



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ / ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Διευθυντής: Ιωάννης Στεφανίδης

Διδακτορική Διατριβή

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΔΙΧΛΩΡΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ
CD4⁺ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ»**

υπό

ΜΑΡΙΑΣ ΣΟΥΝΙΔΑΚΗ

Ανοσολογία – Μεταβολισμός – Νεφρολογία

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δευτέρου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα, 2019

Με αγάπη και εκτίμηση

Στον σύζυγο μου Κλέωνα, πολύτιμο βοηθό και σύντροφο

Στην κόρη μας Ηλιάνα, πηγή άντλησης δύναμης και υπομονής

© 2019 ΜΑΡΙΑ ΣΟΥΝΙΔΑΚΗ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (15/20-06-2018 ΓΣΕΣ):

- | | |
|---|--|
| 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων) | Ιωάννης Στεφανίδης
Καθηγητής Παθολογίας - Νεφρολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 2^{ος} Εξεταστής | Θεόδωρος Ελευθεριάδης
Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 3^{ος} Εξεταστής | Σπυρίδων Ποταμιάνος
Καθηγητής Γαστρεντερολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 4^{ος} Εξεταστής | Φίλιππος Τρυποσκιάδης
Καθηγητής Καρδιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 5^{ος} Εξεταστής | Γεώργιος Βασιλόπουλος
Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 6^{ος} Εξεταστής | Γεώργιος Νταλέκος
Καθηγητής Παθολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 7^{ος} Εξεταστής | Δημήτριος Μπόγδανος
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων
Νοσημάτων, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με θέμα «*ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΧΛΩΡΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΚΑΛΜΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ CD4⁺ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ*» εκπονήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο της Νεφρολογικής Κλινικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ιωάννη Στεφανίδη για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την εμπιστοσύνη, την αμέριστη συμπαράστασή και την δημιουργική καθοδήγησή του.

Τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες εκφράζω και στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής αλλά και της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Ελευθεριάδη για την στήριξη του όλα αυτά τα χρόνια καθώς και για την βοήθεια του σε πολλά επιστημονικά και τεχνικά ζητήματα που αφορούσαν στην ερευνητική μου πορεία ως υποψήφια διδάκτωρ.

Πολλές ευχαριστίες ανήκουν στους ειδικευμένους και ειδικευόμενους ιατρούς της νεφρολογικής κλινικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ανεύρεση και λήψη των δειγμάτων αλλά και σε όλο το υπόλοιπο προσωπικό για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας όλα αυτά τα χρόνια της ερευνητικής μου δραστηριότητας.

Πολύτιμος συνεργάτης, φίλος και συμπαραστάτης μου υπήρξε ο μεταδιδακτορικός ερευνητής του εργαστηρίου κ. Γιώργος Πίσσας, τον οποίο και ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια του σε κάθε βήμα της προσπάθειάς μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη μητέρα μου Χρύσα, τον πατέρα μου Θανάση και τον αδερφό μου Δημήτρη, των οποίων η στήριξη και η αγάπη έκαναν τα πάντα να μοιάζουν πιο εύκολα. Ακόμα, θα ήταν ειλικρινά μεγάλη παράλειψη, αν δεν ευχαριστούσα στο σημείο αυτό το σύζυγο μου Κλέωνα, για την τεράστια υπομονή και το κουράγιο που μου έδωσε όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος δε μπορώ να μη ζητήσω ένα μεγάλο συγνώμη από την κόρη μου Ηλιάνα, που με στερήθηκε κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διατριβής, ελπίζοντας ότι κάποτε θα καταλάβει.

Μαρία Σουνιδάκη

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Υποψήφιου διδάκτορα Μαρίας Α. Σουνιδάκη

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Μαρία Σουνιδάκη
Όνομα πατρός: Αθανάσιος
Ημερ. γεννήσεως: 12-10-1986
Τόπος γεννήσεως: Λάρισα
Σύζυγος: Κλέων Κορομπίλιας, Φιλολόγος
Τέκνα: Ηλιάνα 2018
Δ/ση κατοικίας: Κίρκης 1, Λάρισα 41221
Τηλ.Παν/μίου: 241-3501665
Κιν.: 6989466904
Fax: 241-3501667
Email: maria_sounidaki@hotmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ

Μάιος 2017 –
Σεπτέμβριος 2017

**Μετεκπαίδευση μέσω του προγράμματος
κινητικότητας υποψηφίων διδασκόντων στο
εξωτερικό ERASMUS +.**

Ερευνητικό εργαστήριο Πανεπιστημιακής κλινικής
Νεφρολογίας, Υπέρτασης, Διαβήτη και Ενδοκρινολογίας,
Πανεπιστήμιο Otto von Guericke, Μαγδεβούργο, Γερμανία.

Τίτλος ερευνητικού προγράμματος: «Μελέτη του ρόλου του πρωτεϊνικού παράγοντα YB1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική απόπτωση και τον μεταβολισμό των σωληναριακών κυττάρων στο πλαίσιο της νεφρικής ανεπάρκειας» (“The Many Roads to Cell Death: Gaining an insight of the role of YB-1 in apoptosis associated to kidney disease”).

Σεπτέμβριος 2014 – **Διδακτορικό Δίπλωμα Ειδίκευσης (PhD) στην νεφρολογία, ανοσοβιολογία και τον κυτταρικό μεταβολισμό.**
Σήμερα

Εργαστήριο Νεφρολογικής Κλινικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Τίτλος διδακτορικής διατριβής: «Μελέτη της ανοσοτροποποιητικής δράσης του διχλωροξικού οξέος σε καλλιέργειες ανθρώπινων CD4⁺ T λεμφοκυττάρων»

Σεπτέμβριος 2012 – **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Msc) στις Βιο-ιατρικές Επιστήμες (Master of Science in Biomedical Sciences) με ειδίκευση στον κυτταρικό μεταβολισμό (Βαθμός: Λίαν Καλώς, 7,05)**
Ιούνιος 2014

Σχολή Υγείας, Ιατρικής και Επιστημών ζωής, Πανεπιστήμιο Μάαστριχτ, Μάαστριχτ, Ολλανδία

Τίτλος μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας: «Ο ρόλος της οξειδωμένης χοληστερόλης (oxLDL) στην δυσλειτουργία των λυσοσωμάτων στο πλαίσιο της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας» (“Lysosomes and oxLDL: A vesicular “traffic jam” in non alcoholic steatohepatitis”) [Βαθμός: 9, Cum caude (Άριστα)]

Σεπτέμβριος 2011 – **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Msc) στην**
Ιούνιος 2012 **Διατροφογενωμική και την Εξατομικευμένη Διατροφή**
(Master’s Degree in Nutrigenomics and Personalized Nutrition)
(Βαθμός: Άριστα, 9,08)

Σχολή Βιολογίας και Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Βαλεαρίδων
Νήσων, Μαγιόρκα, Ισπανία.

Τίτλος μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας: «Διατροφικός έλεγχος νέων μυοκινών σε C2C12 μυϊκά κύτταρα» (“Nutritional control of novel myokines in C2C12 muscle cells”) [Βαθμός: 10, Honor list (άριστα)].

Σεπτέμβριος 2006 – **Πτυχίο στην Βιολογία με ειδίκευση στη Μοριακή Βιολογία,**
Ιούνιος 2011 **Γενετική, Βιοτεχνολογία. (Βαθμός: Λίαν Καλώς, 7,73).**

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.

Τίτλος διπλωματικής εργασίας σε συνεργασία με το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Έρευνας (INSERM, UMR 1149), Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Paris Diderot, Παρίσι, Γαλλία: «Πειραματική εντεροπάθεια από γλουτένη σε ποντίκια και αποδόμηση γλοιαδίνης από πιθανά προβιοτικά στελέχη μικροοργανισμών» (**Βαθμός: 10, Άριστα**).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Τίτλος συνεδρίου:** 6^ο Νεφρολογικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδος

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Ξενοδοχείο Larisa Imperial, Δεκέμβριος 7-9, 2018

Φορέας διοργάνωσης: Ακαδημία Νεφρολογίας Κεντρικής Ελλάδος, σε συνεργασία με τη Πανεπιστημιακή Νεφρολογική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τρόπος συμμετοχής: Μέλος οργανωτικής επιτροπής

2. **Τίτλος συνεδρίου:** Kongress für Nephrologie (Nephrology Congress)

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Βερολίνο, Γερμανία, Σεπτέμβριος 27 – 30, 2018

Φορέας διοργάνωσης: Γερμανική εταιρεία Νεφρολογίας (Deutschen Gesellschaft für Nephrologie)

Τρόπος συμμετοχής: Αναρτημένη δημοσίευση (poster): Bernhardt A., Jerchel S., Brandt S., Wolters K., Sounidaki M., Lindquist J.A., Mertens P.R. The Cold Shock Domain Protein YB-1 Plays a Critical Role in Sterile Tubulointerstitial Nephritis (Das Kälteschockprotein YB-1 spielt eine kritische Rolle in der tubulointerstitiellen Nephritis).

3. **Τίτλος συνεδρίου:** 30th Meeting of the European Renal Cell Study Group (ERCSCG)

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Φλορεντία, Ιταλία, Απρίλιος 19–22, 2018.

Τρόπος συμμετοχής: Ομιλία: Bernhardt A., Jerchel S., Brandt S., Wolters K., Sounidaki M., Lindquist J.A., Mertens P.R. “The Cold Shock Domain Protein YB-1 Plays a Critical Role in Sterile Tubulointerstitial Nephritis”.

4. **Τίτλος συνεδρίου:** 5^ο Νεφρολογικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδος

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Ξενοδοχείο Larisa Imperial, Δεκέμβριος 8-10, 2017

Φορέας διοργάνωσης: Ακαδημία Νεφρολογίας Κεντρικής Ελλάδος σε συνεργασία με τη Πανεπιστημιακή Νεφρολογική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τρόπος συμμετοχής: Μέλος οργανωτικής επιτροπής

5. **Τίτλος συνεδρίου:** 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταμοσχεύσεων

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Κέντρο Διάδοσης Ερευνητικών Αποτελεσμάτων ΚΕ.Δ.Ε.Α. / Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη, Νοέμβριος 17-18-19, 2017.

Φορέας διοργάνωσης: Ελληνική Εταιρεία Μεταμοσχεύσεων, υπό την αιγίδα της Περιφέρειας Κεντρικής Μακεδονίας και του Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ.

Τρόπος συμμετοχής: Ομιλία: Πίσσας Γ., Ελευθεριάδης Θ., Σουνιδάκη Μ., Τσόγκα Κ., Γεωργία Α., Γκολφινόπουλος Σ., Λιακόπουλος Β., Στεφανίδης Ιωάννης. «Η 2,3 διοξυγενάση της ινδολεαμίνης μειώνει την χυμική αλλοανοσία σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων».

6. **Τίτλος συνεδρίου:** 16th European Nephrology Conference

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Βαρκελώνη, Ισπανία, Οκτώβριος 02-03, 2017.

Τρόπος συμμετοχής: Ομιλία: Sounidaki M., Stefanidis I., Eleftheriadis T. and Pissas G. “Indoleamine 2,3-dioxygenase decreases humoral alloimmunity in primary human peripheral blood mononuclear cells by pathways different than those implicated in its effect on T-cells”.

7. **Τίτλος συνεδρίου:** 4^ο Νεφρολογικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδος

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Ξενοδοχείο Larisa Imperial, Νοέμβριος 25-27, 2016

Φορέας διοργάνωσης: Ακαδημία Νεφρολογίας Κεντρικής Ελλάδος, σε συνεργασία με τη Πανεπιστημιακή Νεφρολογική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τρόπος συμμετοχής: Μέλος οργανωτικής επιτροπής και Ομιλία με θέμα: «Αγγειογενίνη ως ανοσοτροποιοτική κυτταροκίνη».

8. **Τίτλος συνεδρίου:** 22nd World Congress on Advances in Oncology and 20th International Symposium on Molecular Medicine.

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Athens Metropolitan Hotel, Οκτώβριος 6-8, 2016

Φορέας διοργάνωσης: Spandidos Publications

Τρόπος συμμετοχής: Ομιλία μετά από πρόσκληση με θέμα: «Dichloroacetate: Targeting energy metabolism in immune cells».

9. **Τίτλος συνεδρίου:** 3^ο Νεφρολογικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδος

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Ξενοδοχείο Larisa Imperial, Δεκέμβριος 11-13, 2015

Φορέας διοργάνωσης: Ακαδημία Νεφρολογίας Κεντρικής Ελλάδος σε συνεργασία με τη Πανεπιστημιακή Νεφρολογική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τρόπος συμμετοχής: Μέλος οργανωτικής επιτροπής και Ομιλία με θέμα: «Παρέμβαση στο μεταβολισμό της γλυκόζης με διχλωροξικό οξύ (DCA) στα T-λεμφοκύτταρα».

10. **Τίτλος συνεδρίου:** 4th European Congress of Immunology.

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Βιέννη, Αυστρία, Σεπτέμβριος 6-9, 2015

Φορέας διοργάνωσης: European Federation of Immunological Societies (EFIS)

Τρόπος συμμετοχής: αναρτημένη δημοσίευση (poster): Sounidaki M., Eleftheriadis T, Pissas G., Stefanidis I. “The effect of dichloroacetate on certain glycolytic enzymes and on the signature transcription factors of Th1, Th2, Th17 and Treg on human alloreactive CD4⁺ T cells”.

11. **Τίτλος συνεδρίου:** 4^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ρευματικών και Αυτοάνοσων παθήσεων Κεντρικής Ελλάδος

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Ξενοδοχείο Larisa Imperial, Σεπτέμβριος 26-28, 2014

Φορέας διοργάνωσης: Ελληνική Ρευματολογική Εταιρεία

Τρόπος συμμετοχής: αναρτημένη δημοσίευση (poster): Eleftheriadis T., Pissas G., Sounidaki M., Stefanidis I. “Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits aerobic glycolysis and cell proliferation in human T cells increasing p53”.

12. **Τίτλος συνεδρίου:** International conference of Master students in Biomedical Sciences.

Τόπος/Ημερομηνία διεξαγωγής: Πανεπιστήμιο Χάσελτ, Χάσελτ, Βέλγιο, 26 Ιουνίου 2014.

Φορέας διοργάνωσης: Σχολή Υγείας, Ιατρικής και Επιστημών ζώης, Πανεπιστήμιο Μάαστριχτ, Μάαστριχτ, Ολλανδία σε συνεργασία με τη Σχολή Υγείας, Ιατρικής και Επιστημών ζώης, Πανεπιστήμιο Χάσελτ, Χάσελτ, Βέλγιο.

Τρόπος συμμετοχής: αναρτημένη δημοσίευση (poster): **Sounidaki M.**, Houben T., Walenbergh S.M.A., Hendrikx T., Jeurissen M.L.J, van Gorp P.J., Sverdlov R. “Lysosomes and oxLDL: a vesicular traffic jam in NASH”.

ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ - ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ - ΒΡΑΒΕΙΑ

1. **Χορήγηση υποτροφίας-χρηματοδότησης για το χρονικό διάστημα 01/06/2017 έως 31/08/2017 από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για μετεκπαίδευση** στο Ερευνητικό εργαστήριο της Πανεπιστημιακής κλινικής Νεφρολογίας, Υπέρτασης, Διαβήτη και Ενδοκρινολογίας του Πανεπιστημίου Otto von Guericke University, Μαγδεβούργο, Γερμανία, στο πλαίσιο του προγράμματος ERASMUS +.

2. **Χορήγηση υποτροφίας-χρηματοδότησης για το χρονικό διάστημα 15/5/2017 έως 15/5/2018 από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σε εφαρμογή του Κανονισμού του Επιχειρησιακού Προγράμματος (Απόφαση 62511/Ζ1/11.04.2017, ΦΕΚ 1411/τ.Β'/26.04.2017) με τίτλο: «ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ» 2ος ΚΥΚΛΟΣ. ΜΑΪΟΣ 2017 (Για υποψήφιους διδάκτορες που έχουν αρχίσει το διδακτορικό πριν από 18-36 μήνες).**

3. **Επιλογή στον κατάλογο επιτυχόντων με τις προς χρηματοδότηση αιτήσεις ανά επιστημονική περιοχή έρευνας στο πλαίσιο της υπ' αριθμόν ΓΓΕΤ 185494/12/3.11.2016 (ορθή επανάληψη της 182390/12/31.10.2016) πρώτης προκήρυξης υποτροφιών ΕΛΙΔΕΚ για υποψήφιους διδάκτορες. Ωστόσο, υποβλήθηκε αίτημα (αρ. πρ. 188761/12/3-11-2017 ΓΓΕΤ) μη αποδοχής της υποτροφίας από την ίδια την υποψήφια, λόγω νομικών φραγμών, δεδομένου ότι είχε προηγηθεί λήψη χρηματοδότησης από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (βλ. παράγραφο 2).**

4. **Απονομή εύφημους μνείας στην αναρτημένη δημοσίευση: «Sounidaki M., Eleftheriadis T, Pissas G., Stefanidis I. The effect of dichloroacetate on certain glycolytic enzymes and on the signature transcription factors of Th1, Th2, Th17 and Treg on human alloreactive CD4⁺ T cells», στο πλαίσιο του συνεδρίου: 4th European Congress of Immunology, Βιέννη, Αυστρία, Σεπτέμβριος 6-9, 2015.**

5. Χορήγηση υποτροφίας-οικονομικής ενίσχυσης για τη συμμετοχή στο σεμινάριο:

«Onassis Foundation Science Lecture Series in Biology 2009: “Immunobiology”»,
Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, Ιούλιος 27-31, 2009.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Δημοσιευμένα άρθρα στην Pubmed:

1. **Sounidaki M**, Pissas G, Eleftheriadis T, Antoniadis G, Golfopoulos S, Liakopoulos V, Stefanidis I. Indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses humoral alloimmunity via pathways that different to those associated with its effects on T cells. *Biomed Rep.* 2019;10: 323-330.

2. Stefanidis I, Tziastoudi M, Tsironi E, Dardiotis E, Tachmitzi S, Fotiadou A, Pissas G, Kytoudis K, **Sounidaki M**, Ampatzis G, Karakosta P, Mertens P.R, Liakopoulos V, Eleftheriadis T, Hadjigeorgiou G, Santos M; Zintzaras E. The contribution of genetic variants of SLC2A1 gene in T2DM and T2DM-nephropathy: association study and meta-analysis. *Ren Fail.* 2018;40(1):561-576.

3. Eleftheriadis T, Pissas G, **Sounidaki M**, Antoniadis G, Tsialtas I, Liakopoulos V, Stefanidis I. Urate crystals activate directly T-cell receptor complex and induce T-cell proliferation. *Biomed Rep.* 2017; 7(4):365-369.

4. Eleftheriadis T, Pissas G, **Sounidaki M**, Antoniadi G, Antoniadis N, Liakopoulos V, Stefanidis I. In human cell cultures, everolimus is inferior to tacrolimus in inhibiting cellular alloimmunity, but equally effective as regards humoral alloimmunity. *Int Urol Nephrol.* 2017; 49(9):1691-1697.

