D., Puladi, B., Ooms, M., Chelliah, M. P., Rein, S., Pförringer, D., Thor, D., Reumuth, G., Wallner, C., Branski, L. K., Siemers, F., Grieb, G., Lehnhardt, M., Yazdi, A. S., Maan, Z. N., & Duscher, D. (2020). Molecular Mechanisms of Hair Growth and Regeneration: Current Understanding and Novel Paradigms. *Dermatology*, 236(4), 271-280. <https://doi.org/10.1159/000506155>
22. Trüeb, R.M., 2018. Further Clinical Evidence for the Effect of IGF-1 on Hair Growth and Alopecia. *Skin Appendage Disorders*, 4(2), pp.90-95. <https://doi.org/10.1159/000479333>.
23. Hwang, S.B., Park, H.J., Lee, B.-H., 2022. Hair-Growth-Promoting Effects of the Fish Collagen Peptide in Human Dermal Papilla Cells and C57BL/6 Mice Modulating Wnt/ $\beta$ -Catenin and BMP Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 11904. <https://doi.org/10.3390/ijms231911904>.
24. Guan, C.-P., Li, Q.-T., Jiang, H., Geng, Q.-W., Xu, W., Li, L.-Y., Xu, A.-E., 2018. IGF-1 resist oxidative damage to HaCaT and depigmentation in mice treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(4), 2485-2492. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.004>.



25. Paus, R., Christoph, T., Müller-Röver, S., 1999. Immunology of the hair follicle: a short journey into terra incognita. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 4(3), 226-234. <https://doi.org/10.1038/sj.jidsp.5640217>.
26. Beleznai, T., Feher, A., Spielvogel, D., Lansman, S.L., Bagi, Z., 2011. Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300(3), H777-H783. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00831.2010>.
27. Krishna, C.S., Srikanta, S., 2015. Type 1 diabetes pathogenesis - Prevention? *Indian J Endocrinol Metab*, 19(Suppl 1), S58-S63. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.155404>.
28. Ren, Y., Li, Z., Li, W., Fan, X., Han, F., Huang, Y., Yu, Y., Qian, L., Xiong, Y., 2022. Arginase: Biological and Therapeutic Implications in Diabetes Mellitus and Its Complications. *Oxid Med Cell Longev*, 2022:2419412. <https://doi.org/10.1155/2022/2419412>.
29. Alam, C.M., Baghestani, S., Pajari, A., Omary, M.B., Toivola, D.M., 2021. Keratin 7 Is a Constituent of the Keratin Network in Mouse Pancreatic Islets and Is Upregulated in Experimental Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 22:7784. <https://doi.org/10.3390/ijms22157784>
30. Tao, J., Yu, X.L., Yuan, Y.J., Shen, X., Liu, J., Gu, P.P., Wang, Z., Ma, Y.T., Li, G.Q., 2022. DMRT2 Interacts With FXR and Improves Insulin Resistance in Adipocytes and a Mouse Model. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12:723623. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.723623>
31. Ursino, G., et al., 2024. S100A9 exerts insulin-independent antidiabetic and anti-inflammatory effects. *Sci. Adv.* 10, eadj4686. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adj4686>
32. Doran, T.M., et al., 2016. Discovery of Phosphorylated Peripherin as a Major Humoral Autoantigen in Type 1 Diabetes Mellitus. *Cell Chem Biol.* 23(5), pp. 618-628. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.04.006>



33. Zhou, P., et al., 2023. KRT17 from skin cells with high glucose stimulation promotes keratinocytes proliferation and migration. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 14: 1237048. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1237048>
34. Zimmer, D.B., Chessher, J., Wilson, G.L., Zimmer, W.E., 1997. S100A1 and S100B expression and target proteins in type I diabetes. *Endocrinology*. 138(12), 5176-5183. <https://doi.org/10.1210/endo.138.12.5579>
35. Hu, Q., Yang, Q., Gao, H., Tian, J., Che, G., 2024. Immunoglobulin heavy constant gamma 1 silencing decreases tonicity-responsive enhancer-binding protein expression to alleviate diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig*. 15(5), 572-583. <https://doi.org/10.1111/jdi.14144>
36. Ardawi, M.S.M., Nasrat, H.A.N., Bahnassy, A.A., 1994. Serum Immunoglobulin Concentrations in Diabetic Patients. *Diabetic Medicine* 11(4), 384-387. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1994.tb00290.x>
37. Nekoua, M.P., Alidjinou, E.K. & Hober, D., 2022. Persistent coxsackievirus B infection and pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 18, pp.503-516. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00688-1>.
38. Sanyoura, M., Woudstra, C., Halaby, G., Baz, P., Senée, V., Guillausseau, P.J., Zalloua, P., Julier, C., 2014. A novel ALMS1 splice mutation in a non-obese juvenile-onset insulin-dependent syndromic diabetic patient. *European Journal of Human Genetics*, 22(1), pp.140-143. Available at: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.87>.
39. Jin, Y., Sharma, A., Carey, C., Hopkins, D., Wang, X., Robertson, D.G., Bode, B., Anderson, S.W., Reed, J.C., Steed, R.D., Steed, L., She, J.X., 2013. The expression of inflammatory genes is upregulated in peripheral

