



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Νεότερα δεδομένα για τη χρήση βιοδεικτών σε αυτοάνοσα νοσήματα

GRADUATE THESIS

New perspectives for the use of biomarkers in autoimmune diseases



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Κρύσα Κρέσπα

Krisa Kreshpa

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Πέτρος Καρκαλούσος

Petros Karkalousos

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

New perspectives for the use of biomarkers in autoimmune diseases

KRISA KRESHPA

kreshpach01@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

PETROS KARKALOUSOS

SECOND SUPERVISOR

MARIA TRAPALI

THIRD SUPERVISOR

CHRISTINA FOUNTZOULA

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 7/10/2024

Όνόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Πέτρος Καρκαλούσος

2^{ος} Εξεταστής Μαρία Τράπαλη

3^{ος} Εξεταστής Χριστίνα Φούντζουλα

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κρύσα Κρέσπα του Πετρίτ, με αριθμό μητρώου 20678139 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω 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».

Όνομα φοιτητή

Κρύσα Κρέσπα

Υπογραφή φοιτητή

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Krysia Kresspa', written on a light-colored background.

Ευχαριστίες

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, την αδελφή μου Τζένη, τους γονείς μου και τον άνθρωπο μου Διονύση. Χωρίς την οικογένεια μου δεν θα μπορούσα να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου. Με βοήθησαν σε όλους τους τομείς, τόσο ψυχολογικά όσο και στη συγγραφή αυτής της διπλωματικής. Ευχαριστώ πολύ και τους καθηγητές μου Πέτρο Καρκαλούσο, Μαρία Τράπαλη και Χριστίνα Φούτζουλα για τη πολύτιμη βοήθεια τους.

Αφιερώσεις

Αυτή τη διπλωματική την αφιερώνω σε όλη την οικογένεια μου και ειδικά στον μπαμπά μου, τον οποίο νιώθω κάθε στιγμή δίπλα μου ακόμα και αν είναι ψηλά στον ουρανό. Χάρη σε εκείνον αγάπησα το αντικείμενο αυτό και μακάρι να μπορέσω να προσφέρω όσα μπορώ, με οποιονδήποτε τρόπο σε όσους υποφέρουν από ανίατες ασθένειες.

Περίληψη

Η παρούσα ανασκόπηση επικεντρώνεται στη διερεύνηση νέων βιοδεικτών για τη διάγνωση αυτοάνοσων ασθενειών, όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, η Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα, ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου Ι και η Ρευματοειδής αρθρίτιδα. Παρά την ύπαρξη ήδη εδραιωμένων βιοδεικτών, η έρευνα επιδιώκει να ανακαλύψει νέους και πιο αποτελεσματικούς βιοδείκτες, χρησιμοποιώντας τα εξελιγμένα επιστημονικά πεδία της πρωτεομικής και της μεταβολομικής. Κατά την διάρκεια της ανασκόπησης, θα αναφερθούν οι κύριοι μηχανισμοί που προκαλούν την εμφάνιση των παραπάνω αυτοάνοσων νοσημάτων, καθώς και οι βιοδείκτες που έχουν ανακαλυφθεί από κάθε πεδίο. Τέλος, θα συγκριθούν οι παραδοσιακοί με τους νέους βιοδείκτες και θα εξαχθούν συμπεράσματα για την πρόοδο της επιστήμης στις παθήσεις αυτές.

Λέξεις κλειδιά:

- Αυτοάνοσες ασθένειες
- Βιοδείκτες
- Πρωτεομική
- Μεταβολομική
- Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
- Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα
- Σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι
- Ρευματοειδή αρθρίτιδα

Abstract

The present review focuses on the investigation of new biomarkers for the diagnosis of autoimmune diseases, such as Systemic Lupus Erythematosus, Axonal Spondylitis, Type I Diabetes Mellitus and Rheumatoid Arthritis. Despite the existence of already established biomarkers, research seeks to correct new and more effective biomarkers, using the advanced scientific fields of proteomics and metabolomics. During the review, the main mechanisms that cause the appearance of the above autoimmune diseases will be mentioned, as well as the biomarkers that have been discovered from each field. Finally, traditional and new biomarkers will be compared, and conclusions will be drawn about the progress of science in these diseases.

Key words:

- Autoimmune diseases
- Biomarkers
- Proteomics
- Metabolomics
- Systemic Lupus Erythematosus
- Axial Spondyloarthritis
- Diabetes type I
- Rheumatoid Arthritis

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Αφιερώσεις.....	vi
Περίληψη.....	vii
Abstract	viii
Συνοτομογραφίες.....	xi
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στην έννοια των βιοδεικτών και των αυτοάνοσων παθήσεων	4
Υποενότητα 1.1 Εμβάθυνση στην έννοια των αυτοάνοσων νοσημάτων.....	4
Υποενότητα 1.2 Έμφυτη ανοσία.....	7
Υποενότητα 1.3 Ειδική ανοσία και αυτοανοσία	9
Κεφάλαιο 2: Εισαγωγή στο τομέα της Πρωτεομικής και της Μεταβολομικής	11
Υποενότητα 2.1 Επιστήμη της Πρωτεομικής	11
Υποενότητα 2.2 Επιστήμη της Μεταβολομικής	18
Κεφάλαιο 3: Συστηματικός ερυθματώδης λύκος	22
Υποενότητα 3.1 Επιδημιολογία νόσου.....	22
Υποενότητα 3.2 Μηχανισμός αιτιοπαθογένεσης της νόσου	25
Κεφάλαιο 4. Αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα	32
Υποενότητα 4.1 Επιδημιολογία νόσου.....	32
Υποενότητα 4.2 Παθογένεση της νόσου	33
Κεφάλαιο 5. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου Ι.....	38
Υποενότητα 5.1 Επιδημιολογία και αίτια της νόσου του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου Ι	38
Υποενότητα 5.2 Παθογένεση της νόσου	41
Κεφάλαιο 6. Ρευματοειδής αρθρίτιδα.....	46
Υποενότητα 6.1 Επιδημιολογικά στοιχεία Ρευματοειδούς αρθρίτιδας	46
Υποενότητα 6.2 Αιτιοπαθογένεση Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας	46
Κεφάλαιο 7. Η εξέλιξη των βιοδεικτών στο Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο.....	49
Υποενότητα 7.1 Παραδοσιακοί βιοδείκτες του Συστηματικού Ερυθματώδη Λύκου ..	49
Υποενότητα 7.2 Πρωτεωμικοί Βιοδείκτες του Συστηματικού Ερυθματώδη Λύκου	54
Υποενότητα 7.3 Μεταβολομικοί βιοδείκτες στο Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο	56
Κεφάλαιο 8. Η εξέλιξη των βιοδεικτών της Αξονικής Σπονδυλοαρθρίτιδας	58
Υποενότητα 8.1 Παραδοσιακοί βιοδείκτες της Αξονικής Σπονδυλοαρθρίτιδας	58

Υποενότητα 8.2 Πρωτεομικοί βιοδείκτες Αξονικής Σπονδυλοαρθρίτιδας	59
Υποενότητα 8.3 Μεταβολομικοί βιοδείκτες Αξονικής Σπονδυλοαρθρίτιδας	61
Κεφάλαιο 9. Η εξέλιξη των βιοδεικτών στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου Ι	62
Υποενότητα 9.1 Κλασικοί βιοδείκτες του σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι	62
Υποενότητα 9.2 Βιοδείκτες από το πεδίο της πρωτεωμικής του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου Ι	67
Υποενότητα 9.3 Βιοδείκτες μεταβολομικής στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου Ι	71
Κεφάλαιο 11. Η εξέλιξη των βιοδεικτών στη Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	78
Υποενότητα 11.1 Παραδοσιακοί βιοδείκτες της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας	78
Υποενότητα 11.2 Πρωτεομικοί Βιοδείκτες της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας	80
Υποενότητα 11.3 Μεταβολομικοί Βιοδείκτες της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας	82
Συμπεράσματα	83
Βιβλιογραφία	87
Πηγές Εικόνων	94

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
MHC	Major histocompatibility complex	Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
NOD 2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2	Πρωτεΐνη που περιέχει περιοχή ολιγομερισμού που δεσμεύει νουκλεοτίδια 2
TNF	tumor necrosis factor	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκου
BAFF	B-cell activating factor	Παράγοντας ενεργοποίησης Β - κυττάρων
TLR	Toll – Like Receptors	Υποδοχέας Toll
ATG	anti-thymocyte globulin	Τριφωσφορική Πρωτεΐνη
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	Μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνο
IEC	Ion Exchange Chromatography	Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
SEC	Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Ανοσοπροσοφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμα
SDS - PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκυλοθεικού νατρίου-πολυακρυλαμίδιου
2D - PAGE	Two-dimensional gel electrophoresis	Δισδιάστατη Ηλεκτροφόρηση γέλης
2D - DIGE	Differential Gel Electrophoresis	Διαφορική Ηλεκτροφόρηση γέλης
2D - LC/MS	Two-dimensional Liquid Chromatography / Mass Spectrometry	Δισδιάστατη υγρή χρωματογραφία / Φασματοσκοπία μάζας
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization	Ιονισμό εκρόφησης λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα
SELDI	Surface Desorption/ Laser Ionization	Επιφανειακή εκρόφηση/ Ιοντισμό με Λέιζερ
ESI	Electrospray Ionization	Ιονισμό Ηλεκτροψεκασμού
SILAC	Stable isotopic labeling with amino acids in cell culture	Σταθερή ισοτοπική επισήμανση με αμινοξέα σε κυτταρική καλλιέργεια
iTRAQ	Isobaric label for relative absolute quantification	Ισοβαρική ετικέτα για σχετική απόλυτη ποσοτικοποίηση
SELDI-TOF MS	Improved MS laser surface desorption/ionization	Βελτιωμένη επιφανειακή εκρόφηση/ιοντισμός λέιζερ MS
LLE	Liquid-liquid extraction	Εκχύλιση υγρού-υγρού
SPE	Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
SPME	Solid phase microextraction	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
LC	Liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία
GC	Gas chromatography	Αέρια χρωματογραφία
CE	Capillary electrophoresis	Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση
IS	Samples of internal standards	Δείγματα εσωτερικών προτύπων
QC	Quality control	Ποιοτικός έλεγχος

PLS-DA	Partial least squares discriminant analysis	Ανάλυση μερικής διάκρισης ελαχίστων τετραγώνων
DFFB	DNA fragmentation factor	Παράγοντας θραυσματοποίησης του DNA
NET	Extracellular traps of neutrophils	Εξωκυττάριες παγίδες των ουδετεροφίλων
BAFF	B cell activating factor	Παράγοντας ενεργοποίησης των Β κυττάρων
HLA	Human Leukocyte Antigen	Ανθρώπινο Λευκοκυτταρικό Αντιγόνο
IL	Interleukin	Ιντερλευκίνη
T1DM	Type 1 Diabetes Mellitus	Τύπου 1 Σακχαρώδης Διαβήτης
T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus	Τύπου 2 Σακχαρώδης Διαβήτης
IDF	International Diabetes Federation	Διεθνής Ομοσπονδία Διαβήτη
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults	Λανθάνον Αυτοάνοσος Διαβήτης σε ενήλικες
INS	Insulin gene	Γονίδιο Ινσουλίνης
TCR	Receptors of T - cells	Υποδοχές των Τ - κυττάρων
APC	Antigen-presenting cells	Αντιγονοπαρουσιαστικά Κύτταρα
IFN	Interferon	Ιντερφερόνη
Tregs	Regulatory T - cells	Ρυθμιστικά Τ - κύτταρα
RA	Rheumatoid arthritis	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα
ANA	Antinuclear Antibodies	Αντιπυρηνικά Αντισώματα
CRP	C-reactive protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
ICA	Antibodies against pancreatic islet cells	Αντισώματα κατά των κυττάρων των νησίδων του παγκρέατος
IAA	Antibodies against insulin	Αντισώματα κατά της ινσουλίνης
GAD	Glutamate dehydratase carboxylase	Γλουταμινική αφυδρασική καρβοξυλάση
GADA	Autoantibodies against Glutamine Dehydrating Carboxylase	Αυτοαντισώματα κατά της Γλουταμινικής Αφυδρασικής Καρβοξυλάσης
IA - 2	Anti-Tyrosine Phosphatase-Associated Islet Antigen Autoantibodies	Αυτοαντισώματα κατά της Τυροσινικής Φωσφατάσης – Σχετιζόμενου αντιγόνου νησίδων
HBA1c	Glycosylated Hemoglobin	Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη
FDA	Federal Drug Association	Ομοσπονδιακή Ένωση Φαρμάκων
FSG	Fasting glucose	Γλυκόζη νηστείας
ZnT8	Zinc Carrier 8	Μεταφορέας Ψευδαργύρου 8
BCAA	Branched chain amino acids	Διακλαδισοαλυσιδωτά Αμινοξέα
CM	Tiny lipoproteins	Χυλομικρά
LDL	Low density lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
VLDL	Very low density lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας
HDL	High density lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
SCFA	Brachea Alysos Fatty Acids	Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλύσου
RF	Rheumatoid Factor	Ρευματοειδής Παράγοντας
ACPA	Antibodies against citrullinated protein	Αντισώματα κατά της κιτρουλινωμένης πρωτεΐνης

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως βασικό στόχο την ενδελεχή βιβλιογραφική μελέτη των υπαρχόντων βιοδεικτών που σχετίζονται με τα αυτοάνοσα νοσήματα, εμβαθύνοντας κατά βάση στο Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, την Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα, το Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου Ι και τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Οι αναφερθείσες ασθένειες ανήκουν στην οικογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων, διαταραχών που χαρακτηρίζονται από επιβλαβείς ιδιοπαθείς ανοσολογικές αποκρίσεις του ίδιου του οργανισμού. Σύμφωνα με τα τωρινά επιδημιολογικά στοιχεία, η συχνότητα των αυτόανοσων νοσημάτων έχει δεκαπλασιαστεί από το 1950, μαρτυρώντας πως οι περιβαλλοντικές και οι γενετικές συνθήκες των ανθρώπων έχουν ριζικά μεταβληθεί. Ειδικότερα, οι ασθένειες αυτές συνεχίζουν να απασχολούν μαζικά την επιστημονική κοινότητα, καθώς η παθογένεσή τους και η διάγνωσή τους συνεχίζει να αποτελεί μια πτυχή της σύγχρονης ιατρικής που ακόμα ερευνάται επιστάμενα (Dinse et al. 2022).

Οι μηχανισμοί αυτοανοσίας ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά από τον Macfarlane Burnett πριν από περίπου εξήντα χρόνια, οδηγώντας στην ανακάλυψη του «απαγορευμένου κλώνου», μία έρευνα η οποία κέρδισε το βραβείο Nobel (Rose, 2016). Το πείραμα αυτό αποτέλεσε την βάση για την κατανόηση πως το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι πάντοτε αλάνθαστο. Με την πάροδο των χρόνων, η μελέτη διάφορων αυτοάνοσων νοσημάτων οδήγησε στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων μορίων, η παρουσία των οποίων βοηθά τους επιστήμονες να διακριβώσουν τις αυτοάνοσες ασθένειες. Οι σύγχρονες προσεγγίσεις ανακάλυψης βιοδεικτών στο πεδίο των αυτοάνοσων ασθενειών εστιάζουν, είτε σε προϊόντα αποικοδόμησης που προκύπτουν από την καταστροφή των προσβεβλημένων ιστών, είτε σε ένζυμα με σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των ιστών, είτε στις κυτταροκίνες και σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Wang et al. 2015).

Με τον όρο βιοδείκτη, ορίζουμε μια ένωση η οποία αντικειμενικά προσδιορίζεται και εκτιμάται, ως ένδειξη φυσιολογικών βιολογικών διαδικασιών, παθολογικών διαδικασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση (Abulaban and Brunner 2015). Οι βιοδείκτες μπορούν να διακριθούν σε προγνωστικούς, διαγνωστικούς,

προβλεπτικούς και φαρμακοδυναμικούς. Οι προγνωστικοί βιοδείκτες χαρακτηρίζουν μια συγκεκριμένη εκδήλωση της νόσου, εντοπίζουν άτομα υποψήφια να εμφανίσουν τη νόσο ή εκείνους που θα παρουσιάσουν έξαρση, ενώ οι διαγνωστικοί βιοδείκτες επιβεβαιώνουν την παρουσία ή τον υπότυπο της νόσου. Οι προβλεπτικοί βιοδείκτες βοηθούν στην εκτίμηση της θεραπευτικής απόκρισης ενώ οι φαρμακοδυναμικοί βιοδείκτες καθορίζουν τις βέλτιστες θεραπευτικές δόσεις (Brown et al. 2020).

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος αποτελεί ένα πολυσυστημικό ετερογενές σύνδρομο, το οποίο χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι κυτταρικών στοιχείων, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας (Arriens et al. 2017). Αυτή η ετερογένεια στην ανοσολογική δυσλειτουργία έχει οδηγήσει στην αδυναμία καθιέρωσης ενός μοναδικού βιοδείκτη για τη δράση και την πρόβλεψη του συνδρόμου. Ο αιτιοπαθολογικός μηχανισμός περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση διαφόρων συνιστωσών, όπως η παραγωγή αυτοαντισωμάτων, η ανεπάρκεια απομάκρυνσης των αποπτωτικών κυττάρων, η χρόνια φλεγμονή, η απώλεια της αυτό-ανοχής, σε συνδυασμό με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες εμφάνισης του συστηματικού ερυθματώδους λύκου είναι σημαντικά μεγαλύτερη στον γυναικείο πληθυσμό συγκριτικά με τον ανδρικό, ενώ πάνω από πέντε εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν παγκοσμίως (Li et al. 2022).

Η ανακάλυψη ενός ιδανικού βιοδείκτη για το Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο συνιστά μια εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία καθώς θα πρέπει ο βιοδείκτης να τονίζει τη παθοφυσιολογία του συνδρόμου ή τον θεραπευτικό στόχο, να είναι αξιόπιστος, να παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, να διαθέτει την ικανότητα παρακολούθησης των φάσεων έξαρσης και υποτροπής, να μπορεί αξιόπιστα να μετρηθεί σε ιστούς, κύτταρα και βιολογικά υγρά (Yu, Nagafuchi and Fujio, 2021). Λόγω των πολλαπλών οργάνων που πλήττονται και των ετερογενών κλινικών εκδηλώσεων ένας μεμονωμένος βιοδείκτης είναι αδύνατο να περιγράψει το σύνδρομο στο σύνολό του. Εντούτοις ορισμένοι κλινικοί βιοδείκτες αξιοποιούνται στην κλινική πράξη, όπως η πρωτεΐνουρία, η αιμολυτική αναιμία, ο αριθμός των λευκών και των αιμοπεταλίων, η παρουσία των Smith αντισωμάτων, τα

αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), η ενεργότητα του συμπληρώματος, το συμπλήρωμα C3 και C4 και τα αντισώματα έναντι του δίκλωνου DNA (Fenton and Pedersen, 2023).

Η Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα αποτελεί μια φλεγμονώδη νόσο που περιλαμβάνει την ακτινογραφικά επιβεβαιωμένη αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα και την μη επιβεβαιωμένη ακτινογραφικά σπονδυλοαρθρίτιδα, η οποία ονομάζεται αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Οι βιοδείκτες με την καλύτερη διαγνωστική και προβλεπτική αξία έως σήμερα για την αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα είναι το HLA-B27, η CRP και η ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων. Ωστόσο, υπάρχει έντονα η ανάγκη εύρεσης νέων βιοδεικτών που θα αναδυθούν μέσω των τεχνολογιών -omics και στατιστικών προσεγγίσεων (Diaconu et al. 2022). Το πεδίο της γονιδιωματικής, το μικροβίωμα, η μεταγραφωμική, η πρωτεομική και το μεταβολομικό προφίλ πιθανά να οδηγήσουν στην εύρεση καινοτόμων και πιο πληροφοριακών βιοδεικτών, με κλινικές εφαρμογές (Maksymowych, 2019).

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου Ι αποτελεί μια χρόνια αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια ινσουλίνης και επακόλουθη υπεργλυκαιμία. Η μελέτη και η χαρτογράφηση της νόσου έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία 25 χρόνια, με αποτέλεσμα την ευρεία κατανόηση πολλών πτυχών της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της γενετικής, της επιδημιολογίας, της κλινικής διάγνωσης και της θεραπείας. Παρά τα γνωστά γενετικά υπόβαθρα, οι περισσότεροι άνθρωποι που διαγιγνώσκονται με διαβήτη τύπου 1 δεν έχουν συγγενή με τη νόσο ή ακόμη και τον υψηλότερο κίνδυνο συνδυασμό αλληλόμορφων HLA, δυσκολεύοντας τις προσπάθειες πρωτογενούς πρόληψης της νόσου. Αν και η επιβίωση και η υγεία των ασθενών έχουν βελτιωθεί σημαντικά, ιδιαίτερα τα τελευταία 30 χρόνια, η θεραπεία για τον διαβήτη τύπου Ι παραμένει αδιευκρίνιστη. Συνεπώς, η ανάγκη διερεύνησης πιθανών βιοδεικτών από τα πεδία της πρωτεομικής και της μεταβολομικής κρίνεται αναγκαία, ώστε να βρεθούν νέοι μέθοδοι για την ανίχνευση της νόσου σε σύντομο χρονικό διάστημα από την εμφάνιση της νόσου (DiMeglio, Evans-Molina and Oram, 2018).

Η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα ορίζεται ως μια συστηματική αυτοάνοση νόσος που σχετίζεται με μια χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία, η οποία σταδιακά οδηγεί σε καταστροφή των αρθρώσεων, παραμόρφωση, αναπηρία, ακόμη και θάνατο. Είναι μια ευρέως

διαδεδομένη νόσος παγκοσμίως, με επιπολασμό περίπου 0,5% έως 2% και υψηλότερο επιπολασμό στις γυναίκες, στις καπνίστριες και σε όσους έχουν οικογενειακό ιστορικό της. Προς το παρόν, η αιτιολογία της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αλλά αυτό που προσελκύει την προσοχή είναι οι ανοσολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στο αρθρικό υγρό. Το γεγονός αυτό, καθιστά επιτακτική την ανάγκη εύρεσης εξειδικευμένων βιοδεικτών που να συνδράμουν αφενός στην επεξήγηση της αυτοάνοσης φύσης του και αφετέρου στην έγκαιρη διάγνυσή του (Wu et al., 2022).

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στην έννοια των βιοδεικτών και των αυτοάνοσων παθήσεων

Υποενότητα 1.1 Εμβάθυνση στην έννοια των αυτοάνοσων νοσημάτων

Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου σχεδιάστηκε για να τον προστατεύει από την εισβολή των παθογόνων και για την επούλωση των πληγών ύστερα από τραυματισμούς. Ωστόσο, στα αυτοάνοσα νοσήματα οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ της αναγνώρισης των παθογόνων και της αυτοανοχής διαταράσσονται. Επίσης, ο έλεγχος της φλεγμονής έχει χαθεί, με αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Η ετερογενής ομάδα των αυτοάνοσων νοσημάτων περιλαμβάνει πάνω από 80 συστηματικές ή οργανοειδικές ασθένειες, οι οποίες μοιράζονται ορισμένα κοινά γνωρίσματα όπως η δραστικότητα των T λεμφοκυττάρων και των αντισωμάτων έναντι των αυτοαντιγόνων και η συσχέτιση με αλληλόμορφα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι, τα αυτοάνοσα νοσήματα εκδηλώνονται ως αποτέλεσμα της διατάραξης της αυτοανοχής και της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων. Το έντονο γενετικό υπόβαθρο των αυτοάνοσων νοσημάτων γίνεται κατανοητό από τις μελέτες σε ομοζυγωτικά δίδυμα, τα οποία εμφανίζουν υψηλή σύμπτωση στα ποσοστά εκδήλωσης αυτών των ασθενειών, καθώς επίσης και από μελέτες που επικρατούν τα τελευταία 50 έτη για την εμπλοκή των γονιδίων του MHC. Ακόμη, το ιστορικό μιας οικογένειας σε αυτοάνοσες ασθένειες αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου και ενισχύει τη σημασία των

γενετικών παραγόντων για αυτού του είδους τα νοσήματα. Δυο εξαιρετικά εδραιωμένοι γενετικοί τόποι για αυτοάνοσες ασθένειες είναι όπως ήδη αναφέρθηκε το MHC για τη νόσο του διαβήτη τύπου 1 και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη NOD2 στη νόσο του Crohn (Harroud and Hafler 2023).

Εξαιρετικά σημαντικός είναι και ο ρόλος των περιοχών του DNA που δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με τη συντριπτική πλειονότητα τους να συσχετίζεται με αυτοάνοσα νοσήματα. Σε μια μελέτη 21 αυτοάνοσων νοσημάτων βρέθηκε ότι το 60% των γενετικών περιοχών που συσχετίζονται με τα νοσήματα αφορά περιοχές ενισχυτών των γονιδίων και συγκεκριμένα στα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα οι περιοχές αυτές φέρουν ακετυλιώσεις στη λυσίνη 27. Οι παρατηρήσεις αυτές προτείνουν ότι οι γενετικές περιοχές που συσχετίζονται με τα αυτοάνοσα επιδρούν μέσω μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών και καθορίζουν την τύχη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Harroud and Hafler, 2023).

Από εξελικτική σκοπιά, το κοινό γενετικό υπόβαθρο των αυτοάνοσων νοσημάτων υπονοεί ότι αυτές οι γενετικές περιοχές έδωσαν ορισμένο εξελικτικό πλεονέκτημα σε όσα άτομα τις κληρονόμησαν, για αυτό και κατάφεραν να επικρατήσουν. Μια εξελικτική υπόθεση προτείνει τον ρόλο αυτών των γενετικών περιοχών στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων ως ερμηνεία για την αυξημένη συχνότητα εμφάνισής τους στους πληθυσμούς. Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα που ενισχύει τη συγκεκριμένη υπόθεση αφορά στον παράγοντα νέκρωσης TNF, ο οποίος συσχετίζεται με την πολλαπλή σκλήρυνση και τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο σε άτομα από τη Σαρδηνία. Η γενετική περιοχή αυτή οδηγεί σε μεγαλύτερη έκφραση του παράγοντα BAFF και κατ' επέκταση σε μεγαλύτερη χυμική ανοσία που ενισχύει την 3 αντιμετώπιση της ελονοσίας. Αυτό το πλεονέκτημα που δίνει αυτό το γονίδιο έναντι της ελονοσίας μπορεί να εξηγεί εξελικτικά την επικράτησή του στον πληθυσμό της Σαρδηνίας και επομένως και την αυξημένη συχνότητα των συγκεκριμένων αυτοάνοσων με τα οποία έχει συσχετισθεί (Harroud and Hafler 2023).

Σημαντικοί είναι και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στην πρόκληση των αυτοάνοσων νοσημάτων και συσχετίζονται με γενετικούς πολυμορφισμούς που έχουν αναφερθεί. Χημικά μόρια όπως οι αρωματικές αμίνες και τα φάρμακα όπως οι θειαζίδες, οι

υδραλαζίνες, οι αναστολείς καναλιών ασβεστίου, οι αναστολείς αντλιών πρωτονίων και η ιντερφερόνη α μπορούν να προκαλέσουν αναστρέψιμες διαταραχές, για παράδειγμα τον φαρμακοεπαγόμενο συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Συγκεκριμένα, η ιντερφερόνη α μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα της διεγείρει σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν διάφορους γενετικούς πολυμορφισμούς του συστηματικού ερυθματώδους λύκου, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες TYK2, IKF2, STAT4 (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Η υπεριώδης ακτινοβολία αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που μπορεί να διεγείρει δερματολογικές εκδηλώσεις στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο και στη δερματομυοσίτιδα. Ο τρόπος διέγερσης της αυτοανοσίας μπορεί να γίνεται είτε μέσω ανοσολογικών μονοπατιών είτε μέσω επαγωγής της απόπτωσης. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, τα αυτοαντιγόνα εκτίθενται και οι ελαττωματικοί μηχανισμοί κάθαρσης των αποπτωτικών υλικών σε ασθένειες όπως ο λύκος επιτρέπουν την παρατεταμένη αλληλεπίδραση των αυτοαντιγόνων με τα Β κύτταρα. Η καταρροϊκή σηματοδότηση του υποδοχέα των Β λεμφοκυττάρων εμπλέκει πρωτεΐνες όπως LYN, PTPN22, BLK και BANK1, τα γονίδια των οποίων φέρουν πολυμορφισμούς που έχουν συσχετισθεί με τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Επίσης, μέσω της απόπτωσης παράγονται αυτοαντιγόνα που περιλαμβάνουν νουκλεϊκά οξέα και μπορούν να ενεργοποιήσουν τους toll-τύπου υποδοχείς στα ενδοσώματα (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Το κάπνισμα συνιστά έναν ακόμη περιβαλλοντικό παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων. Μπορεί να διεγείρει την απόκριση της έμφυτης ανοσίας και εμπλέκει διάφορους παράγοντες της σηματοδότησης των toll-τύπου υποδοχέων. Ο καπνός περιέχει τον λιποπολυσκαχαρίτη που αποτελεί αγωνιστή του TLR4 υποδοχέα και μέσω αυτού μπορεί να επάγει μονοπάτια φλεγμονής. Επίσης, το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, οι οποίες μπορούν να ενεργοποιήσουν τα μονοπάτια των toll-τύπου υποδοχέων άρα και τη φλεγμονή. Ένα ακόμη κυτταρικό φαινόμενο που ενεργοποιεί το κάπνισμα είναι η αυτοφαγία στην αναπνευστική οδό, μια διαδικασία που περιλαμβάνει τα ATG γονίδια ως βασικά. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου ATG 5 συνδέονται με τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Τέλος, το κάπνισμα επάγει την

απόπτωση στα κύτταρα του πνεύμονα μέσω των δραστικών ελευθέρων ριζών διατηρώντας με αυτό τον τρόπο την αυτοάνοση απόκριση (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Μια σημαντική υπόθεση αναφέρει τον μοριακό μιμητισμό ως μηχανισμό επαγωγής της αυτοανοσίας και εμπλέκει τους παράγοντες πρόκλησης λοιμώξεων και το μονοπάτι της ιντερφερόνης τύπου 1. Δυο μηχανισμοί προτείνονται για την ενεργοποίηση της αυτοανοσίας από τους μικροοργανισμούς, ο ένας είναι ο μοριακός μιμητισμός ανάμεσα στα ξένα μόρια και στα εαυτά και ο άλλος μηχανισμός περιλαμβάνει τα μοριακά μοτιβά PAMPs που διεγείρουν την έμφυτη ανοσία. Για τον μοριακό μιμητισμό ένα σημαντικό παράδειγμα είναι εκείνο του ρευματικού πυρετού, μιας αυτοάνοσης διαδικασίας που μπορεί να προκύψει από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, λόγω της μόλυνσης από τον στρεπτόκοκκο της ομάδας A (Pisetsky, 2023).

Υποενότητα 1.2 Έμφυτη ανοσία

Η έμφυτη ανοσία περιλαμβάνει τους φυσικούς φραγμούς, όπως οι βλεννογόνοι, τις διαφορες πρωτεΐνες και τα κύτταρα όπως οι φυσικοί φονείς, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στους μολυσματικούς παράγοντες και τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Ειδικά, τα δενδριτικά κύτταρα εμπλέκονται άμεσα με τη συστηματική αυτοανοσία διότι λειτουργούν τόσο ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όσο και ως βασικοί παραγωγείς της ιντερφερόνης τύπου 1. Διαφορετικοί υπότυποι των δενδριτικών κυττάρων ρυθμίζουν την χυμική και την κυτταρική ανοσία. Η χυμική ανοσία ρυθμίζεται κυρίως από τα CD14⁺ δενδριτικά κύτταρα, τα οποία παράγουν την ιντερλευκίνη 12, με άμεση επίδραση στα B κύτταρα. Οι κυτταρικές αποκρίσεις στο δέρμα καθορίζονται κυρίως από τα Langerhans κύτταρα, τα οποία παράγουν την ιντερλευκίνη 15 και ενεργοποιούν τα T βοηθητικά κύτταρα, υποστηρίζοντας έτσι τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Επίσης, η άμεση ενεργοποίηση των B κυττάρων από τα δενδριτικά κύτταρα μπορεί να προκάλεσει την αύξηση της χυμικής ανοσίας (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ιντερφερόνης τύπου 1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο, στο σύνδρομο Sjogren και στη δερματομυοσίτιδα. Η θεραπευτική χρήση της ιντερφερόνης α για την αντιμετώπιση του καρκίνου και της

ηπατίτιδας φαίνεται να οδηγεί στην εκδήλωση ασθενειών που μοιάζουν με τον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο. Ακόμη, υψηλά επίπεδα της ιντερφερόνης α έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς που πάσχουν από συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο και συνδέονται με την ενεργότητα της νόσου και τη σοβαρότητα. Τα επίπεδα της ιντερφερόνης α έχουν συνδυαστεί με μια σειρά εκδηλώσεων όπως τα δερματικά εξανθήματα, ο πυρετός και η λευκοπενία. Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο εμφανίζουν αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που επάγονται από ιντερφερόνη και το φαινόμενο αυτό καλείται ιντερφερονική υπογραφή (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Η ιντερφερόνη α μπορεί να παραχθεί από τα περισσότερα κύτταρα κατά τη διάρκεια των ιικών λοιμώξεων, ενώ από τα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα η ιντερφερόνη α εκφράζεται συνεχώς και παράγουν έως και 1000 φορές μεγαλύτερες ποσότητες από τα άλλα κύτταρα. Στον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο τα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα μπορούν να εντοπιστούν στις περιοχές του δέρματος που έχουν επηρεαστεί, στο σύνδρομο του Sjogren διεισδύουν τους σιελογόνους αδένες ενώ στη δερματομυοσίτιδα εντοπίζονται στα μυϊκά κύτταρα που έχουν επηρεαστεί (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Το μονοπάτι της ιντερφερόνης τύπου 1 στις αυτοάνοσες ασθένειες βασίζεται στην παραγωγή ιντερφερόνης μέσω toll-τύπου υποδοχέων. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων επιτυγχάνεται από την πρόσδεση των ανοσοσυμπλεγμάτων που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των αυτοαντισωμάτων με αυτοαντιγόνα που συνδέονται με νουκλεϊκά οξέα (ιστόνες, ριβονουκλεοπρωτεΐνες, Ro/La). Ακόμη, οι εξωκυττάρια παγίδες ουδετερόφιλων που περιέχουν DNA έχουν χαρακτηριστεί ως επιπλέον διεγέρτες της παραγωγής ιντερφερόνης από τα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Η ιντερφερόνη α παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών επιδράσεων που συνδέονται με την αυτοανοσία. Συνήθως, τα ανώριμα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα εγκλωβίζουν αποπτωτικά σώματα και παρουσιάζουν τα αυτοαντιγόνα χωρίς μόρια συνδιεγέρτες σε 5 αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα, τα οποία απαλείφονται ή είναι αδρανοποιημένα.