6. Eleftheriadis T, Pissas G, **Sounidaki M**, Antoniadi G, Antoniadis N, Liakopoulos V, Stefanidis I. Uric acid increases cellular and humoral alloimmunity in primary human peripheral blood mononuclear cells. *Nephrology (Carlton).* 2017. doi: 10.1111/nep.13069.

7. Eleftheriadis T, Pissas G, **Sounidaki M**, Antoniadi G, Antoniadis N, Liakopoulos V, Stefanidis I. Preconditioning of primary human renal proximal tubular epithelial cells without tryptophan increases survival under hypoxia by inducing autophagy. *Int Urol Nephrol.* 2017; 49(7):1297-1307.

8. Eleftheriadis T, Pissas G, **Sounidaki M**, Antoniadi G, Antoniadis N, Liakopoulos V, Stefanidis I. Tryptophan depletion under conditions that imitate insulin resistance enhances fatty acid oxidation and induces endothelial dysfunction through reactive oxygen species dependent and independent pathways. *Mol Cell Biochem.* 2017; 428(1-2):41-56.

9. Eleftheriadis T, Pissas G, **Sounidaki M**, Tsogka K, Antoniadis N, Antoniadi G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Indoleamine 2,3-dioxygenase, by degrading L-tryptophan, enhances carnitine palmitoyltransferase I activity and fatty acid oxidation, and exerts

fatty acid-dependent effects in human alloreactive CD4⁺ T-cells. *Int J Mol Med*. 2016; 12(5):3471-3475.

10. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Tsogka K, **Sounidaki M**, Stefanidis I. Differential effects of the two amino acid sensing systems, the GCN2 kinase and the mTOR complex 1, on primary human alloreactive CD4⁺ T-cells. *Int J Mol Med*. 2016;37(5):1412-20

11. Eleftheriadis T, Pissas G, **Sounidaki M**, Antoniadis N, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Angiogenin is upregulated during the alloreactive immune response and has no effect on the T-cell expansion phase, whereas it affects the contraction phase by inhibiting CD4⁺ T-cell apoptosis. *Exp Ther Med*. 2016;12(5):3471-3475.

12. Eleftheriadis T, **Sounidaki M**, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. In human alloreactive CD4⁺ T-cells, dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis, induces apoptosis and favors differentiation towards the regulatory T-cell subset instead of effector T-cell subsets. *Mol Med Rep*. 2016;13(4):3370-6.

13. Stefanidis I, Vainas A, Giannaki CD, Dardiotis E, Spanoulis A, **Sounidaki M**, Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Karatzaferi C, Sakkas GK, Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. Restless legs syndrome and mortality in hemodialysis patients. *Sleep Med*. 2016;22:103

14. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Tsogka K, **Sounidaki M**, Liakopoulos V, Stefanidis I. Indoleamine 2,3-dioxygenase down-regulates T-cell receptor complex zeta-chain and c-myc, and decreases proliferation, lactate dehydrogenase and mitochondrial glutaminase in human T-cells. *Mol Med Rep.* 2016;13(1):925-32.
15. Stefanidis I, Vainas A, Giannaki CD, Dardiotis E, Spanoulis A, **Sounidaki M**, Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Karatzaferi C, Sakkas GK, Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. Restless legs syndrome does not affect 3- year mortality in hemodialysis patients. *Sleep Med.* 2015;16(9):1131-8.
16. Papista C, Gerakopoulos V, Kourelis A, **Sounidaki M**, Kontana A, Berthelot L, Moura IC, Monteiro RC, Yiangou M. Gluten induces coeliac-like disease in sensitised mice involving IgA, CD71 and transglutaminase 2 interactions that are prevented by probiotics. *Lab Invest.* 2012;92(4):625-35.

Κατατιθέμενα άρθρα (υπό εξέταση)

1. **Sounidaki M**, Eleftheriadis T, Stefanidis I. Dichloroacetate: a novel “metabolic”, immunoregulatory drug.
2. Stefanidis I, Tsironi E, Dardiotis E, Tachmitzi S, Fotiadou A, Pissas G, Kytoudis K, **Sounidaki M**, Xanthopoulou P, Tziastoudi M, Liakopoulos V, Eleftheriadis T, Hadjigeorgiou G.M., Zintzaras E. Genetic Variants in SLC2A1 enhance the Risk of Type 2 Diabetes leading to Nephropathy: a Candidate-gene Association Study.

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΔΙΧΛΩΡΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ
CD4⁺ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ»**

ΜΑΡΙΑ ΣΟΥΝΙΔΑΚΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ιωάννης Στεφανίδης**, Καθηγητής Παθολογίας - Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Θεόδωρος Ελευθεριάδης**, Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Σπυρίδων Ποταμιάνος**, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Σήμερα, η μεταμόσχευση νεφρού θεωρείται η πιο διαδεδομένη θεραπεία για τη νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Ωστόσο, η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων και ασφαλέστερων ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων θεωρείται αναγκαία, δεδομένων των σοβαρών επιπλοκών που εμφανίζονται στους μεταμοσχευμένους νεφροπαθείς.

Έρευνες των τελευταίων ετών προσανατολίζονται στην διερεύνηση ουσιών που παρεμβαίνουν στο μεταβολισμό των αλλοδραστικών $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων, με το να αναστέλλουν την αερόβια γλυκόλυση, επιτυγχάνοντας τελικά τη στοχευμένη διαφοροποίησή τους προς ρυθμιστικά (Tregs) έναντι των εκτελεστικών (Teffs). Τα τελευταία, μάλιστα, αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές της απόρριψης αλλογενών μοσχευμάτων. Αντίθετα, τα ρυθμιστικά συμβάλλουν στην ανοχή του μοσχεύματος. Στο πλαίσιο αυτό, το διχλωροξικό οξύ (DCA) είναι ένα φάρμακο που επηρεάζει τον κυτταρικό μεταβολισμό. Πιο συγκεκριμένα, ο εν λόγω παράγοντας παρεμποδίζει την αερόβια γλυκόλυση, ενώ ήδη χρησιμοποιείται κλινικά στη θεραπεία της κληρονομικής γαλακτικής οξέωσης χωρίς παρενέργειες. **Σκοπός**, λοιπόν, της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση του DCA στα ανθρώπινα αλλοδραστικά $CD4^+$ T-λεμφοκύτταρα και συγκεκριμένα στη διαφοροποίησή τους προς Tregs ή Teffs, μέσω παρέμβασης στον μεταβολισμό τους.

Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο άλλο-ανοσοαντίδρασης η αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR) η οποία προσομοιάζει τις *in vivo* συνθήκες. Αρχικά, για τη μελέτη της επίδρασης του DCA στο μεταβολικό μονοπάτι της αερόβιας γλυκόλυσης υπολογίστηκε η κατανάλωση

γλυκόζης και η παραγωγή γαλακτικού οξέος στο υπερκείμενο των κυτταροκαλλιιεργειών. Η επίδραση του φαρμάκου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκτιμήθηκε ανοσοενζυμικά με τη χρήση βρωμο-δεοξυ-ουριδίνης. Κατόπιν, ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν με χρήση αρνητικού διαχωρισμού σε στήλες από κάθε MLR. Σε αυτά, με τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, εκτιμήθηκε η επίδραση του DCA στην σχετική πρωτεϊνική έκφραση: **α)** μεταφορέων και ενζύμων που εμπλέκονται στην γλυκόλυση, **β)** δεικτών της κυτταρικής απόπτωσης και **γ)** μεταγραφικών παραγόντων-δεικτών διαφοροποίησης των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων προς Tregs ή Teffs.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι συνολικά στις MLRs, το DCA μείωσε την κατανάλωση γλυκόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος, ενώ άσκησε αμελητέα επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ειδικότερα, στα ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από τις MLRs, το DCA:

α) μείωσε την πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα-μεταφορέα της γλυκόζης GLUT1, της εξοκινάσης II, της γαλακτικής δεϋδρογενάσης A και της φωσφορυλιωμένης πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, ενώ συγχρόνως αύξησε την ολική πυροσταφυλική αφυδρογονάση,

β) αύξησε τα επίπεδα έκφρασης της ματισμένης (ενεργοποιημένης) κασπάσης-3 και

γ) αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του FoxP3, μεταγραφικού παράγοντα-δείκτη των Tregs, μειώνοντας ταυτόχρονα την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων RORγt, GATA-3 και T-bet που αποτελούν δείκτες διαφοροποίησης των εκτελεστικών υποειδών Th17, Th2 και Th1.

Συνοψίζοντας, το DCA αναστέλλει την αερόβια γλυκόλυση, προκαλεί κυτταρική απόπτωση και ευνοεί την διαφοροποίηση των ανθρώπινων αλλοδραστικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων προς Tregs. Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το DCA χρησιμοποιείται ήδη στη κλινική πράξη, το καθιστούν ένα πολλά υποσχόμενο ανοσοκατασταλτικό φάρμακο στον τομέα των μεταμοσχεύσεων συμπαγών οργάνων.

Abstract

Today, kidney transplantation is considered to be the most widespread treatment for end-stage renal failure. However, the development of novel, more effective and safer immunosuppressants is considered essential given the serious complications of renal transplanted patients.

Recent research has been focused on investigating substances that interfere with the metabolism of allogeneic CD4⁺ T cells, inhibit aerobic glycolysis and direct their differentiation to Tregs instead of Teffs. The latter are the main mediators of rejection of allogeneic grafts whereas, on the contrary, Tregs have been shown to contribute to graft tolerance. In this context, dichloroacetic acid (DCA) is a drug that inhibits aerobic glycolysis and is already used in the treatment of hereditary lactic acidosis without side effects. The **aim** of this PhD dissertation was to investigate the potential immunomodulatory effect of DCA focusing on the metabolism of allogeneic CD4⁺ T-lymphocytes and their differentiation into effector or regulatory subsets.

In this context, two-way mixed lymphocyte reaction (MLR) was used as a model of alloreactivity. Initially, in order to study the effect of DCA on the metabolic pathway of aerobic glycolysis, both glucose consumption and lactic acid production were measured in the supernatant of cell cultures. Moreover, the effect of the drug on cell proliferation was assessed with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) immunostaining. In addition to this, human alloreactive CD4⁺ T-cells of each MLR were isolated using negative magnetic separation and the effect of DCA on the relative protein expression of: (a) transporters and enzymes involved in glycolysis; (b) cleaved caspase-3, marker of cellular apoptosis; and c) transcriptional markers that characterize the differentiation

of CD4⁺ T lymphocytes to effector or regulatory subsets, was assessed by Western blotting.

The results of our experiments showed that in MLRs, DCA reduced glucose consumption and aerobic glycolysis while having a negligible effect on cell proliferation. In addition, with respect to human alloreactive CD4⁺ T-lymphocytes isolated from MLRs, DCA:

- a) reduced the protein expression of the glucose receptor GLUT1, hexokinase II, lactate dehydrogenase A and phosphorylated pyruvate dehydrogenase, while increasing total pyruvate dehydrogenase.
- b) increased the protein expression levels of cleaved (activated) caspase-3
- c) increased the protein expression levels of FoxP3, a transcriptional factor and lineage marker of CD4⁺ Tregs, while reducing expression of ROR γ t, GATA-3 and T-bet transcription factors and markers of differentiation of CD4⁺ T-lymphocytes to effector Th17, Th2 and Th1 subspecies, respectively.

Summarizing, in alloreactive CD4⁺ T lymphocytes, DCA inhibits aerobic glycolysis, induces cell apoptosis and favors differentiation into Tregs. The above data, couple with the fact that DCA is already used in clinical practice, rendering it a promising immunosuppressive drug in the field of solid organ transplantation.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	29
1.1. Χρόνια νεφρική νόσος και μεταμόσχευση νεφρού	29
1.1.1. Λειτουργία νεφρού.....	29
1.1.2. Χρόνια νεφρική νόσος.....	30
1.1.2.1. Ορισμός	30
1.1.2.2. Στάδια	31
1.1.3. Μεταμόσχευση νεφρού.....	33
1.2. Ανοσολογία μεταμόσχευσης νεφρού.....	36
1.2.1. Κυτταρική και χυμική ανοσοαπόκριση απόρριψης του μοσχεύματος	38
1.2.2. Ο ρόλος των CD4 ⁺ T λεμφοκυττάρων στη μεταμόσχευση νεφρού.....	46
1.3. Επιβίωση μοσχεύματος και ανοσοκαταστολή	57
1.3.1. Κλασικά ανοσοκατασταλτικά σχήματα στη μεταμόσχευση νεφρού	57
1.3.1.1. Κορτικοστεροειδή.....	57
1.3.1.2. Αντιμεταβολίτες (αζαθειοπρίνη, MMF).....	58
1.3.1.3. Αναστολείς της καλσινευρίνης (κυκλοσπορίνη, tacrolimus)	59
1.3.1.4. Αναστολείς mTOR (mammalian target of rapamycin) (Sirolimus – Everolimus)	61
1.3.1.5. Αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ATG)	63
1.3.1.6. Αντίσωμα κατά των υποδοχέων της ιντερλευκίνης-2 (βασιλξιμάμπη - δακλιζουμάμπη)	64
1.3.1.7. Αντίσωμα κατά του αντιγόνου CD52 (αλεμουζουμάμπη).....	66
1.3.2. Νέας γενιάς ανοσοκατασταλτικά σχήματα στη μεταμόσχευση νεφρού.....	67
1.3.2.1. Αναστολείς του μονοπατιού ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων CD28-CD80/86	67
1.4. Μεταβολισμός CD4 ⁺ T λεμφοκυττάρων.....	69
1.4.1. Η Γλυκόλυση στην ανοσία	69
1.4.2. Η οδός των φωσφορικών πεντοζών στην ανοσία.....	72
1.4.3. Ο κύκλος του Krebs στην ανοσία	73
1.4.4. Οξείδωση λιπαρών οξέων και αποκρίσεις T κυττάρων	74
1.4.5. Σύνθεση λιπαρών οξέων και ανοσολογική λειτουργία	75
1.4.6. Μεταβολισμός αμινοξέων και ανοσολογική λειτουργία.....	76
1.5. Το διγλωροξικό οξύ (DCA)	81
1.5.1. Χρήση του διγλωροξικού οξέος στην κλινική πράξη: φαρμακολογική δόση και παρενέργειες	82
1.5.2. Το διγλωροξικό οξύ ως νέο «μεταβολικό φάρμακο» κατά του καρκίνου.....	86
1.5.3. Ανοσοτροποποιητική δράση του διγλωροξικού οξέος	90
1.6. Σκοπός εργασίας.....	96

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι	99
2.1. Βιολογικό υλικό και εθελοντές δότες	99
2.2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC)	99
2.3. Δημιουργία αμιφίδρομης μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης (MLR).....	101
2.4. Μαγνητικός διαχωρισμός CD4 ⁺ T λεμφοκυττάρων με την τεχνική MACS (magnetic cell sorting).....	102
2.4.1. Προετοιμασία δείγματος.....	103

2.4.2 Σήμανση των κυττάρων	103
2.4.3 Μαγνητικός διαχωρισμός.....	104
2.5 Υπολογισμός της κατανάλωσης γλυκόζης και της παραγωγής γαλακτικού οξέος σε αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR).....	105
2.6 Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της μεθόδου BrdU.....	106
2.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	108
2.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων	109
2.7.2 Προετοιμασία διαλυμάτων- αντιδραστηρίων.....	110
2.7.3 Πρωτόκολλο Μεθόδου.....	110
2.8 Ηλεκτροφόρηση.....	111
2.8.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πηκτή Πολυακρυλαμιδίου.....	112
2.8.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS – PAGE, SDS – PolyAcrylamide Gel Electroforesis)	115
2.8.3 Πρωτόκολλο Μεθόδου.....	116
2.9 Ανάλυση κατά Western (Ανοσοαποτύπωμα).....	118
2.9.1 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη	118
2.9.2 Ανοσοανίχνευση	119
2.10 Στατιστική ανάλυση.....	124
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα.....	125
3.1 Το DCA μειώνει την κατανάλωση γλυκόζης και την αερόβια γλυκόλυση σε αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR).....	125
3.2 Το DCA ασκεί αμελητέα επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR).....	126
3.3 Το DCA σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4 ⁺ T-λεμφοκύτταρα ευνοεί τη μείωση της κατανάλωσης γλυκόζης και αερόβιας γλυκόλυσης, με παράλληλη αύξηση της εισόδου του πυροσταφυλικού οξέος στον κύκλο του Krebs.	128
3.4 Το DCA σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4 ⁺ T-λεμφοκύτταρα ευνοεί τη διαφοροποίησή τους προς T-ρυθμιστικά και αναστέλλει τη διαφοροποίησή τους προς τα εκτελεστικά υποείδη Th17, Th1 και Th2.....	131
3.5 Το DCA επάγει την κυτταρική απόπτωση σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4 ⁺ T-λεμφοκύτταρα	133
Κεφάλαιο 4. Συμπεράσματα.....	135
Κεφάλαιο 5. Σύνοψη Αποτελεσμάτων.....	146
Κεφάλαιο 6. Βιβλιογραφία	147



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1. Χρόνια νεφρική νόσος και μεταμόσχευση νεφρού

1.1.1 Λειτουργία νεφρού

Οι δύο νεφροί, τα επεκκριτικά όργανα που ευθύνονται για την αποβολή των μη πτητικών προϊόντων του μεταβολισμού, εντοπίζονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο στο ύψος του 12^{ου} θωρακικού και του 3^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου. Ο δεξιός νεφρός συνήθως βρίσκεται λίγο χαμηλότερα από τον αριστερό, πιθανώς λόγω του ήπατος που βρίσκεται από πάνω. Η επιμήκης διάμετρος του νεφρού ανέρχεται σε 10 cm περίπου. Οι νεφροί περιβάλλονται από λίπος και περιτονίες, που τους καθλώνουν και τους προστατεύουν. Ο καθένας περιέχει πάνω από 1 εκατομμύριο νεφρώνες που είναι δομικές και λειτουργικές μονάδες των νεφρών. Οι νεφρώνες αποτελούνται από ένα θύσανο τριχοειδών, το σπείραμα, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (1).

Κάθε νεφρός δέχεται περίπου το 1/8 της καρδιακής παροχής μέσω της νεφρικής αρτηρίας. Το σπείραμα διηθεί το αίμα και παράγει ένα υπερδιήθημα (το λεγόμενο πύουρο) με ρυθμό 100-125 ml ανά λεπτό (175 L ημερησίως). Το υπερδιήθημα αυτό δεν περιέχει έμμορφα στοιχεία και μεγαλομοριακές πρωτεΐνες. Κατά τα άλλα η σύνθεση του είναι ίδια με το πλάσμα. Το μεγαλύτερο τμήμα του υπερδιηθήματος, συμπεριλαμβανομένων των ηλεκτρολυτών, της γλυκόζης και των μικρομοριακών πρωτεϊνών που περιέχει, επαναρροφάται στο εγγύς σωληνάριο. Ο όγκος των ούρων ελέγχεται από την αντιδιουρητική ορμόνη (ADH) ώστε να διατηρείται μια σταθερή ποσότητα νερού στον οργανισμό. Μετα από επίδραση των

ανωτέρω μηχανισμών έκκρισης και επαναρρόφησης το πρόουρο μετατρέπεται σε ούρα. Ο όγκος των ούρων ανέρχεται περίπου σε 1,5 L ημερησίως. (2).