- blood of patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 36(9), pp.2794-2802. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc12-1986>.
40. Morran, M.P., Vonberg, A., Khadra, A., Pietropaolo, M., 2015. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Molecular Aspects of Medicine*, 42, pp.42-60. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.12.004>.
41. Al-Amrani, S., Al-Jabri, Z., Al-Zaabi, A., Alshekaili, J., Al-Khabori, M., 2021. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World Journal of Biological Chemistry*, 12(5), pp.57-69. Available at: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v12.i5.57>.
42. Graves, P.R. and Haystead, T.A., 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), pp.39-63. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002>.
43. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G. et al., 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), pp.1017-1031. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>.
44. Shuken, S.R., 2023. An Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 22(7), pp.2151-2171. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00838>.
45. Nakayasu, E.S., Qian, W.J., Evans-Molina, C., Mirmira, R.G., Eizirik, D.L., Metz, T.O., 2019. The role of proteomics in assessing beta-cell dysfunction and death in type 1 diabetes. *Expert Review of Proteomics*, 16(7), pp.569-582. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1634548>

46. Zhi, W., Purohit, S., Carey, C., Wang, M., She, J.X., 2010. Proteomic technologies for the discovery of type 1 diabetes biomarkers. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 4(4), pp.993-1002. doi:<https://doi.org/10.1177/193229681000400431>
47. Lucier, J., Weinstock, R.S., 2023. Type 1 Diabetes. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 29939535.
48. Mehers, K.L. and Gillespie, K.M., 2008. The genetic basis for type 1 diabetes. *British Medical Bulletin*, 88(1), pp.115-129. doi: 10.1093/bmb/ldn045.
49. Wait, R., 1993. Introduction to mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*, 17, pp.191-213. doi: 10.1385/0-89603-215-9:191.
50. Han, X., Aslanian, A., Yates Jr, J.R., 2008. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), pp.483-490. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.024.
51. Rappold, B.A., 2022. Review of the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical laboratories: Part II-operations. *Annals of Laboratory Medicine*, 42(5), pp.531-557. doi: 10.3343/alm.2022.42.5.531.
52. Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M. and Cox, J., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13(9), pp.731-740. doi: 10.1038/nmeth.3901.
53. Hughes, C.S., Moggridge, S., Müller, T. et al., 2019. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nature Protocols*, 14, pp.68-85. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0082-x>

54. Haag, A.M., 2016. Mass analyzers and mass spectrometers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 919, pp.157-169. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7)
55. Demichev, V., Messner, C.B., Vernardis, S.I., Lilley, K.S. and Ralser, M., 2020. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nature Methods*, 17(1), pp.41-44. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0638-x>
56. Chang, C.W., Hsu, J.Y., Lo, Y.T., Liu, Y.H., Mee-inta, O., Lee, H.T., Kuo, Y.M. and Liao, P.C., 2024. Characterization of Hair Metabolome in 5xFAD Mice and Patients with Alzheimer's Disease Using Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *ACS Chemical Neuroscience*, 15(3), pp.527-538. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.3c00587>
57. Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1, 2856–2860 (2006). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
58. Goodman JK, Zampronio CG, Jones AME, Hernandez-Fernaund JR. Updates of the In-Gel Digestion Method for Protein Analysis by Mass Spectrometry. *Proteomics*. 2018 Dec;18(23):e1800236. doi: 10.1002/pmic.201800236.
59. Sung Chan Kim, Yue Chen, Shama Mirza, Yingda Xu, Jaeick Lee, Pingsheng Liu, and Yingming Zhao. A Clean, More Efficient Method for In-Solution Digestion of Protein Mixtures without Detergent or Urea. *Journal of Proteome Research* 2006 5 (12), 3446-3452 DOI: 10.1021/pr0603396
60. León IR, Schwämmle V, Jensen ON, Sprenger RR. Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols

for unbiased protein analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Oct;12(10):2992-3005. doi: 10.1074/mcp.M112.025585.

61. Wiśniewski JR. Filter-Aided Sample Preparation for Proteome Analysis. *Methods Mol Biol*. 2018;1841:3-10. doi: 10.1007/978-1-4939-8695-8\_1.
62. Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P. *et al*. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13, 731–740 (2016). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
63. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C, Chanda SK. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. 2019 Apr 3;10(1):1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6. PMID: 30944313; PMCID: PMC6447622.
64. Demichev, V., Messner, C.B., Vernardis, S.I. *et al*. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat Methods* 17, 41–44 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0638-x>
65. Catia F. Marques *et.al*. "Optimized Protocol for Obtaining and Characterizing Primary Neuron-Enriched Cultures from Embryonic Chicken Brains." *STAR Protocols*, vol. 3, no. 4, **2022**, p. 101753
66. Rotello RJ, Veenstra TD. Mass Spectrometry Techniques: Principles and Practices for Quantitative Proteomics. *Curr Protein Pept Sci*. 2021;22(2):121-133. doi: 10.2174/1389203721666200921153513.
67. Moggridge S, Sorensen PH, Morin GB, Hughes CS. Extending the Compatibility of the SP3 Paramagnetic Bead Processing Approach for

Proteomics. *J Proteome Res.* 2018 Apr 6;17(4):1730-1740. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00913.

68. Winter D, Dehghani A, Steen H. Optimization of cell lysis and protein digestion protocols for protein analysis by LC-MS/MS. *Methods Mol Biol.* 2015;1295:259-73. doi: 10.1007/978-1-4939-2550-6\_20.
69. Moore SM, Hess SM, Jorgenson JW. Extraction, Enrichment, Solubilization, and Digestion Techniques for Membrane Proteomics. *J Proteome Res.* 2016 Apr 1;15(4):1243-52. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b01122.
70. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009 Feb;30(1):19-34.