Η ιντερφερόνη επάγει την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και τα ενεργοποιημένα δενδριτικά παρουσιάζουν τα αυτοαντιγόνα. Τα δενδριτικά κύτταρα των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο χαρακτηρίζονται από την *in vitro* ικανότητά τους να επάγουν τη διαφοροποίηση των CD8+ T λεμφοκυττάρων σε κυτταροτοξικά T κύτταρα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν τη λύση των κυττάρων και την έκθεση νουκλεϊκών οξέων (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να παρουσιάζουν αυτοαντιγόνα στα B κύτταρα και να επάγουν την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση τους προς πλασματοκύτταρα, μέσω της έκκρισης ιντερλευκίνης 6. Επίσης, η ιντερφερόνη α διεγείρει τα CD4+ T_H κύτταρα να ενισχύουν την αντιγονοειδική απόκριση των B κυττάρων. Ταυτόχρονα, τα ενεργοποιημένα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα και τα αυτοδραστικά T βοηθητικά κύτταρα θα επάγουν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων (Wahren-Herlenius and Dörner, 2013).

Υποενότητα 1.3 Ειδική ανοσία και αυτοανοσία

Σε ασθενείς με Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα της ιντερλευκίνης 17 και αύξηση των T κυττάρων που την παράγουν, τα οποία εντοπίζονται σε όργανα που πλήττονται στην νόσο (δέρμα, νεφρούς, πνεύμονες). Σημαντικός είναι και ο ρόλος των B κυττάρων, καθώς οι αυτοάνοσες ασθένειες χαρακτηρίζονται από υπεργαμμασφαιριναιμία και παραγωγή αυτοαντισωμάτων (για παράδειγμα αυτοαντισώματα έναντι του δίκλωνου DNA, έναντι Ro/La, έναντι της καρδιολιπίνης). Υπάρχουν δυο βασικές ιδέες για τον τρόπο με τον οποίο προκύπτουν αυτοδραστικά B κύτταρα, είτε μέσω της διατάραξης σημείων ελέγχου και της αδειοδότησης των ανώριμων αυτοδραστικών B κυττάρων είτε μέσω αποτυχίας των περιφερικών φραγμών και της εξαρτώμενης από T κύτταρα έναρξης των αποκρίσεων των B κυττάρων. Οι ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο φαίνεται να μην μπορούν να απομακρύνουν από την κυκλοφορία τα αυτοδραστικά B κύτταρα αλλά ο VH (D)JH ανασυνδυασμός για την παραγωγή του υποδοχέα των B κυττάρων παραμένει ίδιος με τους υγιείς (Wahren-Herlenius and Dörner 2013).

Ο προσδιορισμός μια ασθένειας ως αυτοάνοσης θα πρέπει να περιλαμβάνει ορισμένα κριτήρια, παρόμοια με εκείνα του Koch για μολυσματικές ασθένειες, τα οποία στην

περίπτωση των αυτοάνοσων νοσημάτων χαρακτηρίζονται ως αξιώματα του Witebsky. Ειδικότερα, θα πρέπει να εντοπίζονται αυτοδραστικά Β και Τ λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα του ασθενή, να επάγεται η ασθένεια ύστερα από μεταμόσχευση κυττάρων ή μεταφορά αντισωμάτων σε πειραματικά μοντέλα, να παρατηρείται διαπλακουντιακή μεταβίβαση της ασθένειας, να παρουσιάζονται συγκεκριμένα χαρακτηριστικά παθοφυσιολογίας *in vitro* και σε ζωικά μοντέλα και να παρατηρείται αυτοδραστικότητα σε περιοχές που εμφανίζουν βλάβες. Ορισμένες βέβαια από τις ασθένειες που χαρακτηρίζονται ως αυτοάνοσες μπορεί να μην πληρούν όλα τα κριτήρια (Pisetsky, 2023).

Η έρευνα για τα αυτοάνοσα νοσήματα έχει εδραιώσει το φαινόμενο της προκλινικής αυτοανοσίας. Η προκλινική αυτοανοσία ουσιαστικά αποτελεί μια χρονική περίοδο κατά την οποία η αυτοδραστικότητα παρατηρείται κυρίως μέσω της αύξησης των αυτοαντισωμάτων αλλά δεν παρατηρούνται τα συμπτώματα της ασθένειας. Το εύρος ανάμεσα στην προκλινική αυτοανοσία και την εκδήλωση της αυτοάνοσης νόσου ποικίλλει ανάλογα με τον βαθμό της συμπτωματολογίας, τη διαθεσιμότητα των εργαστηριακών ευρημάτων και την αναγνώριση των συμπτωμάτων από τον θεράποντα. Οι αυτοάνοσες ασθένειες αναπτύσσονται στη διάρκεια του χρόνου και η έκβαση τους επηρεάζεται από την παρουσία γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Pisetsky, 2023).

Η παρουσία γενετικών παραγόντων κινδύνου μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στη σηματοδότηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων και στα πρώτα στάδια της ζωής. Στη συνέχεια, αυτές οι διαταραχές γίνονται κλινικές εκδηλώσεις λόγω της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Με την πάροδο του χρόνου τα ευρήματα της αυτοανοσίας παρουσιάζονται (αυξημένα επίπεδα αυτοαντισωμάτων και κυτταροκινών) και οι ασθενείς εισέρχονται σε μια φάση της νόσου που καλείται ασυμπτωματική. Η επακόλουθη συσσώρευση άλλων αιτιολογικών παραγόντων μπορεί να προκαλέσει την μετάβαση στη φάση της προκλινικής αυτοανοσίας, όπου μπορεί να παρατηρούνται ορισμένα συμπτώματα όπως η αρθραλγία, τα οποία όμως υποεκτιμώνται (Pisetsky, 2023).

Κεφάλαιο 2: Εισαγωγή στο τομέα της Πρωτεομικής και της Μεταβολομικής

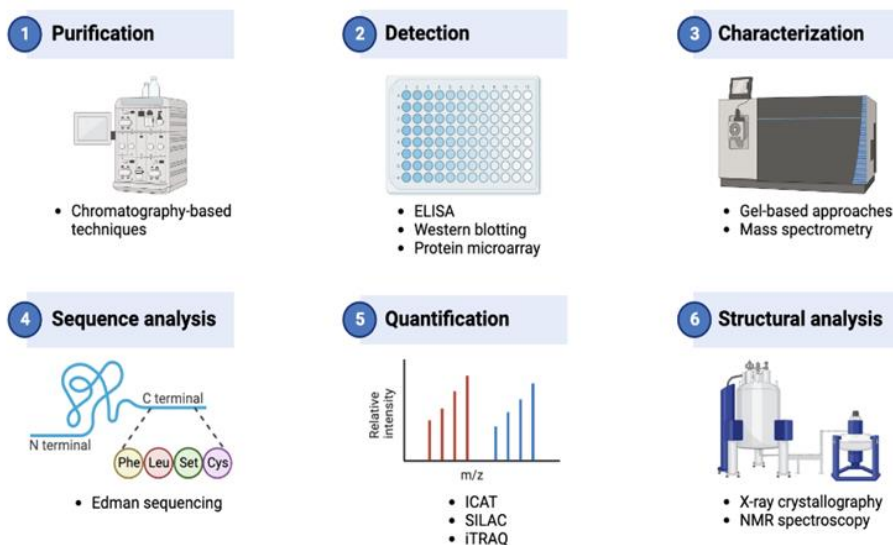
Υποενότητα 2.1 Επιστήμη της Πρωτεομικής

Η πρωτεομική είναι ένας ταχέως αναπτυσσόμενος κλάδος, ο οποίος με την μελέτη του εξασφαλίζει την κατανόηση πληθώρας πρωτεϊνών που υπάρχουν σε ένα κύτταρο ή ιστό. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεομική ασχολείται με τη ανάλυση της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Ο όρος πρωτεώμιο αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα, συμπεριλαμβανομένης της πρόσθετης παραλλαγής της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Σκοπός της μελέτης των συνολικών πρωτεϊνών ενός κυττάρου ως προς την έκφραση τους, τη δομή τους, τη λειτουργία τους και την αλληλεπίδραση τους, είναι η ανακάλυψη νέων πρωτεϊνικών βιοδεικτών. Συνεπώς, η πρωτεομική λειτουργεί ως αρωγός για την έρευνα, την πρόληψη και τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, με μη παρεμβατικό τρόπο. Ο ρόλος της είναι συμπληρωματικός με τις άλλες τεχνολογίες της «ωμικής», όπως είναι η γονιδιωματική. Σε σύγκριση με τη γονιδιωματική, η κατανόηση της γονιδιακής λειτουργίας μέσω της πρωτεομικής είναι πιο σύνθετη. Η δυσκολία της πρωτεομικής έγκειται στο γεγονός ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών δεν καθορίζονται μόνο από τα αντίστοιχα επίπεδα των mRNAs αλλά και από τη ρύθμιση του ξενιστή (Aslam et al. 2017).

Η ανάλυση του μεταγραφώματος ή του πρωτεώματος προσδιορίζει τις διακυμάνσεις στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης, η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται μέσω των τσιπ μικροσυστοιχίας. Οι συμβατικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών βασίζονται στη χρωματογραφία, όπως τη χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC), τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) και τη χρωματογραφία συγγένειας. Επίσης, άλλες συμβατικές μέθοδοι για την ανάλυση μεμονομένων πρωτεϊνών, είναι η ενζυμική ανοσοπροσοφνητική δοκιμασία (ELISA) και η Western blotting. Με αυτές τις τεχνικές δεν μπορεί να προσδιοριστεί το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτελείται μέσω της ηλεκτροφόρησης γέλης δωδεκυλοθειικού

νατρίου- πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης γέλης (2-DE) και δισδιάστατης διαφορικής ηλεκτροφόρησης γέλης (2D-DIGE). Έχουν δημιουργηθεί μικροσυστοιχίες για ανάλυση υψηλής απόδοσης και ταχείας έκφρασης. Την υψηλότερη ευαισθησία για την ανάλυση πρωτεϊνικών μιγμάτων έχει η φασματομετρία μάζας (MS) (Aslam et al. 2017).

Proteomics Workflow and Techniques



Εικόνα 1: Ροή εργασίας και τεχνικές που πραγματοποιούνται στη πρωτεομική. Πηγή: <https://www.biorender.com> 14/06/2024

➤ Συμβατικές τεχνικές για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών:

- I. **Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC):** Το IEC είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό πρωτεϊνών με βάση το φορτίο τους. Ορισμένα αμινοξέα είναι ανιονικά και κάποια αμινοξέα είναι κατιονικά σε μία πρωτεΐνη. Αρχικά διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση τη φύση του φορτίου τους (κατιονικό και ανιονικό) και περαιτέρω με βάση τη συγκριτική ισχύ του φορτίου τους (Aslam et al. 2017).
- II. **Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC):** Το SEC διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μοριακό τους μέγεθος, μέσω μιας πορώδους μήτρας, με διακριτό μέγεθος πόρων με βάση τη διείσδυση τους. Χρησιμοποιείται κυρίως για μη ομοιολογικές πολυμερικές πρωτεΐνες υπό βιολογικές συνθήκες (Aslam et al. 2017).

- III. **Χρωματογραφία συγγένειας:** Η χρωματογραφία συγγένειας επιτρέπει την διερευνήσει της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η βασική αρχή αυτής της μεθόδου είναι η αναστρέψιμη αλληλεπίδραση μεταξύ του συνδέτη συγγένειας της χρωματογραφικής μήτρας και των πρωτεϊνών που πρόκειται να καθαριστούν (Aslam et al. 2017).

Συμβατικές τεχνικές για την ανίχνευση των πρωτεϊνών:

- I. **Ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμα (ELISA):** Η ανάλυση χρησιμοποιεί το αντιγόνο ή τα αντισώματα στη στερεά επιφάνεια και την προσθήκη αντισωμάτων συζευγμένων με ένζυμο και μετράει τις διακυμάνσεις στις ενζυμικές δραστηριότητες που είναι ανάλογες με τη συγκέντρωση αντισώματος και αντιγόνου στο βιολογικό δείγμα (Aslam et al. 2017).
- II. **Western blotting (ανοσαποτύπωση κηλίδων):** Το Western blotting είναι μια σημαντική και ισχυρή τεχνική για την ανίχνευση πρωτεϊνών χαμηλής αφθονίας που περιλαμβάνει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση, τη μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και την ακριβή ανίχνευση μιας πρωτεΐνης στόχου από αντισώματα συζευγμένα με ένζυμα (Aslam et al. 2017).

Τεχνικές για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών:

- I. **Ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE):** Το SDS-PAGE είναι μια τεχνική υψηλής ανάλυσης για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους, διευκολύνοντας έτσι την προσέγγιση του μοριακού βάρους. Οι πρωτεΐνες είναι ικανές να κινούνται με ηλεκτρικό πεδίο σε ένα μέσο που έχει pH διαφορετικό από το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Διαφορετικές πρωτεΐνες στο μείγμα μεταναστεύουν με διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με την αναλογία μεταξύ του φορτίου και της μάζας τους. Ωστόσο, η προσθήκη δωδεκυλοθειικού νατρίου μετουσιώνει τις πρωτεΐνες, επομένως τις διαχωρίζει απολύτως ανάλογα με το μοριακό βάρος (Aslam et al. 2017).
- II. **Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση γέλης (2D-PAGE):** Οι δισδιάστατες ηλεκτροφορήσεις γέλης πολυακρυλαμιδίου (2D-PAGE) είναι μια αποτελεσματική και

αξιόπιστη μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών με βάση τη μάζα και το φορτίο τους. Το 2D-PAGE είναι ικανό να αναλύει ~ 5.000 διαφορετικές πρωτεΐνες διαδοχικά, ανάλογα με το μέγεθος της γέλης. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με φορτίο στην πρώτη διάσταση ενώ στη δεύτερη διάσταση διαχωρίζονται με βάση τις διαφορές μεταξύ της μάζας τους. Το 2-DE εφαρμόζεται με επιτυχία για τον χαρακτηρισμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και αξιολόγηση μεταβολικών οδών. Η ηλεκτροφόρηση 2D-gel, το επίκεντρο της έρευνας πρωτεϊνικής κατά την τελευταία δεκαετία, έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά ευρέως στην αυτοανοσία. Μία από τις πρώτες αναφορές επικεντρώθηκε στη μελέτη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Χρησιμοποιώντας το 2D-gel/MS, η S100A9, μια μικρή πρωτεΐνη που δεσμεύει το ασβέστιο, επισημάνθηκε ως πιθανός δείκτης για τη Ρευματοειδή αρθρίτιδα (Aslam et al. 2017).

- III. **Μη ποσοτικές προσεγγίσεις που δεν βασίζονται σε γέλη 2D-LC MS:** Μια συνήθως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που δεν βασίζεται σε γέλη για διαχωρισμό και ταυτοποίηση πρωτεϊνών είναι η δισδιάστατη (2D) υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (LC/MS). Αυτή η τεχνολογία περιλαμβάνει την έκλυση πεπτιδίων που έχουν υποστεί πέψη από μια ισχυρή στήλη ανταλλαγής κατιόντων που ακολουθείται από διαχωρισμό αντίστροφης φάσης και ταυτοποίηση με MS. Οι ερευνητές έχουν μελετήσει το αρθρικό πρωτέωμα από ασθενείς με RA με διαβρωτική έναντι μη διαβρωτική αρθρίτιδα χρησιμοποιώντας 2D LC-MS και έχουν αποκαλύψει 3 πρωτεΐνες που δεσμεύουν ασβέστιο της οικογένειας S100, συμπεριλαμβανομένων των S100A8 (calgranulin A), S100A9 (calgranulin B) και S100A12 (calgranulin C) ως πιθανοί δείκτες ασθένειας (Aslam et al. 2017).

Όργανα για την ανάλυση της δομής και της αλληλουχίας των πρωτεϊνών:

- I. **Φασματομετρία μάζας (MS):** Το MS χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αναλογίας μάζας προς φορτίο (m/z), επομένως είναι χρήσιμο για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών. Η συνολική διαδικασία

περιλαμβάνει τρία βήματα. Τα μόρια πρέπει να μετατραπούν σε ιόντα αέριας φάσης στο πρώτο βήμα, γεγονός που αποτελεί πρόκληση για τα βιομόρια σε υγρή ή στερεή φάση. Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει τον διαχωρισμό ιόντων με βάση τις τιμές m/z παρουσία ηλεκτρικών ή μαγνητικών πεδίων σε ένα διαμέρισμα γνωστό ως αναλυτής μάζας. Τέλος, μετρώνται τα διαχωρισμένα ιόντα και η ποσότητα κάθε είδους με συγκεκριμένη τιμή m/z . Η μέθοδος ιονισμού που χρησιμοποιείται συνήθως περιλαμβάνει ιονισμό εκρόφησης λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI), επιφανειακή εκρόφηση/ιοντισμό με λέιζερ (SELDI) και ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI) (Aslam et al. 2017).

II. Φασματοσκοπία NMR: Το NMR είναι ένα κορυφαίο εργαλείο για τη διερεύνηση της μοριακής δομής, της αναδίπλωσης και της συμπεριφοράς των πρωτεϊνών. Ο προσδιορισμός της δομής μέσω φασματοσκοπίας NMR τυπικά περιλαμβάνει διάφορες φάσεις, καθεμία από τις οποίες χρησιμοποιεί ένα διακριτό σύνολο εξαιρετικά ειδικών τεχνικών. Τα δείγματα προετοιμάζονται και γίνονται μετρήσεις ακολουθούμενες από ερμηνευτικές προσεγγίσεις για την επιβεβαίωση της δομής. Η δομή της πρωτεΐνης είναι θεμελιώδης σε αρκετούς ερευνητικούς τομείς, όπως ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή, η μοντελοποίηση ομολογίας και η λειτουργική γονιδιωματική (Aslam et al. 2017).

Τεχνικές για την ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών:

- ✓ **Σήμανση ICAT:** Η ICAT είναι μια μέθοδος ισοτοπικής σήμανσης στην οποία χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια χημικής σήμανσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Το ICAT έχει επίσης επεκτείνει το φάσμα των πρωτεϊνών που μπορούν να αναλυθούν και επιτρέπει τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση της αλληλουχίας των πρωτεϊνών από σύνθετα μείγματα. Τα αντιδραστήρια ICAT περιλαμβάνουν ετικέτα συγγένειας για απομόνωση σημασμένων πεπτιδίων, ισοτοπικά κωδικοποιημένο συνδετήρα και αντιδραστική ομάδα (Aslam et al. 2017).
- ✓ **Σταθερή ισοτοπική επισήμανση με αμινοξέα σε κυτταρική καλλιέργεια (SILAC):** Το SILAC είναι μια προσέγγιση βασισμένη στο MS για ποσοτική πρωτεομική που

εξαρτάται από τη μεταβολική σήμανση ολόκληρου του κυτταρικού πρωτεώματος. Τα πρωτεώματα διαφορετικών κυττάρων που αναπτύσσονται σε κυτταρική καλλιέργεια επισημαίνονται με «ελαφριά» ή «βαριά» μορφή αμινοξέων. Το SILAC έχει αναπτυχθεί ως μια πρόσφορη τεχνική για τη μελέτη της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, της κυτταρικής σηματοδότησης, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Επιπλέον, το SILAC είναι μια ζωτικής σημασίας τεχνική για τις εκκρινόμενες οδούς και τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες σε κυτταρική καλλιέργεια (Aslam et al. 2017).

- ✓ **Ισοβαρική ετικέτα για σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση (iTRAQ):** Το iTRAQ είναι τεχνική πολλαπλής επισήμανσης πρωτεϊνών για ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με βάση τη διαδοχική φασματομετρία μάζας. Αυτή η τεχνική βασίζεται στην επισήμανση της πρωτεΐνης με ισοβαρικές ετικέτες (8-plex και 4-plex) για σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση. Η τεχνική περιλαμβάνει την επισήμανση των αμινομάδων πρωτεϊνών του N-άκρου και της πλευρικής αλυσίδας, κλασματοποιούνται μέσω υγρής χρωματογραφίας και τελικά αναλύονται μέσω MS. Είναι σημαντικό να βρεθεί η γονιδιακή ρύθμιση για να κατανοηθεί ο μηχανισμός της νόσου, επομένως η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας το iTRAQ είναι μια κατάλληλη μέθοδος που βοηθά στο να αναγνωρίζει και να ποσοτικοποιεί μία πρωτεΐνη ταυτόχρονα (Aslam et al. 2017).

Βιοπληροφορική ανάλυση

Η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιείται με κάποιες βάσεις δεδομένων όπως είναι το GenBank, RefSeq, UniProt, UniRef, UniParc. Στη μελέτη ανακάλυψης βιοδεικτών στα αυτοάνοσα νοσήματα πέρα από τις τεχνικές 2D-gel-MS-MS και 2D-LC-MS-MS, που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη βιοδεικτών στην Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, χρησιμοποιούνται επίσης και οι εξής τεχνικές για την ανακάλυψη βιοδεικτών στον Συστηματικό Ερυθηματώδες Λύκο: (Aslam et al. 2017)

- **SELDI-TOF-MS-MS:** είναι μία μη ποσοτική μέθοδος μη βασιμμένη σε γέλη. Η βελτιωμένη επιφανειακή εκρόφηση/ιοντισμός λέιζερ MS (SELDI-TOF MS) επιτρέπει στα πρωτεΐνες είτε με χημικά είτε με βιοχημικά τροποποιημένες επιφάνειες να δεσμεύουν διαφορετικά υποσύνολα πρωτεϊνών για ταυτοποίηση από το MS. Αν

και σπάνια χρησιμοποιείται στην έρευνα αυτοανοσίας, οι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει το SELDI-TOF MS για να διακρίνουν τα πρωτεώματα των ούρων μεταξύ ενεργού και ανενεργού νεφρίτιδας λύκου, επιτρέποντάς τους να διακρίνουν σωστά το 92% των ανενεργών και ενεργών ασθενών με Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο (Aslam et al. 2017).

- **Συστοιχία επικαλυμμένη με αντιγόνο:** Σε αντίθεση με τις παραπάνω προσεγγίσεις, οι στοχευμένες πρωτεομικές πλατφόρμες βασισμένες σε συστοιχίες ξεκινούν με ένα πεπερασμένο σύνολο πρωτεϊνών ή αντισωμάτων και επιδιώκουν να εξακριβώσουν εάν υποσύνολα αυτών των υποψηφίων μπορεί να είναι χρήσιμα στη διάκριση των ασθενών δειγμάτων από τους κανονικούς μάρτυρες. Μια τέτοια εστιασμένη συστοιχία έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των ειδικοτήτων αυτοαντισωμάτων. Η πρώτη συστοιχία αυτοαντιγόνων που σχεδιάστηκε για να ανιχνεύει και να χαρακτηρίζει αυτοαντισώματα αναπτύχθηκε από τον Joos. Αργότερα, μια μεγαλύτερης κλίμακας συστοιχία αυτοαντιγόνων αναπτύχθηκε από τον Robinson και τους συνεργάτες του για τη μελέτη ορών από αυτοάνοσα νοσήματα. Άλλοι έχουν σχεδιάσει «συστοιχίες πειραματικών πρωτεωμάτων» για τον εντοπισμό πιθανών συστάδων αυτοαντισωμάτων που θα μπορούσαν να προβλέψουν καλύτερα τη δραστηριότητα της νεφρικής νόσου σε SLE ποντικού, καθώς και σε ασθενείς με νεφρίτιδα λύκου (Aslam et al. 2017).
- **Συστοιχία αντισωμάτων κυτοκίνη:** Οι συστοιχίες αντισωμάτων κυτοκίνης/χημειοκίνης είναι πολυπλεγμένες, βασισμένες σε σάντουιτς δοκιμασίες ELISA που έχουν σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πολλαπλών κυτοκινών σε ένα πείραμα. Μια τέτοια σειρά έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των επιπέδων 62 πρωτεϊνών στα ούρα από ποντίκια με νεφρίτιδα που προκαλείται από ανοσοποιητικό. Είναι ενδιαφέρον ότι τα αυξημένα επίπεδα VCAM-1, sTNFR-1, CXCL16 και P-σελεκτίνης στα ούρα, συσχετίστηκαν καλά με τον βαθμό νεφρίτιδας σε ποντικούς και ασθενείς με Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο (Aslam et al. 2017).

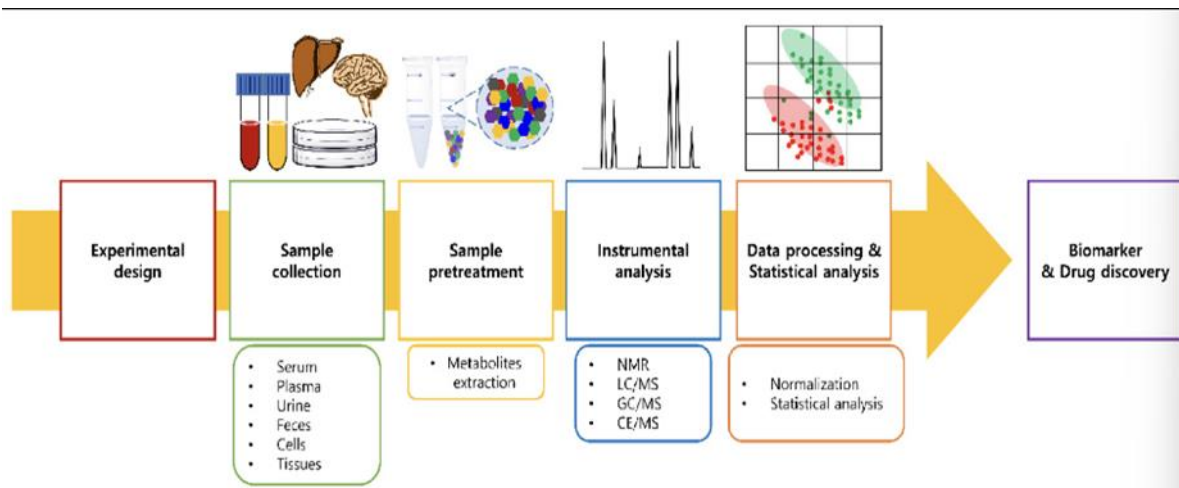
Υποενότητα 2.2 Επιστήμη της Μεταβολομικής

Η μεταβολομική είναι ένα πεδίο που εντάσσεται και αυτό στις τεχνολογίες της «ωμικής». Το πεδίο αυτό ασχολείται με την αναγνώριση και τη μέτρηση ενδογενών μικρών μορίων σε βιοχημικές διεργασίες, με σκοπό τη διάγνωση της νόσου μέσω βιοδεικτών και την παροχή σημαντικών πληροφοριών για την εύρεση θεραπείας. Η μεταβολομική διακρίνεται σε μη στοχευμένη και στοχευμένη μεταβολομική. Οι μη στοχευμένες μεταβολομικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη δημιουργία ενός ευρέος φάσματος μεταβολιτών χωρίς προηγούμενη υπόθεση και εστιάζει στην ταυτόχρονη ανίχνευση όλων των προσβάσιμων μεταβολιτών σε ένα δείγμα, δίνοντας τη συνολική εικόνα ολόκληρου του μεταβολισμού (Yoon et al. 2021).

Η στοχευμένη μεταβολομική χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό, δηλαδή για τη μέτρηση συγκεκριμένων βιοδεικτών. Συνεπώς η στοχευμένη μεταβολομική επικεντρώνεται στην ποσοτική ανάλυση προκαθορισμένων μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα. Η στοχευμένη μεταβολομική παρέχει υψηλότερη ευαισθησία και επιλεκτικότητα από τη μη στοχευμένη, διότι απαιτεί προηγούμενες πληροφορίες για την ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση της μεθόδου ειδικής ανάλυσης μεταβολιτών για την αξιολόγηση της. Η επιλογή της κατάλληλης προσέγγισης ανάλογα με το σκοπό της μελέτης κρίνεται απαραίτητη, καθώς οι δύο προσεγγίσεις έχουν εντελώς διαφορετικούς αναλυτικούς σκοπούς (Yoon et al. 2021).

Η ροή εργασίας της μεταβολομικής περιλαμβάνει έξι βήματα: (Aslam et al. 2017b)

- τον πειραματικό σχεδιασμό
- τη συλλογή δειγμάτων
- προεπεξεργασία δειγμάτων (εκχύλιση μεταβολίτη)
- ενόργανη ανάλυση
- επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση
- και επαλήθευση βιοδεικτών



Εικόνα 2: Η διαδικασία βήμα προς βήμα για την μεταβολομική ανάλυση δειγμάτων. Πηγή: Yoon, N., Jang, A.-K., Seo, Y. and Jung, B.H. 2021. *Metabolomics in Autoimmune Diseases: Focus on Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, and Multiple Sclerosis*. *Me-tabolites* 11(12), p. 812. doi: 10.3390/metabo11120812. 14/06/2024

Η συλλογή δειγμάτων και η προπεξεργασία

Στο στάδιο της συλλογής δειγμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά δείγματα, αλλά για την ανακάλυψη βιοδεικτών χρησιμοποιούνται τα βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι ο ορός/πλάσμα, τα ούρα και τα εκχυλίσματα κοπράνων, επειδή είναι ελάχιστα επεμβατικά και περιέχουν πληθώρα μεταβολιτών (Yoon et al. 2021).

Τυπικές προεπεξεργασίες βιολογικών δειγμάτων που εφαρμόζονται για μελέτες μεταβολομικής περιλαμβάνουν την κατακρήμνιση πρωτεϊνών, την εκχύλιση και την ανασύσταση. Η μέθοδος που εφαρμόζεται για την καθίζηση πρωτεϊνών είναι η χρήση οργανικών διαλυτών όπως η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Η εκχύλιση του μεταβολίτη είναι σημαντικό βήμα, επειδή τα αποτελέσματα της μεταβολομικής εξαρτώνται από αυτή τη διαδικασία. Στόχος της εκχύλισης είναι η απόκτηση του μεταβολίτη από τη δείγμα και η απομάκρυνση της παρεμβαλλόμενης ουσίας. Η εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης ποικίλλει ανάλογα με το βιολογικό δείγμα. Υπάρχει η εκχύλιση στερεού- υγρού, η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) ή η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) εφαρμόζονται για τα υγρά δείγματα. Το LLE μπορεί να διαχωρίσει τους μεταβολίτες σε δύο μέρη, πολικούς και μη πολικούς, χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες και υδατικά διαλύματα. Το LLE αφαιρεί ανεπιθύμητες ουσίες και απομονώνει τους

αναλυόμενους αναλύτες. Η SPE χρησιμοποιεί υλικά αντίστροφης φάσης και υλικά ανταλλαγής ιόντων για τη απορρόφηση παρεμβαλλόμενων ουσιών. Η SPE παρέχει έναν πιο επιλεκτικό σχεδιασμό πρωτοκόλλου από τη LLE, καθώς διαθέτει ποικιλία ροφητών (όπως υλικά αντίστροφης φάσης) (Yoon et al. 2021).

Η ενόργανη ανάλυση

Στη μεταβολομική τα δύο κύρια όργανα ανάλυσης που χρησιμοποιούνται είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η φασματομετρία μάζας (MS). Το NMR είναι μια μη καταστροφική τεχνική, που σημαίνει ότι τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν περισσότερες από μία φορές. Η μεθοδολογία που εφαρμόζει το NMR βασίζεται στην αρχή ότι ορισμένα άτομα (^1H , ^{13}C , ^{31}P) μέσα στα μόρια μπορούν απορροφήσουν τη χαρακτηριστική ακτινοβολία που συμβαίνει όταν τα μόρια τοποθετούνται σε πολύ ισχυρά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα ισχυρά μαγνητικά πεδία αλλάζουν την κατεύθυνση του πυρηνικού σπιν σε κάθε άτομο του μορίου. Κάθε μόριο έχει ένα ξεχωριστό μοτίβο χημικών μετατοπίσεων NMR λόγω της χημικής του δομής και η διάταξη των ατόμων υδρογόνου γύρω από το μόριο είναι διαφορετική. Αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν τη ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων με NMR. Ενώ τα όργανα MS ανιχνεύουν μεταβολίτες με εντελώς διαφορετικό τρόπο από τα όργανα NMR. Ο MS είναι μία καταστροφική τεχνική, διότι, σε όλες τις τεχνικές ο ιονισμός των μορίων είναι το κλειδί για την ανίχνευση και τη ταυτοποίηση μεταβολιτών. Οι ενώσεις μπορούν να αναγνωριστούν μετρώντας την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) ή θραυσμάτων των ιονισμένων μορίων (Yoon et al. 2021).

Η MS συνήθως συνδυάζεται με άλλες τεχνικές διαχωρισμού όπως η υγρή χρωματογραφία (LC), αέρια χρωματογραφία (GC), η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (CE). Οι διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων: (Yoon et al. 2021).