Ο νεφρός λειτουργεί επίσης και ως ενδοκρινής αδένας, υπεύθυνος για την παραγωγή της ρενίνης, που είναι σημαντική για το τελικό έλεγχο της έκκρισης της αλδοστερόνης. Αποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής ερυθροποιητίνης, επηρεάζοντας έτσι τη συνολική μάζα των ερυθροκυττάρων του οργανισμού. Παράγει τη βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης D καθώς και πλειάδα προσταγλανδινών (3).

Εν κατακλείδι, οι νεφροί είναι ζωτικά όργανα που εξασφαλίζουν την αποβολή των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού. Ρυθμίζουν όμως και άλλες σημαντικές λειτουργίες του σώματος, όπως: α) διατήρηση της ισορροπίας ύδατος και ηλεκτρολυτών, β) διατήρηση της ωσμωτικότητας του πλάσματος και των άλλων υγρών του σώματος, γ) διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας, δ) διαφύλαξη ορισμένων απαραίτητων ουσιών, όπως γλυκόζης, αμινοξέων, πρωτεϊνών κ.α., ε) άσκηση ορμονικής δράσεως (με τη ρενίνη, ερυθροποιητίνη κ.α.) και ορισμένων μεταβολικών διεργασιών (διασπαση πεπτιδίων, μετατροπή οργανικών οξέων κ.α.) (4).

1.1.2. Χρόνια νεφρική νόσος

1.1.2.1. Ορισμός

Χρόνια νεφρική νόσος (XNN) είναι η προοδευτική, γενικά μη αναστρέψιμη μείωση της νεφρικής λειτουργίας, που προκαλείται από βλάβη του νεφρού ποικίλης αιτιολογίας. Η μείωση της νεφρικής λειτουργίας μπορεί να προσδιοριστεί ως ελάττωση του ρυθμού σπειραματικής διηθήσεως (GFR) δηλαδή του συνόλου του υπερδιηθήματος που περνά από το αίμα στον αυλό των σωληναρίων στη μονάδα του

χρόνου (5). Οι φυσιολογικές τιμές του GFR, που μετράται με την κάθαρση κρεατινίνης, είναι 90-125ml/min/1.73m² (6). Η προοδευτική μείωση της νεφρικής λειτουργίας δίνει τη δυνατότητα στο νεφρώνα να προχωρήσει σε προσαρμοστικές μεταβολές και έτσι η ΧΝΝ μπορεί να διαδράμει για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς ιδιαίτερα συμπτώματα (5).

Η πιο συχνή αιτία της χρόνιας νεφρικής νόσου είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, ενώ ακολουθούν σε συχνότητα η αρτηριακή υπέρταση και οι σπειραματονεφρίτιδες. Λιγότερο συχνές αιτίες είναι οι πολυκυστικοί νεφροί και η αποφρακτική ουροπάθεια (5).

1.1.2.2. Στάδια

Ως χρόνια νεφρική νόσος ορίζεται η διαταραχή της λειτουργικής ή δομικής ακεραιότητας του νεφρού, χωρίς ή με μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR < 60 ml/min/ 1.73 m²), για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο ή τουλάχιστον 3 μηνών. Ανεξάρτητα από την αιτία που την προκάλεσε η χρόνια νεφρική νόσος παρουσιάζει σημαντικές επιπτώσεις που επηρεάζουν την υγεία του ασθενούς. Η διαταραχή της δομικής / λειτουργικής ακεραιότητας του νεφρού δηλαδή η ύπαρξη νεφρικής βλάβης στοιχειοθετείται με την παρουσία ενός ή περισσότερων από τα παρακάτω κριτήρια:

- παρουσία αλβουμίνης στα ούρα σε ποσότητα > 30mg/24h ή ACR δηλαδή λόγος αλβουμίνης / κρεατινίνης > 30mg/gr
- σπειραματική αιματοουρία / λευκωματοουρία
- διαταραχές στον εργαστηριακό έλεγχο π.χ. αυξημένη τιμή κρεατινίνης
- ιστολογική διάγνωση νεφρικής βλάβης με βιοψία νεφρού

- υπερηχογραφική απεικόνιση (πχ μικρό μέγεθος νεφρών, πολυκυστικοί νεφροί, ινωτικές ουλές)

Παράλληλα, η μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης πρέπει να αντιστοιχεί και να εμμένει σε $GFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ για το χρονικό διάστημα που προαναφέρθηκε (τουλάχιστον 3 μηνών). Με βάση τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης και την ύπαρξη νεφρικής βλάβης, η χρόνια νεφρική νόσος χωρίζεται σε 5 συνολικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο οι ασθενείς έχουν φυσιολογικό ρυθμό σπειραματικής διήθησης $>90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. Στο δεύτερο στάδιο παρατηρείται μείωση του GFR ($60-89 \text{ ml/min/1.73 m}^2$) και στο τρίτο μεγαλύτερη μείωση του GFR ($30-59 \text{ ml/min/1.73 m}^2$). Το τέταρτο στάδιο της ΧΝΝ επέρχεται όταν ο GFR είναι $15-29 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ ενώ το πέμπτο και τελευταίο στάδιο χαρακτηρίζεται από GFR κάτω του $15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ ή όταν ο ασθενής υποβάλλεται σε θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης (Πίνακας 1.1).

Η χρόνια νεφρική νόσος δεν έχει συμπτώματα στα πρώτα 2 στάδια. Στο στάδιο 3 εμφανίζεται υπέρταση, στον εργαστηριακό έλεγχο παρατηρείται αύξηση του φωσφόρου στο αίμα και μείωση της βιταμίνης D που θα οδηγήσουν στην αύξηση της παραθορμόνης και στον δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό με αποτέλεσμα παθολογικές διαταραχές των οστών. Στο στάδιο 4 παρατηρούνται αναιμία και συμπτώματα όπως κόπωση και αδυναμία. Στο στάδιο 5 εμφανίζονται περισσότερα συμπτώματα όπως ανορεξία, ναυτία, έμετοι, μυϊκή αδυναμία, διαταραχή συγκέντρωσης, οιδήματα κάτω άκρων. Σε αυτό το στάδιο οι ασθενείς αντιμετωπίζονται με θεραπευτικές μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση, περιτοναϊκή κάθαρση ή μεταμόσχευση (5).

Στάδιο	Περιγραφή	GFR (ml/min/1,73m ²)	Επιπολ. (%)
1	Νεφρική βλάβη (NB) με φυσιολ. ή ↑ GFR	> 90	3,3%
2	NB με ελαφρά ↓ GFR	60-89	3,0%
3	Μέτρια ↓ GFR	30-59	4,3%
4	Σοβαρή ↓ GFR	15-29	0,2%
5	Τελικό	< 15 ή AK	0,2%

Πίνακας 1.1. Στάδια ΧΝΝ (5)

1.1.3. Μεταμόσχευση νεφρού

Η μεταμόσχευση θεωρείται η καλύτερη μέθοδος υποκαταστάσεως της νεφρικής λειτουργίας με βασικότερα πλεονεκτήματα έναντι της αιμοκάθαρσης και της περιτοναϊκής κάθαρσης: την καλύτερη ποιότητα ζωής, το μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης, τη σχεδόν πλήρη απαλλαγή από τα συμπτώματα της ουραιμίας καθώς και το μικρότερο κόστος (7–9).

Τα μοσχεύματα νεφρών προέρχονται από δύο κύριες πηγές: από ζώντες ή από πτωματικούς δότες. Οι βασικές προϋποθέσεις για δωρεά οργάνων από ζώντα δότη είναι η εθελοντική και πλήρως ενημερωμένη συναίνεση και η καλή υγεία του δότη. Οι πτωματικοί δότες έχουν υποστεί καρδιακό ή εγκεφαλικό θάνατο. Στον καρδιακό θάνατο (non heart beating donor) υπάρχει περιθώριο 90 min από το θάνατο για να

πραγματοποιηθεί η δωρεά. Στον εγκεφαλικό θάνατο το χρονικό περιθώριο είναι μεγαλύτερο διότι η οξυγόνωση και η κυκλοφορία διατηρούνται παροδικά με μηχανική αναπνοή και φάρμακα (10).

Στη μεταμόσχευση νεφρού διακρίνουμε τρεις χρόνους που έχουν σημασία:

1) Χρόνος θερμής ισχαιμίας. Το διάστημα από τη διακοπή της κυκλοφορίας του νεφρού μέχρι την ψύξη του στους 4° C με έκπλυση (και τοποθέτηση στη λεκάνη με πάγο).

2) Χρόνος ψύξεως ή ψυχρής ισχαιμίας. Ο χρόνος αυτός, που αφορά κυρίως τους πτωματικούς νεφρούς ανέρχεται μέχρι 48 ώρες. Πέραν των 48 ωρών υπάρχει ανεπανόρθωτη μείωση της λειτουργίας του μοσχεύματος.

3) Χρόνος επαναθερμάνσεως ή αναστόμωσης. Είναι η χρονική περίοδος αναλήψεως του μοσχεύματος από την ψύξη με πάγο μέχρι την αναστόμωση της αρτηρίας.

Όσο μικρότεροι είναι αυτοί οι χρόνοι, τόσο ευνοϊκότερες είναι οι συνθήκες για τη λειτουργία του μοσχεύματος (11). Το νεφρικό μόσχευμα τοποθετείται στο λαγόνιο βόθρο, με τομή από την ηβική σύμφυση προς τη λαγόνιο ακρολοφία. Η νεφρική αρτηρία αναστομώνεται με την έξω λαγόνιο αρτηρία, η φλέβα με την έξω λαγόνιο φλέβα και ο ουρητήρας με την κύστη (10).

Το μείζον πρόβλημα της νεφρικής μεταμοσχεύσεως είναι η απόρριψη και γι'αυτή σημαντικό ρόλο παίζει η ιστοσυμβατότητα μεταξύ λήπτη και δότη. Συγκεκριμένα, στην αλλομεταμόσχευση εκλύεται μια ανοσολογική αντίδραση κατά του μοσχεύματος, το οποίο αναγνωρίζεται από τον οργανισμό σαν ξένο. Η αντίδραση ονομάζεται ανοσολογική απόρριψη και έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή του

νεφρικού αλλομοσχεύματος από το λήπτη. Για το λόγο αυτό στην αλλομεταμόσχευση απαιτείται ανοσοκατασταλτική αγωγή. Η απόρριψη είναι η συχνότερη αιτία απώλειας ενός νεφρικού μοσχεύματος. Με κλινικά και ιστολογικά κριτήρια διακρίνουμε τέσσερις μορφές της ανοσολογικής απόρριψης νεφρικού μοσχεύματος: την υπεροξεία, την επιταχυνόμενη οξεία, την οξεία και τη χρόνια απόρριψη.

Η υπεροξεία αρχίζει με την αφαίρεση των λαβίδων, δηλαδή αμέσως μετά την έναρξη αιματώσεως του μοσχεύματος. Το μόσχευμα γίνεται χαλαρό και κυανωτικό από βλάβη των αγγείων και ισχαιμική νέκρωση. Δεν υπάρχει θεραπεία και το μόσχευμα αφαιρείται. Η επισπεύδουσα οξεία απόρριψη εμφανίζεται 24 ώρες με 4 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση και εμφανίζεται σε ευαισθητοποιημένους από προηγηθείσα μεταμόσχευση ή μεταγγίσεις ασθενείς. Η οξεία απόρριψη εμφανίζεται ημέρες ή και εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση με πυρετό, ρίγος, μυαλγίες αρθραλγίες, ευαισθησία στο μόσχευμα και διαταραχές της νεφρική λειτουργίας. Με τη σύγχρονη ανοσοκαταστολή (μετά την κυκλοσπορίνη) προεξάρχει η μείωση της νεφρικής λειτουργίας ενώ δεν παρατηρούνται συχνά τα ανωτέρω συμπτώματα συστηματικής φλεγμονής ούτε και ευαισθησία στο μόσχευμα. Τέλος η χρόνια απόρριψη χαρακτηρίζεται από σπειραματοσκλήρυνση, ατροφία σωληναρίων και διάμεση ίνωση. Επειδή οι αλλοιώσεις μοιάζουν με αυτές στις χρόνιες σπειραματοπάθειες, επικράτησε για τη χρόνια απόρριψη ο όρος χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος (12). Για τον έλεγχο της οξείας απόρριψης οι ασθενείς αντιμετωπίζονται με ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες. Ωστόσο, τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα μπορεί να έχουν σοβαρές παρενέργειες κυρίως με επιρρέπεια σε λοιμώξεις και καρκίνο (13).

Σήμερα, είναι γνωστό ότι η απόρριψη αλλομοσχεύματος συμπεριλαμβάνει τις αλλοανοσιακές αποκρίσεις των Β κυττάρων, καθώς και των CD8⁺ και CD4⁺ Τ κυττάρων (12), με κυριότερους διαμεσολαβητές τις διάφορες κυτταρικές υποομάδες των CD4⁺ Τ-λεμφοκυττάρων (14). Η καλύτερη κατανόηση των αλλοανοσιακών αποκρίσεων καθώς και του ρόλου των υποομάδων των CD4⁺ στην απόρριψη αλλομοσχεύματος, θα είναι καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών για την επαγωγή ανοχής στην κλινική μεταμόσχευση.

1.2 Ανοσολογία μεταμόσχευσης νεφρού

Μεταμόσχευση νεφρού μπορεί να πραγματοποιηθεί αφού διαπιστωθεί ότι το συγκεκριμένο όργανο πληρεί τις απαραίτητες ανοσολογικές προϋποθέσεις για μεταμόσχευση. Η απόρριψη ενός μοσχεύματος εξαρτάται από τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας του δότη, την ανοσολογική αναγνώριση των αντιγόνων αυτών από το ανοσολογικό σύστημα του λήπτη και την καταστροφή και εξάλειψη του ιστού που φέρει τα παραπάνω αντιγόνα. Δύο είναι τα κύρια αντιγονικά συστήματα στον άνθρωπο, από τα οποία εξαρτάται η ιστοσυμβατότητα μεταξύ δότη και λήπτη μοσχεύματος: τα αντιγόνα της ομάδας αίματος (σύστημα ABO) και τα HLA-αντιγόνα.

Τα αντιγόνα Α και Β του συστήματος ABO βρίσκονται εκτός των ερυθροκυττάρων στην επιφάνεια όλων των κυττάρων του οργανισμού. Ασυμβατότητα στο σύστημα ABO οδηγεί κατά κανόνα σε υπεροξεία απόρριψη του μοσχεύματος. Για το λόγο αυτό η συμβατότητα της ομάδας αίματος είναι μέγιστης σημασίας (αναγκαία συνθήκη) στη χειρουργική των μεταμοσχεύσεων. Η ασυμβατότητα Rhesus δεν αποτελεί αντένδειξη για τη μεταμόσχευση.

Τα HLA-αντιγόνα είναι γλυκοπρωτεΐνες, που παράγονται από τα γονίδια του μεγίστου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας ("Major Histocompatibility Complex", MHC) και εντοπίζονται στην επιφάνεια εμπύρηνων κυττάρων. Κωδικοποιούνται από επτά γονιδιακούς επιτόπους (A, B, C, D, DR, DQ, DP), που βρίσκονται στο μικρό σκέλος του χρωμοσώματος 6, που ονομάζεται και HLA-χρωμόσωμα. Σύμφωνα με τη δομή, τη λειτουργία και την εντόπισή τους τα HLA-αντιγόνα κατατάσσονται σε δύο ομάδες (τάξεις): την τάξη I και την τάξη II (15). Στη μεταμόσχευση οργάνων η επίδραση της συμβατότητας των HLA στην κλινική έκβαση ποικίλλει, ανάλογα με το όργανο που μεταμοσχεύεται. Συγκεκριμένα, στη μεταμόσχευση νεφρού, μελέτες προηγούμενων ετών έχουν ήδη αποδείξει τα οφέλη της συμβατότητας των HLA-A, -B, και -DR (16–18). Η καλύτερη επιβίωση των μεταμοσχευμένων νεφρών με καλή συμβατότητα των HLA εξηγείται από τη μείωση των επεισοδίων απόρριψης, οδηγώντας παράλληλα και σε μείωση του συνολικού «φορτίου» των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων (13). Επομένως, η καλή συμβατότητα των HLA οδηγεί σε λιγότερη ανοσοκαταστολή και καλύτερη ανοσία σε μεταμοσχευμένους ασθενείς (18).

Πέραν όμως από τα HLA μόρια, και άλλα μόρια παίζουν ρόλο στην απόρριψη του μοσχεύματος όπως τα πολυμορφικά μόρια του ελάσσονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (mHAgS). Αυτά είναι πρωτεϊνικά μόρια που είτε προέρχονται από μιτοχονδριακό DNA είτε μόρια που κωδικοποιούνται οπουδήποτε στο γονιδίωμα, όπως π.χ. το αντιγόνο H-Y που κωδικοποιείται στο Y χρωμόσωμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, όταν τα παραπάνω αντιγόνα δεν είναι συμβατά μεταξύ δότη και λήπτη, μπορούν να προκαλέσουν οξεία απόρριψη του μοσχεύματος, ακόμη και όταν τα MHC (HLA) μόρια εμφανίζουν συμβατότητα (19). Μια τέτοια

αλλοανοσιακή αντίδραση μπορεί να αντιμετωπιστεί μόνο με την χορήγηση ισχυρών ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων (15).