- η μέθοδος MS είναι χιλιάδες φορές πιο ευαίσθητη από τις μεθόδους NMR. Το NMR χάνει πληροφορίες όταν οι μεταβολίτες βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση.
- Σε αντίθεση με το MS, ανάλυση NMR δεν απαιτεί ειδική προεπεξεργασία του δείγματος, που συνήθως απαιτεί μόνο αραιώση του δείγματος.

- Η ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση NMR είναι 300 μL, αλλά η ανάλυση με βάση το MS απαιτεί μόνο 10-30 μL.

Όλες οι μεταβολικές αναλύσεις, ανεξάρτητα από το ποιο όργανο θα χρησιμοποιηθεί, απαιτούν τη χρήση δειγμάτων εσωτερικών προτύπων (IS) και ποιοτικού ελέγχου (QC). Τα εσωτερικά πρότυπα είναι γνωστές ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις που προστίθενται στο βιολογικό δείγμα και ο ποιοτικός έλεγχος αντιπροσωπεύει τη σύνθεση μεταβολιτών των δειγμάτων. Βοηθούν στην πραγματοποίηση ακριβούς μεταβολομικής ανάλυσης των πραγματικών διαφορών συγκέντρωσης των μεμονωμένων μεταβολιτών που βρίσκονται σε διαφορετικά δείγματα και στη διασφάλιση ότι η δοκιμή είναι ικανοποιητική. Επειδή, οι ποσότητες ολόκληρου του δείγματος ή οι συγκεντρώσεις μεταβολιτών μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από δείγμα σε δείγμα, είναι σημαντικό να μειωθεί ή να εξαλειφθεί η επίδραση της παραλλαγής (Yoon et al. 2021).

Στατιστική ανάλυση

Η κατάλληλη στατιστική ανάλυση, στη μεγάλης κλίμακας πηγές μεταβολικών δεδομένων, είναι απαραίτητη για την εξαγωγή ουσιαστικών αποτελεσμάτων. Υπάρχουν δύο τύποι προσεγγίσεων στις πολυμεταβλητές της μεταβολομικής. Η πρώτη προσέγγιση είναι η μάθηση χωρίς επίβλεψη, η οποία βρίσκει μοτίβα αυτόνομα και αυτόματα ομαδοποιεί και σχηματίζει ομάδες για να συμπίεσει το σύνολο των δεδομένων και να εξάγει σημαντικά συμπεράσματα. Η προσέγγιση χωρίς επίβλεψη ερμηνεύει τα δεδομένα χωρίς να γνωρίζει κάποια ετικέτα. Η άλλη προσέγγιση είναι η εποπτευόμενη μάθηση, η οποία ερμηνεύει δεδομένα με γνώση των πληροφοριών ετικέτας. Στην εποπτευόμενη μάθηση, η πιο κοινή τεχνική είναι η ανάλυση μερικής διάκρισης ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), η οποία βρίσκει την κατεύθυνση προβολής που δίνει τη μεγαλύτερη συνδιακύμανση μεταξύ των αρχικών δεδομένων και των ετικετών (Yoon et al. 2021).

Κεφάλαιο 3: Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

Υποενότητα 3.1 Επιδημιολογία νόσου

Ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) αποτελεί μια αυτοάνοση ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και συνοδεύεται από ένα ευρύ εύρος κλινικών εκδηλώσεων, όπως νεφρικά, δερματολογικά, νευροψυχιατρικά και καρδιαγγειακά συμπτώματα. Η επίπτωση του λύκου είναι 0.3-31.5 στα 100.000 άτομα το έτος και ο προσαρμοσμένος επιπολασμός 50-100 στα 100.000. Το κόστος των συστημάτων υγείας για την αντιμετώπιση του λύκου είναι σημαντικό, το οποίο ανέρχεται περίπου στα 21.000-53.000 δολάρια στις ΗΠΑ ετησίως και στα 26.000-48.000 ευρώ στην Ευρώπη. Ο λύκος συνιστά ένα σημαντικό κοινωνικό και δημόσιας υγείας πρόβλημα καθώς οι θεραπείες στοχεύουν στον έλεγχο των συμπτωμάτων και στην καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου και όχι στην πλήρη θεραπεία (Kaul et al., 2016).

Η εξέλιξη της νόσου του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου αποτελεί συνδυασμό τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο φαινότυπος του λύκου φαίνεται από μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα ότι καθορίζεται σημαντικά από το περιβάλλον καθώς το ποσοστό συμφωνίας σε αυτά είναι μόλις 25%. Οι πιο σημαντικές γενετικές συνιστώσες για το λύκο είναι τα συστατικά του συμπληρώματος C1Q και C4. Ακόμη, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον IRF5 σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα απόκρισης ιντερφερόνης τύπου 1 σε ασθενείς με λύκο. Υποψήφιοι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι η έκθεση σε UV ακτινοβολία, η μόλυνση από τον ιό Epstein Barr, ενδογενείς αλληλουχίες ρετροϊών και διάφορα φάρμακα (Kaul et al., 2016).

Τα αυξημένα ποσοστά της ασθένειας σε γυναίκες υποδηλώνουν την εμπλοκή και ενδοκρινικών παραγόντων. Μελέτες δείχνουν ότι ασθενείς που έλαβαν οιστρογόνα και προγεστερόνη εμφανίζουν 1.34 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για εκδήλωση της νόσου, συγκριτικά με τους ασθενείς που δέχονται placebo αγωγές. Επίσης, τα χαμηλά επίπεδα της δεϋδροεπιανδροστερόνης, ενός ενδιάμεσου μεταβολίτη στο μονοπάτι σχηματισμού ανδρογόνων και οιστρογόνων, συσχετίζονται με την προδιάθεση για λύκο (Kaul et al., 2016).

Η πολυπλοκότητα της νόσου φανερώνεται από τα πολλά διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά όπως η αρθρίτιδα, τα νευρολογικά συμπτώματα, τα δερματολογικά

εξανθήματα, οι αλλοιώσεις στους νεφρούς και οι γαστρεντερικές επιπλοκές. Ακόμη, παρουσιάζονται σημαντικά εργαστηριακά ευρήματα, συγκεκριμένα αιματολογικές και ορολογικές αλλαγές. Για παράδειγμα μειωμένα επίπεδα συστατικών του συμπληρώματος και αυξημένα επίπεδα αυτοαντισωμάτων. Η πολυπλοκότητα αυξάνεται και από το γεγονός των διαφορετικών υποτύπων της ασθένειας, που περιλαμβάνει τον δερματολογικό υπότυπο, ο οποίος παρουσιάζει αρνητικές ορολογικές δοκιμασίες και τον υπότυπο του φαρμακοεπαγώμενου λύκου που συσχετίζεται με μια σειρά φαρμάκων και αντισωμάτων 8 έναντι των ιστονών. Σε όλα αυτά έρχεται να προστεθεί και η συννοσηρότητα για να αυξήσει την πολυπλοκότητα. Σε κοορτές ασθενών που πάσχουν από λύκο το 29-46% εμφανίζει αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, τα οποία εξαρτώνται από την εθνικότητα και μπορούν σε ποσοστό 15% να συσχετιστούν με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Επίσης, οι ασθενείς με λύκο παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακές ασθένειες, που μπορεί να οδηγήσουν σε θνησιμότητα. Η θνησιμότητα σε ασθενείς με λύκο έχει σημαντικά μειωθεί στο δεύτερο μισό του 20ου αιώνα, με τη δεκαετή επιβίωση των ασθενών από το 60% των περιπτώσεων το 1950 να ανεβαίνει στο 90% το 1980 (Kaul et al., 2016).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Ένας σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας είναι η μόλυνση από τον ιό EBV που φαίνεται να μπορεί να πυροδοτήσει την ασθένεια. Ο EBV συνεισφέρει στην ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας και στη διαφοροποίηση των Β κυττάρων και μπορεί να διεγείρει την παραγωγή των αυτοαντισωμάτων τα οποία είναι ειδικά έναντι των πρωτεϊνών που παράγουν οι ίδιοι οι ασθενείς αλλά και ειδικά έναντι των πρωτεϊνών που κωδικοποιεί ο ιός. Τα μικρά RNAs του ιού επάγουν την έκφραση των ιντερφερονών τύπου 1, μέσω της πρόσδεσης στην εξαρτώμενη από δίκλωνο RNA πρωτεϊνική κινάση. Ακόμη, τα αντισώματα που παράγονται έναντι της πρωτεΐνης EBNA1 του ιού μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το δίκλωνο DNA, με αποτέλεσμα την αυτοάνοση απόκριση (Kaul et al., 2016).

Χαρακτηριστικά και κριτήρια	Βαθμολογία με βάση την Ευρωπαϊκή επιτροπή
Γενικά Κριτήρια	
Πυρετός	2

Αιματολογικά Κριτήρια	
Λευκοπενία	3
Θρομβοπενία	4
Αιμόλυση	4
Νευροψυχιατρικά Κριτήρια	
Παραλήρημα	2
Ψύχωση	3
Επιληπτική Κρίση	5
Βλεννοδερματικά Κριτήρια	
Αλωπεκία χωρίς ουλές	2
Στοματικά Έλκη	2
Υποξύς Δερματικός Λύκος	4
Οξύς Δερματικός Λύκος	6
Μυοσκελετικά Κριτήρια	
Εμπλοκή Αρθρώσεων	6
Νεφρικά Κριτήρια	
Πρωτεϊνουρία	4
Βιοψία νεφρού	8
Ανοσολογικά κριτήρια	
Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα	2
Αντικαρδιολιπίνης αντισώματα	3
Χαμηλά επίπεδα C3 ή C4	3
Χαμηλά επίπεδα C3 και C4	4
Ειδικά αυτοαντισώματα (έναντι dsDNA, anti-Sm)	6

Πίνακας 1: Κριτήρια Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή.

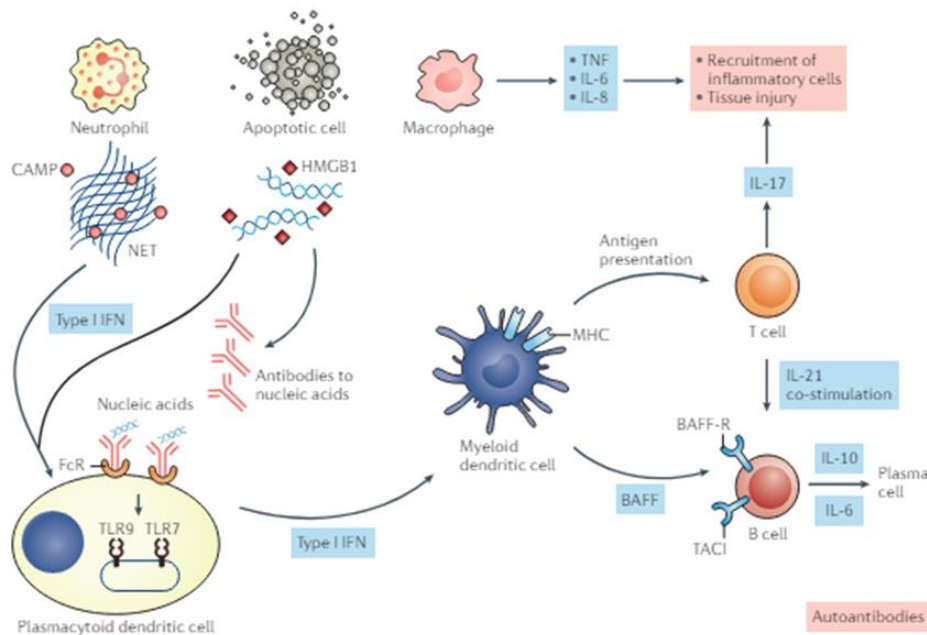
Η UV ακτινοβολία και συγκεκριμένα φάρμακα μπορούν να επάγουν την παθογένεια του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου, μέσω της επίδρασης που έχουν στο DNA. Η UV ακτινοβολία μπορεί να επάγει δίκλωνες θραύσεις με αποτέλεσμα την επίδραση στην έκφραση των γονιδίων, την παραγωγή νουκλεϊκών θραυσμάτων ή την ενεργοποίηση της απόπτωσης ή της νέκρωσης, ενώ τα φάρμακα μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA. Το κάπνισμα αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της ασθένειας, καθώς μπορεί να παρέχει το ερέθισμα για μια φλεγμονώδη κατάσταση που θα επηρεάσει τα επιθήλια ή τα μονοκύτταρα του πνεύμονα (Kaul et al., 2016).

Υποενότητα 3.2 Μηχανισμός αιτιοπαθογένεσης της νόσου

Η παθογένεση του συστηματικού ερυθματώδη λύκου είναι περίπλοκη αλλά περιλαμβάνει δυο βασικά χαρακτηριστικά, την απώλεια της αυτοανοχής έναντι των νουκλεϊκών οξέων και την ενεργοποίηση του συστήματος των ιντερφερονών. Σε ζωικά μοντέλα της νόσου αποδείχτηκε η συσχέτιση αυτών των δυο χαρακτηριστικών καθώς η παραγωγή αυτοαντισωμάτων οδηγούσε στην έκκριση ιντερφερόνης από τα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα, ύστερα από εσωτερίκευση των αυτοαντισωμάτων σε αυτά (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Το δίκλωνο DNA αποτελεί ένα από τα πρώτα αυτοαντιγόνα που εντοπίστηκαν στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Ένας βασικός μηχανισμός έκθεσης των νουκλεοσωμάτων στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ο κυτταρικός θάνατος. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος με την μορφή της απόπτωσης είναι ανοσολογικά αδρανής ενώ η διαδικασία της νέκρωσης έχει χαρακτηριστεί ως προφλεγμονώδης. Η προγραμματισμένη νέκρωση που περιλαμβάνει την νεκρόπτωση, την πυρόπτωση, την NETώση και τη φερρόπτωση οδηγεί στην απελευθέρωση μορίων φλεγμονής με την μορφή των μοριακών προτύπων που ονομάζονται DAMPs (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Οι βλάβες στο μηχανισμό της απόπτωσης και οι αυξημένοι ρυθμοί της φερρόπτωσης και της NETώσης έχουν συσχετισθεί με την παθογένεση του συστηματικού ερυθματώδη λύκου τόσο σε μοντέλα ποντικού όσο και στον άνθρωπο. Η απόπτωση μπορεί να προκληθεί είτε από το εξωγενές μονοπάτι μέσω του υποδοχέα θανάτου είτε από το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι και βοηθάει σημαντικά στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, τα αποπτωτικά κύτταρα εκθέτουν κατάλληλα σήματα στην επιφάνεια ώστε να αναγνωριστούν και να απομακρυνθούν από τα φαγοκύτταρα. Τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα αναγνωρίζονται και από μόρια του συμπληρώματος όπως το C1q, η λεκτίνη που προσδένει μαννόζη και η προπερδίνη, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τον οψωνισμό (Caielli, Wan and Pascual, 2023).



Εικόνα 3: Νέα δεδομένα για την ανοσοπαθγένεση του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου. Πηγή: <https://fse.studenttheses.ub.rug.nl/20008/1/bBio.2019.SchultingaAS.pdf> 16/06/2024

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, η χρωματίνη διασπάται ενδοκυτταρικά μέσω του παράγοντα θραυσματοποίησης του DNA (DFFB) και τα νουκλεοσώματα είτε απελευθερώνονται ως μονομερή ή πολυμερή είτε εσωτερικεύονται σε κυστίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη. Τα κυστίδια εκθέτουν νουκλεοσώματα στην επιφάνειά τους και αυτά γίνονται προσβάσιμα στην DNάση1L3 η οποία μαζί με την DNάση1 είναι υπεύθυνη για την ενεργότητα DNάσης στην κυκλοφορία. Στη συνέχεια, τα κυστίδια και τα αποπτωτικά σωμάτια απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα, μέσω των λυσοσωμάτων, όπου αναλαμβάνει δράση η DNάση2 (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Ειδικά κύτταρα, όπως τα κοκκιοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα έκθεσης γενωμικού δίκλωνου DNA εξωκυττάρια, καθώς πεθαίνουν μέσω του μηχανισμού της NETώσης. Οι εξωκυττάριας παγίδες των ουδετεροφίλων (NETs) είναι μεγάλες, ινώδεις δομές που αποτελούνται από πρωτεΐνες των κοκκιοκυττάρων σε ένα ικρίωμα αποδιοργανωμένης χρωματίνης. Η NETώση αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία απομάκρυνσης των εξωκυττάριας μικροβίων, χωρίς την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και αξιοποιεί την ενεργότητα της εξωκυττάριας DNάσης (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Διαταραχές σε οποιαδήποτε από τις παραπάνω διαδικασίες μπορούν να οδηγήσουν στη νόσο αλλά η μεγαλύτερη συσχέτιση της απώλειας αυτοανοχής του δίκλωνου DNA με το φαινότυπο του λύκου αφορά στην ελαττωματική εξωκυττάρια διάσπαση των κυστιδίων με νουκλεοσωμικό DNA. Σε ποντικούς, η ελαττωματική απόπτωση λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια FAS/FASL μπορούν να οδηγήσουν στον φαινότυπο του λύκου. Επιπλέον, σε ασθενείς με ομοζυγωτία για μεταλλάξεις στο γονίδιο της DNASE1L3, η ελαττωματική αποικοδόμηση του εξωκυττάριου DNA μέσα στα κυστίδια μπορεί να προκαλέσει οικογενή συστηματικό ερυθματώδη λύκο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι δίκλωνου DNA και τη βλάβη των νεφρών (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Ακόμη, το εξωκυττάριο DNA που απελευθερώνεται από την NETώση έχει εκτενώς αναφερθεί να συνεισφέρει στην παθογένεση του συστηματικού ερυθματώδη λύκου. Στο $\frac{1}{3}$ των ορών από ασθενείς που πάσχουν έχει παρατηρηθεί αδυναμία αποικοδόμησης του DNA μέσα στις εξωκυττάρια παγίδες των ουδετεροφίλων, λόγω αυτοαντισωμάτων που μειώνουν την πρόσβαση στη DNάση1 (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Μια επιπρόσθετη μορφή θανάτου των ουδετερόφιλων που πρόσφατα έχει συσχετιστεί με τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο είναι η φερρόπτωση. Η φερρόπτωση καθοδηγείται από την παραγωγή ελεύθερων δραστικών ριζών που εξαρτώνται από τον σίδηρο και από την υπεροξειδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και έχει εμπλακεί με την ουδετεροπενία στον λύκο. Σε ζωικό μοντέλο της ασθένειας φάνηκε να αναστρέφεται ο φαινότυπος ύστερα από αναστολή της φερρόπτωσης (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Η απώλεια της αυτοανοχής στα νουκλεϊκά οξέα έχει παραδοσιακά συσχετισθεί με την πυρηνική προέλευση του DNA αλλά τα νουκλεϊκά οξέα προκύπτουν και από τα μιτοχόνδρια και μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ιντερφερόνης. Τα τελευταία χρόνια τα μιτοχονδριακά στοιχεία έχουν χαρακτηριστεί ως βασική πηγή των DAMPs. Συγκεκριμένα, το κυκλικό DNA των μιτοχονδρίων με τα μοτίβα υπομεθυλίωσης προσομοιάζει το βακτηριακό και ενεργοποιεί μια πληθώρα υποδοχέων, όπως TLR9 και Cgas (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο έχουν αναφερθεί αντισώματα έναντι συστατικών του μιτοχονδρίου, όπως το μιτοχονδριακό DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ή της εξωτερικής και το μιτοχονδριακό RNA. Για τους ασθενείς που πάσχουν από λύκο χαρακτηριστική είναι και η καρδιολιπίνη, ένα φωσφολιπίδιο που εντοπίζεται κυρίως στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τα αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης ανιχνεύονται σε ασθενείς που πάσχουν από λύκο και αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και συσχετίζονται με θρομβωτικά γεγονότα και θρομβοπενία. Η HSP60 αποτελεί μια πρωτεΐνη μοριακή συνοδό για την μιτοχονδριακή μεταφορά είναι σημαντικό μιτοχονδριακό αντιγόνο για τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Το εξωκυττάριο μιτοχονδριακό DNA και το γενωμικό DNA αποτελούν βασικά συστατικά των εξωκυττάρων παγίδων των ουδετεροφύλων. Ειδικά στους ασθενείς που πάσχουν από λύκο οι παγίδες αυτές επάγουν την παραγωγή ιντερφερόνης, λόγω του εμπλουτισμού τους σε οξειδωμένο μιτοχονδριακό DNA. Η εσωτερίκευση του οξειδωμένου μιτοχονδριακού DNA από δενδριτικά κύτταρα επάγει την παραγωγή ιντερφερόνης, μέσω υποδοχέων όπως το cGAS ή ο TLR9 (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα εξωθούν μιτοχονδριακό DNA και μέσω μιας διαδικασίας NETώσης, ενώ παραμένουν ζωντανά. Η διαδικασία αυτή είναι ανοσολογικά αδρανής σε φυσιολογικές καταστάσεις λόγω της επαρκούς απομάκρυνσης των οξειδωμένων μορίων, μέσω της αποικοδόμησής τους στα λυσοσώματα. Ο συνδυασμός ιντερφερόνης τύπου 1 και anti-Sm/RNP αντισωμάτων παρεμβαίνει το λυσοσωμικό μονοπάτι και οδηγεί στην εξώθηση συμπλόκων οξειδωμένου μιτοχονδριακού DNA με τον μεταγραφικό μιτοχονδριακό παράγοντα TFAM, τα οποία επάγουν την παραγωγή ιντερφερόνης (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Πέρα από τα κοκκιοκύτταρα και τα αιμοπετάλια αποτελούν πηγή εξωκυττάρου μιτοχονδριακού DNA στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Στα αιμοπετάλια η εξώθηση μιτοχονδριακού DNA πραγματοποιείται ύστερα από την ενεργοποίησή τους από ανοσοσύμπλοκα και άρα ο ρόλος των αυτοαντισωμάτων μέσω της σταθερής περιοχής τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων για την εξώθηση μιτοχονδριακού DNA αποτελεί έναν

ακόμη παθογενετικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου. Έχει προταθεί ότι η απελευθέρωση μέσω των αιμοπεταλίων προφλεγμονωδών μιτοχονδριακών συστατικών συνεισφέρει στην καρδιαγγειακή νοσηρότητα και τον κίνδυνο θνησιμότητας σε ασθενείς που πάσχουν από συστηματικό ερυθματώδη λύκο (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Η απελευθέρωση του μιτοχονδριακού DNA στο κυτταρόπλασμα επάγει προφλεγμονώδη αντίδραση. Σε μελέτες όπου η μιτοχονδριακή ενδονουκλεάση G απουσίαζε από τα κύτταρα βρέθηκε ότι το κανάλι VDAC1 ολιγομερίζεται και είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση κυτταροπλασματικού μιτοχονδριακού DNA. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι υπάρχουν υψηλά επίπεδα ολιγομερών VDAC1 και μιτοχονδριακού DNA στο κυτταρόπλασμα ενός ζωικού μοντέλου για τον λύκο και στα PBMCs των ασθενών με λύκο. Σημαντικό εύρημα ήταν ότι η αναστολή του ολιγομερισμού του καναλιού VDAC1 οδηγούσε στη μείωση των επιπέδων του μιτοχονδριακού DNA στο κυτταρόπλασμα και στη μείωση της ιντερφερονικής υπογραφής (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Τα μιτοχόνδρια περιλαμβάνουν και δίκλωνο RNA, το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας. Η απώλεια της ελικάσης SUV3 και της πολυνουκλεοτιδικής φωσφορυλάσης PNTάσης οδηγεί στην κινητοποίηση δίκλωνου RNA προς το κυτταρόπλασμα. Το δίκλωνο RNA επάγει την παραγωγή της ιντερφερόνης τύπου 1 (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Διάφορα μιτοχονδριακά DAMPs όπως οι δραστικές ρίζες μπορούν να ενεργοποιήσουν την έμφυτη ανοσία. Μηχανισμοί που σχετίζονται με τον ποιοτικό έλεγχο των μιτοχονδρίων όπως η μιτοφαγία και τα κυστίδια που προκύπτουν από τα μιτοχόνδρια διατηρούν την ομοιότητα και οδηγούν στην αποφυγή της απελευθέρωσης των μιτοχονδριακών DAMPs. Ολοένα και αυξανόμενα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η διαταραχή των μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων σχετίζεται με την παθογένεση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Η μακροαυτοφαγία αποτελεί μια κυτταρική διαδικασία καταβολισμού των κυτταρικών στοιχείων, μέσω του σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος και της τελικής σύντηξης με το λυσόσωμα. Η μιτοφαγία είναι ένας τύπος αυτοφαγίας που χαρακτηρίζεται από ειδικό φορτίο, το οποίο κλείνεται σε αυτοφαγοσώματα και διασπάται από το λυσόσωμα και

συγκεκριμένα το φορτίο είναι μιτοχόδρια που πρέπει να καταστραφούν. Γενετική διασύνδεση ανάμεσα στον λύκο και στην αυτοφαγία έχει βρεθεί καθώς έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί στα γονίδια ATG5 και ATG7 αλλά παραμένει άγνωστο αν επιδρούν και στην μιτοφαγία (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Κυτταροειδική ελαττωματική μιτοφαγία έχει αναφερθεί στον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο. Για παράδειγμα, τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, λόγω μεγάλου μιτοχονδριακού φορτίου και υπερπόλωσης, η οποία οδηγεί στη μη φυσιολογική ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Σημαντική συνεισφορά στην ελαττωματική μιτοφαγία των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων στον λύκο έχει η υπερέκφραση μιας μικρής GTPάσης (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Η μιτοφαγία ελέγχει και την ενεργοποίηση των T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. Στον λύκο, το ένζυμο που ρυθμίζει τα επίπεδα NAD⁺, το CD38, οδηγεί στον περιορισμό της στρατολόγησης των ελαττωματικών μιτοχονδρίων προς το φαγοφόρο, όπου τα μιτοχόνδρια εσωτερικεύονται στα αυτοφαγοσώματα, μέσω του μονοπατιού PINK1-Parkin (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Τα αυτοαντισώματα στο συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του συστήματος της ιντερφερόνης μέσω της ικανότητάς τους να μεταφέρουν, διαμέσου της εσωτερίκευσης της σταθερής περιοχής τους, νουκλεϊκά οξέα τα οποία δε θα μπορούσαν με άλλο τρόπο να είναι προσβάσιμα σε ενδοκυττάρους αισθητήρες όπως οι ενδοσωμικοί TLRs και ο κυτοσολικός cGAS. Τα αυτοαντισώματα anti-RNA/RNP όχι μόνο μέσω των TLR7 επάγουν την παραγωγή της ιντερφερόνης από τα δενδριτικά κύτταρα αλλά διεγείρουν και την απελευθέρωση οξειδωμένου μιτοχονδριακού DNA από τα ουδετερόφιλα (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίον τα αυτοαντισώματα στον λύκο συνεισφέρουν στην παραγωγή ιντερφερόνης είναι παρεμβαίνοντας στην εξωκυττάρια αποικοδόμηση των νουκλεϊκών οξέων. Για παράδειγμα, αυτοαντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν συστατικά των εξωκυττάρων παγίδων των ουδετερόφιλων προστατεύουν το εξωκυττάριο δίκλωνο DNA από την DNάση 1 και η παρουσία τους έχει συσχετιστεί με την νεφρίτιδα του λύκου. Πρόσφατα έχουν αναφερθεί αυτοαντισώματα που στοχεύουν την DNάση1L3 σε

ποσοστό μεγαλύτερο του 50% σε ασθενείς με σποραδική μορφή λύκου και νεφρίτιδα λύκου (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Τα αυτοαντισώματα στον λύκο στοχεύουν και το μονοπάτι των ιντερφερονών. Στους ασθενείς με λύκο έχουν βρεθεί αυτοαντισώματα έναντι πολλών κυτταροκινών όπως ιντερφερονών τύπου 1 και 2, G-CSF, TNF, IL-1, IL-6 και IL-10 (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

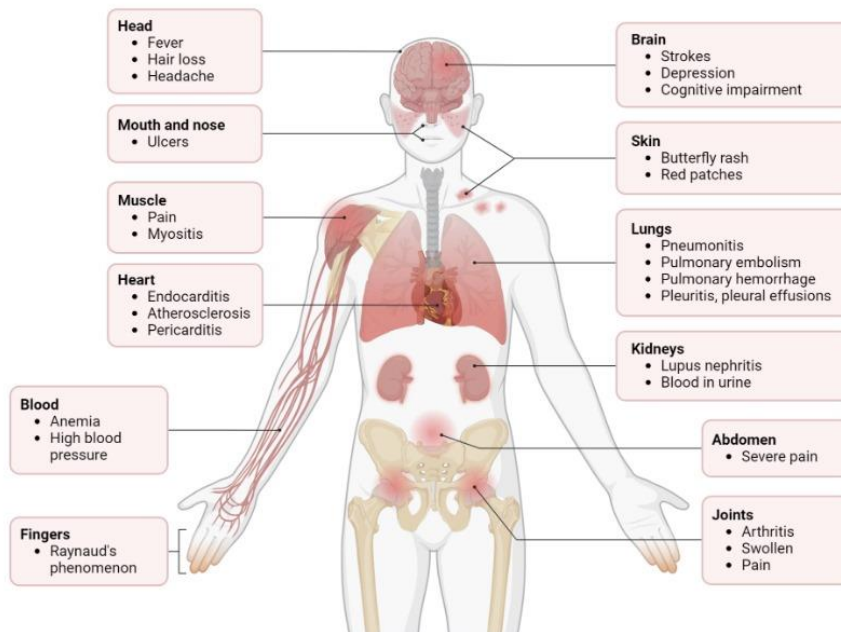
Η προέλευση των αυτοαντισωμάτων στο λύκο είναι περίπλοκη αλλά σημαντικός είναι ο ρόλος των αυτοδραστικών Β κυττάρων. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεϊνική κινάση δ προσδίδουν αντίσταση στον υποδοχέα των Β κυττάρων και στην ασβεστιοεξαρτώμενη απόπτωση, με αποτέλεσμα την μη απομάκρυνση των αυτοδραστικών Β κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Παραλλαγές του γονιδίου BLK μιας κινάσης που βρίσκεται και στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα των Β κυττάρων και της ιντερφερόνης τύπου 1 έχουν συσχετιστεί με πολλά αυτοάνοσα νοσήματα (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Η ενεργοποίηση των Β κυττάρων που εξαρτάται από τα Τ λεμφοκύτταρα συμβαίνει στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Ύστερα τα Β κύτταρα είτε μεταναστεύουν σε εξωθυλακικές εστίες και επεκτείνονται γρήγορα για να γίνουν πλασμαβλάστες μικρής διάρκειας είτε εισάγονται σε βλαστικά κέντρα και μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα. Το φορτίο των σωματικών υπερμεταλλάξεων που παρατηρείται στα αυτοαντισώματα των ασθενών που πάσχουν από λύκο προτείνει την προέλευσή τους από τα βλαστικά κέντρα. Τα επίπεδα των anti-Sm και anti-RNP αυτοαντισωμάτων παραμένουν σταθερά και αντιστέκονται στις θεραπείες έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων άρα πιθανώς προέρχονται από τα πλασματοκύτταρα μακράς διάρκειας, ενώ τα επίπεδα του δίκλωνου DNA έχουν διακυμάνσεις άρα πιθανά να προέρχονται από τους πλασματοβλάστες μικρής διάρκειας ζωής (Caielli, Wan and Pascual, 2023).

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα αυτοδραστικά Β κύτταρα απομακρύνονται στον μυελό των οστών μέσω μηχανισμών όπως η τροποποίηση του υποδοχέα ή η μετατροπή τους σε ανεργικά. Αυτοί οι εσωτερικοί μηχανισμοί ρύθμισης των Β κυττάρων ελέγχονται από τον υποδοχέα των Β κυττάρων. Τα αυξημένα επίπεδα του παράγοντα ενεργοποίησης των

B κυττάρων (BAFF) που παρατηρούνται στους ασθενείς με λύκο φαίνεται σε πειραματικά ζωικά μοντέλα να βοηθούν στην επιβίωση των αυτοδραστικών B κυττάρων. Στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, φαίνεται να αποτυγχάνουν τόσο τα κεντρικά σημεία ελέγχου στον μυελό των οστών όσο και τα περιφερικά. Επίσης, στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο αποτυγχάνει και η μετατροπή των B κυττάρων σε ανεργικά (Zharkova et al., 2017).

Symptoms of Systemic Lupus Erythematosus (SLE)



Εικόνα 4: Συμπτώματα Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου. Πηγή: <https://www.biorender.com> 16/06/2024

Κεφάλαιο 4. Αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα

Υποενότητα 4.1 Επιδημιολογία νόσου

Η Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή στην ιερολαγόνια άρθρωση, τη σπονδυλική στήλη, επαναπορρόφηση οστού και εναπόθεση οστού που μπορεί να οδηγήσει στην αγκύλωση. Η Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα περιλαμβάνει δυο κλινικές εικόνες, την μη ακτινογραφική αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα και την ακτινογραφική, η οποία καλείται και αγκυλωτική σπονδυλίτιδα. Οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν πόνο στην πλάτη πριν από τα 45 έτη. Ο πόνος διαρκεί για περισσότερο από

3 μήνες και χειροτερεύει τη νύχτα και με την ξεκούραση ενώ βελτιώνεται με τη σωματική άσκηση. Σε αυτή τη φάση της ασθένειας μπορεί να προκαλούνται αλλοιώσεις στην ιερολαγόνια άρθρωση, οι οποίες είναι ορατές με την μαγνητική τομογραφία (Del Vescovo et al., 2023).