1.2.1. Κυτταρική και χυμική ανοσοαπόκριση απόρριψης του μοσχεύματος

Ο μηχανισμός απόρριψης οργάνου διαμεσολαβούμενος από T λεμφοκύτταρα (TCMR) εμπεριέχει δυο οδούς αναγνώρισης αλλοαντιγόνων: την άμεση και την έμμεση. Η άμεση οδός έχει να κάνει με την αναγνώριση αλλογενών MHC μορίων που υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του μοσχεύματος του δότη από τα T λεμφοκύτταρα του λήπτη (20). Θεωρείται ότι η άμεση ανοσοαντίδραση συμβαίνει νωρίς, όσο είναι παρόντα ακόμη αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του δότη (21). Έχει αποδειχθεί ότι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα δότη, όπως δενδριτικά κύτταρα που περιέχονται στο μόσχευμα, μέσω της λέμφου μεταφέρονται στους επιχώριους λεμφαδένες του λήπτη. Εκεί, αυτά τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα παρουσιάζουν τα αλλογενή MHC μόρια τους απευθείας σε $CD4^+$ ή $CD8^+$ κύτταρα μέσω άμεσης παρουσίασης. Πιο συγκεκριμένα, ένα MHC μόριο τάξης II ή τάξης I που βρίσκεται πάνω στην κυτταρική μεμβράνη του δενδριτικού κυττάρου συνδέεται με έναν υποδοχέα TCR που βρίσκεται στην μεμβράνη του $CD4^+$ ή $CD8^+$ κυττάρου αντίστοιχα. Δημιουργείται, έτσι, μια φυσική σύνδεση μεταξύ του MHC μορίου του μοσχεύματος και του TCR του λήπτη. Μπορεί ακόμη να δημιουργείται ένα σύμπλοκο του MHC μορίου με ένα πεπτίδιο (**Εικόνα 1.1**). Υπάρχουν δύο περιπτώσεις: είτε να μεσολαβεί ένα αλλοπεπτίδιο, δηλαδή ένα πεπτίδιο που προέρχεται από το μόσχευμα (π.χ. MHC μόρια, αντιγόνα του συστήματος ABO, ενδοθηλιακά αντιγόνα κ.α.) είτε ένα αυτόλογο πεπτίδιο, δηλαδή ένα πεπτίδιο που προέρχεται από τον ίδιο τον λήπτη. Έπειτα, τα παραπάνω κύτταρα

διαφοροποιούνται: τα μεν $CD4^+$ σε εκτελεστικά ή ρυθμιστικά και τα $CD8^+$ σε κυτταροτοξικά (CTLs) αντίστοιχα. Αυτά τα ενεργοποιημένα αλλοδραστικά T κύτταρα επιστρέφουν στο νεφρικό μόσχευμα και διαμεσολαβούν την απόρριψη του μοσχεύματος. Η βλάβη πραγματοποιείται με διαφορετικούς μηχανισμούς όπως: α) μέσω άμεσης επαφής με τα επιθηλιακά κύτταρα των σωληναρίων (κυρίως από $CD8^+$ CTLs κύτταρα), β) μέσω δράσης τοπικά παραγομένων κυτταροκινών (όπως IL-2, IFN- γ και TNF- β) και γ) μέσω ενεργοποίησης φλεγμονωδών και κυττάρων του αγγειακού ενδοθηλίου (20).

Συνεχίζοντας, η έμμεση οδός αλλοαναγνώρισης αφορά στο κλασσικό μονοπάτι παρουσίασης ενός αλλο-αντιγόνου από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του λήπτη. Πιο συγκεκριμένα, αλλογενή MHC μόρια ή άλλα πεπτίδια κυττάρων του αλλομοσχεύματος, μέσω ενδοκύτωσης, υπόκεινται σε φαγοκύτωση από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του λήπτη, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται μαζί με ένα αυτόλογο MHC μόριο στην κυτταρική μεμβράνη του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου. Αυτά ενεργοποιούν κυρίως τα $CD4^+$ T κύτταρα, επειδή μέσω του μονοπατιού ενδοκύτωσης, εκφράζονται MHC μόρια τάξης II. Παράλληλα, όμως, ενεργοποιούνται έμμεσα και $CD8^+$ T κύτταρα λήπτη. Σε αυτή την περίπτωση, αλλοπεπτίδια μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα. Αφού διασπαστούν, εντός των πρωτεοσωμάτων (ενδογενής τρόπος), τελικά μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου και συνδέονται με MHC τάξης I μόρια. Παρουσιάζονται τέλος στην επιφάνεια των κυττάρων, προκειμένου να αναγνωρισθούν από τα $CD8^+$ T κύτταρα του λήπτη (20) (**Εικόνα 1.1**). Ρόλο επίσης στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων από τα δενδριτικά κύτταρα παίζει και η αλληλεπίδραση των συνδιεγερτικών μορίων B7 (CD80/CD86) και CD40 των δενδριτικών με το CD28 και CD40L των T κυττάρων

αντίστοιχα (15). Τελικά, στην περίπτωση της έμμεσης οδού όπως και στην άμεση, τόσο τα κυτταροτοξικά κύτταρα, προερχόμενα από CD8⁺ T κύτταρα, όσο και τα εκτελεστικά, προερχόμενα από CD4⁺ T κύτταρα, συντελούν στην απόρριψη του μοσχεύματος (20). Η ενεργοποίηση είτε κυτταροτοξικών, είτε εκτελεστικών, μέσω της έμμεσης οδού, γίνεται όταν εγκατασταθούν σε αυτό (το μόσχευμα) τόσο δενδριτικά, όσο και CD4⁺ T κύτταρα του λήπτη. Σε αυτό το πλαίσιο, ιστολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα δενδριτικά κύτταρα δότη στο μόσχευμα, αντικαθίστανται σταδιακά από κύτταρα λήπτη. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη, βρέθηκε ότι την πρώτη μέρα της μεταμόσχευσης καρδιάς, το 85% των δενδριτικών κυττάρων του μοσχεύματος είναι κύτταρα λήπτη και την έβδομη μέρα τα ίδια κύτταρα καλύπτουν το 95%. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για μοσχεύματα νεφρών. Τέλος έχει δειχθεί ότι στην οξεία απόρριψη υπεύθυνος είναι ο άμεσος τρόπος παρουσίασης του αλλοαντιγόνου σε αντίθεση με την χρόνια απόρριψη όπου εμπλέκεται κατά κύριο λόγο ο έμμεσος τρόπος παρουσίασης του αλλοαντιγόνου (22).

Φαίνεται, όμως, πως υπάρχει και η ημι-έμμεση οδός, όπου πεπτίδιο με άλλο-MHC μεταφέρεται από ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο του δότη σε ένα αντίστοιχο του λήπτη. Η συγκεκριμένη οδός μελετήθηκε προσφάτως σε τρωκτικά όπου και διαπιστώθηκε ότι μεγάλος αριθμός από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του λήπτη έχουν ένα άλλο-MHC μόριο το οποίο μεταφέρθηκε εκεί από αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο του δότη, είτε μέσω εξωσωμάτων, είτε μέσω διακυτταρικής επαφής κατά την διάρκεια της μεταμόσχευσης (20). Αυτό το άλλο-MHC μόριο παρουσιάζει πεπτίδια του μοσχεύματος απευθείας σε T λεμφοκύτταρα του λήπτη (19) (**Εικόνα 1.1**).

Είναι επίσης γνωστό ότι τα Β κύτταρα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο, στο πλαίσιο της μεταμόσχευσης οργάνων, λόγω της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα, που εμφανίζουν μεγάλη διάρκεια ζωής και παράγουν υψηλής συγγένειας αλλοαντισώματα (23,24). Η ανάπτυξη των Β κυττάρων περιλαμβάνει ένα σύνολο γεγονότων που ξεκινούν στα πρωτογενή λεμφικά όργανα και εν τέλει οδηγούν σε ένα στάδιο λειτουργικής ωρίμανσης στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (24). Η ανάπτυξη και επιβίωση των Β κυττάρων εξαρτάται από την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια ενός λειτουργικού υποδοχέα-αντιγόνου, δηλαδή του υποδοχέα των Β κυττάρων (BCR). Ο BCR είναι ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης (Ig) δεσμευμένο στη μεμβράνη σε σύμπλοκο με τα ετεροδιμερή σηματοδοτικά μόρια Ig α/β (25). Η επιβίωση των Β κυττάρων προάγεται επίσης από έναν αριθμό παραγόντων, όπως ο BAFF (παράγοντας ενεργοποίησης των Β κυττάρων) και ο APRIL (προσδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό) (26,27). Πιο συγκεκριμένα, ένα ώριμο Β κύτταρο απαιτεί δύο σήματα για να ενεργοποιηθεί: το πρώτο σήμα λαμβάνεται μέσω της σύνδεσης του BCR με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο και το δεύτερο μέσω αλληλεπιδράσεων με CD4⁺ T κύτταρα, που ονομάζονται θυλακικά βοηθητικά T κύτταρα (TFH). Η ίδια σηματοδότηση είναι απαραίτητη εκτός από την ενεργοποίηση και για την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων σε μακρόβια πλασματοκύτταρα και Β κύτταρα μνήμης. Επιπρόσθετα, η πρόσδεση του MHC τάξης II στα Β κύτταρα με τον υποδοχέα TCR, του CD40 με το CD40L και του CD80/86 με το CD28 στα T κύτταρα, παρουσία κυτοκινών (όπως οι IL-2, IL -4, IL-5 και IL-21), είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων (28–30). Τα ενεργοποιημένα Β κύτταρα υφίστανται κλωνική επέκταση, ανασυνδυασμό μεταστροφής τάξης από IgM σε IgG, IgA ή IgE και αποκτούν σωματικές υπερμεταλλάξεις στη μεταβλητή περιοχή του

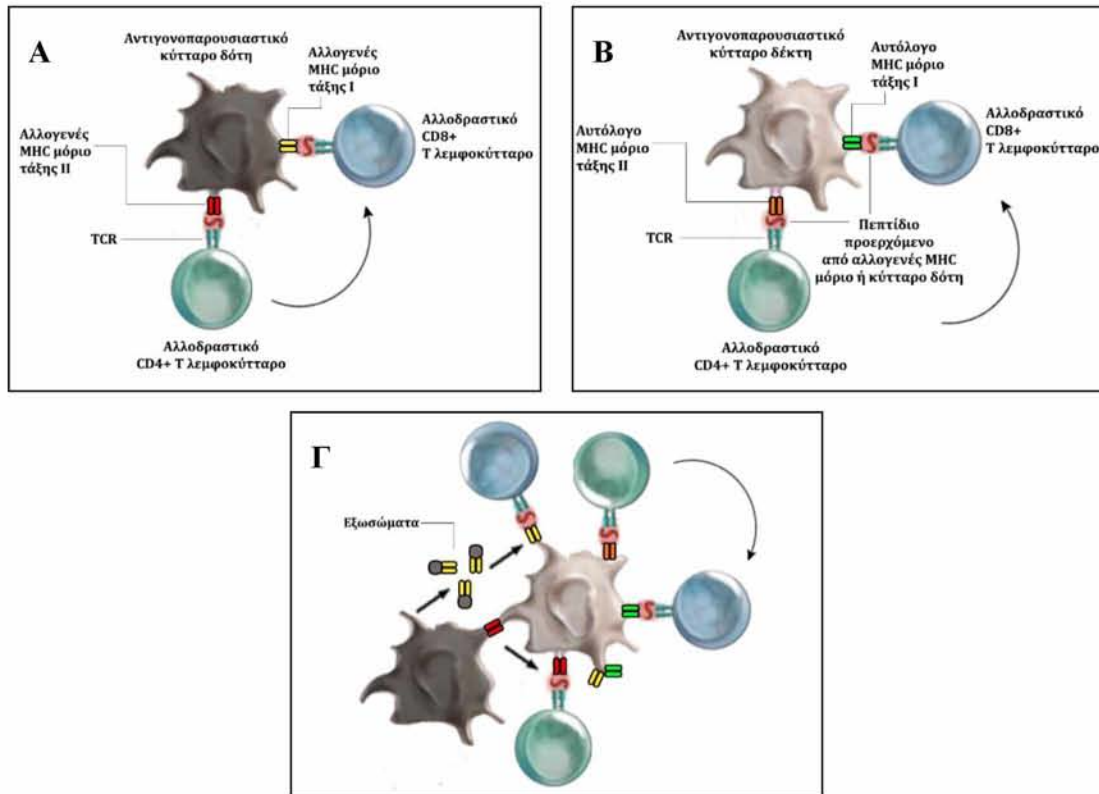
υποδοχέα BCR (31,32). Όσον αφορά τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, τα αντισώματα που συνδέονται με μη συμβατά μόρια HLA (ή μη-HLA) στα ενδοθηλιακά κύτταρα του μοσχεύματος, ξεκινούν ένα σύνολο σηματοδοτικών γεγονότων, που οδηγούν στην στρατολόγηση κυττάρων τελεστών στο ενδοθήλιο του μοσχεύματος μέσω εξαρτώμενων και μη από το συμπλήρωμα μονοπατιών. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε θρόμβωση του μοσχεύματος και τελικά σε μείωση της λειτουργίας του (24). Οι κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η προϋπάρχουσα, όσο και η de novo παραγωγή των ειδικών για τον δότη αντισωμάτων IgG (DSA), σχετίζονται με οξεία αλλά και χρόνια βλάβη του αλλομοσχεύματος στη περίπτωση των νεφρών, της καρδιάς, του πνεύμονα και του ήπατος (33–38). Αντίθετα, οι μελέτες με IgM και IgA DSA αντισώματα δεν αποκάλυψαν καμία επίδραση αυτών των ισοτύπων στην επιβίωση του αλλομοσχεύματος εκτός και αν συνυπήρχαν με IgG αντισώματα (39,40).

Τελειώνοντας, αξίζει να αναφέρουμε ότι η κυτταρική σειρά μονοκύτταρων-μακροφάγων αναγνωρίζεται επίσης όλο και περισσότερο, ως ένας από τους κύριους τελεστές στην οξεία και χρόνια ανοσοπαθολογία αλλομοσχεύματος (41). Τα μονοκύτταρα CD14⁺ (συν-υποδοχέας LPS) προέρχονται από μυελοειδή πρόδρομα κύτταρα πρωτογενών και δευτερογενών λεμφοειδών οργάνων, όπως το ήπαρ και ο μυελός των οστών και μπορούν να στρατολογηθούν στη θέση της φλεγμονής ή σε περιοχές ιστικής βλάβης, όπου μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα (42). Αυτά τα κύτταρα συνεισφέρουν στην αλλοανοσία μέσω διαφόρων οδών, όπως η επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνου, συνδιέγερση, παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και επούλωση ιστικής βλάβης (12,43,44). Στο πλαίσιο της μεταμόσχευσης, τα μακροφάγα υπάρχουν τόσο στην οξεία χυμική, όσο και στην οξεία κυτταρική απόρριψη των συμπαγών οργάνων (45,46). Η

αλληλεπίδρασή τους με άλλα ανοσολογικά κύτταρα του λήπτη και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του δότη ενισχύουν τη φλεγμονή στη θέση του μοσχεύματος (12,43,44). Γι αυτό το λόγο, η παρουσία αυξημένου αριθμού μακροφάγων στο νεφρικό μόσχευμα έχει περιγραφεί ως κακός προγνωστικός δείκτης επιβίωσης του νεφρικού μοσχεύματος και του ασθενούς (45,47,47–55). Ακόμη, ιστοπαθολογικές μελέτες δείχνουν αύξηση του αριθμού των μακροφάγων στο μόσχευμα αρκετά πριν την έναρξη της απόρριψης και της δυσλειτουργίας, γεγονός που τον καθιστά χρήσιμο διαγνωστικό δείκτη για την απόρριψη μοσχεύματος (49).

Η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα είναι εξαρτώμενη από τον υποδοχέα του παράγοντα διέγερσης αποικιών μακροφάγων (CSF1). Παράλληλα, το χημειοτακτικό πεπτιδίο 1 των μονοκυττάρων (MCP-1) είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της προσέλκυσης μακροφάγων που όπως έχει αποδειχθεί εκφράζεται έντονα σε αλλομοσχεύματα νεφρού (56). Τα μακροφάγα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε «κλασικά ενεργοποιούμενα» ή «εναλλακτικά ενεργοποιούμενα». Τα «κλασικά ενεργοποιούμενα» μακροφάγα περιγράφονται ως μακροφάγα M1, τα οποία αναπτύσσονται ως απόκριση σε IFN γ , LPS ή TNF- α . Τα μακροφάγα M1 εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες: MHCII, CD40, CD80, CD86 και CD11b και μπορούν να παράγουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, CCL2, CXCL9 και CXCL10. Τα μακροφάγα M1 συνδέονται με την απόκριση Th1 και θεωρούνται φλεγμονώδη μακροφάγα. Σε αντιδιαστολή, τα «εναλλακτικά ενεργοποιούμενα» ή M2 μακροφάγα θεωρούνται αντιφλεγμονώδη και υποδιαιρούνται σε M2a, M2b και M2c. Τα μακροφάγα M2a παράγονται ως απόκριση σε IL-4 και IL-13. Τα ανοσοσυμπλέγματα και οι προσδέτες του toll-like υποδοχέα (TLR)/IL-1R ενεργοποιούν τα μακροφάγα M2b, ενώ τα μακροφάγα M2c ενεργοποιούνται από IL-

10, TGF- β και γλυκοκορτικοειδή. Τα μακροφάγα M2 εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες: CD163, CD206 και CD209, παράγουν IL-10 και TGF- β και συμμετέχουν στην επούλωση ιστού (41). Τα μακροφάγα M2 συνδέονται με την απόκριση Th2 και παρουσιάζουν ανοσορυθμιστικές λειτουργίες (42,57). Επιπλέον, ένας άλλος υποπληθυσμός μακροφάγων, τα ανθρώπινα ρυθμιστικά μακροφάγα (Mregs), εμφανίζουν ικανότητα καταστολής T-κυττάρων. Τα Mregs προκύπτουν από CD14⁺ μονοκύτταρα περιφερικού αίματος κατά τη διάρκεια καλλιέργειας 7 ημερών παρουσία M-CSF και IFN γ (58). Τα Mregs εκφράζουν αρκετά μόρια, όπως τα MHCII, FCyR, IFN γ R, TLR-4 και PD-L1. Μέχρι σήμερα, δύο κλινικές μελέτες διερεύνησαν την σημασία των Mregs για την επιβίωση του αλλομοσχεύματος με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (59,60). Καταλήγοντας, η καλύτερη κατανόηση του ρόλου των διαφόρων ανοσοκυττάρων στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, θα οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων θεραπειών οι οποίες θα παρατείνουν την επιβίωση του μοσχεύματος.



Εικόνα 1.1. Άμεσες, έμμεσες και ημι-άμεσες οδοί ανοσοαναγνώρισης. (Α) **Άμεση οδός.** Τα αντιγόνα MHC τάξης I και τάξης II του δότη στα APCs στο μόσχευμα αναγνωρίζονται από τα CD8⁺ κυτταροτοξικά T κύτταρα και τα CD4⁺ βοηθητικά T κύτταρα του ξενιστή αντίστοιχα. (Β) **Έμμεση οδός.** Η έμμεση οδός περιλαμβάνει την παρουσίαση επεξεργασμένου άλλο-MHC. Τα APCs του λήπτη παρουσιάζουν τα επεξεργασμένα πεπτίδια σε MHC τάξης II περιορισμένα CD4⁺ T βοηθητικά κύτταρα. Παράλληλα, ενεργοποιούνται και CD8⁺ κύτταρα μιας και δενδριτικά κύτταρα λήπτη πέπτουν κύτταρα του μοσχεύματος, πεπτίδια των οποίων παρουσιάζονται τελικά στην κυτταρική μεμβράνη του δενδριτικού κυττάρου μαζί με ένα MHC μόριο τάξης I. (Γ) **Ημι-άμεση οδός.** Η διακυτταρική επαφή μεταξύ APC δότη και λήπτη μπορεί να μεταφέρει ανέπαφα συστατικά μεμβράνης που περιλαμβάνουν άθικτα άλλο-MHC μόρια. Ομοίως, το APC δότη μπορεί να απελευθερώνει μικρά κυστίδια, γνωστά ως «εξωσώματα» που περιέχουν άθικτα μόρια MHC, τα οποία συγχωνεύονται με τη μεμβράνη των APCs του λήπτη. Το APC του λήπτη, τώρα χιμαιρικό για τα μόρια MHC, διεγείρει την άμεση και την έμμεση οδό αποκρίσεων των CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων.