Μελέτες που έχουν βρεθεί αποδεικνύουν ότι η αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα έχει πρώτη φορά αναφερθεί από τους Αιγύπτιους και οι μελέτες αυτές είχαν συντελεστεί σε μούμιες. Η κλασική περιγραφή της αξονικής σπονδυλοαρθρίτιδας συνέβει στα τέλη του 18ου αιώνα από τους Wladimir von Bechterew στη Ρωσία, τον Adolph Strumpell στη Γερμανία και τον Pierre Marie στη Γαλλία. Η κληρονομική προδιάθεση της νόσου επισημάνθηκε το 1960 ενώ στα μέσα του 1900 τέθηκε για πρώτη φορά ο όρος σπονδυλοαρθριτοπάθειες από τον Moll (Navarro-Comprán et al. 2021)

Η Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα επηρεάζει κυρίως νεαρές ηλικίες, 12 έως 45 ετών και πλήττει εννέα φορές περισσότερο το ανδρικό φύλο συγκριτικά με το γυναικείο. Μέχρι πρότινος ο όρος σπονδυλοαρθρίτιδα μπορούσε να περικλείει τις εξής καταστάσεις: ψωριασική αρθρίτιδα, σπονδυλοαρθρίτιδα που σχετίζεται με τη νόσο του ευερέθιστου εντέρου, δραστική αρθρίτιδα και μη διαφοροποιημένη αρθρίτιδα. Πλέον αυτή η κατηγοριοποίηση έχει αλλάξει και υπάρχει η διάκριση σε δυο μεγάλες κατηγορίες: την αξονική και τη μη αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα (Navarro-Comprán et al. 2021).

Υποενότητα 4.2 Παθογένεση της νόσου

Σημαντικό γενετικό στοιχείο που εμπλέκεται στην αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα είναι το HLA-B27, με το 85%-90% των ασθενών να διαθέτουν το αλληλόμορφο αυτό. Το αλληλόμορφο αυτό είναι πολυμορφικό και έχουν βρεθεί 392 παραλλαγές του. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές θεωρίες που συνδέουν το HLA-B27 με την αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα: 1) το αρθριτογόνο πεπτίδιο, 2) η κακή αναδίπλωση και 3)η συσσώρευση ομοδιμερών στην κυτταρική επιφάνεια. Το γονίδιο HLA-B27 κωδικοποιεί για μόριο του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I, το οποίο είναι ένα περίπλοκο μόριο με μια βαριά αλυσίδα που περιέχει τρεις α επικράτειες και μια αλυσίδα β2-μικροσφαιρίνης. Διαθέτει μια επικράτεια πρόσδεσης πεπτιδίων τα οποία έχουν προκύψει ύστερα από πρωτεόλυση. Το

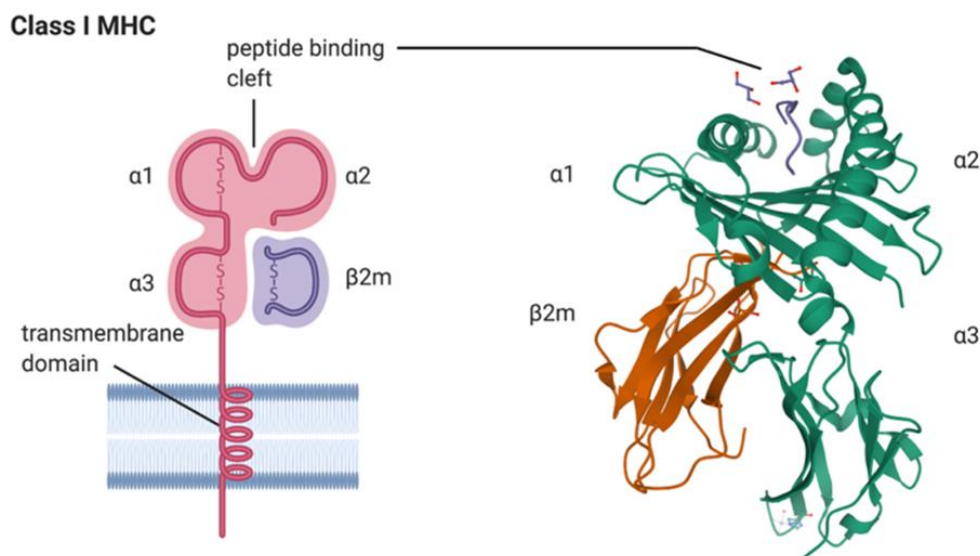
μόριο που κωδικοποιείται από το HLA-B27 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των Τ λεμφοκυττάρων (Del Vescovo et al., 2023).

Γονίδια	Λειτουργία	Συσχέτιση με σπονδυλοαρθρίτιδα
HLA-B	Αντιγονοπαρουσίαση	Συσχέτιση
ERAP1	Αμινοπεπτιδάση	Συσχέτιση
IL23R	Υποδοχέας κυτταροκίνης	Συσχέτιση
TNFRSF1A	Υποδοχέας κυτταροκίνης	Πιθανή συσχέτιση
TRADD	Σηματοδότηση	Πιθανή συσχέτιση
TNFSF15	Φλεγμονώδης κυτταροκίνη	Πιθανή συσχέτιση
IL1A	Φλεγμονώδης κυτταροκίνη	Πιθανή συσχέτιση
IL1R2	Υποδοχέας κυτταροκίνης	Πιθανή συσχέτιση
CARD9	Μόριο φυσικής ανοσίας	Πιθανή συσχέτιση
ANTXR2	Μορφογένεση αγγείων	Πιθανή συσχέτιση

Πίνακας 2: Γενετική Τόποι και συσχέτιση με την Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα

Η θεωρία του αρθριτογόνου πεπτιδίου προτείνει ότι το HLA-B27 παρουσιάζει στα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα ορισμένα μικρά πεπτίδια (αρθριτογόνα) από βακτηριακές πηγές, παρόμοια με εαυτά πεπτίδια που εκφράζονται σε ιστούς που πλήττονται από την ασθένεια και διεγείρεται η ανοσοαπόκριση. Ωστόσο, αυτή η θεωρία έχει αμφισβητηθεί. Η αμφισβήτηση βασίστηκε στο ότι τα διαγονιδιακά ζώα HLA-B27+ που στερούνταν βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα ανέπτυξαν την νόσο. Επίσης, οι άνθρωποι που δε διέθεταν το HLA-

B27 μπορούσαν εξίσου να επηρεαστούν από την ασθένεια. Υπάρχουν όμως και ορισμένα δεδομένα που προτείνουν ότι αυτή η θεωρία δεν μπορεί να αποκλειστεί. Πρώτον, έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα και συγκεκριμένα στο αρθρικό υγρό τα αυξημένα επίπεδα έχουν συσχετιστεί με κυτταροτοξικό φαινότυπο. Τέλος, μελέτες αλληλούχισης του γονιδιώματος έχουν δείξει συγκεκριμένα μοτίβα στον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων, σε ασθενείς με HLA-B27+ (Del Vecovo et al., 2023).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του Μείζον Συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I. Πηγή: Sharip, A. and Kunz, J. 2020. Understanding the Pathogenesis of Spondyloarthritis. Biomolecules 10(10), p. 1461. doi: 10.3390/biom10101461. 16/06/2024

Μια άλλη πιθανή εξήγηση για τον ρόλο του HLA-B27 είναι η υπόθεση της κακής αναδίπλωσης του μορίου και της συσσώρευσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, λόγω των χημικών ιδιοτήτων του. Συνήθως, μόλις συντίθεται το μόριο σχηματίζει ένα ετεροτριμερές, το οποίο εκτίθεται στην κυτταρική μεμβράνη και στη συνέχεια μεταφέρεται ενδοκυτταρικά. Διαφορές στην F θήκη του μορίου επηρεάζουν δραματικά τον ρυθμό ωρίμανσης των HLA-B27 υποτύπων. Τα HLA-B27*06 και *09 ωριμάζουν μέσα σε 90 λεπτά ενώ το *05 ωριμάζει στις 3 ώρες περίπου. Αυτός ο χρόνος επιτρέπει την έκθεση καταλοίπων κυστεΐνης

προς οξειδωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και τη συσσώρευση του HLA-B27 *05 στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η συσσώρευση της μη ορθά πτυχωμένης μορφής του HLA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μονοπατιών αποικοδόμησης πρωτεϊνών, για την αποφυγή δημιουργίας στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες σταματάει η μετάφραση, αυξάνονται οι πρωτεΐνες μοριακές συνοδοί, ενεργοποιούνται ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες και προφλεγμονώδη μονοπάτια. Ο μεταγραφικός παράγοντας CHOP μπορεί να επάγει το μονοπάτι IL-23/IL-17 μέσω της αύξησης της έκφρασης μιας υπομονάδας της IL-23 (Del Vecovo et al., 2023).

Ο σχηματισμός ομοδιμέρων HLA-B27 αποτελεί μια ακόμη θεωρία για την ερμηνεία του ρόλου του στην παθογένεια της αξονικής σπονδυλοαρθρίτιδας. Τα επιφανειακά ομοδιμερή HLA-B27 μπορούν να τροποποιήσουν την ανοσολογική απόκριση μέσω της αλληλεπίδρασης με διάφορους υποδοχείς όπως ο LILR και ο KIR (Del Vecovo et al., 2023).

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί και ο ρόλος του HLA-B27 στο σχηματισμό των οστών. Ορισμένοι προτείνουν ότι ο ρόλος του μορίου εκδηλώνεται μέσω της πρόκλησης φλεγμονής ενώ άλλοι προτείνουν ότι ο απλότυπος αυτός σχετίζεται με τα χαμηλά επίπεδα στον ορό των πρωτεϊνών σκληροστίνης και DKK1, δυο ανταγωνιστών του μονοπατιού Wnt-κατενίνης, το οποίο είναι βασικό για τον σχηματισμό των οστών. Επίσης, έχει αναφερθεί η σχέση μεταξύ του HLA-B27 και των αυξημένων επιπέδων της IHH, μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται με την ενδοχονδρική οστεοποίηση (Del Vecovo et al., 2023).

Πολυμορφισμοί στις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 έχουν συσχετιστεί με την αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα και συνεισφέρουν στο 15-25% στον κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας στον πληθυσμό. Το HLA-B27 μαζί με τις ERAP ερμηνεύουν το 70% του γενετικού κινδύνου ανάπτυξης της αξονικής σπονδυλοαρθρίτιδας. Οι αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 αποτελούν μέλη των μεταλλοπεπτιδασών που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τροποποιούν πεπτίδια προκειμένου να φορτωθούν και να παρουσιαστούν από τα MHC τάξης I μόρια. Η ERAP1 είναι το βασικό ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου που αναλαμβάνει την τροποποίηση των πεπτιδίων, ενώ η ERAP2 έχει έναν λιγότερο σημαντικό ρόλο. Ο ρόλος της ERAP1 είναι διπλός. Αρχικά, θα πέψει το αμινοτελικό άκρο των

πεπτιδίων για να προκύψει το κατάλληλο μέγεθος προκειμένου αυτά να συνδεθούν με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και να παρουσιαστούν στην επιφάνεια των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων ή των ΝΚ κυττάρων (Sharip and Kunz, 2020).

Η δεύτερη λειτουργία της ERAP1 είναι η πρωτεολυτική θραύση των υποδοχέων κυτταροκινών όπως TNFR1, IL6R2 και IL1R2. Παρά το γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί στο ERAP1 έχουν συσχετιστεί με την αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα, μέσω αύξησης της διάσπασης του υποδοχέα TNF, δε φαίνεται να είναι βασικός αυτός ο ρόλος τους για την ανάπτυξη της νόσου. Η ERAP1 παράγει πεπτίδια μεγέθους 8-10 αμινοξέων από μεγαλύτερα πεπτίδια (περισσότερα από 10 αμινοξέα) και δρα ακόμη σε εννεαπεπτίδια για να προκύψουν μικρότερου μεγέθους πεπτίδια. Έτσι, η ERAP1 διαμορφώνει το πεπτιδίωμα που είναι διαθέσιμο για αντιγονοπαρουσίαση, είτε σχηματίζοντας τα κατάλληλα πεπτίδια είτε με την περαιτέρω πέψη και τελική απόρριψη των υπόλοιπων πεπτιδίων. Η ERAP2 διαφέρει στο ότι προτιμά μικρότερα πεπτίδια (7-8 αμινοξέων) και παράγεται σε χαμηλότερα επίπεδα από την ERAP1. Διαφέρουν ακόμη και στην ενεργότητά τους, καθώς η ERAP1 προτιμά υποστρώματα με υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο και στο καρβοξυτελικό άκρο ενώ η ERAP2 προτιμά υποστρώματα με βασικά κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο και δεν έχει προτίμηση στο καρβοξυτελικό άκρο. Το γεγονός ότι η γενετική συσχέτιση με την αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα της ERAP1 βρέθηκε μόνο σε άτομα που έφεραν το HLA-B27 αλληλόμορφο εξηγεί ότι πιθανά τα δυο μόρια αλληλεπιδρούν στο μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης (Sharip and Kunz, 2020).

Ο μηχανισμός της γενετικής συσχέτισης της αξονικής σπονδυλοαρθρίτιδας με την ERAP1 είναι αδιευκρίνιστος αλλά φαίνεται ότι συμμετέχει στην παθογένεια είτε μέσω της δημιουργίας ποικιλίας πεπτιδίων που προσδέονται στο HLA-B27 είτε μέσω της δημιουργίας διαφόρων ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μορφών HLA-B27. Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του γονιδίου ERAP1 επηρεάζουν την έκφραση της βαριάς αλυσίδας του μορίου HLA-B27, τον διμερισμό και την αναδίπλωσή του και μειώνουν τα επίπεδα των ομοδιμερών του στην κυτταρική επιφάνεια (Sharip and Kunz, 2020).

Σημαντικός είναι και ο ρόλος της έμφυτης ανοσίας στην παθογένεση της αξονικής σπονδυλοαρθρίτιδας. Αρχικά, έχει παρατηρηθεί η διήθηση ιστών που σχετίζονται με την

ασθένεια από μαστικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν βασική πηγή έκκρισης της IL-17A, παρά το γεγονός ότι δεν την παράγουν τα ίδια, μπορούν να την αποθηκεύουν σε κοκκία καθώς την εσωτερικεύουν με ειδικούς υποδοχείς. Τα ουδετερόφιλα έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς (Del Vescono et al., 2023).

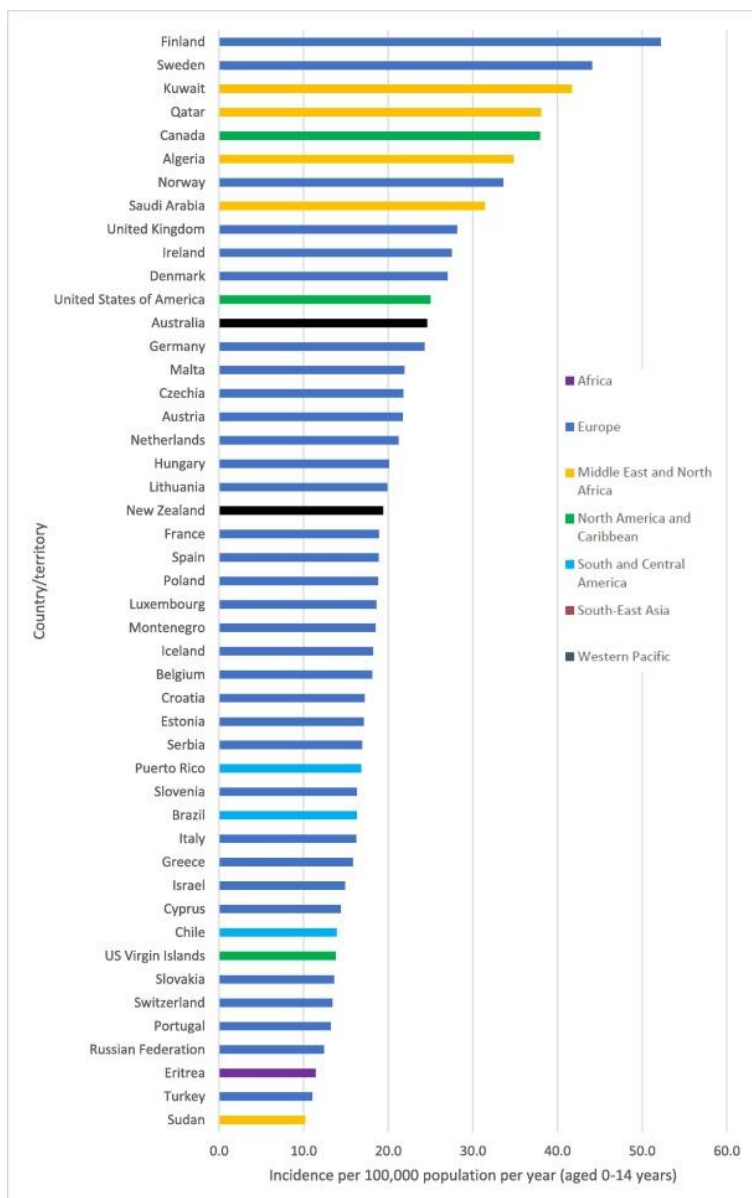
Κεφάλαιο 5. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I

Υποενότητα 5.1 Επιδημιολογία και αίτια της νόσου του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου I

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου I (T1DM), ο οποίος είναι γνωστός και ως ινσουλινοεξαρτώμενος Σακχαρώδης Διαβήτης, είναι μια χρόνια αυτοάνοση διαταραχή που χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση επίθεση έναντι των β-κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη. Αυτή η καταστροφή οδηγεί σε έλλειψη ινσουλίνης, η οποία ρυθμίζει την συγκέντρωση της γλυκόζης στο σώμα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων υπεργλυκαιμίας. Αντίθετα με τον Διαβήτη Τύπου II (T2DM), ο οποίος οφείλεται κυρίως σε αντίσταση στην ινσουλίνη και μεταβολικούς παράγοντες, ο T1DM είναι ουσιαστικά μια επί το πλείστον αυτοάνοση κατάσταση (Dariya et al., 2019).

Παρόλο που ο T1DM είναι λιγότερο συχνός από τον T2DM, αποτελεί σημαντική ανησυχία για την παγκόσμια υγεία λόγω της πρώιμης εμφάνισής του και της ανάγκης για εφόρου ζωής θεραπεία με ινσουλίνη. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη (IDF), το 2019 υπήρχαν περίπου 1,1 εκατομμύρια παιδιά και έφηβοι παγκοσμίως κάτω των 20 ετών που ζούσαν με T1DM. Αυτός διαγιγνώσκεται συνήθως σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 14 ετών, με περισσότερα από 500.000 να επηρεάζονται αυτήν τη στιγμή και 900.000 νέες διαγνώσεις κάθε χρόνο (Ogle et al. 2022). Ωστόσο, μπορεί επίσης να εμφανιστεί σε ενήλικες, μια κατάσταση που μερικές φορές αναφέρεται ως λανθάνοντας αυτοάνοσος διαβήτης σε ενήλικες (LADA). Υπάρχει μια ελαφρά ανδρική υπεροχή στον T1DM παιδικής ηλικίας, αλλά αυτή η διαφορά φύλου φαίνεται μειώνεται με την ηλικία (Maahs et al., 2010).

Η επίπτωση και ο επιπολασμός του T1DM αυξάνονται ραγδαία, με αξιοσημείωτες διακυμάνσεις μεταξύ διαφορετικών περιοχών και πληθυσμών. Σύμφωνα με τωρινές επιδημιολογικές μελέτες, ο IDF χωρίζει τις περιοχές εμφάνισης T1DM ανάλογα με το ποσοστό επίπτωσής της. Χώρες όπως, η Φινλανδία και η Σουηδία έχουν μερικά από τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης T1DM στον κόσμο, με περισσότερες από 40 περιπτώσεις ανά 100.000 παιδιά ετησίως. Οι Ηνωμένες Πολιτείες, ο Καναδάς, η Αυστραλία και μέρη της Ευρώπης έχουν μέτρια ποσοστά επίπτωσης, που κυμαίνονται από 15 έως 30 περιπτώσεις ανά 100.000 παιδιά ετησίως. Τέλος, οι χώρες της Ασίας, συμπεριλαμβανομένης της Κίνας και της Ινδίας, καθώς και ορισμένες αφρικανικές χώρες, έχουν χαμηλότερα ποσοστά επίπτωσης, συχνά λιγότερο από 5 περιπτώσεις ανά 100.000 παιδιά ετησίως (Ogle et al., 2022).



Εικόνα 6: Στατιστικά Στοιχεία Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I στην υφήλιο. Πηγή: Ogle, G.D. et al. 2022. *Global estimates of incidence of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Atlas, 10th edition. Diabetes research and clinical practice 183, p. 109083. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109083. 17/06/2024*

Η επίπτωση και ο επιπολασμός του T1DM ποικίλλει επίσης ανάλογα με την κοινωνικοοικονομική κατάσταση και την εθνικότητα. Τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης αναφέρονται συχνά σε πληθυσμούς με υψηλότερη κοινωνικοοικονομική κατάσταση, η οποία μπορεί να σχετίζεται με καλύτερη πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη και διαγνωστικές δυνατότητες. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως οι αναπτυγμένες χώρες, λόγω της

καλύτερης πρόσβασης σε υγειονομικές πρακτικές, διαγιγνώσκουν καλύτερα περιστατικά της νόσου σε σύγκριση με υποανάπτυκτες χώρες, στις οποίες η πλειονότητα των περιστατικών παραμένει αδιάγνωστη. Οι εθνοτικές ανισότητες είναι επίσης εμφανείς, με τους Καυκάσιους να παρουσιάζουν συνήθως υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης σε σύγκριση με άλλες εθνοτικές ομάδες (Mobasser et al., 2020).

Ορισμένοι μεταναστευτικοί πληθυσμοί διατηρούν ακόμα τη νόσο σε υψηλή συχνότητα ανάλογα με την επίπτωση της από τη χώρα από την οποία μετανάστευσαν, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία των γενετικών παραγόντων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον γενετικό κίνδυνο εμφάνισης T1DM μεταξύ των πληθυσμών, όπως φαίνεται από τον υψηλό κίνδυνο των Σαρδηνών μεταναστών δεύτερης γενιάς στην ηπειρωτική Ιταλία και τον χαμηλό κίνδυνο στα παιδιά αρκετών μεταναστευτικών ομάδων, όπως των ατόμων που έχουν μετακομίσει από τη Νοτιοανατολική Ασία στη Σουηδία (Ilonen, Lempainen and Veijola, 2019).

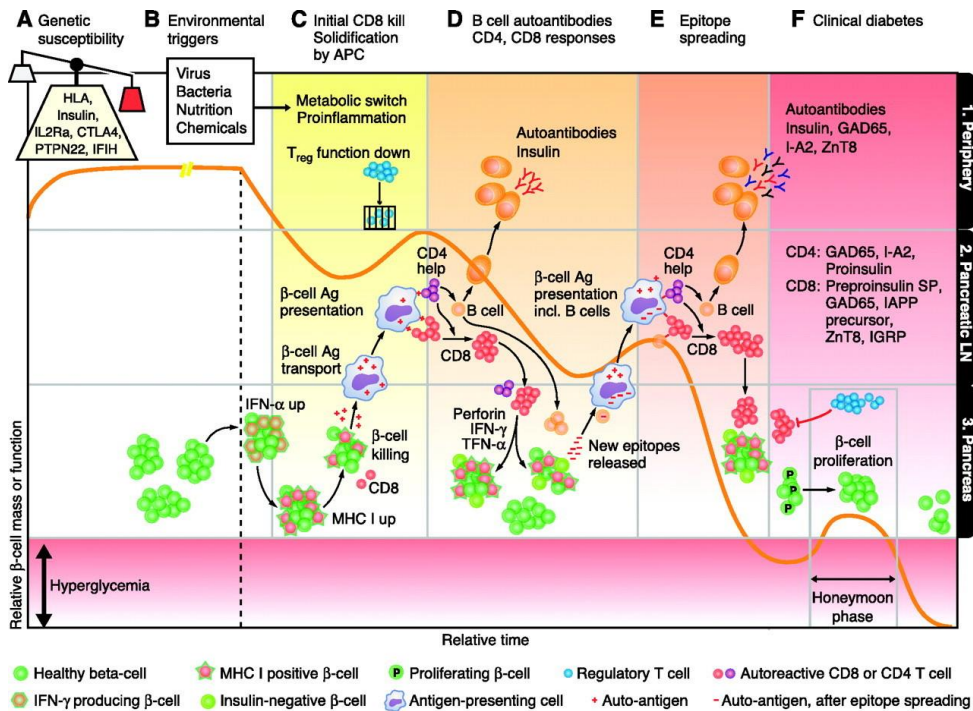
Υποενότητα 5.2 Παθογένεση της νόσου

Το γενετικό τοπίο του T1DM είναι πολύπλοκο, με πολλαπλά γονίδια να παρεμβάλλονται και να συμβάλλουν στην ευαισθησία στη νόσο. Οι πιο σημαντικοί γενετικοί παράγοντες εντοπίζονται στην περιοχή του Ανθρώπινου Λευκοκυτταρικού Αντιγόνου (HLA) στο χρωμόσωμα 6p21, ιδιαίτερα στους τύπους HLA-DR και HLA-DQ. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν μόρια HLA τάξης II του μείζον συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) που είναι ζωτικής σημασίας για την παρουσίαση αντιγόνων στα T κύτταρα. Συγκεκριμένοι απλότυποι HLA, όπως οι HLA-DR3-DQ2 και HLA-DR4-DQ8, συνδέονται ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο T1DM. Αυτά τα αλληλόμορφα διευκολύνουν την παρουσίαση των αντιγόνων β - κυττάρων σε αυτοαντιδραστικά T κύτταρα, προάγοντας μια αυτοάνοση απόκριση (van Belle, Coppieters and von Herrath, 2011).

Πέρα από την περιοχή HLA, πολλά μη HLA γονίδια συμβάλλουν στον κίνδυνο T1DM. Για παράδειγμα, το γονίδιο ινσουλίνης (INS) στο χρωμόσωμα 11p15 περιέχει έναν μεταβλητό αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (VNTR) στην περιοχή προαγωγέα του. Τα

αλληλόμορφα VNTR κατηγορίας I σχετίζονται με χαμηλότερη έκφραση της θυμικής ινσουλίνης, η οποία μπορεί να βλάψει την κεντρική ανοσολογική ανοχή και να ενισχύσει την πιθανότητα διαφυγής των T κυττάρων που αντιδρούν στην ινσουλίνη (Khoshroo et al., 2017). Επιπρόσθετα, το γονίδιο PTPN22, το οποίο κωδικοποιεί μια λεμφοειδή ειδική φωσφατάση (LYP) και χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1p13.3-p13.1, έχει σημαντικό ρόλο στην νόσο. Ειδικότερα, ρυθμίζει τη σηματοδότηση του υποδοχέα T κυττάρων (TCR) και την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Ένας πολυμορφισμός στο PTPN22, ο οποίος προκαλείται από την υποκατάσταση αμινοξέος στο κωδικόνιο 620 από αργινίνη σε τρυπτοφάνη (R620W) επηρεάζει την καταλυτική δραστηριότητα του TCR (Haider et al., 2018).

Η αυτοάνοση επίθεση στα β - κύτταρα του παγκρέατος διαμεσολαβείται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση εγγενών και προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Κεντρική θέση σε αυτή τη διαδικασία διαδραματίζουν τα αυτοαντιδραστικά T κύτταρα που διαφεύγουν των μηχανισμών της θετικής και αρνητικής επιλογής του θύμου αδένος και ενεργοποιούνται στην περιφέρεια. Στα αρχικά στάδια της νόσου, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), όπως τα δενδριτικά κύτταρα, συλλαμβάνουν και παρουσιάζουν τα αντιγόνα β - κυττάρων στα μόρια HLA τάξης II. Αυτά τα APCs μεταναστεύουν στους παγκρεατικούς λεμφαδένες, όπου ενεργοποιούν τα βοηθητικά T κύτταρα CD4+. Τα ενεργοποιημένα CD4+ T κύτταρα, ιδιαίτερα αυτά του υποτύπου Th1, εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η ιντερφερόνη-γάμμα (IFN-γ) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α), οι οποίοι ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση και συμβάλλουν στην τοπική φλεγμονή (van Belle et al. 2011).



Εικόνα 7: Διάγραμμα που απεικονίζει την ποσότητα των β – κυττάρων σε σχέση με την χρονική εξέλιξη του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Στο διάγραμμα επίσης απεικονίζεται και η επίδραση ορισμένων ανοσοποιητικών κυττάρων στην εξέλιξη της νόσου. Πηγή: https://theses.hal.science/tel-01024122v1/file/these_BEGORRE.pdf 17/07/2024

Τα CD8+ κυτταροτοξικά Τ κύτταρα ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την καταστροφή των β - κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν τα αντιγόνα β - κυττάρων που παρουσιάζονται από μόρια HLA τάξης I στην επιφάνεια των β - κυττάρων. Κατά την ενεργοποίηση, τα CD8+ Τ κύτταρα απελευθερώνουν περφορίνη και γράνζιμα (πρωτεάση σερίνης) , τα οποία προκαλούν απόπτωση στα β - κύτταρα. Τα αντιγόνα β - κυττάρων που στοχεύουν αυτά τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα περιλαμβάνουν την ινσουλίνη, την αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος 65 (GAD65) και το αντιγόνο-2 των νησιδίων (IA-2) (Kanatsuna et al., 2012).

Η συμμετοχή των ρυθμιστικών Τ κυττάρων (Tregs) είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ανοσιακής ανοχής και την πρόληψη της αυτοανοσίας. Τα Tregs, που χαρακτηρίζονται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, καταστέλλουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των αυτοαντιδραστικών Τ κυττάρων. Σε άτομα με TD1M, υπάρχουν ενδείξεις λειτουργικής έκπτωσης και μειωμένου αριθμού Tregs, που

μπορεί να συμβάλλουν στη διάσπαση της ανοσολογικής ανοχής και στην εξέλιξη της αυτοανοσίας (Łuczynski et al., 2012).

Η χρόνια φλεγμονή είναι χαρακτηριστικό του T1DM και συμβάλει στην εξέλιξη της καταστροφής των β - κυττάρων. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-1 β , η IFN- γ και ο TNF- α , που παράγονται, τόσο από εγγενή, όσο και από προσαρμοστικά ανοσοκύτταρα, συμβάλλουν στο τοπικό φλεγμονώδες περιβάλλον εντός των παγκρεατικών β - νησίδων. Αυτές οι κυτοκίνες μπορούν να προκαλέσουν την έκφραση των μορίων MHC τάξης I σε β - κύτταρα, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα στην αναγνώριση και την επίθεση από τα CD8+ T κύτταρα. Επιπλέον, οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να προάγουν την απόπτωση των β - κυττάρων και να βλάψουν τη λειτουργία τους, προκαλώντας στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Tsalamandris et al., 2019).

Το μεταβολικό στρες, συμβάλλει επίσης στην ευπάθεια των β - κυττάρων. Τα β - κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη έχουν υψηλή μεταβολική ανάγκη και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις διακυμάνσεις των επιπέδων γλυκόζης και λιπιδίων. Η υπεργλυκαιμία και τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων, κατάσταση κοινή στον διαβήτη, μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες και να επιδεινώσουν περαιτέρω το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Ο συνδυασμός φλεγμονώδους και μεταβολικού στρες δημιουργεί ένα εχθρικό περιβάλλον που επιταχύνει την απόπτωση των β - κυττάρων και μειώνει την αναγεννητική τους ικανότητα (Huang et al., 2014).

Η εξέλιξη από την αυτοανοσία σε κλινικό T1DM εμφανίζεται σε μια μεταβλητή περίοδο, επηρεασμένη από την ισορροπία μεταξύ της καταστροφής των β - κυττάρων και της αναγεννητικής τους ικανότητας. Στην προκλινική φάση, τα άτομα μπορεί να έχουν ανιχνεύσιμα αυτοαντισώματα και αυτοαντιδραστικά T κύτταρα, αλλά διατηρούν επαρκή λειτουργία β - κυττάρων για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης. Καθώς η αυτοάνοση διαδικασία προχωρά και η μάζα των β - κυττάρων μειώνεται, η έκκριση ινσουλίνης καθίσταται ανεπαρκής για τη διατήρηση του φυσιολογικού ισοζυγίου γλυκόζης, οδηγώντας στην εμφάνιση υπεργλυκαιμίας και στην κλινική διάγνωση του T1DM (Galderisi et al., 2023).

Ενώ οι γενετικοί παράγοντες θέτουν το στάδιο για τον T1DM, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για την έναρξη της αυτοάνοσης διαδικασίας. Οι ιογενείς λοιμώξεις είναι από τους πιο μελετημένους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Εντεροϊοί, όπως ο ιός coxsackie B, έχουν εμπλακεί στην εμφάνιση του T1DM. Αυτοί οι ιοί μπορεί να μολύνουν τα παγκρεατικά β - κύτταρα απευθείας ή να πυροδοτήσουν μια ανοσολογική απόκριση μέσω μοριακού μιμητισμού, όπου τα ιικά αντιγόνα μοιάζουν με αντιγόνα β - κυττάρων, οδηγώντας το ανοσοποιητικό σύστημα να στοχεύει εσφαλμένα τα β - κύτταρα. Επιπλέον, οι ιογενείς λοιμώξεις μπορούν να προκαλέσουν τοπική φλεγμονή και ενεργοποίηση αυτοαντιδραστικών T κυττάρων, συμβάλλοντας περαιτέρω στην καταστροφή των β - κυττάρων (Zajec et al., 2022).

Οι διατροφικοί παράγοντες στην πρώιμη ζωή έχουν επίσης διερευνηθεί για τον πιθανό ρόλο τους στην παθογένεση του T1DM. Μελέτες έχουν διερευνήσει το αγελαδινό γάλα, τα δημητριακά και άλλα διατροφικά συστατικά ως πιθανούς παράγοντες κινδύνου, αν και τα αποτελέσματα ήταν ασυνεπή. Η υπόθεση στηρίζεται στο γεγονός πως η πρώιμη έκθεση σε ορισμένα διατροφικά αντιγόνα μπορεί να επηρεάσει την ανοσία του εντέρου και τη στοματική ανοχή, επηρεάζοντας δυνητικά την ανάπτυξη αυτοανοσίας (Pongrac Barlovic, Harjutsalo and Groop, 2022). Η ανεπάρκεια βιταμίνης D έχει αναδειχθεί ως ένας άλλος πιθανός περιβαλλοντικός παράγοντας. Η βιταμίνη D παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και η ανεπάρκειά της μπορεί να βλάψει την ανοσολογική ανοχή, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο αυτοάνοσων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου του T1DM (Charoenngam and Holick, 2020).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των γενετικών, περιβαλλοντικών και ανοσολογικών παραγόντων οδηγεί τελικά σε προοδευτική απώλεια της λειτουργίας και της ποσότητας των β - κυττάρων. Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους αλληλεπιδρούν αυτοί οι παράγοντες και τα ακριβή ερεθίσματα που ξεκινούν την αυτοάνοση απόκριση βρίσκονται ακόμη υπό διερεύνηση. Ωστόσο, είναι σαφές ότι ο T1DM προκύπτει από έναν συνδυασμό κληρονομικής ευαισθησίας και εξωτερικών περιβαλλοντικών παραγόντων, με

αποκορύφωμα μια ανώμαλη ανοσοαπόκριση ενάντια στα κύτταρα του ίδιου του σώματος που παράγουν ινσουλίνη (Garcia-Bonilla et al., 2016).

Κεφάλαιο 6. Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Υποενότητα 6.1 Επιδημιολογικά στοιχεία Ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) ορίζεται ως μια συστηματική αυτοάνοση παθολογική νόσος που σχετίζεται με μια χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία, η οποία μπορεί να βλάψει τόσο τις αρθρώσεις όσο και τα εξωαρθρικά όργανα, συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς, των νεφρών, των πνευμόνων, του πεπτικού συστήματος, των ματιών, του δέρματος και του νευρικού συστήματος. Τα τελευταία 30 χρόνια πολλοί επιστήμονες έχουν μελετήσει εκτενώς την ποικιλία του επιπολασμού και της επίπτωσης της RA. Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι η νόσος είναι μια παγκόσμια ασθένεια που κατανέμεται παγκοσμίως, ανεξάρτητα από φυλή, φύλο, εθνικότητα, εθνικότητα και ηλικία (Radu and Bungau 2021).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο συνολικός επιπολασμός και τα ποσοστά επίπτωσης της RA αυξάνονται από το 1990. Στις ΗΠΑ, επηρεάζει περισσότερους από 1,3 εκατομμύρια ενήλικες, που αντιπροσωπεύουν το 0,6–1% του πληθυσμού. Η συχνότητα εμφάνισης της RA παρουσιάζει χρονική και γεωγραφική μεταβλητότητα, πιθανώς επηρεασμένη από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Γενικά, οι γυναίκες έχουν 2-3 φορές περισσότερες πιθανότητες να την αναπτύξουν από τους άνδρες. Πράγματι, ο αθροιστικός κίνδυνος εμφάνισης ρευματοειδούς αρθρίτιδας από ενήλικες κατά τη διάρκεια της ζωής έχει υπολογιστεί χονδρικά σε 3,6% για τις γυναίκες και 1,7% για τους άνδρες (Jang, Kwon and Lee, 2022).

Υποενότητα 6.2 Αιτιοπαθογένεση Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Αν και έχει προταθεί ένας αριθμός βιομοριακών μηχανισμών, η αιτιολογία της RA δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Η εξέλιξη της είναι κυμαινόμενη με επεισοδιακές

παροξύνσεις με τα συμπτώματα σταδιακά να επιδεινώνονται έως ότου οι αρθρώσεις υποστούν μη αναστρέψιμη βλάβη και επηρεαστεί η σωματική και ψυχολογική λειτουργία. (Cush, 2022).

Η RA είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που προκαλείται από γενετικούς, περιβαλλοντικούς και στοχαστικούς παράγοντες. Ο γενετικός κίνδυνος για RA που έχει εκτιμηθεί από επιστημονικές μελέτες είναι περίπου 50%. Ως σημαντικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην υγεία του πληθυσμού, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση της RA. Όπως και άλλες ασθένειες, το κάπνισμα συνδέεται με την ανάπτυξη ή την έξαρση της νόσου. Η πρώτη απόδειξη της συσχέτισης των καπνιστών με αυξημένο κίνδυνο RA παρατηρήθηκε σε μια μελέτη με διαφορετικό σκοπό. Έκτοτε, έχει γίνει ο καλύτερα περιγραφόμενος παράγοντας κινδύνου για RA. Οι επιβλαβείς χημικές ουσίες στα προϊόντα καπνού έχουν αξιολογηθεί διεξοδικά και τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το κάπνισμα μεταδίδει ένα συγκεκριμένο σήμα (Venetsanopoulou et al., 2023).

Οι διατροφικοί παράγοντες και οι καταναλωτικές συνήθειες έχουν επίσης αξιολογηθεί με την πάροδο του χρόνου. Οι διατροφικοί παράγοντες επηρεάζουν τη RA έχουν δείξει ότι οι περίοδοι νηστείας και οι χορτοφαγικές δίαιτες μπορούν να μειώσουν την εξέλιξη της. Επιπλέον, η αποφυγή κόκκινου κρέατος και η αύξηση της κατανάλωσης φρούτων και λιπαρών ψαριών μπορεί να συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο για RA. Επιπρόσθετα, η βιταμίνη D, ως λιποδιαλυτή βιταμίνη και στεροειδής προ-ορμόνη, πιστεύεται ότι έχει ανοσοτροποποιητική δράση. Έρευνες υποδηλώνουν ότι η πρόσληψη βιταμίνης D έχει αντίστροφα συσχετιστεί με τον κίνδυνο RA (Venetsanopoulou et al., 2023).

Από την άλλη, η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή διαφορετικών αυτοαντισωμάτων, εκ των οποίων ο ρευματοειδής παράγοντας (RF) αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου, που είναι ανιχνεύσιμος σε έως και 80% των ασθενών. Η RF είναι γνωστό ότι στοχεύει την περιοχή Fc των αντισωμάτων IgG1, σχηματίζοντας μεγάλα ανοσοσυμπλέγματα στον αρθρικό ιστό. Αυτές οι εναποθέσεις ξεκινούν ως εντοπισμένες φλεγμονώδεις διεργασίες και πολλαπλασιάζονται με την ανάπτυξη έκτοπων δευτερογενών λεμφοειδών δομών εντός της

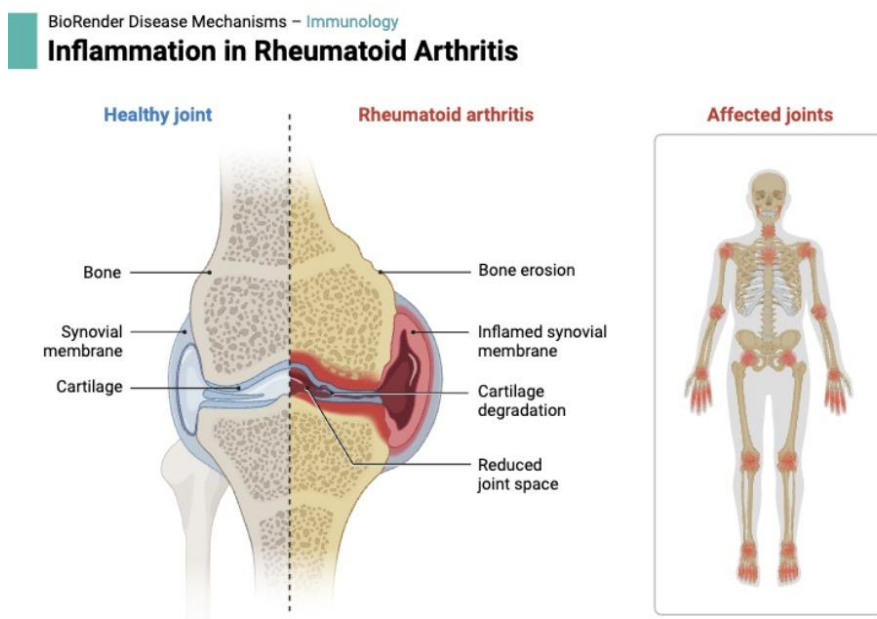
άρθρωσης στην οποία η RF υφίσταται ωρίμανση συγγένειας και εναλλαγή ισotyπων (Trela et al., 2019).

Η δεύτερη μεγάλη ομάδα αυτοαντισωμάτων που υπάρχει σε περίπου 60-70% των ορών ασθενών με RA αποτελούν τα ACPAs. Αυτά τα αντισώματα στοχεύουν επιτόπους που έχουν τροποποιηθεί μετα-μεταφραστικά με την απιονισμό των υπολειμμάτων αργινίνης σε κιτρουλίνη. Αυτή η τροποποίηση είναι γνωστό ότι συμβαίνει σε υψηλή συχνότητα στον αρθρικό υμένα RA, καθώς οι υπεύθυνες ισομορφές πεπτιδυλικής αργινίνης (PAD) 2 και 4 υπερεκφράζονται σε αυτή τη θέση (Trela et al., 2019).

Η μακροχρόνια συσχέτιση του τύπου ανθρώπινου αντιγόνου λευκοκυττάρου (HLA)-DRB1 με ασθενείς με RA υποδηλώνει την επίδραση της επιλογής των T κυττάρων και της παρουσίασης αντιγόνου στην επαγωγή αυτοαντιδραστικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Η RA καθοδηγείται από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα, που σημαίνει ότι η IL-6 είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της οστικής καταστροφής στη RA, επειδή ρυθμίζει την παραγωγή και τη φλεγμονή των T λεμφοκυττάρων. Αν και τα επίπεδα της IFN-γ δεν είναι υψηλά στην αρθρική μεμβράνη, η κυτοκίνη θεωρείται καθοριστική στην παθογένεση της. Όχι μόνο τα κύτταρα Th1 που παράγουν IFN-γ αλλά και τα βοηθητικά T (Th17) κύτταρα που παράγουν IL-17 έχουν σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη της (Jang, Kwon and Lee, 2022).

Υπάρχουν δύο τύποι κυττάρων Th17, τα «παθογόνα» κύτταρα Th17 και τα «μη παθογόνα» κύτταρα Th17, ανάλογα με το περιβάλλον κυτοκίνης που υπάρχει κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης. Συνήθως, τα «παθογόνα» κύτταρα Th17 θεωρούνται θετικοί ρυθμιστές των ανοσολογικών αποκρίσεων επειδή παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των IL-17A, IL-17F και IL-22. Αντίθετα, «μη παθογόνα» κύτταρα Th17 μπορεί να εκκρίνουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες όπως η IL-10 για να ρυθμίσουν αρνητικά την ανοσοαπόκριση. Στη RA, τα παθογόνα Th17 κύτταρα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Μεταξύ των διαφορετικών κυτοκινών που παράγει αυτός ο υποτύπος Th17 είναι ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF) ή IL-22. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η οδός σηματοδότησης της IL-22 (GM-CSF) μπορεί να ενεργοποιηθεί στην παθογένεση της RA. Αντίθετα, «μη παθογόνα» κύτταρα Th17 μπορεί

να εκκρίνουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες όπως η IL-10 για να ρυθμίσουν αρνητικά την ανοσοαπόκριση (Jang et al. 2022).



Εικόνα 8: Φλεγμονή στην Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Πηγή: <https://www.biorender.com/> 18/06/2024

Κεφάλαιο 7. Η εξέλιξη των βιοδεικτών στο Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο

Υποενότητα 7.1 Παραδοσιακοί βιοδείκτες του Συστηματικού Ερυθηματώδη Λύκου

Ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος αποτελεί μια αυτοάνοση νόσο, η οποία εμφανίζει σημαντικές δυσκολίες στην διάγνωσή του. Απόρροια αυτού αποτελεί οι παραδοσιακοί βιοδείκτες να είναι ελάχιστοι και δύσκολα ανιχνεύσιμοι.

ANA, αντιπυρηνικά αντισώματα

Η παραγωγή των αντιπυρηνικών αντισωμάτων αποτελεί την κορωνίδα του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου. Αυτά, αλληλεπιδρούν με μια πληθώρα βασικών κυτταρικών

συστατικών, όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα, DNA και RNA, οι πρωτεΐνες και τα σύμπλοκα των DNA και RNA με πρωτεΐνες. Παρά το γεγονός ότι η παραγωγή αντιπυρηνικών αντισωμάτων δεν είναι μοναδική για την περίπτωση της νόσου, το πρότυπο έκφρασης των αυτοαντισωμάτων είναι εξαιρετικά χαρακτηριστικό και επιτρέπει τη χρήση του ως εργαλείο σάρωσης του πληθυσμού, κατηγοριοποίησης, διάγνωσης, πρόγνωσης και σταδιοποίησης της νόσου. Επιπλέον, μελέτες σχετικά με την απόκριση στη θεραπεία των ασθενών έχουν δείξει ότι οι ANA θετικοί ασθενείς συγκριτικά με τους ANA αρνητικούς εμφανίζουν διαφορετικές αποκρίσεις σε φαρμακευτικούς παράγοντες, πιθανά λόγω του ρόλου των αντιπυρηνικών αντισωμάτων στη παραγωγή των κυτταροκινών και στη φλεγμονή και βλάβη των ιστών (Pisetsky and Lipsky 2020).

Ο έλεγχος για αντιπυρηνικά αντισώματα είναι σημαντικός για την εκτίμηση της νόσου για πάνω από 60 χρόνια και έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλών διαφορετικών εργαστηριακών προσεγγίσεων. Τα αντιπυρηνικά αντισώματα που προσδένουν το νουκλεόσωμα μπορεί να αλληλεπιδρούν είτε με το DNA, είτε με τις ιστόνες είτε με τα σύμπλοκα του DNA και των ιστονών. Τα αντισώματα αυτού του τύπου έναντι του δίκλωνου DNA έχουν εξαιρετική κλινική σημασία και για τη διάγνωση και για τη κατηγοριοποίηση της νόσου. Σε αντίθεση, με άλλα αντιπυρηνικά αντισώματα, τα αντι-DNA αντισώματα παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις επιπέδων στην πάροδο του χρόνου. Ο έλεγχος των αυτοαντισωμάτων έναντι ιστονών αξιοποιείται πιο σπάνια και κυρίως για την περίπτωση του συστηματικού ερυθρεμάτους λύκου που επάγεται από φάρμακα (Pisetsky and Lipsky 2020).

Μια άλλη κατηγορία αντιπυρηνικών αντισωμάτων αναγνωρίζει μικρές ριβονουκλεοπρωτεΐνες που βρίσκονται σε σύμπλοκα με RNA μόρια. Τα αντι-Sm αντισώματα αλληλεπιδρούν με τα μικρά πυρηνικά RNPs U1, U2, U4 και U5, ενώ τα αντι-RNPs αντισώματα αλληλεπιδρούν με την U1 snRNP39. Σε αυτή την κατηγορία αντισωμάτων ανήκουν και τα αντι-SSA/Ro και τα αντι-SSB/La αντισώματα. Τα SSA/Ro διακρίνονται σε δυο τύπους: τα αντισώματα που αναγνωρίζουν την Ro60 σε σύμπλοκα με RNA μόρια και τα αντισώματα που αναγνωρίζουν την Ro52 που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TRIM21. Από αυτή την

κατηγορία αντιπυρηνικών αντισωμάτων μόνο τα αντι-Sm αξιοποιούνται στην κατηγοριοποίηση της νόσου (Pisetsky and Lipsky 2020).

Ο βασικός μηχανισμός που τα αντιπυρηνικά αντισώματα προκαλούν τη φλεγμονή είναι μέσω του σχηματισμού ανοσοσυμπλεγμάτων, τα οποία είτε εναποτίθενται στους ιστούς είτε προάγουν την παραγωγή των κυτταροκινών από κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Στο Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο ο εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος σε συνδυασμό με τους ελαττωματικούς μηχανισμούς κάθαρσης παρέχουν τη δυνατότητα παραγωγής αυτοαντιγόνων. Η διαρκής παροχή αυτοαντιγόνων προκαλεί την παραγωγή αυτοαντισωμάτων τα οποία μπορούν, καθώς σχηματίζουν σύμπλοκα να εσωτερικεύονται στα κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Συγκεκριμένα, καθώς το DNA βρίσκεται στο εσωτερικό των κυττάρων μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον ενδοσωμικό TLR9 υποδοχέα και άλλους αισθητήρες νουκλεϊκών οξέων στο κυτταρόπλασμα. Αισθητήρες όπως η συνθάση κυκλικού GMP-AMP μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή τύπου 1 ιντερφερονών (Pisetsky and Lipsky 2020).

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα αποτελούν βασικό ανοσολογικό βιοδείκτη τόσο για την κατηγοριοποίηση, την πρόγνωση, τη διάγνωση όσο και για τη σταδιοποίηση της νόσου. Αξιοποιείται ο έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κυτταρικά υποστρώματα Hep-2 και σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος εξετάζονται τα αντισώματα έναντι του δικλόνου DNA, Sjögren's συνδρόμου αντισώματα A (SSA (Ro60)), B, Sm αντισώματα και αντισώματα έναντι της ριβονουκλεοπρωτεΐνης. Τα αντιπυρηνικά αντισώματα έχουν υψηλή ευαισθησία 90% με 95% αλλά παρουσιάζουν χαμηλή ειδικότητα 5–20%. Το αρνητικό αποτέλεσμα των ANA δεν μπορεί να αποκλείσει τη διάγνωση SLE, το 6.2% των ασθενών εμφανίζει αρνητικό αποτέλεσμα (Yu et al. 2021).

Επομένως, τα αντιπυρηνικά αντισώματα ή αλλιώς ANA αξιολογούνται παραδοσιακά με την μεθοδολογία του έμμεσου ανοσοφθορισμού, κυρίως σε υποστρώματα επιθηλιακών κυττάρων (Hep2) ή σε τομές από ιστούς τρωκτικών. Στα κυτταρικά αυτά υποστρώματα παρατηρείται με μικροσκόπιο φθορισμού η ύπαρξη φθορισμού, ύστερα από την επώαση των υποστρωμάτων με σημασμένα αντισώματα. Επιπλέον, καταγράφεται και ο μεγαλύτερος παρατηρούμενος τίτλος αντισωμάτων ως ένα ποσοτικό μέγεθος το οποίο αντιστοιχεί στην μεγαλύτερη αραιώση του δείγματος όπου παρατηρείται ακόμη

φθορισμός. Η διαχωριστική τιμή στον τίτλο των αντιπυρηνικών αντισωμάτων που κρίνει αν υπάρχει θετικό αποτέλεσμα είναι η αραιώση 1/160. Σημαντική είναι και η καταγραφή του προτύπου του φθορισμού που σε ορισμένες περιπτώσεις συσχετίζεται με συγκεκριμένα αυτοαντισώματα. Τα βασικότερα πρότυπα ανοσοφθορισμού του πυρήνα είναι ο ομοιογενής τύπος, ο στικτός, ο πυρηνισκικός και ο κεντρομεριδιακός. Το πρότυπο του ομοιογενή ανοσοφθορισμού φαίνεται να συσχετίζεται με τα αυτοαντισώματα έναντι του δίκλωνου DNA, το πρότυπο του λεπτού στικτού ανοσοφθορισμού συσχετίζεται με τα αυτοαντισώματα έναντι της Ro πρωτεΐνης, το πρότυπο του αδρού στικτού ανοσοφθορισμού συσχετίζεται με αυτοαντισώματα έναντι της U1RNP και έναντι της Sm πρωτεΐνης και το πυρηνισκικό πρότυπο συσχετίζεται με αυτοαντισώματα έναντι της SCL και της U3RNP (Bossuyt et al. 2020).

Συμπλήρωμα C3-C4

Το συμπλήρωμα αποτελείται από παραπάνω από 30 συστατικά, στα οποία ανήκουν πρωτεΐνες πλάσματος, υποδοχείς μεμβρανών και ρυθμιστικοί παράγοντες. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος επιτυγχάνεται με αλυσιδωτές αντιδράσεις και περιλαμβάνει δυο διακριτές φάσεις, τη φάση της ενεργοποίησης μέχρι την αποικοδόμηση της C3 και την όψιμη φάση με τη δημιουργία του συμπλόκου επίθεσης μεμβρανών. Η φάση της ενεργοποίησης περιλαμβάνει τρία μονοπάτια: το κλασσικό μονοπάτι, το μονοπάτι της λεκτίνης και το εναλλακτικό μονοπάτι και τα μονοπάτια αυτά συγκλίνουν μετά την ενεργοποίηση της C3. Στο κλασσικό μονοπάτι, το σύμπλοκο του αντιγόνου-αντισώματος προσδένεται στην C1q και αμέσως ενεργοποιείται η C1r, η οποία ενεργοποιεί την C1s. Η C1s με τη σειρά της ενεργοποιεί την C4 και ύστερα την C2, με αποτέλεσμα τη δημιουργία C4bC2a ενός ενζύμου μετατροπής 14 της C3. Όταν η C3 ενεργοποιείται διασπάται σε δυο θραύσματα το C3a και το C3b, με το C3b να αλληλεπιδρά με το C4bC2a για να σχηματίσει ένα ένζυμο μετατροπής του C5 (Ayano and Horiuchi, 2023).

Στον ορό οι δείκτες του συμπληρώματος C3 and C4 χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της παρουσίας των βιολογικά ενεργών ανοσοσυμπλεγμάτων και για την παρακολούθηση της ασθένειας. Τα μειωμένα επίπεδα των C3 και C4 συνδυαστικά είναι ισχυρότερος

βιοδείκτης συγκριτικά με τα μειωμένα επίπεδα του καθενός ξεχωριστά. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα των C3 και C4 και ταυτόχρονα έχουν θετικό αποτέλεσμα στα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) εμφανίζουν 97,6% ειδικότητα στη διάγνωση της νόσου του συστηματικού ερυθματώδους λύκου. Οι βιοδείκτες του συμπληρώματος συσχετίζεται με τις εξάρσεις του λύκου και συνήθως με νεφρικές και αιματολογικές εξάρσεις (Ayano and Horiuchi, 2023).

Βιοδείκτες στη νεφρίτιδα του λύκου

Η βιοψία των νεφρών αποτελεί την πρότυπη μέθοδο για διάγνωση, κατηγοριοποίηση και πρόγνωση αλλά λόγω των μειονεκτημάτων όπως η επεμβατική διαδικασία, ο κίνδυνος αιμορραγίας και η πιθανότητα λανθασμένης δειγματοληψίας, μπορεί να μην χρησιμοποιηθεί ευρέως. Ακόμη, υπάρχει ένα ποσοστό 10% με 20% λανθασμένης κατηγοριοποίησης εξαιτίας της αδυναμίας της βελόνας να διεισδύσει στην παθολογική περιοχή. Τα αντισώματα έναντι του δίκλωνου DNA συσχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου και βοηθούν στην εκτίμηση της εξέλιξης της νεφρίτιδας. Ωστόσο, τα επίπεδα τους υφίστανται διακυμάνσεις και μπορεί να ελαχιστοποιηθούν κατά τη διάρκεια θεραπείας. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, με τη χρήση *Crithidia luciliae* ως υπόστρωμα και η ELISA είναι οι πιο κοινές δοκιμασίες για τον προσδιορισμό της παρουσίας των αντισωμάτων έναντι του δίκλωνου DNA. Τα επίπεδα των αντισωμάτων αυτών δε συσχετίζονται πάντοτε με την ενεργότητα της νεφρίτιδας και καθιστούν τον βιοδείκτη αυτό μη αξιόπιστο λόγω των διακυμάνσεων του. Αυτές οι διακυμάνσεις οφείλονται σε πολλαπλούς λόγους όπως η συσχέτιση της συγκέντρωσής τους με το στάδιο της παθολογίας της νόσου, η εναπόθεση των αντισωμάτων αυτών στους ιστούς και η μη εύρεση στον ορό, η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεθόδων προσδιορισμού των αντισωμάτων δεν επαρκούν, οι μη νεφρικές εξάρσεις δε συσχετίζονται πάντα με τα αντισώματα αυτά και δε συσχετίζονται όλες οι υποτάξεις των αντισωμάτων με παθογένεια (Yu et al. 2021).

Η παρουσία των αντι-Sm αντισωμάτων είναι χαρακτηριστική για τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο και δεν έχει βρεθεί σε άλλες ρευματολογικές ασθένειες ή σε υγιή άτομα. Η ειδικότητα των αντισωμάτων αυτών είναι 99% ενώ εμφανίζουν χαμηλή

ευαισθησία της τάξης του 5-30%. Οι υψηλοί τίτλοι των αντι-Sm αντισωμάτων μπορούν να προβλέψουν την παρουσία σιωπηλής νεφρίτιδας και την έγκαιρη κακή έκβαση της (van Beers and Schreurs, 2022).

Τα αντισώματα έναντι C1q έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της C1q, η οποία οδηγεί στην παρεμπόδιση της απομάκρυνσης των ανοσολογικών συμπλεγμάτων και των αποπτωτικών σωμάτων ή στην εναπόθεση ανοσολογικών συμπλεγμάτων στη βασική μεμβράνη των νεφρών. Η αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων εμφανίζει ευαισθησία 81%-97% και ειδικότητα 71%-95%, για την εκτίμηση των εξάρσεων της νεφρίτιδας (Yu et al. 2021).

Υποενότητα 7.2 Πρωτεωμικοί Βιοδείκτες του Συστηματικού Ερυθηματώδη Λύκου

Η ανάλυση από δεδομένα πολύ-ομικών τεχνολογιών από τα T κύτταρα, B κύτταρα και περιφερικά κύτταρα του αίματος σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο ανέδειξε 18 μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλουτίζονται σημαντικά και στα τρία είδη κυττάρων. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες σχετίζονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντερφερονών όπως ο STAT1 και ο STAT2. Η μεταγραφωμική ανάλυση των κυττάρων του στρώματος των νεφρών έδειξαν ότι οι ιντερφερόνες και τα χαρακτηριστικά ίνωσης των σπειραματικών κυττάρων μπορεί να σχετίζονται με τη μη ανταπόκριση στη θεραπεία. Η ανάλυση των PBMC αποκάλυψε αυξημένες διαφορές στη σύνθεση των ανοσολογικών κυττάρων (B, T και μυελοειδικών κυττάρων), των ιντερφερονών, των χημειοκινών και διαφορές στα μεταγραφικά επίπεδα των κυτοσολικών RNA και DNA αισθητήρων (Fenton and Pedersen, 2023).

Η δυσλειτουργία των T ρυθμιστικών κυττάρων συγκριτικά με τα T βοηθητικά (Th1, Th2 και Th17) εμπλέκεται στην παθογένεια του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου και παρατηρήθηκε η αύξηση της έκφρασης στα Th17 των γονιδίων CXCL1, ICAM1, IL10, IL5, IL8, ISG20, JAK2 και η μείωση της έκφρασης των γονιδίων CD28, CD40LG, S1PR1, IL17RE, IL23R, RORC (Fenton and Pedersen, 2023). Το μονοπάτι των ιντερφερονών διαχωρίζει τους ασθενείς σε δυο ομάδες: την πρώτη ομάδα με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων

του μονοπατιού και τη δεύτερη ομάδα με υψηλά επίπεδα έκφρασης. Στη δεύτερη ομάδα ένα υποσύνολο των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων έχει χαρακτηριστεί και έχει παρατηρηθεί μείωση της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων και μεταβολικών μονοπατιών (Fenton and Pedersen, 2023).

Τα δεδομένα πρωτεομικής έδειξαν ότι η πρωτεΐνη MX1 που δεσμεύει GTP και επάγεται από τις ιντερφερόνες, η συνθάση OAS3 και η IFIT3 που επάγεται από τις ιντερφερόνες είναι σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς που πάσχουν από λύκο. Επίσης, οι μεταγωγείς σήματος και ο ενεργοποιητής της μεταγραφής STAT1 και STAT2 οι οποίοι εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης JAK/STAT παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στους ασθενείς που πάσχουν από λύκο (Li et al., 2022). Η αυξημένη αναλογία γυναικών που πάσχουν από συστηματικό ερυθματώδη λύκο αποδεικνύει την εμπλοκή των ορμονών στην ανάπτυξη της νόσου. Ακόμη, επιγενετικές δυσλειτουργίες ως προς την έκφραση των γονιδίων που εντοπίζονται στο Χ χρωμόσωμα όπως του γονιδίου CD40L φαίνεται να συμμετέχουν στην επιβάρυνση του ποσοστού των γυναικών που πάσχουν (Arriens et al., 2016).

Η έκφραση των γονιδίων ξεκινάει με την πρόσβαση σε αυτά των μεταγραφικών προϊόντων και η μεθυλίωση των υποκινητών σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες παρεμποδίζει αυτή την πρόσβαση, με αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των γονιδίων. Η υπομεθυλίωση μπορεί να οδηγήσει στην αυξημένη έκφραση των γονιδίων και στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα των ασθενών που πάσχουν από λύκο παρατηρείται γενικευμένη υπομεθυλίωση του DNA. Συγκεκριμένα, η υπομεθυλίωση στα γονίδια CD70, CD40L, ITGAL, της περφορίνης, των υποδοχέων KIRs, της ιντερλευκίνης IL-10 και IL-13 έχουν αναφερθεί στην περίπτωση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου. Επακόλουθα, η υπομεθυλίωση του DNA μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της παραγωγής κυτταροκινών και την υπερενεργοποίηση των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων, ταυτόχρονα με την αύξηση της παραγωγής των αντισωμάτων από τα Β κύτταρα (Arriens et al., 2016).

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών αποτελούν έναν ακόμη επιγενετικό μηχανισμό για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων και μπορούν να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης. Για παράδειγμα, η ακετυλίωση και η μεθυλίωση συγκεκριμένων

καταλοίπων λυσίνης στην ιστόνη 3 μπορούν να επάγουν ή να καταστείλουν την έκφραση των γονιδίων, αντίστοιχα. Στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα των ασθενών με λύκο εμφανίζεται γενικευμένη μείωση της μεθυλίωσης και της ακετυλίωσης της ιστόνης 3. Επιπροσθέτως, η υπερακετυλίωση της ιστόνης 4 και η υπερέκφραση ορισμένων γονιδίων έχει αναφερθεί στα μονοκύτταρα των ασθενών που πάσχουν από λύκο (Arriens et al., 2016).

Οι επιγενετικές αναλύσεις των B κυττάρων ασθενών που πάσχουν από λύκο τόνισε το ότι το περιβάλλον μπορεί να διαμορφώσει τα επιγενετικά δίκτυα των B κυττάρων. Ειδικότερα, τα πρότυπα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου IFI44L αποτελούν έναν εξαιρετικά ευαίσθητο και ειδικό βιοδείκτη και μπορεί να διαχωρίσει τους ασθενείς με λύκο από τους υγιείς ή τους ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (Arriens et al., 2016).

Σημαντικός είναι ο ρόλος και των μη κωδικών μορίων RNA στην παθογένεια του συστηματικού ερυθματώδους λύκου. Το miR-146a στοχεύει σηματοδοτικές πρωτεΐνες και ρυθμίζει αρνητικά την έμφυτη ανοσία αλλά φαίνεται να υποεκφράζεται στα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα των ασθενών, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της ιντερφερόνης τύπου 1. Ένα ακόμη μη κωδικό μόριο που υποεκφράζεται στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο είναι το miR-125 και συγκεκριμένα στα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Η μειωμένη έκφραση αυτού του μορίου οδηγεί στην παραγωγή της φλεγμονώδους χημειοκίνης RANTES. Στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα των ασθενών με λύκο έχει παρατηρηθεί η υπερέκφραση των miR-21 και miR-148a, τα οποία στοχεύουν τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες, με αποτέλεσμα την DNA υπομεθυλίωση. Έχουν γίνει ορισμένες μελέτες και για τα μη κωδικά μόρια RNA που κυκλοφορούν ελεύθερα σε δείγματα ορών και ούρων ασθενών με λύκο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα miR-146a και miR-155 υποεκφράζονται στον ορό των ασθενών ενώ τα επίπεδα του miR-146a αυξάνονται στα ούρα των ασθενών που πάσχουν (Liu, Zhang and Wang, 2022).

Υποενότητα 7.3 Μεταβολομικοί βιοδείκτες στο Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο

Οι μεταβολομικές μελέτες προτείνουν ότι η L βαλίνη, η πυριμιδίνη και η L λευκίνη είναι εξαιρετικοί διαγνωστικοί βιοδείκτες για τον λύκο. Σε σύγκριση με τα άτομα ελέγχου, οι

οροί από ασθενείς με ΣΕΛ είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα των περισσότερων αμινοξέων, υδατανθράκων (δηλαδή φρουκτόζη, μαννόζη, γλυκόζη, γλυκονικό οξύ-λακτόνη, γλυκερόλη), λιπαρά οξέα (δηλαδή ελαϊκό οξύ, αραχιδονικό οξύ), φουμαρικό, αμινομηλονικό, θρεονικό, άλφα-τοκοφερόλη και αξιοσημείωτα υψηλότερα επίπεδα μεθειονίνης, γλουταμικό, κυστίνη, 1-μονοπαλμιτίνη, 1 μονολινολεΐνη, 1-μονολεΐνη, 2-υδροξυισοβουτυρικό, μεταξύ άλλων (Yu, Nagafuchi and Fujio, 2021).

Το φουμαρικό και το κιτρικό είναι τα ενδιάμεσα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), κεντρικά στην κυτταρική παραγωγή ενέργειας. Σε μια επιστημονική έρευνα, διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με ΣΕΛ είχαν χαμηλότερα επίπεδα φουμαρικού σε σύγκριση με υγιή άτομα και εκείνοι με ανενεργό ΣΕΛ είχαν χαμηλότερα επίπεδα κιτρικών σε σύγκριση με εκείνους με ενεργό νόσο. Συνολικά, αυτό υποδηλώνει ότι ο ΣΕΛ προκαλεί δυσλειτουργία στον ενεργειακό μεταβολισμό και τον βαθμό δυσλειτουργίας μπορεί να σχετίζεται με τη δραστηριότητα της νόσου (Yan et al., 2016).