1.2.2. Ο ρόλος των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στη μεταμόσχευση νεφρού

Τα CD4⁺ T κύτταρα συντονίζουν προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω της έκκρισης κυτοκινών και των διακυτταρικών επαφών (61). Τα παρθένα T λεμφοκύτταρα του θύμου αδένος εκφράζουν ένα πολύ μεγάλο ρεπερτόριο διαφορετικών αντιγονικών υποδοχέων (αντιγονικοί υποδοχείς T κυττάρων, TCR) και είναι έτσι δυνητικά ικανά να αναγνωρίσουν πολλά είδη παθογόνων (62). Κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα και εισέρχονται στους λεμφαδένες μέσω ενδοθηλιακών φλεβιδίων ενώ δεν έχουν πρόσβαση σε μη λεμφοειδείς ιστούς (61). Για αυτή τη διαδικασία απαιτούν L-σελεκτίνη (CD62L) και τον υποδοχέα χημειοκινών CCR7 (63,64). Ανθρώπινα παρθένα CD4⁺ T κύτταρα ταυτοποιήθηκαν με την έκφραση της μακρύτερης ισομορφής του κοινού αντιγόνου λεμφοκυττάρων CD45 (CD45RABC, “CD45RA”) ή/και της έλλειψης της μικρότερης ισομορφής (CD45R0) (65).

Στους περιφερικούς ιστούς, τα αλλοαντιγόνα από τα νεομεταμοσχευθέντα όργανα ανιχνεύονται από τα δενδριτικά κύτταρα (DC), τα οποία στη συνέχεια καθοδηγούν την κατάλληλη πρωτογενή απόκριση T κυττάρων στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα (66). Τα δενδριτικά κύτταρα, που αναγνωρίζουν ένα παθογόνο, υφίστανται ένα σύνθετο πρόγραμμα ωρίμανσης: επάγουν την έκφραση μορίων MHC και συν-διεγερτικών μορίων, μεταναστεύουν σε λεμφαδένες, αλληλεπιδρούν με ειδικά για το παθογόνο T-λεμφοκύτταρα και εκκρίνουν τις κατάλληλες κυτταροκίνες πόλωσης. Η ισχύς των σημάτων που μεταγόνται από τους υποδοχείς TCR και ο τύπος των κυτοκινών που τα δενδριτικά κύτταρα ελευθερώνουν καθορίζουν τη διαφοροποίησή των T λεμφοκυττάρων σε διάφορους υποτύπους εκτελεστικών (Teffs)

ή ρυθμιστικών (Tregs) κυττάρων. Αυτά με τη σειρά τους αποκτούν την ικανότητα να εδρεύουν σε συγκεκριμένους ιστούς και να εκκρίνουν χαρακτηριστικές κυτοκίνες (61). Το κύριο μονοπάτι ενεργοποίησης των CD4⁺T κυττάρων περιλαμβάνει σήματα που ενεργοποιούν την μεταγραφή από τρεις σηματοδότες: τον πυρηνικό παράγοντα κB (NF-κB), την πρωτεΐνη ενεργοποίησης 1 (AP-1) και τον πυρηνικό παράγοντα των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων (NFAT). Θεωρείται ότι για να ενεργοποιηθούν τα T λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητο και ένα δεύτερο μονοπάτι συν-ενεργοποίησης, του οποίου οι μηχανισμοί δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως (67).

Όσον αφορά το μοριακό μηχανισμό που καθοδηγεί τη διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων σε Teffs και Tregs, αυτό που ισχύει είναι ότι αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους, το σήμα, μέσω του υποδοχέα TCR, προωθείται προς τις κινάσες Janus (JAKs). Αυτές φωσφορυλιώνουν το ενδοκυτταρικό κομμάτι του υποδοχέα με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται τα μόρια STAT (signal transducer and activator of transcription). Τα μόρια STAT ενεργοποιούν έναν κύριο μεταγραφικό παράγοντα με αποτέλεσμα, μέσω τροποποιήσεων στις ιστόνες (π.χ. ακετυλίωση-αποακετυλίωση και μεθυλίωση-απομεθυλίωση ιστονών) και γενικότερα στην διάπλαση της χρωματίνης (π.χ. μεθυλίωση του DNA-σχηματισμός νησίδων ^{5m}CpG που επιτυγχάνονται μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων), την παραγωγή μιας κύριας κυτοκίνης. Με άλλα λόγια, οι περιοχές του DNA που φέρουν τα γονίδια για συγκεκριμένες κυτοκίνες παραμένουν προσβάσιμες από τους μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ τα γονίδια για κυτοκίνες που δεν εκφράζονται από τον συγκεκριμένο υποπληθυσμό, παραμένουν μη προσβάσιμα. Έτσι, κάθε κύτταρο δεσμεύεται ως προς ποιες κυτοκίνες παράγει, ενώ οι παραπάνω επιγενετικές αλλαγές στο DNA κληρονομούνται στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα κάθε συγκεκριμένου υποπληθυσμού (67) (**Εικόνα 1.2**).

Η κυτταρική σταθερότητα ελέγχεται επίσης με την έκφραση microRNA. Αυτά τα μικρά μονόκλιωνα μη κωδικά RNA καταστέλλουν τα mRNAs στόχους, παρεμποδίζοντας τη μετάφραση και επάγοντας την αποσύνθεση του mRNA (68). Πέραν όμως από τις STAT, υπάρχουν και αναστολείς αυτών, που ονομάζονται πρωτεΐνες SOCS. Οι τελευταίες δρουν κατασταλτικά στην ενεργοποίηση των STAT είτε μέσω μπλοκαρίσματος της φυσικής σύνδεσης με τον υποδοχέα της κυτοκίνης, είτε μέσω παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης από τις JAKs. Μεταλλάξεις στις STAT προκαλούν διάφορα προβλήματα, όπως μετάλλαξη στην STAT 3 εμπλέκεται στη νόσο Chron, ενώ μη ρυθμισμένη έκφραση των SOCS εμπλέκεται σε διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες (67).

Υπάρχουν τρεις κύριοι υποπληθυσμοί εκτελεστικών CD4⁺ λεμφοκυττάρων: τα Th1, Th2 και τα Th17 (61). Ως προς την δημιουργία του υποπληθυσμού των Th1, η πιο χαρακτηριστική κυτοκίνη που παράγεται είναι η INF-γ. Αρχικά, κατά την διαφοροποίηση προς τον υποπληθυσμό Th1, η κυτοκίνη IL-12 που παράγεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ενεργοποιεί καταρχάς τον μεταγραφικό παράγοντα STAT4, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα T-bet. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας, θεωρητικά, προσδένεται σε T-box περιοχές πάνω στο γονιδίωμα, ενώ πράγματι τέτοιες περιοχές έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο της INF-γ, όπου ο T-bet δρα σαν ενεργοποιητής (67,69). Ο T-bet επάγει επίσης τους υποδοχείς χημειοκινών CXCR3, που επιτρέπουν στα κύτταρα τελεστές Th1 να εισέλθουν σε περιφερικούς ιστούς (70). Τέλος, η INF-γ παράγεται και από τα NK κύτταρα και δεσμεύει με αυτόν τον τρόπο τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων προς τη δημιουργία Th1, μέσω των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων (61,67) (**Εικόνα 1.2**). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους τα Th1 κύτταρα

συμμετέχουν στην απόρριψη μοσχεύματος. Πρώτον, μετά από αλλογενή διέγερση, τα κύτταρα Th1 παράγουν τον αυξητικό παράγοντα IL-2, που προάγει τον πολλαπλασιασμό αλλοαντιδραστικών κυτταροτοξικών CD8⁺ T κυττάρων. Επιπλέον, τα CD8⁺ T κύτταρα παράγουν ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), η οποία ενισχύει τις αποκρίσεις των Th1 κυττάρων. Έτσι, τα αλλοδραστικά CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα δρουν ως βρόγχος ανατροφοδότησης για την ενίσχυση αλλοαντιδραστικών αποκρίσεων Th1 κυττάρων. Δεύτερον, τα αλλοδραστικά Th1 κύτταρα επάγουν μια καθυστερημένου τύπου υπερευαισθησία (DTH) από τα μακροφάγα και ενεργοποιούν τα B κύτταρα για την παραγωγή αλλοαντιδραστικών αντισωμάτων. Πράγματι, η χυμική απόρριψη που προκαλείται από τα ειδικά άλλο-αντισώματα παρατηρείται έντονα μετά τη μεταμόσχευση. Τρίτον, αλλοδραστικά Th1 κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν βλάβη αλλομοσχεύματος απευθείας, λόγω κυτταροτοξικότητας, μέσω του υποδοχέα κυτταρικού θανάτου Fas (CD95) και του προσδέτη του (FasL) (71). Τα Th1 κύτταρα κυριαρχούν στην οξεία απόρριψη αλλομοσχεύματος (72), αλλά υπάρχουν επίσης μελέτες που υποδηλώνουν ότι συνεισφέρουν και στη χρόνια απόρριψη στη νεφρική κυρίως μεταμόσχευση (73).

Για τη δημιουργία του υποπληθυσμού Th2, χαρακτηριστική είναι η κυτοκίνη IL-4, η οποία ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT6, ο οποίος με τη σειρά του μαζί με σήμα από τον υποδοχέα TCR ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα GATA-3. Ο GATA-3 επάγει την παραγωγή IL-4 (61). Επιπλέον, ο παράγοντας GATA-3 επάγει τον υποδοχέα χημειοκινών CCR4 και τον υποδοχέα της προσταγλανδίνης D2 CRTh2 σε ανθρώπους (74). Τέλος, άλλες κυτοκίνες που παράγονται από τα Th2 κύτταρα είναι η IL-13 και η IL-5 (61) (**Εικόνα 1.2**). Στους ανθρώπους, στη χρόνια απόρριψη αλλομοσχευμάτων, παρατηρήθηκε η έκφραση της

IL-4 στις νεφρικές βιοψίες, υποδεικνύοντας ότι τα Th2 κύτταρα κυριαρχούν κατά τη διάρκεια της χρόνιας απόρριψης (75). Οι κυτοκίνες των Th2 κυττάρων ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα, τα οποία πιστεύεται ότι μεσολαβούν στην απόρριψη αλλομοσχεύματος (76). Επιπρόσθετα, οι κυτοκίνες των Th2 κυττάρων, ιδιαίτερα η IL-4, είναι ικανές να αναστέλλουν τις αποκρίσεις των Th1 κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, έχει προ πολλού προταθεί ότι τα Th2 κύτταρα μπορούν να καθυστερήσουν και ακόμη και να αποτρέψουν την απόρριψη μοσχεύματος. Τα στοιχεία από τη βιβλιογραφία για την υποστήριξη αυτού του μηχανισμού είναι αντικρουόμενα (77), αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι η IL-4 και άλλες κυτοκίνες των Th2 κυττάρων προάγουν την απόρριψη μοσχεύματος (75,76,78,79).

Συνεχίζοντας, τα Th17 κύτταρα διαφοροποιούνται μέσω δυο μεταγραφικών παραγόντων: STAT3 και ROR γ t. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται από κυτοκίνες όπως η IL-6 και ο παράγοντας TGF- β , που μαζί επάγουν την ανάπτυξη των Th17 κυττάρων από τα παρθένα CD4⁺ T κύτταρα. Η IL-23 δρα ως «κινητήριο δύναμη» για την ωρίμανση πλήρως δεσμευμένων Th17 κυττάρων (14). Ο παράγοντας ROR γ t με τη σειρά του οδηγεί στην παραγωγή IL-17, την πιο χαρακτηριστική κυτοκίνη που παράγεται από αυτό τον υποπληθυσμό, και στην έκφραση του υποδοχέα χημειοκινών CCR6, καθώς και του υποδοχέα IL-23R (80–82). Άλλες κυτοκίνες που παράγονται είναι η IL-22 και IL-21 (14) (**Εικόνα 1.2**). Υπάρχει πλειάδα δεδομένων που καταδεικνύουν την εμπλοκή των κυτοκινών των Th17 κυττάρων στην παθογένεση της απόρριψης μοσχεύματος. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της απόρριψης μοσχεύματος με τη μεσολάβηση των κυττάρων Th17 είναι η προσέλκυση ουδετερόφιλων (μέσω της IL-17), που προκαλούν βλάβη στο αλλομόσχευμα. Στην κλινική μεταμόσχευση, οι ειδικοί δείκτες των Th17 κυττάρων είναι εύκολα

ανιχνεύσιμοι κατά την διάρκεια της οξείας απόρριψης (83–85). Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα σχετικά με το ρόλο των Th17 κυττάρων στη χρόνια απόρριψη (86–88).

Πρόσφατα, προσδιορίστηκε (89,90) ένα υποσύνολο εξειδικευμένων βοηθητικών T κυττάρων, τα θυλακικά βοηθητικά T κύτταρα (TFH) (91–93) που βοηθούν τα B κύτταρα στις ανοσιακές αποκρίσεις. Πιο συγκεκριμένα, βοηθούν στην ανάπτυξη βλαστικών κέντρων (εξειδικευμένες περιοχές εντός των δευτερογενών λεμφικών ιστών που προάγουν την ανοσία των B κυττάρων) ενώ επάγουν τον ανασυνδυασμό μετάπτωσης τάξης των ανοσοσφαιρινών και την ωρίμανση συγγένειας (94–96). Τα ανθρώπινα TFH κύτταρα εκφράζουν τον μεταγραφικό καταστολέα BCL-6 (97) και το συν-διεγερτικό μόριο ICOS (91,93). Αυτό που δεν γνωρίζουμε είναι αν τα TFH είναι ένας διακριτός υποπληθυσμός παράλληλος με τους υπόλοιπους των CD4⁺ T κυττάρων ή αν πρόκειται για μια ενδιάμεση μορφή κάποιου από όλους τους υποπληθυσμούς (94,98). Χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας κυττάρων είναι η έκφραση του υποδοχέα της χημοκίνης CXCR5 (99) που προκαλεί τη μετανάστευση τους στη ζώνη B κυττάρων σε λεμφοειδή όργανα (100,101). Για την διαφοροποίηση τους φαίνεται ότι είναι απαραίτητη η IL-6, η οποία δρα μέσω του STAT3. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή IL-21, η οποία παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ωρίμανση των B λεμφοκυττάρων (102) (**Εικόνα 1.2**). Ο ρόλος των αλλοειδικών TFH κυττάρων, στις διαμεσολαβούμενες από αλλοαντισώματα αποκρίσεις κατά την μεταμόσχευση, δεν είχε μελετηθεί μέχρι παρά πολύ πρόσφατα. Σε αυτό το πλαίσιο, σε ένα μοντέλο μεταμόσχευσης καρδιάς, η στόχευση των TFH κυττάρων, φαίνεται να κατέχει το κλινικό δυναμικό για την πρόληψη της βλάβης του μοσχεύματος που προκαλείται από αλλοαντισώματα (103).

Ένας άλλος υποπληθυσμός $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων που διαφέρει από τους υποπληθυσμούς των εκτελεστικών κυττάρων (Teff) Th1, Th2, Th17 και Tfh, είναι τα ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) (61). Αυτά αναξάρτητα αν προέρχονται από το θύμο αδένι (tTregs) ή από την περιφέρεια (pTregs) ορίζονται με την έκφραση του CD4 και του βασικού μεταγραφικού παράγοντα Foxp3. Τα Tregs διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην καταστολή της φλεγμονής, τόσο στους επιχώριους λεμφαδένες, όσο και στους ίδιους τους ιστούς. Τα Tregs με την έκφραση της αλυσίδας IL-2Ra υψηλής συγγένειας (CD25), που τα χαρακτηρίζει, ταυτοποιήθηκαν ως μείζον ρυθμιστικό υποσύνολο στο ανοσοποιητικό σύστημα (5% - 10% των $CD4^+$ T κυττάρων) (104). Τα παρθένα $CD4^+$ T κύτταρα διαφοροποιούνται σε Tregs με αντιγονική διέγερση μέσω του υποδοχέα TCR, παρουσία TGF- β και IL-2 (105). Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται ο παράγοντας STAT5 που προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 και ενεργοποιεί την έκφραση του (104) (**Εικόνα 1.2**). Επιπρόσθετα, διάφορα συνδιεγερτικά μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των Treg. Σε αυτά συγκαταλέγεται το κυτταροτοξικό αντιγόνο 4 σχετιζόμενο με T λεμφοκύτταρα (CTLA-4 ή CD152), μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη που εκφράζεται ιδιосуστατικά σε FoxP3⁺ Treg κύτταρα. Επάγεται σε συμβατικά T κύτταρα μετά την ενεργοποίηση και είναι σημαντικό για τον έλεγχο της ανοσιακής ομοιόστασης (106,107). Συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας FoxP3, προάγει την έκφραση του CTLA-4 καθώς και άλλων χαρακτηριστικών δεικτών των Treg όπως το CD25. Το CTLA-4 συνδέεται με τους υποδοχείς CD80/CD86 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων δρώντας ως ανταγωνιστής του CD28. Έχει παρατηρηθεί, ότι σε ποντίκια με έλλειψη CTLA-4 αναπτύσσονται θανατηφόρες αυτοάνοσες διαταραχές (108). Το CTLA-4 χρησιμοποιείται από τα FOXP3⁺ Tregs για να προκληθεί ανοσοκαταστολή (94,95).

Μόλις ενεργοποιηθούν, τα $CD4^+$ $FoxP3^+$ Tregs, καταστέλλουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε πολλαπλά επίπεδα. Άμεσα, αναστέλουν την ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των $CD4^+$ και $CD8^+$ T κυττάρων και έμμεσα, εμποδίζουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων μέσω της τροποποίησης της λειτουργίας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC). Άλλοι στόχοι των Tregs περιλαμβάνουν: τα B κύτταρα, τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK), τα T κύτταρα φυσικούς φονείς (NKT) και τα ιστιοκύτταρα (109–112). Σε αυτό το πλαίσιο, οι παράγοντες IL-10 και TGF- β που εκκρίνονται από τα Tregs, έχει αποδειχθεί, ότι είναι κρίσιμοι για την πρόληψη των αυτοάνοσων νόσων και για την ανοχή σε αλλομοσχεύματα (113–116) **(Εικόνα 1.2)**.