Ο ΣΕΛ έχει επίσης χαρακτηριστεί από αυξημένο οξειδωτικό στρες, όπου η υπερβολική οξειδωτική ικανότητα έχει εμπλακεί στην υποκείμενη ανοσολογική δυσλειτουργία, στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων και στις καρδιαγγειακές επιπλοκές της νόσου. Η γλουταθειόνη (GSH), αποτελεί το κύριο ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό, που συντίθεται από τα συστατικά αμινοξέα που περιλαμβάνουν κυστεΐνη, γλουταμικό και πυρογλουταμαρικό από τις διαδοχικές δράσεις της γλουταμινικής κυστεΐνολιγάσης (GCL) και της συνθετάσης GSH. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς με ΣΕΛ είχαν μειωμένα επίπεδα πυρογλουταμαρικού και αυξημένα επίπεδα γλουταμικού και κυστίνης σε σύγκριση με τα άτομα ελέγχου (Yan et al., 2016).

<u>Οργανοειδική βλάβη σε λύκο</u>	<u>Βιοδείκτες</u>	<u>Βιολογικό δείγμα προς ανάλυση</u>
Νεφρίτιδα	Αντι- dsDNA αντισώματα	Ορός
	Αντι- Sm αντισώματα	Ορός
	Αντι-C1q αντισώματα	Ορός
	Πρωτεϊνουρία	Ούρα
	Λόγος κρεατινίνης	Ούρα
	Χημειοκίνες	Ούρα
	Κυτταροκίνες	Ούρα
	Μόρια προσκόλλησης	Ούρα

Δερματικές αλλοιώσεις	Αντι-SSA αντισώματα	Ορός
	Αντιπηκτικό του λύκου	Ορός
	Αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης	Ορός ή ΕΝΥ
	Αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης	Ορός ή ΕΝΥ

Πίνακας 3: Βιοδείκτες και βιολογικά υγρά απομόνωσή τους

Κεφάλαιο 8. Η εξέλιξη των βιοδεικτών της Αξονικής Σπονδυλοαρθρίτιδας

Υποενότητα 8.1 Παραδοσιακοί βιοδείκτες της Αξονικής Σπονδυλοαρθρίτιδας

CRP και ταχύτητα καθίζησης ερυθρών

Η CRP πρωτεΐνη και η ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στη διάγνωση της αξονικής σπονδυλοαρθρίτιδας και παρουσιάζουν σημαντική αξία ως προγνωστικοί βιοδείκτες για την έκβαση της θεραπείας. Ως διαγνωστικός βιοδείκτης η CRP στον ορό εμφανίζει μόλις 50% ευαισθησία και 80% ειδικότητα, τιμές μικρότερες από εκείνες της MRI ή του HLA-B*27 (Brown, Li and K.-A. L. Cao, 2020).

Τα βασικά επίπεδα της συγκέντρωσης της CRP είναι χρήσιμα και για την εκτίμηση της απόκρισης στη θεραπεία με διάφορους βιολογικούς παράγοντες. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα και φυσιολογικά επίπεδα CRP αποκρίνονται σε θεραπείες με TNF αναστολείς και IL-17 αναστολείς, όχι με μεγάλη διαφορά από τους ασθενείς που δέχτηκαν placebo αγωγές. Για παράδειγμα, σε μελέτη 1.250 ασθενών που δέχτηκαν το σκεύασμα adalimumab υπήρξε βελτίωση εντός 12 εβδομάδων στο 68% των ασθενών με επίπεδα CRP >2.8mg/dl, συγκριτικά με το 40% των ασθενών που είχε επίπεδα CRP < 0.4mg/dl. Για κάθε 1mg/dl αύξηση στα επίπεδα της CRP αυξανόταν 7% η πιθανότητα απόκρισης στη θεραπεία εντός 12 εβδομάδων (Brown, Li and K.-A. L. Cao, 2020).

Στους ασθενείς με αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα τα υψηλά επίπεδα CRP και οι τιμές της ταχύτητας καθίζησης ερυθροκυττάρων συνδέονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης των συνδεσμοφύτων. Όταν δέχονται θεραπεία με golimumab, οι ασθενείς με χαμηλές

συγκεντρώσεις CRP την εβδομάδα 104, παρουσιάζουν ελάχιστο σχηματισμό συνδεσμοφύτων. Παραδόξως η μείωση στα επίπεδα της CRP με τη θεραπεία συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο δημιουργίας συνδεσμοφύτων, πιθανώς διότι ασθενείς με υψηλότερες τιμές CRP είναι πιο πιθανό να αποκριθούν στη θεραπεία (Brown, Li and K.-A. L. Cao, 2020).

HLA

Ο κίνδυνος εκδήλωσης της αξονικής σπονδυλοαρθρίτιδας και η σοβαρότητα της νόσου επηρεάζονται ισχυρά από κληρονομικούς παράγοντες. Το 90% του κινδύνου εκδήλωσης της νόσου κληρονομείται, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη διαγνωστική αξία στους γενετικούς ελέγχους. Ωστόσο, το HLA-B*27 συνεισφέρει το 20% στη συνολική κληρονομικότητα της νόσου και οι άλλοι 115 γνωστοί γενετικοί τόποι συσχετίζονται μόλις σε ποσοστό 7.4% (Brown, Li and K.-A. L. Cao, 2020).

Στον πληθυσμό της Ευρώπης, το 85% των ασθενών με αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα είναι HLA-B*27 θετικοί, συγκριτικά με το 8% των υγιών ατόμων. Η κυριαρχία του HLA-B*27 στα υγιή άτομα στον πληθυσμό της Ασίας είναι μικρότερο, ενώ το γονίδιο απουσιάζει στους περισσότερους Αφρικανικούς πληθυσμούς. Η ειδικότητα του HLA-B*27 για τη νόσο είναι μικρή, καθώς μόνο το 6% των φορέων του γονιδίου αναπτύσσει αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα. Οι ομόζυγοι για το HLA-B*27 παρουσιάζουν κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου 3.3 φορές μεγαλύτερο από τους ετερόζυγους αλλά στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό οι ομόζυγοι αποτελούν το 4% (Brown, Li and K.-A. L. Cao, 2020).

Οι HLA-B*27 θετικοί ασθενείς παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά απόκρισης στη θεραπεία με TNF αναστολείς συγκριτικά με τους HLA-B*27 αρνητικούς ασθενείς αλλά ο βιοδείκτης δεν μπορεί να αξιοποιηθεί ευρέως (Brown, Li and K.-A. L. Cao, 2020).

Υποενότητα 8.2 Πρωτεομικοί βιοδείκτες Αξονικής Σπονδυλοαρθρίτιδας

Κυτταροκίνες

Οι συγκεντρώσεις ορισμένων κυτταροκινών αυξάνονται στους ασθενείς με αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα και συσχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου, όπως επίσης και με την

απόκριση σε θεραπείες (Brown, Li and K.-A. L. Cao, 2020). Η ιντερλευκίνη 6 (IL6) έχει ελεγχθεί για συσχέτισμό με τη MRI φλεγμονή σε ασθενείς με αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα που λαμβάνουν τον παράγοντα anti-TNF golimumab. Η συσχέτιση αυτή δε διευκρινίστηκε αν επηρεαζόταν και από τα επίπεδα της CRP (Maksymowych, 2019)

Τα επίπεδα των Th1, Th2 και Th17 κυτταροκινών εκτιμήθηκαν σε μια Γαλλική μελέτη 443 ασθενών και 79 υγιών με τη μεθοδολογία της ELISA και αναφέρθηκαν οι εξής 17 κυτταροκίνες: IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFNγ, sCD40L και TNFα. Μόνο τα επίπεδα των IL31 και sCD40L βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς (Maksymowych, 2019).

Καλπροτεκτίνη

Η καλπροτεκτίνη αποτελεί μια ετεροδιμερή πρωτεΐνη που προσδένει ασβέστιο και εντοπίζεται στο ερειστικό σύστημα των ασθενών με αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα. Η προφλεγμονώδης δράση της καλπροτεκτίνης εκδηλώνεται μέσω του υποδοχέα TLR4. Σε μια μελέτη 262 ασθενών και 260 υγιών, τα επίπεδα της καλπροτεκτίνης βρέθηκαν υψηλότερα στους ασθενείς και η ευαισθησία του βιοδείκτη ήταν 80.2% και η ειδικότητα 92.7% , με οριακή τιμή το 151ng/mL. Τα επίπεδα της καλπροτεκτίνης στον ορό και στα κόπρανα και της CRP συσχετίζονται ανεξάρτητα με ενδείξεις φλεγμονής του εντέρου σε ασθενείς με αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα σε πρώιμο στάδιο (Maksymowych, 2019).

Αντισώματα

Μια κατηγορία αυτοαντισωμάτων που παράγονται στην αξονική σπονδυλοαρθρίτιδα είναι τα αυτοαντισώματα έναντι του μορίου CD74, το οποίο ανήκει στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II. Μπορεί να επηρεάσει τη διαφοροποίηση των B κυττάρων και προσδένεται στον ανασταλτικό παράγοντα των μακροφάγων, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κΒ και κατ' επέκταση των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών. Η πρώτη ELISA που ανίχνευσε την πλήρους μήκους CD74 παρουσίασε 56% δραστικότητα στους 41 ασθενείς και 5% στους 100 υγιείς δότες. Η δεύτερη ELISA που ανιχνεύει την επικράτεια CLIP του μορίου παρουσίασε 69% δραστικότητα στους 216 ασθενείς

και 97% σε ασθενείς με πόνο στη μέση διάρκειας μικρότερης του ενός έτους. (Maksymowych, 2019).

Υποενότητα 8.3 Μεταβολομικοί βιοδείκτες Αξονικής Σπονδυλοαρθρίτιδας

Οι μεταβολομικοί βιοδείκτες βασίζονται κυρίως στον μεταβολισμό της γλυκόζης και των παραγώγων της. Λόγω της ευαισθησίας της μεταβολομικής, μπορούν να ανιχνευθούν ανευπαίσθητες μεταβολές στα βιολογικά μονοπάτια για την παροχή πληροφοριών σχετικά με τους μηχανισμούς παθογένεσης που αποτελούν τη βάση της νόσου. Μετά από συγκρίσεις με αυτά των υγιών μαρτύρων, ορισμένα αλλαγμένα μεταβολικά πρότυπα είναι παρόμοια μεταξύ ασθενών με Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα και ασθενών με άλλες ρευματικές παθήσεις όπως η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, όπως αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και μειωμένα επίπεδα λιπιδίων και μεταβολιτών της μεμβράνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι αρθρίτιδα μοιράζονται τους ίδιους μηχανισμούς της ανοσοφλεγμονώδους δυσρύθμισης, ενώ οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες που βρέθηκαν να αλλοιώνονται μόνο στην Σπονδυλοαρθρίτιδα υποδηλώνουν έναν νέο μηχανισμό παθογένεσης (Huang et al., 2022).

Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, ηλεκτρικού οξέος, μηλικού οξέος και γαλακτικού έχουν υποστηριχθεί από άφθονα στοιχεία, που υποδεικνύουν την αναποτελεσματική χρήση της γλυκόζης και τον αυξημένο αναερόβιο μεταβολισμό. Η αλλαγή του μεταβολισμού των υδατανθράκων μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) (Huang et al., 2022).

Τέλος, τα μειωμένα επίπεδα λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα των ακόρεστων λιπαρών οξέων, υποδηλώνουν αυξημένη χρήση τους υπό φλεγμονώδεις συνθήκες. Τα λιπαρά οξέα μεταβολίζονται με β-οξειδωση για να καλύψουν την ενεργειακή ζήτηση, η οποία αποδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα κετονικών σωμάτων. Απόρροια αυτού αποτελεί, μια *in vitro* μελέτη που διεξήχθη βρήκε ανοδικές ρυθμίσεις στα επίπεδα των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την β-οξειδωση λιπαρών οξέων στα συνδεδετικά κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες ασθενών με την νόσο. Από την άλλη πλευρά, η ζήτηση προφλεγμονωδών (ω -PUFAs) και αντιφλεγμονωδών (ω 3- PUFAs) μεσολαβητών αυξάνεται για να διαιωνιστεί η ανοσομεταβολική απόκριση (Huang et al., 2022).

Κεφάλαιο 9. Η εξέλιξη των βιοδεικτών στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I

Υποενότητα 9.1 Κλασικοί βιοδείκτες του σακχαρώδη διαβήτη τύπου I

Η έγκαιρη διάγνωση, θεραπεία και πρόληψη βασίζεται στην όσο τον δυνατόν πιο πρώιμη διάγνωση του T1DM. Με τα χρόνια, έχουν ερευνηθεί πολυάριθμοι βιοδείκτες για την χρησιμότητά τους στην κατανόηση της εξέλιξης και της θεραπείας αυτής της νόσου.

Αντισώματα κατά των κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος (ICA)

Τα ICA αποτελούν ένας από τους πρώτους βιοδείκτες που αναγνωρίστηκαν στον T1DM από τον Bottazzo το 1974. Ο πρωταρχικός στόχος αυτών των αντισωμάτων αποτελούν τα β - νησίδια του παγκρέατος. Οι ερευνητές ανακάλυψαν πως τα αντισώματα αυτά παράγονται πολύ πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα της νόσου. Η παρουσία ICA στο ανθρώπινο σώμα μπορεί να σηματοδοτήσει μια συνεχιζόμενη ανοσολογική αντίδραση ενάντια στα β - κύτταρα, επιτρέποντας την άμεση παρέμβαση του ανοσοποιητικού συστήματος, αναστέλλοντας την εξέλιξη της νόσου. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την επώαση των ορών των ασθενών σε τμήματα ανθρώπινης κρυοτομής, ομάδας αίματος O παγκρέατος. Μετά το πλύσιμο του τμήματος ιστού, προστίθεται ένα αντιανθρώπινο συζυγές IgG σημασμένο με φθορίζουσες χρωστικές φλουορεσκεΐνη-ισοθειοκυανικό. Μετά από ένα άλλο βήμα πλύσης και μετά την εφαρμογή γλυκερόλης και κάλυμμα, η αντικειμενοφόρος πλάκα εξετάζεται προσεκτικά κάτω από το μικροσκόπιο φθορισμού. Εάν υπάρχει ICA, οι νησίδες φθορίζουν (Kawasaki 2023).

Ωστόσο, έχουν αναφερθεί πολλοί περιορισμοί στη χρήση των ICA. Το ICA είναι τα πιο δύσκολα μετρήσιμα αυτοαντισώματα νησιδίων, επειδή η διαδικασία υπόκεινται σε διακυμάνσεις στον παγκρεατικό ιστό, στους χρόνους επώασης, τις συνθήκες της εργασίας και την ερμηνεία βιολογικών αποτελεσμάτων από τους ιατρούς. Επιπλέον, η διαδικασία προετοιμασίας για τον προσδιορισμό του βιοδείκτη στο μικροσκόπιο φθορισμού απαιτεί πολύ χρόνο και πολλές φορές παράγει ασαφή αποτελέσματα. Τέλος, παρόλο που το ICA

ανιχνεύεται στο 70% έως 80% των ατόμων με νεοεμφανιζόμενο διαβήτη, η θετικότητα του μειώνεται και μετά από 10 χρόνια, λίγα άτομα παραμένουν θετικά (περίπου 5%) (Kawasaki 2023).

Τα αντισώματα κατά της ινσουλίνης (IAAs)

Τα αντισώματα κατά της ινσουλίνης (IAAs) είναι αυτό - αντισώματα που στρέφονται κατά της ίδιας της ινσουλίνης του σώματος. Τα IAAs είναι συχνά τα πρώτα αντισώματα που εμφανίζονται σε ποσοστό 50% – 60% σε μικρά παιδιά κάτω των 10 ετών που θα αναπτύξουν T1DM και μπορούν να ανιχνευθούν, όπως και τα ICA, πολύ πριν από τη διάγνωση της νόσου. Οι περισσότερες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν συγκλίνουν στο γεγονός πως τα άτομα με γονότυπο HLA – DR4 εμφανίζουν κατά μέσο όρο μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης πολύ αυξημένης τιμής του βιοδείκτη. Επιπρόσθετα, το IAA υψηλής συγγένειας αποδείχθηκε σταθερά ότι σχετίζεται με την εξέλιξη σε πολλαπλά αυτοαντισώματα και κλινική νόσο. Ένα κατώφλι συγγένειας με IAA $>10^9$ L/mol στο αρχικό δείγμα αυτοαντισωμάτων, βρέθηκε ότι ταυτοποιεί σχεδόν όλα τα παιδιά με T1DM. (Ziegler et al. 2013)

Ένας από τους κύριους περιορισμούς των IAAs είναι η εξάρτησή τους από την ηλικία του ασθενή. Τα IAAs είναι κατά συντριπτική πλειοψηφία πιο συχνά σε παιδιά και λιγότερο συχνά σε ενήλικες που διαγιγνώσκονται με T1DM. Η μέτρηση των IAAs είναι πολύ περιορισμένη στην πρόβλεψη και τη διάγνωση σε μεγαλύτερες ηλικίες και απαιτεί εξειληγμένες και εξαιρετικά ειδικές δοκιμές, οι οποίες ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμες σε όλα τα κλινικά εργαστήρια. Επιπλέον, υπάρχει το ζήτημα της διασταυρούμενης αντίδρασης με την εξωγενή ινσουλίνη σε άτομα που έχουν ξεκινήσει θεραπεία με ινσουλίνη, το οποίο μπορεί να δυσκολέψει την ερμηνεία των επιπέδων των IAAs, δίνοντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα. (Achenbach et al., 2004).

Αυτοαντισώματα κατά της Γλουταμινικής Αφυδρασικής Καρβοξυλάσης (GADAs)

Η γλουταμινική αφυδρασική καρβοξυλάση (GAD) αποτελεί ένα ένζυμο που φυσιολογικά εντοπίζεται στα β - κύτταρα του παγκρέατος, το οποίο αποτελεί στόχος των αυτοαντισωμάτων κατά της GAD (GADAs). Η βιοχημική ανάλυση έχει δείξει ότι η GAD βρίσκεται σε

διάφορους ιστούς, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο νευρικό σύστημα. Το GAD καταλύει τη μετατροπή του γλουταμικού οξέος στον ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή GABA (γ-αμινο βουτυρικό οξύ). Ο ειδικός ρόλος του GABA στα β - κύτταρα δεν είναι γνωστός. Το 1990, το GAD ανακαλύφθηκε ότι είναι το αυτοαντιγόνο νησίδων μοριακού βάρους 64000 Da που ήταν ανοσοκαθιζήσιμο από διαβητικούς (αλλά όχι μη διαβητικούς) ορούς. Το GADA βρίσκεται σε παρόμοια ποσοστά (70%-80%) με το ICA σε ασθενείς με νεοεμφανιζόμενο T1DM. Μετά την εμφάνιση της νόσου, η GADA είναι πιο επίμονη από την ICA. Επιπρόσθετα, τα αυτοαντισώματα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τον εντοπισμό του LADA, μια μορφή διαβήτη που μοιράζεται χαρακτηριστικά τόσο του T1DM, όσο και του T2DM. Τέλος, τα GADAs παραμένουν στο αίμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με άλλα αυτοαντισώματα, κάνοντάς τα χρήσιμα τόσο για τη διάγνωση όσο και για την παρακολούθηση. (Verge et al., 2016).

Παρόλο που τα GADAs έχουν τα πλεονεκτήματά τους, δεν είναι και χωρίς περιορισμούς. Αποτελούν διακεκριμένους βιοδείκτες και σε άλλες αυτοάνοσες καταστάσεις, όπως η αυτοάνοση νόσος του θυρεοειδούς και η κακοήθης αναιμία, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Επιπλέον, ενώ τα GADAs συχνά εμφανίζονται σε πολλά άτομα με T1DM, δεν είναι πάντα εμφανή και ορισμένοι ασθενείς, ιδιαίτερα μικρότερα παιδιά, μπορεί να μην έχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα. Αυτή η διακύμανση στους ασθενείς μειώνει τη χρησιμότητα των GADAs ως μοναδικού διαγνωστικού δείκτη. (Verge et al., 2016).

Αυτοαντισώματα κατά της Τυροσινικής Φωσφατάσης-Σχετιζόμενου Αντιγόνου Νησίδων 2 (IA-2)

Το IA-2 είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνικής φωσφατάσης τυροσίνης (PTP) και εντοπίζεται κυρίως σε εκκριτικά κοκκία εντός του β-κυττάρου. Έχει μια εξωκυτταροπλασματική (EC) περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταροπλασματική (IC) περιοχή. Οι κυρίαρχοι αυτοαντιδραστικοί επίτοποι βρίσκονται στην C-τερματική του περιοχή και είναι προσανατολισμένοι ενδοκυτταρικά με τρόπο που να είναι σύμφωνος με ένα απομονωμένο αυτοαντιγόνο. Τα IA-2As έχουν υψηλή ειδικότητα για την νόσο και σπάνια

απαντώνται σε άτομα χωρίς τη νόσο. Η παρουσία τους συνδέεται έντονα με την αυτοάνοση καταστροφή των β - κυττάρων, καθιστώντας τα αξιόπιστους βιοδείκτες για την νόσο. Τα IA-2s χρησιμοποιούνται συχνά σε συνδυασμό με άλλα αυτοαντισώματα για τη βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας και την πρόβλεψη της ανάπτυξης της νόσου σε άτομα υψηλού κινδύνου (Decochez et al., 2005).

Ο κύριος περιορισμός των IA-2As είναι η σχετικά χαμηλή ευαισθησία τους σε σύγκριση με άλλα αυτοαντισώματα, όπως τα GADAs και τα ICAs. Εντοπίζονται σε περίπου 50-60% των περιστατικών Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Αυτό σημαίνει ότι η αποκλειστική εξάρτηση στα IA-2s για τη διάγνωση μπορεί να οδηγήσει σε διαφυγόντα κρούσματα της νόσου. Επιπλέον, και σε αυτή την περίπτωση ο εντοπισμός των IA-2s απαιτεί εξειδικευμένες εργαστηριακές τεχνικές, οι οποίες μπορεί να μην είναι ευρέως διαθέσιμες, λόγω του κόστους και της εξειδίκευσης που χρειάζεται (Decochez et al., 2005).

C-Πεπτίδιο

Το C-πεπτίδιο είναι μια χρήσιμη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος αξιολόγησης της λειτουργίας των παγκρεατικών β – κυττάρων. Μετά τη διάσπαση της προϊνσουλίνης, η ινσουλίνη και το πεπτίδιο c-πεπτιδίου 31-αμινοξέων παράγονται σε ίσες ποσότητες. Ο ρυθμός αποικοδόμησης του πεπτιδίου c στο σώμα είναι πιο αργός από εκείνον της ινσουλίνης (χρόνος ημιζωής 20-30 λεπτά, σε σύγκριση με τον χρόνο ημιζωής της ινσουλίνης μόλις 3-5 λεπτά), γεγονός που παρέχει ένα πιο σταθερό παράθυρο δοκιμής κυμαινόμενη απόκριση των β - κυττάρων. Σε υγιή άτομα η συγκέντρωση του c-πεπτιδίου στο πλάσμα σε κατάσταση νηστείας είναι 0,3-0,6 nmol/l, με μεταγευματική αύξηση σε 1-3 nmol/l (Leighton, Sainsbury and Jones, 2017).

Ένας από τους περιορισμούς του C-πεπτιδίου ως βιοδείκτη είναι η μεταβλητότητα του. Τα επίπεδα C-πεπτιδίου μπορούν να επηρεαστούν από παράγοντες όπως τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, η χρονική στιγμή λήψης τροφής και η διάρκεια του διαβήτη. Αυτή η μεταβλητότητα μπορεί να δυσκολέψει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του C-πεπτιδίου. Επιπλέον, στα προχωρημένα στάδια του ΣΔ τύπου 1, όταν η λειτουργία των βήτα κυττάρων έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, τα επίπεδα C-πεπτιδίου μπορεί να είναι ανιχνεύσιμα,

περιορίζοντας τη χρησιμότητά του σε μακροχρόνιο διαβήτη. Η μέτρηση του C-πεπτιδίου απαιτεί επίσης ειδικές δοκιμές, οι οποίες μπορεί να μην είναι διαθέσιμες σε όλες τις κλινικές περιπτώσεις (Leighton, Sainsbury and Jones, 2017).

HbA1c (Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη)

Η HbA1c αποτελεί μια γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, η οποία προσδιορίζει την μέση συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα σε διάστημα 8 με 12 εβδομάδων. Σε άτομα με διαβήτη, χρησιμοποιείται ως το κύριο μέτρο για την αξιολόγηση του μακροχρόνιου γλυκαιμικού ελέγχου και ως προγνωστικό παράγοντα για τον κίνδυνο ανάπτυξης μικροαγγειακών επιπλοκών του διαβήτη. Αυξημένη HbA1c ορού (> 6,5%) είναι ενδεικτικό μιας ακανόνιστης γλυκαιμικής κατάστασης, ενώ χαμηλότερα επίπεδα για τρεις συνεχόμενους μήνες (< 6,5%) αντανακλά θετικό γλυκαιμικό έλεγχο. Επί του παρόντος, η Ομοσπονδιακή Ένωση Φαρμάκων (FDA) δέχεται την HbA1c ως εγκεκριμένο δείκτη για μακροχρόνιο γλυκαιμικό έλεγχο (Little, Rohlfing and Sacks, 2019).

Ωστόσο, η HbA1c δεν είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση της γλυκαιμικής κατάστασης του ασθενούς σε ορισμένες διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων αιμοσφαιρινοπαθειών και διαταραχών με μη φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Για παράδειγμα, πολλοί τύποι αναιμίας μεταβάλλουν λανθασμένα τα επίπεδα HbA1c. Όλοι αυτοί οι περιορισμοί στις τρέχουσες προσεγγίσεις ανάγκασαν τους ερευνητές να αναζητήσουν άλλους δείκτες για την αξιολόγηση του γλυκαιμικού ελέγχου, ειδικά σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Τέλος, η HbA1c δεν καταγράφει τις καθημερινές διακυμάνσεις στα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές για τη διαχείριση του T1DM (Little, Rohlfing and Sacks, 2019).

Γλυκόζη Ορού Νηστείας (FSG)

Η μέτρηση των επιπέδων γλυκόζης ορού νηστείας χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια ως διαγνωστικό κριτήριο για τον διαβήτη. Αυξημένα επίπεδα γλυκόζης ορού νηστείας μπορεί να υποδεικνύουν προβλήματα με την έκκριση ινσουλίνης και το μεταβολισμό της γλυκόζης. Η διάγνωση του διαβήτη περιλαμβάνει γλυκόζη αίματος νηστείας υψηλότερη

από 7 mmol/L (126 mg/dL). Η μέτρηση αυτή είναι απλή και εύκολα προσβάσιμη, παρέχοντας άμεση πληροφόρηση για τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Συνήθως χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για τη διάγνωση του διαβήτη και την αξιολόγηση του ελέγχου του σακχαρώδους διαβήτη. Είναι οικονομική και εύκολη στη διενέργεια, καθιστώντας την κατάλληλη για μαζικούς ελέγχους και την τακτική παρακολούθηση ('Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus', 2014).

Από την άλλη, η μέτρηση της γλυκόζης ορού νηστείας δεν είναι ιδανική για τον έλεγχο του διαβήτη, καθώς παρέχει μόνο μια στιγμιαία εικόνα των επιπέδων σακχάρου στο αίμα και μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως ο στρες, η αρρώστια και η πρόσφατη πρόσληψη τροφής. Επιπλέον, δεν παρέχει πληροφορίες για την αυτοάνοση διαδικασία ή τη λειτουργία των β - κυττάρων, περιορίζοντας την αξία της στην κατανόηση των μηχανισμών της νόσου ('Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus', 2014).

Υποενότητα 9.2 Βιοδείκτες από το πεδίο της πρωτεωμικής του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I

Πρόσφατες εξελίξεις στην πρωτεομική έχουν διευκολύνει τον εντοπισμό νέων βιο-δεικτών που μπορούν να παρέχουν πιο ακριβείς πληροφορίες σχετικά με την παθοφυσιολογία, τη διάγνωση και την πρόγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I.

Μεταφορέας Ψευδαργύρου 8 (ZnT8)

Ο ψευδάργυρος αποτελεί ένα απαραίτητο ιόν για το ανθρώπινο σώμα, καθώς διατηρεί σημαντικές βιολογικές λειτουργίες, ενεργώντας ως καταλύτης, ρυθμιστής ή δομικό συστατικό. Ο ψευδάργυρος λειτουργεί ως ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μόριο στη ρύθμιση της σηματοδότησης της ινσουλίνης και της ομοιόστασης της γλυκόζης και η συσσώρευση ψευδαργύρου σε κόκκους είναι απαραίτητη για τη συσκευασία, την ωρίμανση, τη διακίνηση, την έκκριση και τη ρύθμιση της ινσουλίνης. Η συγκέντρωση ψευδαργύρου είναι περίπου 30 mM στους κόκκους των β κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος. Ο ψευδάργυρος εμπλέκεται στην κρυστάλλωση της ινσουλίνης εντός των εκκριτικών κόκκων σε pH 5,5 μέχρι την έκκρισή του. Η προπροϊνσουλίνη συντίθεται από τα ριβοσώματα ως μόριο μονής

αλυσίδας και το πεπτίδιο σήματος αφαιρείται αμέσως για να παραχθεί προϊνσουλίνη. Η προϊνσουλίνη διπλώνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συνδέεται με τον ψευδάργυρο για να σχηματίσει ένα εξαμερές με ηλεκτροστατική σύζευξη στους όξινους κόκκους. Καθώς οι κόκκοι ωριμάζουν στη συσκευή Golgi, η προϊνσουλίνη υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία η οποία μεσολαβεί από την προορμόνη κονβερτάση για να διαχωρίσει το πεπτίδιο. Έξι μονομερή προϊνσουλίνης συνδέονται με δύο κεντρικά ιόντα ψευδαργύρου στην ιστιδίνη 30 στην αλυσίδα Β για να σχηματίσουν ένα εξαμερές που οδηγεί σε κρυσταλλωμένη προϊνσουλίνη. Σε αντίθεση με τους κόκκους, η συγκέντρωση ψευδαργύρου στο ελεύθερο κυτταρόπλασμα είναι μόνο περίπου 0,4 nM και είναι σημαντικό να διατηρηθεί υψηλή βαθμίδα ψευδαργύρου στους κόκκους (Huang et al., 2019).

Το μέλος πρωτεΐνης μεταφορέα ψευδαργύρου 8 (ZnT8) πιστεύεται ότι είναι ο ρυθμιστής της συγκέντρωσης ψευδαργύρου στα β κύτταρα και επίσης δρα ως αισθητήρας ψευδαργύρου. Το ZnT8 είναι μια μοναδική πρωτεΐνη καθώς εκφράζεται αποκλειστικά σε νησίδες και διευκολύνει τη μεταφορά ψευδαργύρου από το κυτταρόπλασμα σε εκκριτικά κυστίδια. Το ZnT8 ανήκει σε μια υποομάδα της υπερ-οικογένειας του διευκολυντή διάχυσης κατιόντων. Είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από 369 αμινοξέα σε μορφή Α και 320 αμινοξέα σε μορφή Β, σύμφωνα με μια Ν-τελική επέκταση. Το ZnT8 παρουσιάζεται με ειδικό για κύτταρο ή ιστό τρόπο. Εκφράζεται κυρίως στις παγκρεατικές νησίδες και εντοπίζεται στη μεμβράνη των κοκκίων ινσουλίνης των β κυττάρων, αλλά μπορεί επίσης να ανιχνευθεί στα α κύτταρα του παγκρέατος. Σε επίπεδο mRNA, το ZnT8 είναι ο μεταφορέας ψευδαργύρου με την υψηλότερη έκφραση στους παγκρεατικούς ιστούς (Huang et al., 2019).

Το ZnT8 είναι ένα νέο αυτοαντιγόνο νησίδων για τον T1DM και έχει αποδειχθεί λόγω του ότι αποτέλεσε στόχος από αυτοαντισώματα στο 60-80% των ασθενών με T1DM με νέα εμφάνιση. Τα αντισώματα αντι-ZnT8 έχουν αποδειχθεί ότι υπάρχουν στο αίμα από την προδιαβητική φάση και είναι πιθανόν ένα συμβάν κατάντη της πρωτογενούς γενετικής παθογένεσης της νόσου. Είναι ένας χρήσιμος ανεξάρτητος δείκτης αυτοανοσίας, είτε μόνος σε άτομα αρνητικά σε αντισώματα, είτε σε συνδυασμό με άλλους δείκτες αυτοαντισώματος T1DM. Τέλος, το ZnT8 είναι μια πρωτεΐνη ειδική για το πάγκρεας και θα

μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της λειτουργίας των παγκρεατικών νησίδων (Huang et al., 2019).

Το ZnT8 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη πολλαπλών διαστάσεων και είναι δύσκολο να καθαριστεί διατηρώντας τη φυσική του δομή. Τα αντισώματα αντι-ZnT8 μπορούν να ανιχνεύσουν έως και το 26% των ασθενών με T1DM που εμφανίζονταν προηγουμένως ως αρνητικοί σε αυτοαντίσωμα χρησιμοποιώντας αναλύσεις IAA, ICA ή GADA (Huang et al., 2019).

Σύστημα Συμπληρώματος

Το σύστημα του συμπληρώματος είναι ένας καταρράκτης πρωτεασών που συνθέτουν μια χυμική επέκταση του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Η απορρύθμιση της οδού του συμπληρώματος συνδέεται με χρόνιες και αυτοάνοσες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του διαβήτη. Οι ελλείψεις του συμπληρώματος είναι, είτε κληρονομικές, είτε επίκτητες. Οι κληρονομικές ανεπάρκειες των πρωτεϊνών του συμπληρώματος C1-C4 συνδέονται στενά με βακτηριακή λοίμωξη και συστηματικό ερυθματώδη λύκο, ενώ οι κληρονομικές ανεπάρκειες του C5-C9 σχετίζονται με βακτηριακή μόλυνση και σήψη. Επίκτητη ανεπάρκεια ή αλλαγές στο επίπεδο του παράγοντα προκύπτουν όταν υπάρχουν αποκρίσεις οξείας φάσης που σχετίζονται με ενεργοποίηση ή φλεγμονή, με αποτέλεσμα είτε προς τα πάνω είτε προς τα κάτω εξάντληση κάποιου παράγοντα. Σε άτομα με T1DM, τα συστατικά του συμπληρώματος C3 και C4 εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στο πάγκρεας, συμπεριλαμβανομένων των β νησίδων. Μελέτες του παγκρέατος που ελήφθησαν από πτωματικούς δότες T1DM ανέφεραν ανοσοχρώση C4D στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων και στους εξωκρινείς πόρους, μια αλλαγή που συνήθως σχετίζεται με την ενεργοποίηση σε αυτό το σημείο και σημαντική ανοδική ρύθμιση του καταρράκτη του συμπληρώματος (Sarkar et al., 2023).

Ύστερα από μακροχρόνιες μελέτες αποδείχθηκε μια λειτουργική σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης των συστατικών C3 και C5 και της βελτιωμένης λειτουργίας των β-κυττάρων σε ποντίκια και ανθρώπους, υποδηλώνοντας άμεσες επιδράσεις στα β κύτταρα. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες ιντερλευκίνη-1β και ιντερφερόνη-γ αυξάνουν την έκφραση

του C3 σε κύτταρα β τρωκτικών και ανθρώπων. Η σίγαση του C3 επιδεινώνει την απόπτωση των β-κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η ανοδική ρύθμιση του συστήματος του συμπληρώματος βελτιώνει την αυτοφαγική απόκριση των β-κυττάρων, μια προστατευτική ομοιοστατική απόκριση στο στρες των β-κυττάρων που είναι μειωμένη στην ανάπτυξη T1DM. Το εξωγενώς προστιθέμενο C3 προστατεύει από τον επαγόμενο από κυτοκίνη θάνατο β-κυττάρων μέσω ενεργοποίησης πρωτεϊνικής κινάσης B και αναστολής της N-τερματικής κινάσης c-Jun (Sarkar et al., 2023).

Παρόλα αυτά, οι αυτές πληροφορίες ενδέχεται να έχουν περιορισμένη αξία, καθώς η κατάσταση ιστού ή πλάσματος του συστήματος συμπληρώματος τη στιγμή του θανάτου ενός ατόμου με μακροχρόνιο T1DM μπορεί να μην μοιάζει με εκείνη τη στιγμή της εμφάνισης αυτοαντισωμάτων νησίδων σε ένα κατά τα άλλα υγιές παιδί. Εν ολίγοις, αν και οι αλλαγές στο σύστημα του συμπληρώματος συνδέονται σαφώς με τον κίνδυνο ανάπτυξης T1DM και την ταχεία εξέλιξή του, η κατεύθυνση του αποτελέσματος και οι θεραπευτικές επιπτώσεις είναι αβέβαιες (Sarkar et al., 2023).

Απολιποπρωτεΐνες

Τα περισσότερα κυκλοφορούντα λιπίδια πλάσματος συσκευάζονται σε λιποπρωτεΐνες οι οποίες παραδοσιακά ταξινομούνται σε τέσσερα κοινά υποκλάσματα με βάση την πυκνότητα σωματιδίων: χυλομικρά (CM), λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) και λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Το APOA4 είναι καλά τεκμηριωμένο για τη ρύθμιση της συσκευασίας της τριακυλογλυκερόλης στις πλούσιες σε τριακυλογλυκερόλη λιποπρωτεΐνες (CMs και VLDL). Επιπρόσθετα, το APOA4 αναφέρεται ότι συντελεί ρόλους κλειδί στον κορεσμό, τη γαστρική λειτουργία και την ομοίωση της γλυκόζης, τα οποία έχουν αναφερθεί όλα αλλαγμένα σε άτομα με T1DM.

Πέντε μελέτες μετά την ορομετατροπή και μετά τη διάγνωση ανέφεραν αυξημένη APOA2 στο πλάσμα, μια πολύ γνωστή πρωτεΐνη ικρίωματος HDL. Ενώ η HDL έχει λίγη τριακυλογλυκερόλη, η APOA2 έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στον μεταβολισμό της τριακυλογλυκερόλης μέσω ενός μηχανισμού που εξακολουθεί να είναι ελάχιστα κατανοητός. Αρκετές μελέτες αναφέρουν αλλαγές στο APOE που πιστεύεται επίσης ότι ρυθμίζουν τη

λιπόλυση της τριακυλογλυκερόλης στα VLDL. Αυτές οι παρατηρήσεις συνάδουν με τα αυξημένα επίπεδα τριακυλογλυκερόλης και την αναστολή της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης που σχετίζεται με την έμφυτη ανοσοαπόκριση (Li et al., 2023).

Οι περισσότερες από τις μελέτες βιοδεικτών πραγματοποιήθηκαν σε ολόκληρο το πλάσμα. Καθώς οι περισσότερες απολιποπρωτεΐνες είναι ανταλλάξιμες, απαιτούνται πιο λεπτομερείς μελέτες λιποπρωτεϊνών για να προσδιοριστεί η υποκατηγορία στην οποία βρίσκονται αυτά τα σωματίδια και πώς διαμορφώνουν τη λειτουργία των σωματιδίων στο πλαίσιο του T1DM. Αν και δύο μελέτες προσπάθησαν να προσδιορίσουν λιποπρωτεΐνες από άτομα με T1DM, αμφότερες περιόρισαν την ανάλυσή τους σε HDL, χάνοντας έτσι τις περισσότερες από τις αλλαγές που σχετίζονται με τα πλούσια σε τριακυλογλυκερόλη σωματίδια. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η συγκέντρωση των απολιποπρωτεϊνών μεταβάλλεται καθημερινά ανάλογα με τα γεύματα και τις καθημερινές δραστηριότητες του ανθρώπου, καθιστώντας το δείκτη αρκετά ασταθής για μακροχρόνιες συγκρίσεις. (Li et al., 2023).

Υποενότητα 9.3 Βιοδείκτες μεταβολομικής στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου

I

Ο μεταβολικός αποτυπωτικός έλεγχος παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις βιοχημικές οδούς που επηρεάζονται από τον διαβήτη, προσφέροντας νέους δείκτες νόσου.

Διακλαδισσαλυσιδωτά Αμινοξέα (BCAAs)

Τα διακλαδισσαλυσιδωτά αμινοξέα (BCAAs), συμπεριλαμβανομένων της λευκίνης, της ισολευκίνης και της βαλίνης, αποτελούν ένα κοινό συμπλήρωμα πρωτεϊνών. Τα BCAAs εμφανίζουν σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού, της σύνθεσης πρωτεϊνών και της πρόσληψης τροφής. Μεταξύ αυτών, τα επίπεδα του κυκλοφορικού BCAA ρυθμίζονται αυστηρά από τον καταβολισμό και οι ανωμαλίες του BCAA σχετίζονται με την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη, τον διαβήτη τύπου 1, τις καρδιακές παθήσεις και τον καρκίνο. Όλα τα αμινοξέα που ταξινομούνται ως BCAAs καταλύονται από τις διακλαδισμένες αλυσίδες τρανσαμινάση αμινοξέων (BCAT1/2) για να σχηματίσουν κετοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCKA), τα οποία στη συνέχεια οξειδώνονται από το

σύμπλοκο κετοξέος αφυδρογονάσης διακλαδισμένης αλυσίδας (BCKDH) για να σχηματίσουν τους τελικούς μεταβολίτες. (Yao et al., 2023).

Υψηλά επίπεδα BCAA σε άτομα με ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε σκύλους με πειραματικό διαβήτη. Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από την αύξηση των BCAAs, υπάρχει μείωση στα επίπεδα των γλυκονεογόνων αμινοξέων, ιδιαίτερα της αλανίνης. Επιπρόσθετα, υπάρχουν κάποιες ομοιότητες στην παθογένεση των αυξημένων BCAA στον διαβήτη και τη βραχυπρόθεσμη αστία, η οποία είναι επίσης μια κατάσταση έλλειψης ινσουλίνης. Ωστόσο, οι αλλαγές στο διαβήτη σχετίζονται με αξιοσημείωτη αύξηση της πρωτεόλυσης και της δραστηριότητας BCKD στους μύες, με αποτέλεσμα σοβαρή καχεξία. Ενώ εμφανίζεται αναπλήρωση μυϊκού αζώτου και τα επίπεδα BCAA ομαλοποιούνται μετά τη σίτιση ατόμων που είχαν προηγουμένως πεινάσει, τα BCAA συσσωρεύονται και η μειωμένη αναπλήρωση αζώτου παραμένει μετά τη σίτιση σε άτομα με διαβήτη τύπου 1 (Yao et al., 2023).

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα επίπεδα των BCAAs, όπως η διατροφή, η φυσική δραστηριότητα και οι συννοσηρότητες, που μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβλητότητα στα αποτελέσματα. Η σχέση μεταξύ των BCAAs και του διαβήτη είναι πολύπλοκη και απαιτεί περαιτέρω έρευνα για να καθοριστούν τυποποιημένα εύρη αναφοράς και να επικυρωθεί η κλινική τους χρησιμότητα (Yao et al., 2023).

Σώματα Κετόνης

Τα σώματα κετόνης, συμπεριλαμβανομένου του β-υδροξυβουτυρικού οξέος (BHB) και της ακετόνης, παράγονται κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και έχουν μελετηθεί ως βιοδείκτες για την νόσο. Τα σώματα κετόνης που παράγονται σε μη ελεγχόμενο T1DM μπορούν να φτάσουν στα κυκλοφοριακά επίπεδα έως και 25 mmol/L, πολύ πάνω από τα επίπεδα που φαίνονται σε κανονική νηστεία (<0,5 mmol/L) ή ακόμη και παρατεταμένη νηστεία (6–7,5 mmol/L). Η συσσώρευση ιόντων υδρογόνου λόγω της διάστασης αυτών των σχετικά ισχυρών μεταβολικών οξέων υπερβαίνει σύντομα τη ρυθμιστική ικανότητα του νεφρού. Το αποτέλεσμα είναι η διαβητική κετοξέωση (DKA), μια κατάσταση υψηλών επιπέδων κετονικού σώματος στο αίμα, αφυδάτωση και οξέωση, που σχετίζεται με

σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Το DKA μπορεί να είναι η αιτία του T1DM, ή μπορεί να εμφανίζεται περιστασιακά κατά τη διάρκεια της T1DM, ή πιο σπάνια μπορεί να είναι ένα υποτροπιάζον πρόβλημα. (Lizzo, Goyal and Gupta, 2024).

Τα επίπεδα των σωμάτων κετόνης μπορεί να διαφοροποιηθούν από διάφορους παράγοντες όπως η διατροφή, η νηστεία και η σωματική δραστηριότητα, οδηγώντας σε μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, μειώνοντας την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί πως η παρουσία σωμάτων κετόνης δεν είναι ειδική για τον διαβήτη τύπου 1 και μπορεί να εμφανιστεί σε άλλες καταστάσεις, όπως η λιμοκτονία και οι δίαιτες χαμηλές σε υδατάνθρακες. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να καθοριστούν τυποποιημένα εύρη αναφοράς και να επικυρωθεί η κλινική χρησιμότητα των σωμάτων κετόνης ως βιοδεικτών (Lizzo, Goyal and Gupta, 2024).

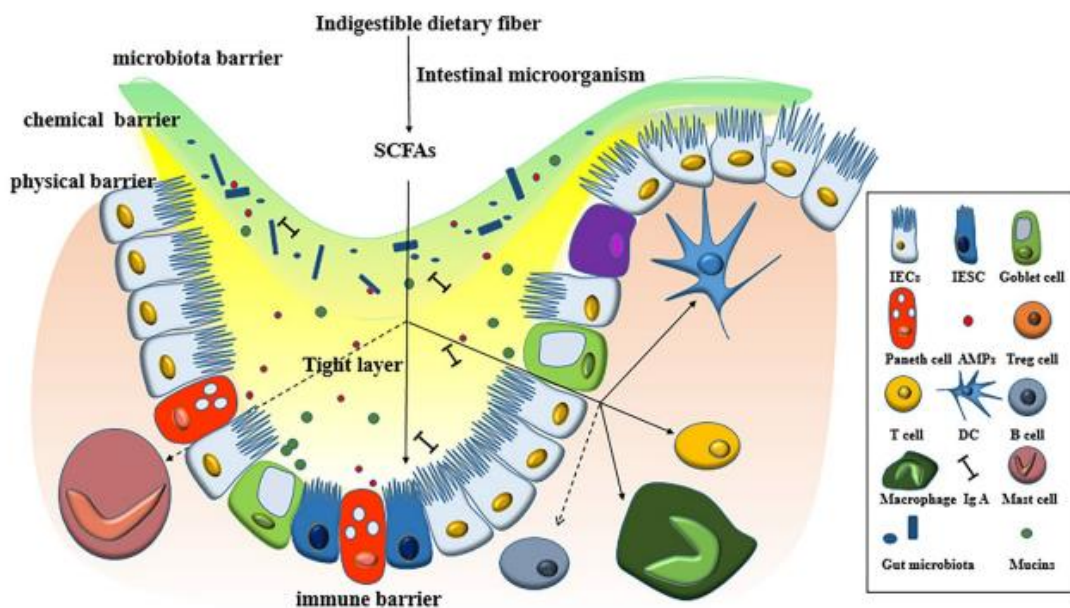
Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλύσου (SCFAs)

Το κόλον και το παρακείμενο τμήμα του λεπτού εντέρου περιέχουν πολλά μικρόβια, τα οποία είναι κυρίως βακτήρια και ορισμένα είδη μυκήτων. Αυτά τα μικρόβια παράγουν μια ποικιλία μεταβολιτών από διατροφικά συστατικά και βιομόρια που παράγονται από τον ξενιστή στο έντερο. Μερικοί από αυτούς τους μεταβολίτες λειτουργούν ως σημαντικοί ρυθμιστές της φυσιολογίας του ξενιστή και του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs), όπως το οξικό (C2), το προπιονικό (C3) και το βουτυρικό (C4), μπορεί να είναι τα καλύτερα παραδείγματα αυτών των βιολογικά ενεργών μικροβιακών μεταβολιτών. Ως τα πιο άφθονα ανιόντα στον αυλό του παχέος εντέρου, τα SCFA απορροφώνται και χρησιμοποιούνται εν μέρει από τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Κυκλοφορούν σε άλλα όργανα και ασκούν ρυθμιστικές λειτουργίες για τον έλεγχο του μεταβολισμού της γλυκόζης και του λίπους (Kim 2021).

Η μειωμένη παραγωγή SCFA είναι ένας δείκτης απώλειας ωφέλιμων βακτηρίων (δυσβίωση), η οποία συνδέεται συνήθως με χρόνιες αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις νόσους, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη τύπου 1 και του διαβήτη τύπου 2. Πράγματι, μελέτες σε ποντίκια και ανθρώπους έχουν δείξει ότι μια ανεπάρκεια στην παραγωγή SCFAs από τη μικροχλωρίδα του εντέρου σχετίζεται με την ανάπτυξη T1DM, ξεκινώντας πολύ

πριν από την κλινική διάγνωση. Η ανεπαρκής πρόσληψη διαιτητικών ινών ή μια μικροχλωρίδα του εντέρου που είναι φτωχή στην παραγωγή SCFA μπορεί να υποστηρίξει την αυξημένη επίπτωση της T1DM και πολλών άλλων δυτικών ασθενειών. Παρόμοια με τα ποντίκια, αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι οι άνθρωποι με T1D έχουν μειωμένες συγκεντρώσεις SCFA κοπράνων και πλάσματος (Bell et al., 2022).

Τα επίπεδα των SCFAs μπορεί να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες, όπως η διατροφή, τα αντιβιοτικά και η σύνθεση του μικροβιώματος του εντέρου, οδηγώντας σε μεταβλητότητα στα αποτελέσματα. Η σχέση μεταξύ των SCFAs και του διαβήτη είναι αρκετά πολύπλοκη, καθώς περιλαμβάνει την φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα, η οποία μεταβάλλεται συνεχώς. Επίσης, ο βιοδείκτης αυτός ενώ έχει διαγνωστικό χαρακτήρα δεν έχουν ανακαλυφθεί εύρη αναφοράς που μπορούν να εξασφαλίσουν ασφαλή αποτελέσματα. Τέλος, τα SCFAs δεν είναι ειδικά για την νόσο και μπορεί να αλλοιωθούν σε άλλες γαστρεντερικές και μεταβολικές διαταραχές (Ríos-Covián et al., 2016).



Εικόνα 9: Μηχανισμός SCFAs. Πηγή: <https://www.biorender.com/> 19/07/2024

Λιπιδιομική

Η λιπιδωμική είναι μια ταχέως αναπτυσσόμενη υπο-περιοχή της μεταβολομικής, που αναφέρει τη δημιουργία και το μεταβολισμό υδρόφοβων ειδών μικρών μορίων κατά τη διάρκεια της υγείας και της νόσου. Τα λιπίδια είναι ένα ποικίλο σύνολο μορίων που τυπικά αποτελούνται από μία ή περισσότερες αλυσίδες λιπαρών οξέων συνδεδεμένες σε μια ενεργή ομάδα κεφαλής. Αυτή η δομή, η οποία είναι ένας συνδυασμός των αλυσίδων υδρόφοβων λιπαρών οξέων και μιας υδρόφιλης ομάδας κεφαλής, δίνει στα λιπίδια την ικανότητα να αυτοοργανώνονται σε πολύπλοκα κυκλοφορούντα σωματίδια που αποτελούνται από διάφορα είδη λιπιδίων. Αυτά τα σωματίδια ενεργούν σε διεργασίες κυτταρικής μεταφοράς και σηματοδότησης στο σώμα. Από την άλλη πλευρά, τα λιπίδια που αποθηκεύονται στους λιπώδεις ιστούς γύρω από το σώμα αντανακλούν τη μακροπρόθεσμη κατάσταση του ενεργειακού μεταβολισμού και οι εκτροπές σε αυτό μπορούν να παρατηρηθούν στην παχυσαρκία και στον διαβήτη τύπου 1 (Murfit et al., 2018).

Η συσχέτιση μεταξύ λιπιδίων και διαβήτη έχει ευρέως αναγνωριστεί. Προηγμένες αναλύσεις λιποπρωτεϊνών έχουν δείξει μείωση των συγκεντρώσεων στον ορό των τριγλυκεριδίων (TG), της χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη (Apo)B κατά τη σύγκριση ατόμων στην έναρξη της T1DM και μετά την επίτευξη βέλτιστου γλυκαιμικού ελέγχου. Το μεγαλύτερο μέρος της προσοχής στα λιπίδια στο T1DM έχει επικεντρωθεί στις φωσφατιδυλοχολίνες και τη γενική αντίστροφη συσχέτισή τους με φλεγμονές διαφόρων ειδών. Ωστόσο, πάνω από διπλάσιος αριθμός τριακυλογλυκερολών από τις φωσφατιδυλοχολίνες αναφέρθηκε ως αλλοιωμένος σε περισσότερες από μία μελέτες των επιστημονικών κοινοτήτων. Μπορεί οι τριακυλογλυκερόλες να μην αντανακλούν την αυτοάνοση απόκριση με τον ίδιο τρόπο όπως οι φωσφατιδυλοχολίνες. Αντίθετα, οι τριακυλογλυκερόλες μπορεί να ανταποκριθούν στη μείωση του ελέγχου της γλυκόζης που προκαλείται από τον θάνατο των β-κυττάρων, ο οποίος μπορεί να είναι ήδη σε εξέλιξη, αν και δεν είναι ανιχνεύσιμος με κλινική σημασία (Gurgul-Convey, 2020).

Η αξιολόγηση του λιπιδωμικού προφίλ είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί προηγμένες τεχνικές, όπως η φασματομετρία μάζας. Η ερμηνεία των δεδομένων είναι δύσκολη λόγω της ποικιλομορφίας και της πολυπλοκότητας των λιπιδίων. Παράγοντες όπως η διατροφή, τα φάρμακα και οι συννοσηρότητες μπορεί να επηρεάσουν τα επίπεδα

των λιπιδίων. Απαιτούνται μελέτες επικύρωσης μεγάλης κλίμακας για να επιβεβαιωθεί η κλινική χρησιμότητα των βιοδεικτών λιπιδίων που ανιχνεύονται (Ni et al., 2023).

Μεταβολίτες της Οδού Τρυπτοφάνης-Κυνουρενίνης

Η οδός τρυπτοφάνης-κυνουρενίνης εμπλέκεται στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και έχει ενοχοποιηθεί στην παθογένεση του διαβήτη. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχει προκύψει μια θεωρία ότι ο μεταβολισμός της TRP μέσω της KP εμπλέκεται στον έλεγχο των ανοσολογικών αποκρίσεων, για να κρατήσει υπό έλεγχο την αυτοανοσία. Το TRP είναι ένα απαραίτητο αμινοξύ κρίσιμο για τη σύνθεση πρωτεϊνών και τη δημιουργία αρκετών βιοδραστικών ενώσεων με σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η σεροτονίνη, η τρυπταμίνη, οι ινδόλες, οι κυνουρενίνες και το δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NAD⁺). Οι άνθρωποι δεν διαθέτουν τις βιοχημικές οδούς για να συνθέσουν το TRP, το οποίο πρέπει να συλλέγεται από τη διατροφή. Μετά την απορρόφηση της TRP μέσω των εντεροκυττάρων στο έντερο, μεταφέρεται από το ηπατικό πυλαίο σύστημα στο ήπαρ, όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πρωτεϊνών. Η εξωηπατική KP παραμένει υπό τον έλεγχο δύο διακριτών ενζύμων IDO: IDO1 και IDO2, οι δραστηριότητες των οποίων μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους (Krupa and Kowalska, 2021).

Γενικά, το IDO1 αναγνωρίζεται ως ρυθμιστής της ανοσίας, καθώς δεν μόνο παράγει ανοσορυθμιστικές κυνουρενίνες, αλλά δρα επίσης ως μόριο μεταβίβασης σήματος, προάγοντας την ανοσοανοχή σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, η φλεγμονώδης κατάσταση που χαρακτηρίζει την προκλινική φάση του διαβήτη μπορεί να επηρεάσει την έκφραση και τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης IDO1, μειώνοντας το ρόλο της στην ανοσολογική ανοχή στο πάγκρεας. Ύστερα από πολλές κλινικές μελέτες παρατηρήθηκε πως κατά τη φάση του προδιαβήτη η IFN- γ αποτυγχάνει να προκαλέσει ανεκτικές ιδιότητες στα δενδριτικά της κύτταρα. Αυτή η επίδραση συσχετίστηκε με χαμηλή δραστηριότητα IDO1 και μειωμένο καταβολισμό TRP από παροδικό αποκλεισμό της οδού STAT1 της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης από την IFN- γ , που προκαλείται από την παραγωγή υπεροξεινιτρώδους (Krupa and Kowalska, 2021).

Τα επίπεδα των μεταβολιτών στην οδό τρυπτοφάνης-κινουρενίνης μπορεί να επηρεαστούν από πολλούς παράγοντες, όπως η διατροφή, τα φάρμακα και οι συννοσηρότητες, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα στα αποτελέσματα. Η σχέση μεταξύ αυτών των μεταβολιτών και του διαβήτη είναι πολύπλοκη και απαιτεί περαιτέρω έρευνα για την καθορισμό τυποποιημένων εύρων αναφοράς και την επιβεβαίωση της κλινικής τους χρησιμότητας. Επιπλέον, οι μεταβολίτες στην οδό τρυπτοφάνης-κινουρενίνης δεν είναι ειδικοί για την νόσο και μπορεί να αλλοιωθούν σε άλλες ανοσοποιητικές και φλεγμονώδεις νόσους (Krupa and Kowalska, 2021).

Κατηγορία	Βιοδείκτες	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Καθιερωμένοι Βιοδείκτες	ICA IAA GADAs IA-2 C-πεπτίδιο HbA1c FSG	→ Καλά τεκμηριωμένοι και χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πρακτική → Ειδικοί για την αυτοανοσία στον T1DM	→ Μπορούν να ανιχνευθούν μόνο μετά την εμφάνιση της αυτοανοσολογικής αντίδρασης → Δεν ανιχνεύουν πρόωρα στάδια της νόσου
Πρωτεομικοί Βιοδείκτες	ZnT8 Συμπλήρωμα Απολιποπρωτεΐνες	→ Παρέχουν πληροφορίες για τη διαδικασία της αυτοανοσίας → Μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση των μηχανισμών της νόσου	→ Απαιτούν προηγμένη τεχνολογία και εξειδίκευση → Ενδέχεται να επηρεάζονται από άλλους παράγοντες
Μεταβολομικές Βιοδείκτες	BCAAs Σώματα Κετόνης SCFAs Λιπιδωμική Μεταβολίτες της οδού τρυπτοφάνης-κινολίνης	→ Παρέχουν πληροφορίες για τις μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με τον T1DM → Μπορούν να ανιχνευθούν με μη επεμβατικές μεθόδους (αίμα, ούρα) → Μπορούν να εντοπίσουν πρώιμες μεταβολικές αλλαγές	→ Επηρεάζονται από διατροφικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες → Απαιτούν προηγμένη τεχνολογία και εξειδίκευση → Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι πολύπλοκη

Πίνακας 4: Σύνοψη βιοδεικτών στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου.

Κεφάλαιο 11. Η εξέλιξη των βιοδεικτών στη Ρευματοειδής Αρθρίτιδα

Υποενότητα 11.1 Παραδοσιακοί βιοδείκτες της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας Ρευματοειδής Παράγοντας (RF)

Ο ρευματοειδής παράγοντας (RF) περιλαμβάνει αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν την κρυσταλλοποιημένη περιοχή του θραύσματος του IgG και αντιπροσωπεύουν τους πρώτους βιοδείκτες που ανιχνεύονται στη RA. Η RF περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1940 από τον Waaler, ως παράγοντας με αιμοσυγκολλητική δράση στον ορό ενός ασθενούς με RA. Οι περισσότερες από τις RF είναι του ισότυπου IgM και έχουν θεωρηθεί ως βιοδείκτης που

αποκάλυψε πως η RA μπορεί να είναι μια αυτοάνοση νόσος που προκαλείται από αυτοαντιδρώντα αντισώματα. Αρκετές μελέτες έχουν υποδείξει ότι μια συνδυασμένη αύξηση της IgM RF και IgA RF εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με RA. Επιπρόσθετα, η RF συνδέεται με μακροχρόνια φλεγμονή. Επομένως, μπορεί να έχει υψηλότερη τιμή εάν το άτομο πάσχει από RA, που είναι μια φλεγμονώδης κατάσταση. Αν και αυτό το αυτοαντίσωμα δεν προκαλεί άμεσα αρθρίτιδα, συμμετέχει στην αύξηση της φλεγμονής εάν υπάρχουν βλάβες στις αρθρώσεις. Η RF βρίσκεται στο αίμα του 70% έως 80% των ατόμων με RA (Motta et al., 2023).

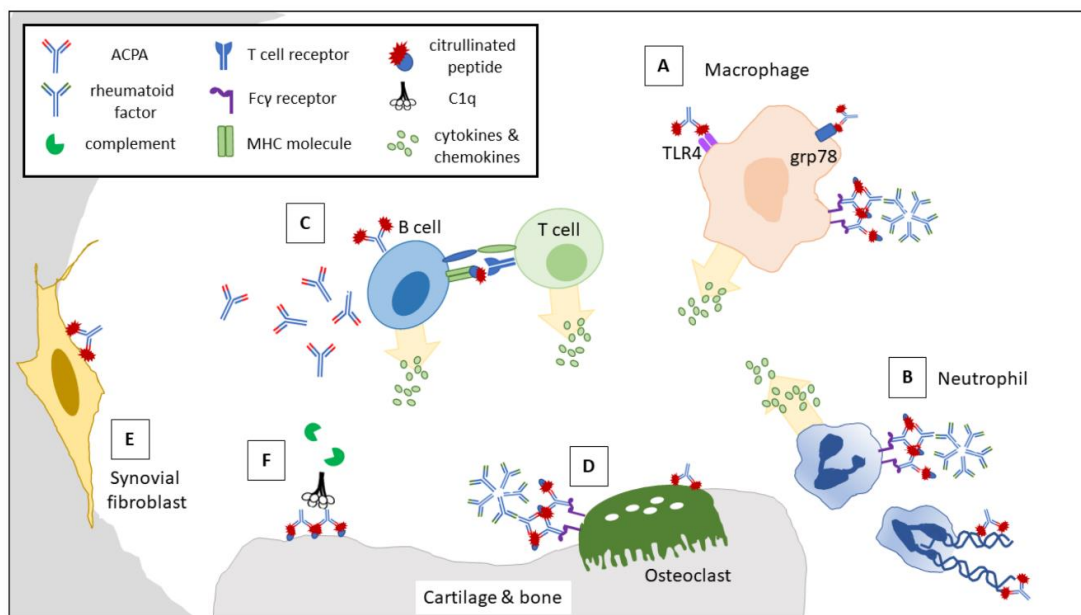
Αν και τα κλασικά RFs συνδέονται με το τμήμα Fc του IgG, αυτοαντισώματα που στρέφονται κατά του τμήματος F(ab) του μορίου έχουν επίσης περιγραφεί και εμφανίζονται επίσης σε ασθενείς με αυτοάνοσα και μολυσματικά νοσήματα. Ομοίως με τα RFs, η ανοσολογική απόκριση έναντι αυτού του τμήματος του μορίου Ig δεν είναι ειδική για τη νόσο. Επίσης, ο ρευματοειδής παράγοντας δεν παρατηρείται σε όλους τους ασθενείς που πάσχουν από την νόσο. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί και η ύπαρξη τέτοιων αντισωμάτων και σε υγιή φυσιολογικά άτομα χωρίς κανένα σύμπτωμα της νόσου (Motta et al., 2023).

Αντισώματα κατά της κιτρουλινωμένης πρωτεΐνης (ACPAs)

Τα αντισώματα κατά της κιτρουλινωμένης πρωτεΐνης (ACPAs) είναι μια σημαντική παράμετρος που βοηθά τους ρευματολόγους να θέσουν μια διάγνωση πρώιμης RA και να ξεκινήσουν την αρχική θεραπεία. Δεδομένου ότι η φλεγμονή διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της RA, έχει προταθεί και αποδειχθεί ότι το ACPA μπορεί να ενεργοποιήσει τα ανοσοκύτταρα και να ρυθμίσει προς τα πάνω την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Τα ACPA, σε σύγκριση με το κλασικό και πολύ γνωστό RF αντισώματος RA, ανιχνεύονται περίπου στα δύο τρίτα των ασθενών με RA, με εξαιρετική διαγνωστική εξειδίκευση έως και 90%. Τα ACPA στρέφονται κατά των υπολειμμάτων κιτρουλίνης σε πρωτεΐνες ή πεπτίδια. Η κιτρουλίωση είναι μια μη αναστρέψιμη μετα-μεταφραστική τροποποίηση αργινίνης που προκαλείται από ένζυμα που ονομάζονται πεπτιδυλοαργινινικές αμινάσες. Κατά συνέπεια, πολλές κιτρουλινωμένες πρωτεΐνες (ινωδογόνο, α-ενολάση,

βιμεντίνη και κολλαγόνο τύπου II) έχει αποδειχθεί ότι αναγνωρίζονται από το ACPA (Wu, Yang and Lai, 2020).

Παρόλο που τα ACPAs είναι πιο ειδικά για την νόσο, η μέτρηση τους είναι πολύπλοκη, με μεγαλύτερο κόστος και εξειδίκευση σε σχέση με την μέτρηση της RF. Επιπρόσθετα, τα αντισώματα αυτά μπορούν να εμφανιστούν και σε ένα μικρό ποσοστό υγιών ατόμων και σε ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα ρευματοειδή σύνδρομα. Συνεπώς, ακόμη και η μεγαλύτερη ειδίκευση του βιοδείκτη για την νόσο δεν περιορίζει την πιθανότητα να προκύψουν ψευδή αποτελέσματα κατά την διάρκεια των μετρήσεων με συνέπεια να υπάρχει πάντα αμφισβήτηση στην διάγνωση με αυτό τον βιοδείκτη (Wu, Yang and Lai, 2020).



Εικόνα 10: Μηχανισμός ACPA. Πηγή: Wu, C.-Y., Yang, H.-Y. and Lai, J.-H. 2020. Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Patients with Rheumatoid Arthritis: Biological Effects and Mechanisms of Immunopathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 21(11), p. 4015. doi: 10.3390/ijms21114015. 20/06/2024

Υποενότητα 11.2 Πρωτεομικοί Βιοδείκτες της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Καθώς οι παραπάνω βιοδείκτες αντιμετωπίζουν σοβαρές δυσκολίες οι επιστημονική κοινότητα μελέτησε διάφορους βιοδείκτες από την πρωτεομική.