Τα $FoxP3^+$ Tregs παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή και διατήρηση ανοχής νεφρικού αλλομοσχεύματος, όπως έχει αποδειχθεί σε διάφορα μοντέλα μεταμοσχευμένων ζώων. Συγκεκριμένα, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν αποδείξει ότι τα $FoxP3^+$ Tregs διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αυθόρμητη ανοχή νεφρικού αλλομοσχεύματος σε μεταμοσχεύσεις από C57BL (H-2b) σε B10BR (H-2k)51 και από DBA/2 (H-2d) σε C57BL/6 (H-2b) ποντικούς (117–119). Σε αυτά τα μοντέλα μεταμόσχευσης μεταξύ ποντικών μη συμβατών για MHC μόρια, η ανοχή του νεφρικού μοσχεύματος εξαρτάται από τα $FoxP3^+$ Tregs. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η ειδική εξάλειψη του $FoxP3^+$ Tregs υποπληθυσμού σε DREG ποντικούς, οι οποίοι φέρουν τον υποδοχέα τοξίνης της διφθερίτιδας, καταλήγει σε απόρριψη αλλομοσχεύματος στα ανωτέρω μοντέλα νεφρικής μεταμόσχευσης (117,119).

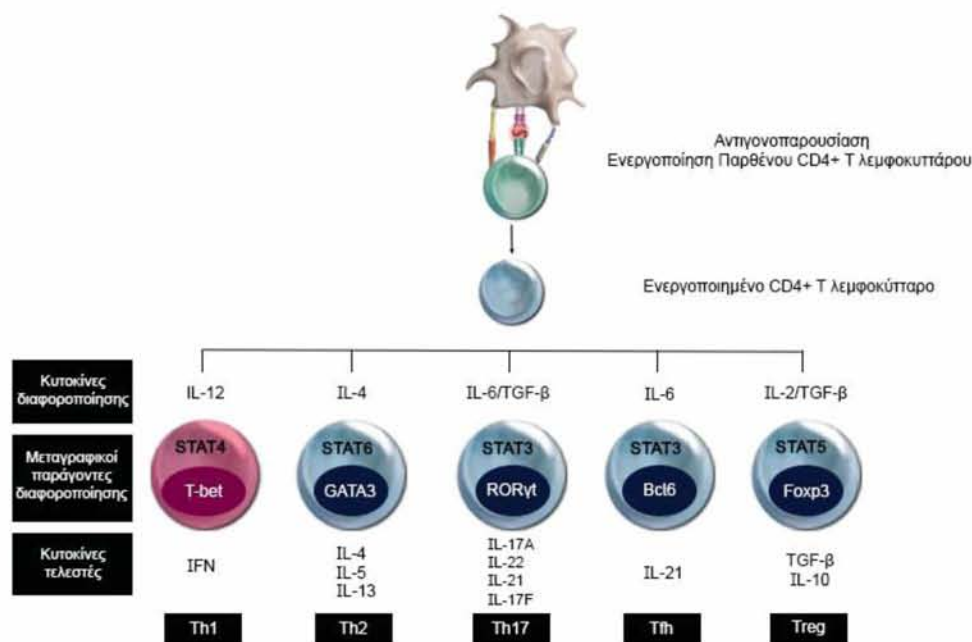
Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές μελέτες σε ανθρώπους που υποδεικνύουν έναν κρίσιμο ρόλο για τα Tregs στην επιβίωση αλλομοσχεύματος νεφρού. Υψηλά επίπεδα του $FoxP3^+$ Tregs στο περιφερικό αίμα συσχετίζονται με την επιβίωση και τη εύρυθμη

λειτουργία του νεφρικού αλλομοσχεύματος (120–125). Παράλληλα, οι παράγοντες TGF-β και IL-10 έχουν ταυτοποιηθεί και σχετίζονται με μακροχρόνια επιβίωση νεφρικού αλλομοσχεύματος (126–128). Συγκεκριμένα, ο παραγόντας TGF-β καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Th1 και Th2 κυττάρων, αναστέλλοντας την έκφραση των παραγόντων T-bet και GATA3 (129,130) και την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (131). Ιστολογικές μελέτες έχουν εξετάσει τα επίπεδα των Tregs σε ανθρώπινα νεφρικά μοσχεύματα. Σε αυτό το πλαίσιο, βρέθηκε ότι η παρουσία διηθητικών FoxP3⁺ Tregs σε δείγματα νεφρικής βιοψίας συσχετίζεται με σημαντικά βελτιωμένη λειτουργία μοσχεύματος (132). Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα FoxP3⁺ Tregs εντοπίζονται σε αλλομοσχεύματα νεφρού από ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μικτά χιμαιρικά πρωτόκολλα ανοσοκαταστολής και εμφανίζουν ανοχή, υποδηλώνοντας ότι τα Tregs μπορεί να είναι σημαντικά στην ρύθμιση της ανοχής των νεφρικών μοσχευμάτων (133,134).

Πέρα από τις παραπάνω μελέτες, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και ορισμένες που εστιάζουν στην ισορροπία μεταξύ των Treg και των διαφόρων υποειδών των T effs στη νεφρική μεταμόσχευση. Πιο συγκεκριμένα, σε ασθενείς με ανοχή για το μόσχευμα βρέθηκε μικρότερος αριθμός Th17 κυττάρων, με μειωμένη δραστηριότητα και ατελή σηματοδότηση μέσω του TCR. Τα παραπάνω οδηγούσαν σε μικρότερη παραγωγή IL-17 (135). Επιπρόσθετα, σε μια μελέτη κυτταρομετρίας ροής, μετρήθηκαν τα T λεμφοκύτταρα σε άτομα με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου πριν και μετά την μεταμόσχευση, σε ασθενείς με οξεία και χρόνια απόρριψη και τέλος σε υγιείς εθελοντές. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν κύτταρα με φαινότυπους CD4⁺IFN-γ⁺IL-17⁻ Th1, CD4⁺IFN-γ⁻IL-17⁺ Th17, CD4⁺IFN-γ⁺IL-17⁺ Th1/17 και CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg. Βρέθηκε ότι σε σταθερούς ασθενείς μετά την μεταμόσχευση ο λόγος μεταξύ

Treg προς Th17 είχε αυξηθεί πολύ, ενώ ο αριθμός όλων των T effs είχε μειωθεί. Αντίθετα, σε ασθενείς με οξεία και χρόνια απόρριψη ο λόγος των Treg προς Th1 παρέμεινε σταθερός πριν και μετά την μεταμόσχευση (136). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η επιβίωση του μοσχεύματος εξαρτάται από τη σχετική ισορροπία μεταξύ T effs και ιδιαίτερος Th17 CD4⁺ T κυττάρων έναντι των Tregs (137). Αν και ο ρόλος των Th17 κυττάρων στην απόρριψη αλλομοσχεύματος βρίσκεται υπό διερεύνηση, έχει αποδειχθεί ότι παράγοντες που παρεμποδίζουν τη διαφοροποίηση των T κυττάρων προς Treg καταστέλλουν την ανάπτυξη ανοχής στο μόσχευμα (86). Τέλος, κατά την περιμεταμοσχευτική περίοδο, η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-6, ο TNF-α, TGF-β, IL-12 και IFN-γ προάγει τους Th1 και Th17 φαινότυπους αντί των FoxP3⁺ Treg (86,138). Έτσι, παράγοντες που εμποδίζουν τη φλεγμονή στο μόσχευμα και στους νεφρικούς λεμφαδένες παράλληλα αποτρέπουν την απόρριψη και προωθούν την ανοχή (139,140).

Εν κατακλείδι, τα κύτταρα Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 και Tfh αντιπροσωπεύουν υπο-ομάδες διαφοροποιημένων εκτελεστικών CD4⁺ T-βοηθητικών κυττάρων, που δρουν ως ενορχηστρωτές στη διαμεσολάβηση ανοσολογικών ασθενειών. Επί του παρόντος, φαίνεται ότι τα κύτταρα Th1, Th2 και Th17 συνεισφέρουν στην απόρριψη αλλομοσχεύματος. Αντίθετα, τα CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs παίζουν κεντρικό ρόλο στην καθιέρωση ανοχής και είναι ικανά να καταστέλλουν όλα τα υποσύνολα των εκτελεστικών CD4⁺ T-κυττάρων στη φλεγμονή και στη μεταμόσχευση. Περαιτέρω μελέτες θα διαλευκάνουν τους υποκείμενους μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχουν τα διαφορετικά υποσύνολα των CD4⁺ T κυττάρων κατά την νεφρική μεταμόσχευση και αυτό θα διευκολύνει τη χάραξη στρατηγικών για την επίτευξη ανοχής στην κλινική πράξη.



Εικόνα 1.2. Διαφοροποίηση παρθένων βοηθητικών CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων σε εκτελεστικά και ρυθμιστικά υποείδη. Μετά από ενεργοποίηση μέσω αντιγονοπαρουσίασης, τα παρθένα CD4⁺ Τ κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ποικίλα υποσύνολα Τ βοηθητικών κυττάρων όπως Th1, Th2, Th17, Tfh και Treg. Αρχικά, ο κύριος μεταγωγέας σημάτων και επαγωγέας της μεταγραφής (STAT) ενεργοποιείται από χαρακτηριστική για κάθε υποτύπο κυτοκίνη (κυτοκίνη διαφοροποίησης). Αυτό οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης συγκεκριμένων παραγόντων-ρυθμιστών διαφοροποίησης για κάθε υποείδος CD4⁺ Τ κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, συγκεκριμένες κυτοκίνες (εκτελεστικές) απελευθερώνονται, χαρακτηριστικές για κάθε υποσύνολο βοηθητικών CD4⁺ Τ κυττάρων, οι οποίες ρυθμίζουν περαιτέρω τις ανοσολογικές αντιδράσεις ανάλογα με τα αντιγόνα.

1.3 Επιβίωση μοσχεύματος και ανοσοκαταστολή

Η σημερινή ανοσοκαταστολή μετά τη μεταμόσχευση βασίζεται κυρίως σε συνδυασμένη θεραπεία πολλαπλών φαρμάκων, με διαφορετικούς και συνεργιστικούς μηχανισμούς δράσης. Σε μια συνεργιστική φαρμακευτική αγωγή, η συγκέντρωση κάθε μεμονωμένου φαρμάκου μπορεί να μειωθεί ουσιαστικά, γεγονός το οποίο έχει ως αποτελέσματα να αποφεύγεται η δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα, χωρίς όμως να χάνεται η αποτελεσματικότητα (141). Η επιλογή του κατάλληλου ανοσοκατασταλτικού σχήματος θα πρέπει να γίνεται με βάση το μέγιστο όφελος με το μικρότερο κόστος. Επιπλέον σημαντικούς παράγοντες για τον βέλτιστο συνδυασμό των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων αποτελούν: το ιστορικό προηγούμενης μεταμόσχευσης νεφρού, ο βαθμός ιστοσυμβατότητας δότη-λήπτη, η ηλικία δότη και λήπτη και η προέλευση νεφρικού μοσχεύματος (από ζώντα ή αποβιώσαντα δότη) (141).

1.3.1. Κλασσικά ανοσοκατασταλτικά σχήματα στη μεταμόσχευση νεφρού

1.3.1.1. Κορτικοστεροειδή

Τα στεροειδή αποτελούν μέρος των ανοσοκατασταλτικών θεραπειών τα τελευταία 50 χρόνια (142,143) και εξακολουθούν να αποτελούν την αρχική πρότυπη θεραπεία παγκοσμίως. Είναι ισχυρά μη ειδικά αντιφλεγμονώδη φάρμακα, που δρουν παρεμβαίνοντας στην οδό του πυρηνικού παράγοντα κΒ (144). Μετά τη σύνδεση στον ενδοκυτταρικό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ένας αριθμός ισχυρών φλεγμονωδών κυτοκινών καταστέλλονται, οι οποίες με τη σειρά τους ασκούν ποικίλες δράσεις σε σχεδόν όλα τα ανοσοκύτταρα (141). Τα στεροειδή είναι αποτελεσματικά στην

πρόληψη, αλλά και στην αντιμετώπιση, των επεισοδίων οξείας απόρριψης. Πράγματι, σε μελέτη με 6070 ασθενείς, που είχαν λάβει μόσχευμα μεταξύ 1990-2012, απόσυρση των εν λόγω φαρμάκων μέσα στους πρώτους 18 μήνες από την χρήση τους οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για απώλεια του μοσχεύματος (145). Ωστόσο, τα στεροειδή δεν έχουν μόνο ισχυρή επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα, αλλά και μεγάλο αριθμό καλά τεκμηριωμένων παρενεργειών, ειδικά μετά από μακροχρόνια χρήση. Πράγματι, τα συγκεκριμένα φάρμακα είναι υπεύθυνα για παρενέργειες που περιλαμβάνουν μεταβολικές διαταραχές (π.χ. υπεργλυκαιμία / διαβήτη, υπέρταση και υπερλιπιδαιμία), αύξηση βάρους, καθυστέρηση ανάπτυξης, καταρράκτη, σύνδρομο Cushing, υπερτρίχωση, ατροφία δέρματος και μυών, οστεοπόρωση και οστεονέκρωση (141).

1.3.1.2. Αντιμεταβολίτες (αζαθειοπρίνη, MMF)

Η αζαθειοπρίνη και το mycophenolate mofetil (MMF) ανήκουν στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών και προκαλούν αναστολή της σύνθεσης των πουρινών και άρα την αντιγραφή του DNA (146). Η δράση του MMF είναι πιο ειδική, σχετίζεται με την αναστολή του ενζύμου ινοσινική μονοφωσφορική δεϋδρογενάση και οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή μονοφωσφορικής γουανίνης (146–149). Η ευεργετική επίδραση της αζαθειοπρίνης και του MMF στην πρόληψη της οξείας απόρριψης οφείλεται στην αδυναμία πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων Β και Τ-λεμφοκυττάρων λόγω της ανικανότητας σύνθεσης πουρινών (146–151). Ο συνδυασμός της αζαθειοπρίνης με τα κορτικοειδή ήταν το κλασσικό ανοσοκατασταλτικό σχήμα στη μεταμόσχευση νεφρού κατά την προ της εφαρμογής της κυκλοσπορίνης περίοδο (μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1970), όταν το ποσοστό ετήσιας επιβίωσης των νεφρικών μοσχευμάτων ήταν 50% και το ποσοστό επεισοδίων οξείας απόρριψης άνω του 85%. Ακολουθώντας, και μετά την

εφαρμογή της κυκλοσπορίνης, ήταν μέρος του τριπλού ανοσοκατασταλτικού σχήματος που περιελάμβανε κορτικοειδή, αζαθειοπρίνη και κυκλοσπορίνη. Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 το MMF έχει υποκαταστήσει σε σημαντικό βαθμό την αζαθειοπρίνη σε αυτό το τριπλό ανοσοκατασταλτικό σχήμα. Η υπεροχή του MMF έναντι της αζαθειοπρίνης συνίσταται κυρίως στη μείωση των επεισοδίων οξείας απόρριψης κατά τους πρώτους 6 μήνες από τη μεταμόσχευση (από 50% σε 25% των ασθενών) αλλά και της χρόνιας δυσλειτουργίας των νεφρικών μοσχευμάτων (141). Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση του MMF είναι γαστρεντερικές διαταραχές, (οισοφαγίτιδα, γαστρίτιδα, διάρροιες), αιματολογικές διαταραχές (λευκοπενία) και ευαισθησία σε λοιμώξεις (κυρίως προσβολή του γαστρεντερικού συστήματος από κυτταρομεγαλοϊό, CMV) (152–154).

1.3.1.3. Αναστολείς της καλσινευρίνης (κυκλοσπορίνη, tacrolimus)

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 η κυκλοσπορίνη προστέθηκε στην ανοσοκατασταλτική αγωγή της μεταμόσχευσης νεφρού. Ο συνδυασμός κυκλοσπορίνης, κορτικοειδών και αζαθειοπρίνης είχε ως συνέπεια τη σημαντική βελτίωση της ετήσιας επιβίωσης των νεφρικών μοσχευμάτων, η οποία ξεπέρασε το 80%. Παρά το γεγονός ότι η κυκλοσπορίνη και το tacrolimus έχουν διαφορές στη χημική τους σύνθεση παρουσιάζουν ομοιότητες στον τρόπο της ανοσοκατασταλτικής τους δράσης. Πιο συγκεκριμένα, συνδέονται με δύο διαφορετικές ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες (κυκλοφυλίνη και FK δεσμευτική πρωτεΐνη) και σχηματίζουν σύμπλοκα τα οποία αναστέλλουν τη δράση της καλσινευρίνης, η οποία είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες για την παραγωγή κυτταροκινών. Κατά συνέπεια, μειώνεται η παραγωγή της

ιντερλευκίνης-2 (IL-2) από ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα (141). Η μετα-ανάλυση, οι προοπτικές μελέτες και οι μεγάλες αναδρομικές αναλύσεις του tacrolimus και της κυκλοσπορίνης έδειξαν παρόμοιες εκβάσεις σε σχέση με την συνολική επιβίωση ασθενούς και μοσχεύματος. Οι περισσότερες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η προφύλαξη απόρριψης είναι καλύτερη με το tacrolimus αλλά απέτυχαν στο να αποδείξουν οφέλη όσον αφορά την μακροπρόθεσμη επιβίωση ασθενούς και μοσχεύματος (155–159). Κατά τη δεκαετία του 1990 το tacrolimus χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη μεταμόσχευση ήπατος και ακολούθως στη μεταμόσχευση νεφρού με καλά αποτελέσματα, όσον αφορά στην πρόληψη της οξείας απόρριψης (141). Παρ' όλα αυτά, οι CNIs, όπως η κυκλοσπορίνη, θεωρείται ότι έχουν επιβλαβή επίδραση στα Tregs (160,161). Ωστόσο, σε μια μελέτη που εξέτασε τη χορήγηση CNIs για την ατοπική δερματίτιδα με τη χρήση tacrolimus, υπήρξε σημαντική μείωση των ενδοθηλιακών κυττάρων CD25⁺ αλλά όχι των FoxP3⁺ κυττάρων (162).

Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση της κυκλοσπορίνης είναι νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα, υπερχοληστερολαιμία, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, υπερτρίχωση, υπερτροφία ούλων, γαστρεντερικές διαταραχές ή ακόμη και προβλήματα που σχετίζονται με την όραση όπως καταρράκτης (141,163). Κατά τα τελευταία χρόνια η κυκλοσπορίνη διατίθεται σε μικρογαλακτώδη μορφή, η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη απορρόφηση και καλύτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά από την παλαιότερα διαθέσιμη μορφή της. Η χορήγηση του tacrolimus συνοδεύεται από ανάλογες με την κυκλοσπορίνη ανεπιθύμητες ενέργειες, αλλά υπάρχουν διαφορές στη συχνότητα και στη βαρύτητα της εκδήλωσής τους. Από την ανάλυση βιοψιών νεφρικών μοσχευμάτων σε πρόσφατη μεγάλη πολυκεντρική μελέτη φαίνεται ότι η χορήγηση κυκλοσπορίνης ή tacrolimus συνοδεύεται από ίδιας

βαρύτητας νεφροτοξικότητα. Υπερτρίχωση και υπερτροφία ούλων παρουσιάζονται λιγότερο συχνά, ενώ η εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη είναι συχνότερη με το tacrolimus συγκριτικά με την κυκλοσπορίνη (σε 20% και 4% των ασθενών σε 12 μήνες θεραπείας αντίστοιχα). Έτσι, συνοπτικά, και τα δύο CNIs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτελεσματική πρόληψη της οξείας απόρριψης. Η επιλογή του ενός έναντι του άλλου εξαρτάται συνήθως από την συχνότητα εμφάνισης των ανεπιθύμητων ενεργειών. Βέβαια, το tacrolimus θεωρείται πρότυπη θεραπεία στα περισσότερα ιατρικά κέντρα και συνιστάται από τις κατευθυντήριες οδηγίες για τη βελτίωση των γενικών αποτελεσμάτων (KDIGO) για τις νεφρικές νόσους (141,164).

Επιπλέον οι αναστολείς της καλσινευρίνης (κυκλοσπορίνη και tacrolimus), είναι γνωστό ότι μεταβολίζονται μέσω του κυτοχρώματος P-450 και η πλειονότητα των μεταβολικών προϊόντων απεκκρίνεται στη χολή. Λόγω του μεταβολισμού τους από το σύστημα του κυτοχρώματος P-450 παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις με διάφορα φάρμακα (μακρολίδες, αναστολείς διαύλων ασβεστίου, αντιεπιληπτικά, κλπ) με αποτέλεσμα να χρειάζεται αναπροσαρμογή της δόσης για διατήρηση των επιθυμητών επιπέδων τους στην κυκλοφορία (141).

1.3.1.4. Αναστολείς mTOR (mammalian target of rapamycin) (Sirolimus – Everolimus)

Το sirolimus άρχισε να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη το 1999. Παρουσιάζει ομοιότητες στη χημική δομή με το tacrolimus, συνδέεται με τον ίδιο υποδοχέα, αλλά έχει διαφορετικό τρόπο δράσης. Αναστέλλει τη δράση ειδικής ενδοκυττάριας πρωτεΐνης (target of rapamycin, TOR), η οποία δεν σχετίζεται με την καλσινευρίνη, αλλά με την ενδοκυττάρια διαβίβαση σήματος της ιντερλευκίνης-2 (IL-2). Η mTOR είναι μια πρωτεϊνική κινάση και δημιουργεί με ρυθμιστικές πρωτεΐνες το

σύμπλοκο mTORC1. Το παραπάνω σύμπλοκο λειτουργεί ως μόριο «αισθητήρας» και όταν ενεργοποιηθεί οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και το everolimus το οποίο έχει ανάλογη δράση (141).

Η χρήση sirolimus ή everolimus παρέχει τη δυνατότητα μείωσης της δόσης των αναστολέων καλσινευρίνης ή ακόμα και διακοπής τους με σκοπό την πρόληψη ή και τον περιορισμό της νεφροτοξικότητας που προκαλείται από τα φάρμακα αυτά. Σε περίπτωση διακοπής του αναστολέα καλσινευρίνης, το ανοσοκατασταλτικό σχήμα στη μεταμόσχευση νεφρού περιλαμβάνει συνδυασμό κορτικοειδών με mycophenolate mofetil και everolimus ή sirolimus. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι η διακοπή του αναστολέα καλσινευρίνης και η αντικατάστασή του με everolimus μπορεί να συνοδεύεται από αυξημένη πιθανότητα οξείας απόρριψης, ειδικά εάν η αλλαγή αυτή γίνεται πριν από τη συμπλήρωση 6 μηνών από τη μεταμόσχευση νεφρού. Αντίθετα, το σχήμα αυτό φαίνεται ότι είναι κατάλληλο για μακροχρόνια θεραπεία συντήρησης ασθενών που δεν έχουν εμφανίσει επεισόδια οξείας απόρριψης (141). Ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην πρόληψη των επεισοδίων οξείας απόρριψης φαίνεται ότι είναι ο συνδυασμός κορτικοειδών με μικρές δόσεις αναστολέα καλσινευρίνης και everolimus ή sirolimus (165). Σε μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκε το εβερόλιμους βρέθηκε μείωση της IL-17 και αύξηση των Treg (166). Σε μελέτες με το σιρόλιμους τα αποτελέσματα σε in vitro και in vivo συστήματα μελέτης έδειξαν μείωση του αριθμού των Th17 και αύξηση των Treg (167). Επιπλέον, η ραπαμυκίνη (αναστολέας mTOR) έχει θετική επίδραση στην επιβίωση των Treg, όχι μόνο in vitro αλλά και in vivo (168–173).

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν τη δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα στον μυελό των οστών, την υπερλιπιδαιμία, το οίδημα, την ανάπτυξη λεμφοκηλών, τα προβλήματα επούλωσης τραύματος, την πνευμονίτιδα, πρωτεϊνουρία και μειωμένη

γονιμότητα (174–176). Όταν συνδυάζεται με CNIs, απαιτείται προφύλαξη από πνευμονοκύστη (π.χ. χαμηλή δόση κοτριμοξαζόλης). Οι αναδυόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως η πρωτεϊνουρία, η ανάπτυξη αντισωμάτων HLA (177), η τοξικότητα των ωοθηκών και η στειρότητα απαιτούν περισσότερη έρευνα και μια πιο προσεκτική προσέγγιση και μελέτη (178).

1.3.1.5. Αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ATG)

Οι αντι-θυμοκυτταρικές σφαιρίνες (ATGs) ή οι αντι-λεμφοκυτταρικές σφαιρίνες είναι κλάσματα πολυκλωνικών ανοσοσφαιρινών G (IgG) που έχουν απομονωθεί από τους ορούς κουνελιών ή αλόγων προηγουμένως ανοσοποιημένων με ανθρώπινα λεμφοκύτταρα από ανθρώπινο σπλήνα, αίμα, θύμο αδένες ή λεμφοβλαστικές σειρές (179). Μετά την έγχυση, προκαλούν ταχεία μείωση των ανοσοκυττάρων και ιδιαίτερα την εξάντληση των T λεμφοκυττάρων μέσω τεσσάρων γνωστών μηχανισμών: 1) εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταροτοξικότητα, 2) εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα, 3) οψωνινοποίηση και 4) επαγόμενος από την ενεργοποίηση κυτταρικός θάνατος (180–182). Επιπλέον, μπορούν να προκαλέσουν μείωση της ενεργοποίησης των T-κυττάρων από την κατασταλτική ρύθμιση του συμπλέγματος TCR/CD3 και άλλων επιφανειακών πρωτεϊνών (179). Σε αυτό το πλαίσιο, η μείωση των T-κυττάρων μετά από ATG είναι σχεδόν πλήρης (98%). Καταστρέφει περισσότερο αθώα από άλλους πληθυσμούς T-κυττάρων (δηλαδή, μνήμης και ρυθμιστικά T κύτταρα) (183). Όσον αφορά την επίδραση του φαρμάκου στα διάφορα υποείδη CD4⁺ T λεμφοκυττάρων έχει βρεθεί ότι σε επαγωγή με θυμοσφαιρίνη, οι υποπληθυσμοί αλλοδραστικών εκτελεστικών CD4⁺ T κυττάρων μειώνονται, ενώ οι πληθυσμοί Treg παραμένουν σταθεροί. Επομένως, σε σχετικό

επίπεδο αυξάνουν τα ποσοστά των ρυθμιστικών κυττάρων (184). Τα αποτελέσματα από άλλο *in vitro* σύστημα μελέτης έδειξαν ότι η rATG προκαλεί κυτταρική απόπτωση σε T λεμφοκύτταρα ενώ τα *in vivo* πειράματα της ίδια μελέτης έδειξαν αναλογική μείωση των εκτελεστικών T λεμφοκυττάρων και ταυτόχρονη αύξηση των Treg (185). Επιπρόσθετα, η αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ATG) αποτελεί ισχυρό ανοσοκατασταλτικό παράγοντα, που χρησιμοποιείται συνήθως για τη θεραπεία απορριπτικών επεισοδίων ανθεκτικών σε υψηλές δόσεις κορτικοειδών. Η χορήγηση ATG συνιστάται ως θεραπεία επαγωγής κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη μεταμόσχευση νεφρού με σκοπό την αποφυγή ή τη μείωση της χρησιμοποίησης των αναστολέων της καλσινευρίνης στη φάση της άμεσης δυσλειτουργίας του μοσχεύματος. Η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών και το υψηλό κόστος αποτελούν προβλήματα για την εφαρμογή της θεραπείας επαγωγής με ATG. Σε αυτό το πλαίσιο η χορήγηση ATG συχνά συνοδεύεται από λευκοπενία και θρομβοπενία και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ευκαιριακών λοιμώξεων (από κυτταρομεγαλοϊό, CMV) ή ανάπτυξης λεμφοϋπερπλαστικού νοσήματος από τον ιό Epstein Barr (156).

1.3.1.6. Αντίσωμα κατά των υποδοχέων της ιντερλευκίνης-2 (βασιλιξιμάμπη - δακλιζουμάμπη)

Η βασιλιξιμάμπη (basiliximab) και η δακλιζουμάμπη είναι δύο αντι-CD25 (μία αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης [IL]-2) μονοκλωνικά χημικά αντισώματα (αντι-CD25 mAb). Η πρόσδεσή τους στο CD25 οδηγεί σε αναστολή της σταθεροποίησης της IL-2 στον υποδοχέα της, που εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T κύτταρα, και κατ' επέκταση σε απενεργοποίηση των οδών JAK3 / STAT5 και PI3K /

Akt / mTOR. Κατά συνέπεια, τα ενεργοποιημένα T κύτταρα δεν είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν και μπλοκάρονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, και στη συνέχεια οδηγούνται σε κυτταρική απόπτωση (141).

Τα αντι-CD25 μονοκλωνικά αντισώματα αναπτύχθηκαν αρχικά για επαγωγικά πρωτόκολλα για την πρόληψη της οξείας απόρριψης σε δέκτες νεφρικών μοσχευμάτων (RTRs). Κατά τα τελευταία χρόνια, η χορήγηση basiliximab έχει χρησιμοποιηθεί στη μεταμόσχευση νεφρού ως θεραπεία επαγωγής. Ο συνδυασμός του basiliximab με κυκλοσπορίνη, κορτικοειδή και mycophenolate mofetil έχει οδηγήσει σε σημαντική μείωση του ποσοστού οξείας απόρριψης κατά τους πρώτους 6 μήνες από τη μεταμόσχευση (<20%). Παρά το γεγονός αυτό, η ετήσια επιβίωση των νεφρικών μοσχευμάτων δεν διαφέρει μεταξύ των ασθενών που έλαβαν ή δεν έλαβαν basiliximab, επιπλέον του κλασικού τριπλού ανοσοκατασταλτικού σχήματος (141). Ακόμη, οι επιδράσεις του αντι-CD25 mAb στα Tregs δεν είναι απολύτως σαφείς. Σε πρόσφατη μελέτη, η βασιλιξιμάμπη μείωσε όλα τα κύτταρα που φέρουν CD25, συμπεριλαμβανομένων των Tregs. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη που εξέτασε τα αποτελέσματα της χορήγησης δακλιζουμάμπης (εξανθρωπισμένο αντι-CD25 mAb) σε ασθενείς με καρδιακή μεταμόσχευση, η παραγωγή Treg στην περιφέρεια δεν επηρεάστηκε (186). Τέλος, το πλεονέκτημά του εν λόγω φαρμάκου έναντι της ATG είναι η απουσία σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει την ισχυρή αντιπορριπτική δράση της ATG. Για το λόγο αυτό δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για θεραπεία ή πρόληψη επεισοδίων οξείας απόρριψης του μοσχεύματος (141).

1.3.1.7. Αντίσωμα κατά του αντιγόνου CD52 (αλεμτουζουμάμπη)

Η αλεμτουζουμάμπη είναι ένα κυτταρολυτικό μονοκλωνικό IgG1κ αντίσωμα που δεσμεύεται με το CD52, μια γλυκοπρωτεΐνη 21-28 kDa, που εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό από διαφορετικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των B, T, NK κυττάρων, των μακροφάγων και των θυμοκυττάρων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αλεμτουζουμάμπη εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πολυκλωνικά κυτταροτοξικά αντισώματα: πρώτον, το CD52 δεν εκφράζεται στα κοκκιοκύτταρα, ερυθροκύτταρα και αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα, καθιστώντας το κυτταροτοξικό προφίλ της αλεμτουζουμάμπης πιο κατάλληλο και δεύτερον, είναι ένα κλινικά καλά ανεκτό μόριο με λιγότερες παρενέργειες που σχετίζονται με την έγχυση, όπως πυρετός, ρίγη, κεφαλαλγία, δύσπνοια, μυαλγία και υπόταση από τα πολυκλωνικά κυτταροτοξικά αντισώματα (141).

Αυτό το εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα αναπτύχθηκε αρχικά για τη θεραπεία της χρόνιας B λεμφογενούς λευχαιμίας, αλλά οι ιδιότητές του που καταστρέφουν τα T κύτταρα, έχουν προκαλέσει ενδιαφέρον στο πεδίο της μεταμόσχευσης συμπαγών οργάνων και των αυτοάνοσων ασθενειών. Όπως και με την ATG, η αλεμτουζουμάμπη επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω εξαρτώμενης από αντισώματα κυτταροτοξικότητα και μονοπατιών κυτταρικού θανάτου (141). Μειώνει το 99% των T κυττάρων και το 75% των B κυττάρων μετά την πρώτη δόση με 50% ανασύσταση της δεξαμενής T-κυττάρων μετά από 36 μήνες και συνολική ανάκτηση του πληθυσμού των B-κυττάρων μετά από 12 μήνες. Ορισμένες τυχαιοποιημένες μελέτες αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητά του (187,188), αλλά και σαφή

τοξικότητα (189,190) στη μεταμόσχευση νεφρού ως μέσο επαγωγής. Η θεραπεία επαγωγής με αυτούς τους ισχυρούς παράγοντες παρόμοια με την ATG έχει ως αποτέλεσμα αρχικά χαμηλότερους ρυθμούς απόρριψης μοσχεύματος (191–193,193,194) που επιτρέπουν την πρόωμη απόσυρση των στεροειδών και την έξοδο από το νοσοκομείο. Ωστόσο, μερικές μελέτες υποδεικνύουν αυξημένο ρυθμό απόρριψης μετά την διακοπή τους και την αύξηση των λεμφοκυττάρων που την ακολουθεί (141). Επιπλέον, δεν υπάρχουν στοιχεία για καλύτερη μακροπρόθεσμη επιβίωση μοσχεύματος σε ασθενείς που λαμβάνουν επαγωγική θεραπεία έναντι αυτών που δεν λαμβάνουν. Αντίθετα, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι οι επαγωγικές θεραπείες με παράγοντες που καταστρέφουν τα T κύτταρα φέρουν αυξημένο κίνδυνο μετεγχειρητικών ευκαιριακών λοιμώξεων και καρκίνου (185,194,195).

1.3.2. Νέας γενιάς ανοσοκατασταλτικά σχήματα στη μεταμόσχευση νεφρού

1.3.2.1. Αναστολείς του μονοπατιού ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων CD28-CD80/86

Το **μπελατασέπτ** (πρωτεΐνη σύντηξης CTLA4-Ig) αποτελεί έναν ελπιδοφόρο, νέας γενιάς, ανοσοκατασταλτικό παράγοντα που δρα σαν αναστολέας στο μονοπάτι ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασης των υποδοχέων CD28-CD80/86. Ως ανοσοκατασταλτικό, έλαβε άδεια από τον αμερικάνικο οργανισμό φαρμάκων μόλις το 2011 (196). Όσον αφορά στην αποτελεσματικότητά του, ποικίλες κλινικές μελέτες που διεξήχθησαν για διάστημα έως και 7 ετών μετά τη μεταμόσχευση, κατέδειξαν καλή νεφρική λειτουργία, με εξαιρετική ανεκτικότητα και χαμηλούς δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου στους μεταμοσχευμένους ασθενείς (π.χ. λιπίδια, αρτηριακή πίεση, διαβήτη) (141). Επιπλέον, μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει

ότι το μπελατασέπτ παρεμποδίζει την κυτταροτοξική δράση των CD8⁺ T κυττάρων καθώς και την παραγωγή IFN- γ από T κύτταρα που διηθούν το μόσχευμα (197). Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, ασθενείς που έλαβαν μπελατασέπτ εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα Treg εντός του μοσχεύματος (198). Επιπλέον, οι ασθενείς που έλαβαν μπελατασέπτ για ένα χρόνο είχαν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης αλλοαντισωμάτων και λιγότερες αλλοιώσεις αλλομοσχεύματος σε σύγκριση με αυτούς που έλαβαν κυκλοσπορίνη (199). Ωστόσο, σημαντικές παρενέργειες περιλαμβάνουν: λοιμώξεις από ιούς έρπητα και φυματίωση σε ενδημικές περιοχές και υψηλότερη συχνότητα μεταμεταμοσχευτικών λεμφοπολλαπλασιαστικών διαταραχών, ιδιαίτερα σε ασθενείς αρνητικούς για τον ιό Epstein-Barr. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το εν λόγω φάρμακο εμφανίζει επικινδυνότητα για την ανάπτυξη διαβήτη (141).