S100 A8 / A9

Το S100 A8 / A9, που αναφέρεται επίσης ως καλπροτεκτίνη ή MRP8/14, είναι μια μικρή πρωτεΐνη που δεσμεύει ασβέστιο, που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων, των ενεργοποιημένων μακροφάγων, των κερατινοκυττάρων, των επιθηλιακών κυττάρων και των οστεοκλαστών. Το S100A8/A9 ασκεί διάφορες ενδοκυτταρικές λειτουργίες, αλλά κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και της βλάβης των ιστών, απελευθερώνεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον και ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα. Πολλές μελέτες υποδηλώνουν τη σημασία του S100A8/A9 τόσο σε πειραματικούς ασθενείς με αρθρίτιδα όσο και σε ασθενείς με RA. Τα επίπεδα πρωτεΐνης S100A8/A9 είναι αυξημένα στον αρθρικό υμένα, στο αρθρικό υγρό και στον ορό ή στο πλάσμα ασθενών με RA και συσχετίζονται με τη δραστηριότητα της νόσου. Ειδικότερα, το S100A8/A9 μπορεί να προκαλέσει διάβρωση των οστών στην αρθρίτιδα μέσω της πρόκλησης φλεγμονής. Το S100A8/A9 διεγείρει την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα T κύτταρα και αυξάνει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών και MMPs από μονοκύτταρα και μακροφάγα (Di Ceglie et al., 2019).

Αδιπονεκτίνη

Η ανθρώπινη αδιπονεκτίνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο ADIPOQ, είναι ένα εκκριτικό προϊόν, κυρίως λευκών λιποκυττάρων, και ένα από βιοενεργά πεπτίδια ή πρωτεΐνες, ανοσομόρια ή φλεγμονώδεις μεσολαβητές, με διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες. Η έκφραση της αδιπονεκτίνης εντοπίστηκε επίσης σε οστεοβλάστες, κύτταρα ηπατικού παρεγχύματος, μυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και πλακούντα. Μαζί με άλλα μέλη της οικογένειας των αδιποκινών, η αδιπονεκτίνη παίζει κρίσιμο ρόλο σε αρκετές σημαντικές διαταραχές, όπως η ευαισθησία στην ινσουλίνη, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι καταστάσεις αρθρίτιδας και η παχυσαρκία (Szumilas et al., 2020).

Η αδιπονεκτίνη αποτελεί μια εκκριτική πρωτεΐνη λιποκυττάρων 28–30 kDa και περιλαμβάνει μια ινώδη υπομονάδα στο αμινοτελικό άκρο και μια σφαιρική υπομονάδα στο καρβοξυλικό άκρο. Ανήκει στην υπεροικογένεια του διαλυτού κολλαγόνου και είναι ομόλογο με τον συμπληρωματικό παράγοντα C1q και του TNF. Οι συστηματικές αυτοάνοσες και χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις των αρθρώσεων χαρακτηρίζονται από αυξημένη

παραγωγή αδιποκινών και υψηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης στο πλάσμα και στο αρθρικό υγρό. Αρκετές μελέτες υπογραμμίζουν ότι η αδιπονεκτίνη μπορεί να παίζει σημαντικό προφλεγμονώδη ρόλο στην παθογένεση της RA, ιδιαίτερα στις αρθρώσεις, μέσω της διέγερσης της έκκρισης φλεγμονωδών μεσολαβητών, μεταξύ άλλων, από ενεργοποιημένους αρθρικούς ινοβλάστες που εξέφραζαν υποδοχείς αδιπονεκτίνης. Μια *in vitro* μελέτη με καλλιιεργημένους αρθρικούς ινοβλάστες ρευματοειδούς αρθρίτιδας αποκάλυψε ότι οι ινοβλάστες ανταποκρίνονται στην αδιπονεκτίνη αυξάνοντας τους προφλεγμονώδεις παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των προσταγλανδινών E2, IL-6, IL-8 και τις MMPs-1, -13 (Szumilas et al., 2020).

Πολλοί περιορισμοί εμποδίζουν την κλινική χρησιμότητα της αδιπονεκτίνης, με έναν σημαντικό περιορισμό να είναι η έλλειψη εξειδίκευσης της. Τα επίπεδα αδιπονεκτίνης μπορεί να επηρεαστούν από πολλές καταστάσεις εκτός από τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και άλλες φλεγμονώδεις διαταραχές. Αυτό μπορεί να δυσκολέψει την ερμηνεία των επιπέδων αδιπονεκτίνης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, καθιστώντας δύσκολη τη διάκριση της φλεγμονής που σχετίζεται με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα από άλλα προβλήματα υγείας. Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί και η μεταβλητότητα στα επίπεδα της αδιπονεκτίνης λόγω παραγόντων όπως η ηλικία, το φύλο και το γενετικό υπόβαθρο. Η σχέση των επιπέδων αδιπονεκτίνης με τη νόσο RA είναι πολύπλοκη και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, καθώς ορισμένες μελέτες υποδηλώνουν αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την προγνωστική της αξία (Szumilas et al., 2020).

Υποενότητα 11.3 Μεταβολομικοί Βιοδείκτες της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα μελετήθηκε και σε επίπεδο μεταβολόματος με σημαντικά ευρήματα στον τομέα της ενέργειας του κυττάρου.

Γλυκόζη

Στους φυσιολογικούς αρθρικούς ιστούς, η γλυκόλυση είναι η κύρια οδός που προάγει την οξείδωση του πυροσταφυλικού άλατος στο μιτοχονδριακό υπόστρωμα. Τα επίπεδα

δραστηριότητας της 3-φωσφορικής αφυδρογονάσης γλυκεραλδεΐδης και της γαλακτικής αφυδρογονάσης, των κύριων ενζύμων της γλυκολυτικής οδού, είναι αυξημένα στα αρθρικά κύτταρα της RA. Κατά συνέπεια, οι συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος είναι υψηλές και οι συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι σαφώς χαμηλές στην φλεγμονώδη άρθρωση. Οι αρθρικοί ινοβλάστες είναι βασικά τελεστικά κύτταρα στα τελικά στάδια της RA και βρίσκονται υπό σημαντικό μεταβολικό στρες, προκαλώντας ανταγωνισμό για πηγές ενέργειας (Qiu et al., 2021).

Αντίστοιχα, τα CD4 + T κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενή με RA παρουσιάζουν μειωμένη γλυκολυτική δραστηριότητα. Προτού αυτά τα CD4 + T κύτταρα γίνουν παθολογικά T κύτταρα μνήμης, χρησιμοποιούν τη γλυκόζη με έναν σαφώς διαφορετικό τρόπο από τα CD4 + T κύτταρα από υγιή άτομα. Ειδικότερα, αποφεύγουν τη γλυκολυτική διάσπαση σε γαλακτικό και αντ' αυτού εκτρέπουν τη γλυκόζη στην οδό της φωσφορικής πεντόζης, οδηγώντας τη συσσώρευση του NADPH και κατανάλωση κυτταρικών ενεργών ειδών οξυγόνου. Με περίσσεια αναγωγικών ισοδυνάμων, τα T κύτταρα δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν τις σχετικές οξειδοαναγωγικές κινάσες, γεγονός που τους επιτρέπει να παρακάμψουν τα ρυθμιστικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου G2/M και να εισέλθουν σε απεριόριστο πολλαπλασιασμό (Qiu et al., 2021).

Συμπεράσματα

Η εξέλιξη στον τομέα της βιοχημείας πρόσφερε στους ερευνητές την δυνατότητα να ερευνήσουν τους τομείς της πρωτεομικής και της μεταβολομικής για την αναζητήσουν νέους βιοδείκτες, οι οποίοι εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία των αντίστοιχων νοσημάτων και μπορούν να προσφέρουν ασφαλή και γρήγορα συμπεράσματα. Για να γίνει ωστόσο αυτό, δεκαετίες ερευνών των αιτιολογικών μηχανισμών και των μεταβολών στην κυτταρική δραστηριότητα πραγματοποιήθηκαν μέχρι ότου αποκρυπτογραφήθηκαν τα βασικά μονοπάτια για την πρόκληση των αντίστοιχων νοσημάτων.

Μέχρι τώρα, οι υφιστάμενοι βιοδείκτες των αυτοάνοσων νοσημάτων βασίζονταν σε εξειδικευμένες ανοσολογικές εξετάσεις, οι οποίες στην πλειονότητα των περιπτώσεων χρειάζονται χρόνο για να πραγματοποιηθούν και ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα

μετά την εμφάνιση της νόσου για να καθιστούν ανιχνεύσιμοι και να γίνει σωστή διάγνωση. Αναγνωρίζοντας το πρόβλημα αυτό, οι ερευνητές αναζήτησαν μόρια, τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό των νοσημάτων αυτών και μπορούν να προσφέρουν ανιχνεύσιμες τιμές σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Με αυτόν τον τρόπο, ακόμα και πριν την εμφάνιση των πρώιμων συμπτωμάτων θα μπορούσε να χαρακτηριστεί η νόσος και να ακολουθηθεί η κατάλληλη θεραπεία με συνέπεια την καλύτερη αντιμετώπισή της.

Στην Αξονική Σπονδυλοαρθίτιδα οι πρωτεομικές μελέτες έχουν εντοπίσει αρκετές πρωτεΐνες που σχετίζονται με φλεγμονή και τις ανοσολογικές αποκρίσεις που την χαρακτηρίζουν. Αυτές οι ανακαλύψεις έχουν προσφέρει νέες πληροφορίες σχετικά με την παθοφυσιολογία της νόσου, βοηθώντας τους κλινικούς ιατρούς να στοχεύσουν πιο εξειδικευμένα με τα κατάλληλα θεραπευτικά σχήματα. Από την άλλη, οι μεταβολομικές αναλύσεις έχουν επισημάνει αλλαγές στα μεταβολικά μονοπάτια, όπως αλλαγές στον μεταβολισμό των λιπιδίων, που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως νέοι βιοδείκτες για τη δραστηριότητα και την εξέλιξη της νόσου.

Ταυτόχρονα, στην περίπτωση του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου, η πρωτεομική έχει ανακαλύψει πολλές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την απόπτωση, οι οποίες εκφράζονται με ποικίλη εκφραστικότητα στους ασθενείς. Αυτά τα ευρήματα έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό πιθανών βιοδεικτών που θα μπορούσαν να βελτιώσουν τη διαγνωστική ακρίβεια και τη διαχείριση των ασθενών. Μελέτες μεταβολισμού έχουν αποκαλύψει σημαντικές αλλαγές στον μεταβολισμό των αμινοξέων και των λιπιδίων, παρέχοντας επιπλέον βιοδείκτες που αντικατοπτρίζουν τη δραστηριότητα της νόσου και τη συμμετοχή των οργάνων.

Στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I, οι πρωτεομικές προσεγγίσεις έχουν ταυτοποιήσει αυτοαντισώματα και πρωτεϊνικά σύμπλοκα που σχετίζονται με την καταστροφή των παγκρεατικών β – κυττάρων και τις ανοσολογικές αποκρίσεις που ακολούθως επίκεινται. Αυτοί οι βιοδείκτες μπορούν να προβλέψουν την έναρξη της νόσου και να προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη της. Από την άλλη, οι μεταβολομικές μελέτες έχουν ερμηνεύσει αλλαγές στους μεταβολίτες που σχετίζονται με τον ενεργειακό μεταβολισμό, όπως

αλλαγές στα προφίλ γλυκόζης και λιπιδίων, όπου μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρόσθετοι δείκτες για την παρακολούθηση της νόσου και τη θεραπευτική ανταπόκριση.

Στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα οι πρωτεομικοί βιοδείκτες προσφέρουν μια βαθύτερη κατανόηση της παθογένεσης της νόσου με τον εντοπισμό πρωτεϊνών και οδών ειδικών για την ασθένεια. Αυτοί οι βιοδείκτες μπορούν ενδεχομένως να βελτιώσουν τη διαγνωστική ακρίβεια και τις εξατομικευμένες στρατηγικές θεραπείας. Από την άλλη, η μεταβολομική μπορεί να αποκαλύψει αλλαγές στα μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη δραστηριότητα και την εξέλιξη της νόσου, προσφέροντας νέα μονοπάτια για την ανακάλυψη βιοδεικτών.

Το μέλλον της έρευνας των βιοδεικτών στις παραπάνω αυτοάνοσες παθήσεις έγκειται στην ενσωμάτωση της πρωτεϊνικής και της μεταβολομικής με παραδοσιακές προσεγγίσεις για την ανάπτυξη ολοκληρωμένων ομάδων βιοδεικτών. Οι ομάδες αυτές θα μπορούσαν να βελτιώσουν τη διαγνωστική ακρίβεια, τη διαστρωμάτωση των ασθενών και τις εξατομικευμένες στρατηγικές θεραπείας.

Στην Αξονική Σπονδυλοαρθρίτιδα, η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στην αναζήτηση πρωτεομικών και μεταβολομικών βιοδεικτών με μεγαλύτερη ειδικότητα για την νόσο και στην ενσωμάτωσή τους με απεικονιστικά και κλινικά δεδομένα για την ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων για την πρόοδο της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Παράλληλα, στον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο ο συνδυασμός πρωτεομικών και μεταβολομικών βιοδεικτών με γενετικά και κλινικά δεδομένα θα μπορούσε να βελτιώσει την κατανόηση της ετερογένειας της νόσου και να οδηγήσει σε εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει επίσης, να διερευνήσουν τον ρόλο αυτών των βιοδεικτών στην πρόβλεψη εξάρσεων και μακροπρόθεσμων αποτελεσμάτων.

Ταυτόχρονα, στο Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου Ι η εξελισσόμενη έρευνα θα πρέπει να στοχεύσει στον εντοπισμό βιοδεικτών που προβλέπουν την πιο πρώιμο έναρξη της νόσου με μεγαλύτερη ακρίβεια. Ο συνδυασμός πρωτεομικών και μεταβολομικών δεδομένων με γενετικές πληροφορίες θα μπορούσε να βελτιώσει την αξιολόγηση κινδύνου και να οδηγήσει σε στοχευμένες παρεμβάσεις για τη διατήρηση της λειτουργίας των β-

κυττάρων. Τέλος, όσο αναφορά την Ρευματοειδή Αρθρίτιδα η επιστημονική κοινότητα θα πρέπει να διερευνήσει περισσότερους εξειδικευμένους βιοδείκτες από τους τομείς της πρωτεομικής και της μεταβολομικής για να επιτύχει καλύτερα διαγνωστικά αποτελέσματα. Για να καταστεί αυτό δυνατό, είναι αναγκαίο να διερευνηθεί εις βάθος η αιτιοπαθογένεια της νόσου και να βρεθούν νέα μόρια που μπορούν να διαγιγνώσκουν τη νόσο σε πρώιμα στάδια.

Συμπερασματικά, η ενσωμάτωση της πρωτεομικής και της μεταβολομικής με τους παραδοσιακούς βιοδείκτες αποτελεί ένα επιστημονικό πεδίο ταχέως εξελισσόμενο. Παρόλο που οι ερευνητικές μελέτες βρίσκονται ακόμη σε πολύ αρχικά στάδια, τα υπάρχοντα κλινικά ευρήματα καταδεικνύουν πως οι γνώσεις που έχουν ήδη αποκομίσει οι ερευνητές από χιλιετίες ερευνών πάνω στα νοσήματα αυτά, σε συνδυασμό με τα νέα δεδομένα, αποτελούν ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για την αποσαφήνιση των αυτοάνοσων νοσημάτων. Ακόμη και αν τα νοσήματα αυτά είναι ιδιοπαθή και μερικές φορές δύσκολα αναγνωρίσιμα, οι βιοδείκτες που προέρχονται από τα πεδία της πρωτεομικής και της μεταβολομικής παρέχουν την δυνατότητα να αναγνωριστούν μεταβολικά και πρωτεϊνικά προϊόντα, τα οποία αποτελούν μοναδικά και εύκολα αναγνωρίσιμα στοιχεία κάθε νοσήματος. Καθώς η μελέτη των αυτοάνοσων νοσημάτων συνεχίζει ακόμη και σήμερα να υφίσταται, καθημερινά θα προκύπτουν και νέοι βιοδείκτες, οι οποίοι θα είναι πιο εξειδικευμένοι και θα παρέχουν πιο γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα στη διάγνωση.

Βιβλιογραφία

- Abulaban, K.M. and Brunner, H.I. 2015. Biomarkers for Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Current Rheumatology Reports* 17(1). doi: 10.1007/s11926-014-0471-2.
- Achenbach, P. et al. 2004. Stratification of Type 1 Diabetes Risk on the Basis of Islet Auto-antibody Characteristics. *Diabetes* 53(2), pp. 384–392. doi: 10.2337/diabetes.53.2.384.
- Arriens, C., Wren, J.D., Munroe, M.E. and Mohan, C. 2016. Systemic lupus erythematosus biomarkers: the challenging quest. *Rheumatology*, p. kew407. doi: 10.1093/rheumatology/kew407.
- Arriens, C., Wren, J.D., Munroe, M.E. and Mohan, C. 2017. Systemic lupus erythematosus biomarkers: the challenging quest. *Rheumatology (Oxford, England)* 56(1), pp. i32–i45. doi: 10.1093/rheumatology/kew407.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M.A., Khurshid, M. and Rasool, M.H. 2017a. Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science* 55(2), pp. 182–196. doi: 10.1093/chromsci/bmw167.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M.A., Khurshid, M. and Rasool, M.H. 2017b. Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science* 55(2), pp. 182–196. doi: 10.1093/chromsci/bmw167.
- Ayano, M. and Horiuchi, T. 2023. Complement as a Biomarker for Systemic Lupus Erythematosus. *Biomolecules* 13(2), p. 367. doi: 10.3390/biom13020367.
- van Beers, J.J.B.C. and Schreurs, M.W.J. 2022. Anti-Sm antibodies in the classification criteria of systemic lupus erythematosus. *Journal of Translational Autoimmunity* 5, p. 100155. doi: 10.1016/j.jtauto.2022.100155.
- Bell, K.J. et al. 2022. Metabolite-based dietary supplementation in human type 1 diabetes is associated with microbiota and immune modulation. *Microbiome* 10(1), p. 9. doi: 10.1186/s40168-021-01193-9.
- van Belle, T.L., Coppieters, K.T. and von Herrath, M.G. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews* 91(1), pp. 79–118. doi: 10.1152/physrev.00003.2010.
- Bossuyt, X., De Langhe, E., Borghi, M.O. and Meroni, P.L. 2020. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 16(12), pp. 715–726. doi: 10.1038/s41584-020-00522-w.
- Brown, M.A., Li, Z. and Cao, K.A.L. 2020a. Biomarker development for axial spondyloarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 16(8), pp. 448–463. doi: 10.1038/s41584-020-0450-0.

Brown, M.A., Li, Z. and Cao, K.-A.L. 2020b. Biomarker development for axial spondyloarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 16(8), pp. 448–463. doi: 10.1038/s41584-020-0450-0.

Caielli, S., Wan, Z. and Pascual, V. 2023. Systemic Lupus Erythematosus Pathogenesis: Interferon and Beyond. *Annual Review of Immunology* 41(1), pp. 533–560. doi: 10.1146/annurev-immunol-101921-042422.

Di Ceglie, I., Kruisbergen, N.N.L., van den Bosch, M.H.J. and van Lent, P.L.E.M. 2019. Fc-gamma receptors and S100A8/A9 cause bone erosion during rheumatoid arthritis. Do they act as partners in crime? *Rheumatology* 58(8), pp. 1331–1343. doi: 10.1093/rheumatology/kez218.

Charoenngam, N. and Holick, M.F. 2020. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients* 12(7). doi: 10.3390/nu12072097.

Cush, J.J. 2022. Rheumatoid Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 48(2), pp. 537–547. doi: 10.1016/j.rdc.2022.02.010.

Dariya, B., Chalikonda, G., Srivani, G., Alam, A. and Nagaraju, G.P. 2019. Pathophysiology, Etiology, Epidemiology of Type 1 Diabetes and Computational Approaches for Immune Targets and Therapy. *Critical reviews in immunology* 39(4), pp. 239–265. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2019033126.

Decochez, K. et al. 2005. Combined positivity for HLA DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia* 48(4), pp. 687–694. doi: 10.1007/s00125-005-1702-x.

Diaconu, A.D., Ceasovschih, A., Şorodoc, V., Pomîrleanu, C., Lionte, C., Şorodoc, L. and Anuşă, C. 2022. Practical Significance of Biomarkers in Axial Spondyloarthritis: Updates on Diagnosis, Disease Activity, and Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences* 23(19). doi: 10.3390/ijms231911561.

Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2014. *Diabetes Care* 37(Supplement_1), pp. S81–S90. doi: 10.2337/dc14-S081.

DiMeglio, L.A., Evans-Molina, C. and Oram, R.A. 2018. Type 1 diabetes. *The Lancet* 391(10138), pp. 2449–2462. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.

Dinse, G.E. et al. 2022. Increasing Prevalence of Antinuclear Antibodies in the United States. *Arthritis & Rheumatology* 74(12), pp. 2032–2041. doi: <https://doi.org/10.1002/art.42330>.

Fenton, K.A. and Pedersen, H.L. 2023. Advanced methods and novel biomarkers in autoimmune diseases - a review of the recent years progress in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Medicine* 10. doi: 10.3389/fmed.2023.1183535.

- Galderisi, A., Carr, A.L.J., Martino, M., Taylor, P., Senior, P. and Dayan, C. 2023. Quantifying beta cell function in the preclinical stages of type 1 diabetes. *Diabetologia* 66(12), pp. 2189–2199. doi: 10.1007/s00125-023-06011-5.
- Garcia-Bonilla, L. et al. 2016. Spatio-temporal profile, phenotypic diversity, and fate of recruited monocytes into the post-ischemic brain. *Journal of neuroinflammation* 13(1), p. 285. doi: 10.1186/s12974-016-0750-0.
- Gurgul-Convey, E. 2020. Sphingolipids in Type 1 Diabetes: Focus on Beta-Cells. *Cells* 9(8), p. 1835. doi: 10.3390/cells9081835.
- Haider, M.Z., Rasoul, M.A., Al-Mahdi, M., Al-Kandari, H. and Dhaunsi, G.S. 2018. Association of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 gene functional variant C1858T, HLA-DQ/DR genotypes and autoantibodies with susceptibility to type-1 diabetes mellitus in Kuwaiti Arabs. *PloS one* 13(6), p. e0198652. doi: 10.1371/journal.pone.0198652.
- Harroud, A. and Hafler, D.A. 2023. Common genetic factors among autoimmune diseases. *Science* 380(6644), pp. 485–490. doi: 10.1126/science.adg2992.
- Huang, Q., Du, J., Merriman, C. and Gong, Z. 2019. Genetic, Functional, and Immunological Study of ZnT8 in Diabetes. *International Journal of Endocrinology* 2019, pp. 1–11. doi: 10.1155/2019/1524905.
- Huang, S. et al. 2014. Valproate pretreatment protects pancreatic β -cells from palmitate-induced ER stress and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3 β . *Journal of biomedical science* 21(1), p. 38. doi: 10.1186/1423-0127-21-38.
- Huang, T., Pu, Y., Wang, X., Li, Y., Yang, H., Luo, Y. and Liu, Y. 2022. Metabolomic analysis in spondyloarthritis: A systematic review. *Frontiers in Microbiology* 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.965709.
- Ilonen, J., Lempainen, J. and Veijola, R. 2019. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology* 15(11), pp. 635–650. doi: 10.1038/s41574-019-0254-y.
- Jang, S., Kwon, E.-J. and Lee, J.J. 2022. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 23(2), p. 905. doi: 10.3390/ijms23020905.
- Kanatsuna, N., Papadopoulos, G.K., Moustakas, A.K. and Lenmark, A. 2012. Etiopathogenesis of insulin autoimmunity. *Anatomy research international* 2012, p. 457546. doi: 10.1155/2012/457546.
- Kaul, A. et al. 2016. Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Disease Primers* 2(1), p. 16039. doi: 10.1038/nrdp.2016.39.

- Kawasaki, E. 2023. Anti-Islet Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *International journal of molecular sciences* 24(12). doi: 10.3390/ijms241210012.
- Khoshroo, M., Khamseh, M.E., Amir Zargar, A.A., Malek, M., Falak, R. and Shekarabi, M. 2017. The Relationship between insulin variable number of tandem repeats (INS-VNTR) - 23 A/T and cytotoxic T lymphocyte associated protein-4 (CTLA-4) +49 A/G polymorphisms with islet autoantibodies in persons with diabetes. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran* 31, p. 83. doi: 10.18869/mjiri.31.83.
- Kim, C.H. 2021. Control of lymphocyte functions by gut microbiota-derived short-chain fatty acids. *Cellular & Molecular Immunology* 18(5), pp. 1161–1171. doi: 10.1038/s41423-020-00625-0.
- Krupa, A. and Kowalska, I. 2021. The Kynurenine Pathway—New Linkage between Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Endocrinopathies. *International Journal of Molecular Sciences* 22(18), p. 9879. doi: 10.3390/ijms22189879.
- Leighton, E., Sainsbury, C.A. and Jones, G.C. 2017. A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes. *Diabetes Therapy* 8(3), pp. 475–487. doi: 10.1007/s13300-017-0265-4.
- Li, Y. et al. 2022. Combined proteomics and single cell RNA-sequencing analysis to identify biomarkers of disease diagnosis and disease exacerbation for systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology* 13(November), pp. 1–19. doi: 10.3389/fimmu.2022.969509.
- Li, Y. et al. 2023. Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8(1), p. 152. doi: 10.1038/s41392-023-01400-z.
- Little, R.R., Rohlfing, C. and Sacks, D.B. 2019. The National Glycohemoglobin Standardization Program: Over 20 Years of Improving Hemoglobin A1c Measurement. *Clinical Chemistry* 65(7), pp. 839–848. doi: 10.1373/clinchem.2018.296962.
- Liu, W., Zhang, S. and Wang, J. 2022. IFN- γ , should not be ignored in SLE. *Frontiers in Immunology* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.954706.
- Lizzo, J.M., Goyal, A. and Gupta, V. 2024. *Adult Diabetic Ketoacidosis*.
- Łuczyński, W., Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Szypowska, A., Iłendo, E., Bossowski, A., Krętowski, A. and Stasiak-Barmuta, A. 2012. Generation of T regulatory cells in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 120(2), pp. 101–9. doi: 10.1055/s-0031-1284432.
- Maahs, D.M., West, N.A., Lawrence, J.M. and Mayer-Davis, E.J. 2010. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 39(3), pp. 481–97. doi: 10.1016/j.ecl.2010.05.011.

- Maksymowych, W.P. 2019a. Biomarkers for diagnosis of axial spondyloarthritis, disease activity, prognosis, and prediction of response to therapy. *Frontiers in Immunology* 10(MAR), pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2019.00305.
- Maksymowych, W.P. 2019b. The role of imaging in the diagnosis and management of axial spondyloarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 15(11), pp. 657–672. doi: 10.1038/s41584-019-0309-4.
- Mobasser, M., Shirmohammadi, M., Amiri, T., Vahed, N., Hosseini Fard, H. and Ghojaza-deh, M. 2020. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. *Health Promotion Perspectives* 10(2), pp. 98–115. doi: 10.34172/hpp.2020.18.
- Motta, F. et al. 2023. Rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis diagnosis and prognosis: a systematic review and meta-analysis. *RMD Open* 9(3), p. e002817. doi: 10.1136/rmdopen-2022-002817.
- Murfitt, S.A. et al. 2018. Metabolomics and Lipidomics Study of Mouse Models of Type 1 Diabetes Highlights Divergent Metabolism in Purine and Tryptophan Metabolism Prior to Disease Onset. *Journal of Proteome Research* 17(3), pp. 946–960. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00489.
- Navarro-Compán, V., Sepriano, A., El-Zorkany, B. and van der Heijde, D. 2021. Axial spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 80(12), pp. 1511–1521. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221035.
- Ni, Z. et al. 2023. Guiding the choice of informatics software and tools for lipidomics research applications. *Nature Methods* 20(2), pp. 193–204. doi: 10.1038/s41592-022-01710-0.
- Ogle, G.D. et al. 2022. Global estimates of incidence of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Atlas, 10th edition. *Diabetes research and clinical practice* 183, p. 109083. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109083.
- Pisetsky, D.S. 2023. Pathogenesis of autoimmune disease. *Nature Reviews Nephrology* 19(8), pp. 509–524. doi: 10.1038/s41581-023-00720-1.
- Pisetsky, D.S. and Lipsky, P.E. 2020. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology* 16(10), pp. 565–579. doi: 10.1038/s41584-020-0480-7.
- Pongrac Barlovic, D., Harjutsalo, V. and Groop, P.-H. 2022. Exercise and nutrition in type 1 diabetes: Insights from the FinnDiane cohort. *Frontiers in endocrinology* 13, p. 1064185. doi: 10.3389/fendo.2022.1064185.

- Qiu, J., Wu, B., Goodman, S.B., Berry, G.J., Goronzy, J.J. and Weyand, C.M. 2021. Metabolic Control of Autoimmunity and Tissue Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology* 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.652771.
- Radu, A.-F. and Bungau, S.G. 2021. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells* 10(11), p. 2857. doi: 10.3390/cells10112857.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G. and Salazar, N. 2016. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00185.
- Sarkar, S. et al. 2023. Systematic review of type 1 diabetes biomarkers reveals regulation in circulating proteins related to complement, lipid metabolism, and immune response. *Clinical Proteomics* 20(1), p. 38. doi: 10.1186/s12014-023-09429-6.
- Sharip, A. and Kunz, J. 2020. Understanding the Pathogenesis of Spondyloarthritis. *Biomolecules* 10(10), p. 1461. doi: 10.3390/biom10101461.
- Szumilas, K., Szumilas, P., Słucznanowska-Głąbowska, S., Zgutka, K. and Pawlik, A. 2020. Role of Adiponectin in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 21(21), p. 8265. doi: 10.3390/ijms21218265.
- Trela, M., Perera, S., Sheeran, T., Rylance, P., Nelson, P.N. and Attridge, K. 2019. Citrullination facilitates cross-reactivity of rheumatoid factor with non-IgG1 Fc epitopes in rheumatoid arthritis. *Scientific Reports* 9(1), p. 12068. doi: 10.1038/s41598-019-48176-3.
- Tsalamandris, S. et al. 2019. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *European cardiology* 14(1), pp. 50–59. doi: 10.15420/ecr.2018.33.1.
- Venetsanopoulou, A.I., Alamanos, Y., Voulgari, P. V. and Drosos, A.A. 2023. Epidemiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis Development. *Mediterranean Journal of Rheumatology* 34(4), p. 404. doi: 10.31138/mjr.301223.eaf.
- Verge, C.F. et al. 1996. Prediction of Type I Diabetes in First-Degree Relatives Using a Combination of Insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 Autoantibodies. *Diabetes* 45(7), pp. 926–933. doi: 10.2337/diab.45.7.926.
- Del Vescovo, S., Venerito, V., Iannone, C. and Lopalco, G. 2023. Uncovering the Underworld of Axial Spondyloarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 24(7), p. 6463. doi: 10.3390/ijms24076463.
- Wahren-Herlenius, M. and Dörner, T. 2013. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *The Lancet* 382(9894), pp. 819–831. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60954-X.

- Wang, L., Wang, F.S. and Gershwin, M.E. 2015. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. *Journal of Internal Medicine* 278(4), pp. 369–395. doi: 10.1111/joim.12395.
- Wu, C.-Y., Yang, H.-Y. and Lai, J.-H. 2020. Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Patients with Rheumatoid Arthritis: Biological Effects and Mechanisms of Immunopathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 21(11), p. 4015. doi: 10.3390/ijms21114015.
- Wu, D. et al. 2022. Systemic complications of rheumatoid arthritis: Focus on pathogenesis and treatment. *Frontiers in Immunology* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.1051082.
- Yan, B. et al. 2016. Serum metabolomic profiling in patients with systemic lupus erythematosus by GC/MS. *Modern Rheumatology* 26(6), pp. 914–922. doi: 10.3109/14397595.2016.1158895.
- Yao, H., Li, K., Wei, J., Lin, Y. and Liu, Y. 2023. The contradictory role of branched-chain amino acids in lifespan and insulin resistance. *Frontiers in Nutrition* 10. doi: 10.3389/fnut.2023.1189982.
- Yoon, N., Jang, A.-K., Seo, Y. and Jung, B.H. 2021. Metabolomics in Autoimmune Diseases: Focus on Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, and Multiple Sclerosis. *Metabolites* 11(12), p. 812. doi: 10.3390/metabo11120812.
- Yu, H., Nagafuchi, Y. and Fujio, K. 2021a. Clinical and immunological biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Biomolecules* 11(7), pp. 1–16. doi: 10.3390/biom11070928.
- Yu, H., Nagafuchi, Y. and Fujio, K. 2021b. Clinical and Immunological Biomarkers for Systemic Lupus Erythematosus. *Biomolecules* 11(7), p. 928. doi: 10.3390/biom11070928.
- Zajec, A. et al. 2022. Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Established Facts and New Insights. *Genes* 13(4). doi: 10.3390/genes13040706.
- Zharkova, O., Celhar, T., Cravens, P.D., Satterthwaite, A.B., Fairhurst, A.-M. and Davis, L.S. 2017. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 56(suppl_1), pp. i55–i66. doi: 10.1093/rheumatology/kew427.
- Ziegler, A.G. et al. 2013. Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children. *JAMA* 309(23), p. 2473. doi: 10.1001/jama.2013.6285.

Πηγές Εικόνων

1. Εικόνα εξωφύλλου: <https://www.everydayhealth.com/autoimmune-diseases/covid-19-could-increase-the-risk-of-developing-some-autoimmune-disorders/>
2. Εικόνα 1: <https://www.biorender.com/>
3. Εικόνα 2: <https://www.mdpi.com/2218-1989/11/12/812#B24-metabolites-11-00812>
4. Εικόνα 3: <https://fse.studenttheses.ub.rug.nl/20008/1/bBio.2019.SchultingaAS.pdf>
5. Εικόνα 4: <https://www.biorender.com/>
6. Εικόνα 5: <https://www.biorender.com/>
7. Εικόνα 6: [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(21\)00442-3/fulltext](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(21)00442-3/fulltext)
8. Εικόνα 7: https://theses.hal.science/tel-01024122v1/file/these_BEGORRE.pdf
9. Εικόνα 8: <https://www.biorender.com/>
10. Εικόνα 9: <https://www.biorender.com/>
11. Εικόνα 10: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7312469/>