Συνοψίζοντας, μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που αντιμετωπίζει ο τομέας της μεταμόσχευσης είναι η διαχείριση της ανοσοκαταστολής. Παρόλο που η ανοσοκαταστολή είναι απαραίτητη για την πρόληψη της απόρριψης, εμπεριέχει επίσης σημαντικούς κινδύνους νοσηρότητας και θνησιμότητας για τους λήπτες των μοσχευμάτων. Η χρόνια ανοσοκαταστολή προσβάλλει τις ανοσολογικές αντιδράσεις στα μικροβιακά παθογόνα και εμποδίζει την ανοσολογική παρακολούθηση των όγκων. Συχνά, οι λοιμώξεις και οι μεταμοσχευτικοί καρκίνοι, παρά η απόρριψη αλλομοσχεύματος, είναι οι κύριοι συντελεστές της θνησιμότητας στη μεταμόσχευση, ειδικά μετά το πρώτο έτος. Εκτός από αυτές τις επιπλοκές, τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα είναι συχνά αίτια νοσηρότητας λόγω άλλων επιπτώσεων όπως η νεφροτοξικότητα, ο διαβήτης, η υπερλιπιδαιμία, η υπέρταση, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και η παχυσαρκία. Όλες αυτές οι επιπλοκές μπορεί να απαιτήσουν μείωση ή ακόμα και απόσυρση της ανοσοκαταστολής που οδηγεί σε απόρριψη και απώλεια του

μοσχεύματος (141). Συνεπώς, το κλειδί για τη βελτίωση της ανοσοκαταστολής μετά τη μεταμόσχευση είναι η επιλεκτική επίδραση στις ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι του μοσχεύματος, χωρίς να παρεμποδίζει άλλες προστατευτικές ανοσολογικές λειτουργίες ή να προκαλεί μη ειδικές τοξικότητες. Τώρα γίνεται ολοένα και πιο προφανές ότι η τελική έκβαση της απόρριψης μοσχεύματος και της ανοχής εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των T εκτελεστικών κυττάρων που συμμετέχουν στην απόρριψη και των ανοσοκατασταλτικών Tregs που την μπλοκάρουν (200). Έτσι, η καλύτερη κατανόηση της βιολογίας τόσο των Treg όσο και των T εκτελεστικών κυττάρων στα πλαίσια της μεταμόσχευσης θα οδηγούσε σε νέα γενιάς πιο αποτελεσματικά και λιγότερα τοξικά ανοσοκατασταλτικά φάρμακα.

1.4 Μεταβολισμός CD4⁺ T λεμφοκυττάρων

Ο προγραμματισμός του ανοσοποιητικού συστήματος του λήπτη με στόχο την πρόκληση ανοχής, διατηρώντας παράλληλα τις φυσιολογικές ανοσοαποκρίσεις έναντι των παθογόνων παραγόντων και των καρκινικών όγκων, υπήρξε από καιρό ο «απώτερος» στόχος των ανοσολόγων μεταμόσχευσης (201). Σε αυτό το πλαίσιο, πρόσφατα, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον κυτταρικό μεταβολισμό έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην έκβαση της ενεργοποίησης των CD4⁺ T κυττάρων καθώς και της περαιτέρω διαφοροποίησής τους προς εκτελεστικά ή ρυθμιστικά υποείδη (202).

1.4.1. Η Γλυκόλυση στην ανοσία

Η γλυκόζη αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας και βιοσύνθεσης στα ενεργοποιημένα T κύτταρα, όπως ακριβώς και στα καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν

αποδειχθεί ότι εμπλέκουν τον μεταβολισμό Warburg όταν πολλαπλασιάζονται (203). Μετά τη μεταφορά στο εσωτερικό των κυττάρων, η γλυκόζη υποβάλλεται σε αντίδραση 10 σταδίων για να δημιουργηθεί πυροσταφυλικό. Το τελευταίο μπορεί να αναχθεί είτε σε γαλακτικό από τη γαλακτική αφυδρογονάση (LDHA) στο κυτοσόλιο είτε να μεταφερθεί στα μιτοχόνδρια μέσω του συμπλέγματος του μιτοχονδριακού φορέα πυροσταφυλικού (MPC) (204,205). Εκεί μετατρέπεται σε ακετυλο- CoA από το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, μια διαδικασία που ρυθμίζεται στενά από την κινάση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDK1). Η PDK1 μπορεί να φωσφορυλιώσει το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και να αναστείλει τη δράση του (206).

Μετά την επαγόμενη από τον TCR υποδοχέα κυτταρική ενεργοποίηση, τα T κύτταρα αυξάνουν γρήγορα την πρόσληψη γλυκόζης μέσω της αυξημένης στην κυτταρική επιφάνεια έκφρασης των μεταφορέων της γλυκόζης GLUT1 (207,208). Αυτό ήταν αρχικά κάπως περίεργο, καθώς η γλυκόλυση δεν είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την παραγωγή ATP. Συγκεκριμένα, η γλυκόλυση παράγει 2 μόρια ATP από 1 μόριο γλυκόζης, ενώ η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι πολύ πιο αποτελεσματική, αφού παράγει 36 μόρια ATP από ένα μόριο γλυκόζης (206). Ωστόσο, ο γλυκολυτικός μεταβολισμός παρέχει βασικά οφέλη στα κύτταρα, διότι επιτρέπει την αναγωγή του NAD^+ σε NADH, το οποίο χρησιμοποιείται από πολυάριθμα ένζυμα. Παράλληλα επιτρέπει την εκτροπή των ενδιάμεσων προϊόντων προς άλλες βιοσυνθετικές οδούς για την υποστήριξη της αναβολικής ανάπτυξης (206).

Πολλά προ-αναπτυξιακά μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) και της επαγόμενης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK), προάγουν την κυτταρική

χρήση του γλυκολυτικού μεταβολισμού (206). Επιπρόσθετα, η γλυκόλυση προάγεται από την ενεργοποίηση του cMyc. Αυτός είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επάγει την έκφραση των: μεταφορέα γλυκόζης GLUT1, πυροσταφυλικής κινάσης, γαλακτικής αφυδρογονάσης A (LDHA) και εξοκινάσης 2 (HKII), το ένζυμο δηλαδή που καταλύει το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης (209). Αυτά τα σήματα ενεργοποίησης μαζί με αυξητικούς παράγοντες προάγουν την έντονα αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και κατ'επέκταση την γλυκόλυση. Αυτή προμηθεύει με ATP το κύτταρο, υποστηρίζει τον κύκλο του Krebs και προσφέρει ενδιάμεσους μεταβολίτες σε μια πλειάδα αντιδράσεων του μεταβολισμού. Για τους λόγους αυτούς, η γλυκόλυση συχνά παρατηρείται να κατέχει κυρίαρχο και ουσιαστικό ρόλο στον μεταβολισμό των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (206).

Όσον αφορά στα CD4⁺ T κύτταρα, είναι γνωστό ότι τα εκτελεστικά υποείδη παρουσιάζουν αύξηση της γλυκόλυσης αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους και ιδιαίτερα τα βοηθητικά Th17 (210), Th1 και Th2 κύτταρα (211). Επίσης, η αυξημένη δραστηριότητα του μονοπατιού mTOR που συσχετίζεται με αυξημένη γλυκόλυση (202) φαίνεται ότι σχετίζεται με την παραγωγή pTregs. Όμως φαίνεται να είναι επιζήμια για τη μακροπρόθεσμη επιβίωση και τη σταθερότητα των συγκεκριμένων υποειδών (212–214) (**Εικόνα 1.3**). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αναστολή της γλυκόλυσης με 2-δεοξυγλυκόζη συνετέλεσε στη μετατροπή των βοηθητικών Th17 κυττάρων σε ρυθμιστικά κύτταρα (Treg) (210). Τέλος, μια άλλη ενδιαφέρουσα πτυχή των αυξημένων επιπέδων της γλυκόλυσης στα CD4⁺ ανοσοκύτταρα είναι ο ρόλος του γλυκολυτικού ενζύμου της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) (202). Στα Th1 κύτταρα, έχει αποδειχθεί, ότι η GAPDH συνδέεται με το mRNA που κωδικοποιεί την ιντερφερόνη-γ (IFN γ), καταστέλλοντας τη μετάφρασή

του. Ωστόσο, μόλις ενεργοποιηθεί η γλυκόλυση, η GAPDH διαχωρίζεται από το mRNA της IFN γ , επιτρέποντάς το να μεταφραστεί (215,216). Επιπλέον, η GAPDH μπορεί να εισέλθει στην γλυκολυτική οδό για να προωθήσει περαιτέρω την παραγωγή ATP (202). Αυτές οι μελέτες τονίζουν και πάλι τη σχέση μεταξύ του μεταβολισμού και του φαινοτύπου ενός ανοσοκυττάρου, με τη γλυκόλυση να οδηγεί στην απόκτηση ενός περισσότερο φλεγμονώδους φαινοτύπου.

1.4.2. Η οδός των φωσφορικών πεντοζών στην ανοσία

Η οδός των φωσφορικών πεντοζών (PPP) λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και εξυπηρετεί διάφορους βασικούς σκοπούς που υποστηρίζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πρώτον, και πιο γνωστό, η οδός των φωσφορικών πεντοζών επιτρέπει την εκτροπή των ενδιάμεσων μεταβολιτών της γλυκολυτικής οδού προς την παραγωγή πρόδρομων ενώσεων νουκλεοτιδίων και αμινοξέων (μη οξειδωτικός κλάδος της οδού των φωσφορικών πεντοζών) (**Εικόνα 1.3**). Μια δεύτερη βασική λειτουργία της συγκεκριμένης μεταβολικής οδού είναι η δημιουργία ανηγμένων ισοδυνάμων του NADPH. Το NADPH έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση ενός ευνοϊκού κυτταρικού οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος ενώ παράλληλα είναι χρήσιμο ως συνένζυμο για τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα το NADPH χρησιμοποιείται από την οξειδάση του NADPH για την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής. Ως αντιστάθμισμα χρησιμοποιείται επίσης για τη παραγωγή γλουταθειόνης και άλλων αντιοξειδωτικών (οξειδωτικός κλάδος της οδού των φωσφορικών πεντοζών) (202).

1.4.3. Ο κύκλος του Krebs στην ανοσία

Ο κύκλος TCA (επίσης γνωστός ως κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs) λαμβάνει χώρα στη μήτρα του μιτοχονδρίου και είναι μια κύρια μεταβολική οδός που θεωρείται ότι χρησιμοποιείται σε μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Ο κύκλος του Krebs αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μεταβολικό μονοπάτι προς ή από το οποίο εκτρέπονται διάφοροι μεταβολίτες. Πιο συγκεκριμένα, το παραγόμενο από γλυκόζη πυροσταφυλικό ή τα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε ακετυλο-συνένζυμο Α (ακετυλο-CoA) το οποίο μέσω του TCA σχηματίζει κιτρικό. Παράλληλα, δύο κύρια προϊόντα του κύκλου του Krebs είναι τα NADH και FADH₂, τα οποία μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρόνια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων για να υποστηρίξουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την παραγωγή ATP. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την επιβίωση στους περισσότερους τύπους κυττάρων. Σήματα από αυξητικούς παράγοντες παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στη γλυκόλυση, μπορούν να προάγουν την εκτροπή ενδιάμεσων ενώσεων του κύκλου του Krebs για την παραγωγή αμινοξέων και λιπιδίων (αποκαλούμενη καταπλήρωση). Ωστόσο, αυτό απαιτεί αυξημένη εκτροπή ουσιών από άλλα μεταβολικά μονοπάτια προς τον κύκλο του Krebs (ονομαζόμενη αναπλήρωση), όπως για παράδειγμα το γλουταμινικό οξύ. Αυτό αποτελεί κρίσιμο «τροφοδοτικό» καύσιμο για τον κύκλο του Krebs μέσω της άμεσης μετατροπής του στην ενδιάμεση ένωση α-κετογλουταρικό (202).

Ο κύκλος του Krebs και η οξειδωτική φωσφορυλίωση έχουν μελετηθεί εκτεταμένα σε ανοσοκύτταρα και έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας πολύ αποδοτικός τρόπος παραγωγής ATP που χρησιμοποιείται από ανοσοκύτταρα των οποίων οι πρωταρχικές απαιτήσεις είναι η ενέργεια και η μακροζωία (202). Και οι δύο

μεταβολικές οδοί είναι πλήρως λειτουργικές στις περισσότερες υποομάδες CD4⁺ T κυττάρων (211). Ωστόσο, στα Teffs υπάρχει μια μετατόπιση προς τη γλυκόλυση, αντί του κύκλου του Krebs. Αντίθετα, τα Tregs χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο αυτή τη συγκεκριμένη οδό για να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες (202) (**Εικόνα 1.3**).

1.4.4. Οξείδωση λιπαρών οξέων και αποκρίσεις T κυττάρων

Η οξείδωση των λιπαρών οξέων κατέχει βασικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Σε αντίθεση με την αερόβια γλυκόλυση, σε πολλά ανοσοκύτταρα που δεν έχουν φλεγμονώδη φύση, παρατηρήθηκε εξάρτηση από την οξείδωση λιπαρών οξέων. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν αυξημένη κυτταρική διάρκεια ζωής, συμπεριλαμβανομένων και των Treg (202) (**Εικόνα 1.3**).

Η οδός οξείδωσης λιπαρών οξέων επιτρέπει τη μιτοχονδριακή μετατροπή των λιπαρών οξέων σε πολυάριθμα προϊόντα που το κύτταρο μπορεί περαιτέρω να χρησιμοποιήσει για να παράγει ενέργεια, συμπεριλαμβανομένων των ακετυλ-CoA, NADH και FADH₂. Συνολικά, η οξείδωση λιπαρών οξέων μπορεί να επιτρέψει την παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων ATP, με την πλήρη β-οξείδωση ενός μονού μορίου παλμιτικού οξέος που έχει τη δυνατότητα να αποδώσει πάνω από 100 μόρια ATP. Μέχρι σήμερα, η οξείδωση λιπαρών οξέων έχει παρατηρηθεί ότι ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ των Teffs και των Tregs (202). Σε αυτό το πλαίσιο έχει αποδειχθεί ότι τα Tregs παρουσιάζουν αυξημένη οξείδωση λιπαρών οξέων σε σχέση με τα εκτελεστικά Th1, Th2 και Th17 κύτταρα. Επιπλέον η οξείδωση λιπαρών οξέων προάγει τη διαφοροποίηση προς Treg και αναστέλλει την ανάπτυξη των Teffs (211) (**Εικόνα 1.3**). Συγκεκριμένα, το etomoxir, ένα φάρμακο που μπλοκάρει την οξείδωση λιπαρών οξέων, (αναστέλλοντας την παλμιτοϋλοτρανσφεράση-1 της καρνιτίνης-

CPT1α) αποτρέπει την ανάπτυξη των κυττάρων Treg. Αντίστροφα, η προσθήκη εξωγενών λιπαρών οξέων προωθεί την ανάπτυξη των παραπάνω κυττάρων, ενώ αναστέλλει ισχυρά την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών από Th1, Th2 και Th17 κύτταρα (211). Συνεπώς με την αναστολή της λειτουργία των Tregs και την επίτευξη ανοχής, η σύνδεση του ανασταλτικού υποδοχέα προγραμματισμένου θανάτου 1 (PD1) στα T κύτταρα βρέθηκε να έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση της CPT1A και κατ'επέκταση την αυξημένη οξείδωση λιπαρών οξέων (217).

1.4.5. Σύνθεση λιπαρών οξέων και ανοσολογική λειτουργία

Σε αντίθεση με την οξείδωση των λιπαρών οξέων, η σύνθεση λιπαρών οξέων φαίνεται να ρυθμίζει θετικά τη δημιουργία και τη λειτουργία των προ-φλεγμονωδών ανοσοκυττάρων τόσο των έμφυτων όσο και των επίκτητων ανοσοποιητικών συστημάτων. Η οδός σύνθεσης λιπαρών οξέων επιτρέπει στα κύτταρα να παράγουν λιπίδια που είναι απαραίτητα για κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό από πρόδρομες ενώσεις προερχόμενες από άλλες κυτταρικές ενδογενείς μεταβολικές οδούς. Η δραστηριότητα της οδού σύνθεσης λιπαρών οξέων συνδέεται στενά με την σηματοδότηση του mTOR. Ο mTOR προάγει τη σύνθεση λιπαρών οξέων μέσω της ρύθμισης πολλών από τα βασικά ένζυμα που ευθύνονται για τη de novo σύνθεση λιπιδίων όπως : SREBP (πρωτεΐνη πρόσδεσης ρυθμιστικού στοιχείου στερολών), FASN (συνθάση λιπαρού οξέος) και ACC (καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA). Η σύνθεση λιπαρών οξέων χρησιμοποιεί προϊόντα που προέρχονται από αρκετές άλλες μεταβολικές οδούς, συγκεκριμένα τη γλυκόλυση, τον κύκλο του Krebs και την οδό φωσφορικών πεντοζών. Όπως παρατηρείται στην οξείδωση λιπαρών οξέων, η ισορροπία των εκτελεστικών και των ρυθμιστικών T κυττάρων επηρεάζεται επίσης

από τη σύνθεση λιπαρών οξέων (202). Σε αυτό το πλαίσιο, η φαρμακολογική ή γενετική αναστολή της ACC1 σε υποομάδες CD4⁺ T κυττάρων έδειξε ότι η σύνθεση λιπαρών οξέων απαιτείται για τη σωστή διαφοροποίηση των κυττάρων Th17 και γενικότερα των T_H17 αλλά όχι για την παραγωγή και τη λειτουργία των κυττάρων Treg (218) (Είκονα 1.3).

1.4.6. Μεταβολισμός αμινοξέων και ανοσολογική λειτουργία

Τα αμινοξέα, ως συνέπεια της χρήσης τους ως υποστρώματα για την πρωτεϊνική σύνθεση, συνδέονται στενά με σημαντικά αναβολικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Τέτοια είναι η οδός mTOR, η σύνθεση νουκλεοτιδίων καθώς και η de novo σύνθεση λιπαρών οξέων διακλαδισμένων αλυσίδων (202). Επιπρόσθετα, μεμονωμένα αμινοξέα μπορούν να παίζουν πιο συγκεκριμένους ρόλους σε μεταβολικές οδούς. Για παράδειγμα, η πρόσληψη και ο μεταβολισμός της γλουταμίνης είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των T κυττάρων (207,219,220). Έχει βρεθεί ότι η στέρηση της γλουταμίνης παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών (207,219). Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέραμε παράπανω, η οξείδωση της γλουταμίνης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή α-κετογλουταρικού. Αυτό είναι βασικός ενδιάμεσος μεταβολίτης του κύκλου του Krebs, ο οποίος παρέχει υποστρώματα για την παραγωγή διαφόρων μακρομορίων (πχ. είναι πηγή κιτρικού για τη σύνθεση λιπαρών οξέων) (203). Ως εκ τούτου, ο μεταβολισμός της γλουταμίνης φαίνεται να ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ των εκτελεστικών T κυττάρων και των Treg. Συγκεκριμένα η γενετική απώλεια της πρωτεΐνης μεταφοράς ASCT2 (η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσληψη ουδέτερων αμινοξέων όπως η γλουταμίνη και η λευκίνη) στα CD4⁺ T κύτταρα φαίνεται να έχει ως

αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή και λειτουργία των κυττάρων Th1 και Th17. Από την άλλη, η παραγωγή των Treg κυττάρων δεν μεταβάλλεται (221) (**Είκονα 1.3**). Επιπλέον, εκτός από τον κεντρικό ρόλο του στη γλυκόλυση, ο παράγοντας cMyc προάγει την έκφραση τόσο της γλουταμινάσης όσο και των μεταφορέων γλουταμίνης (222). Στα εκτελεστικά CD4⁺ T υποείδη, αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μεταγραφικής καταστολής των microRNAs miR-23a και miR-23b, τα οποία παρεμποδίζουν την έκφραση της γλουταμινάσης (223).

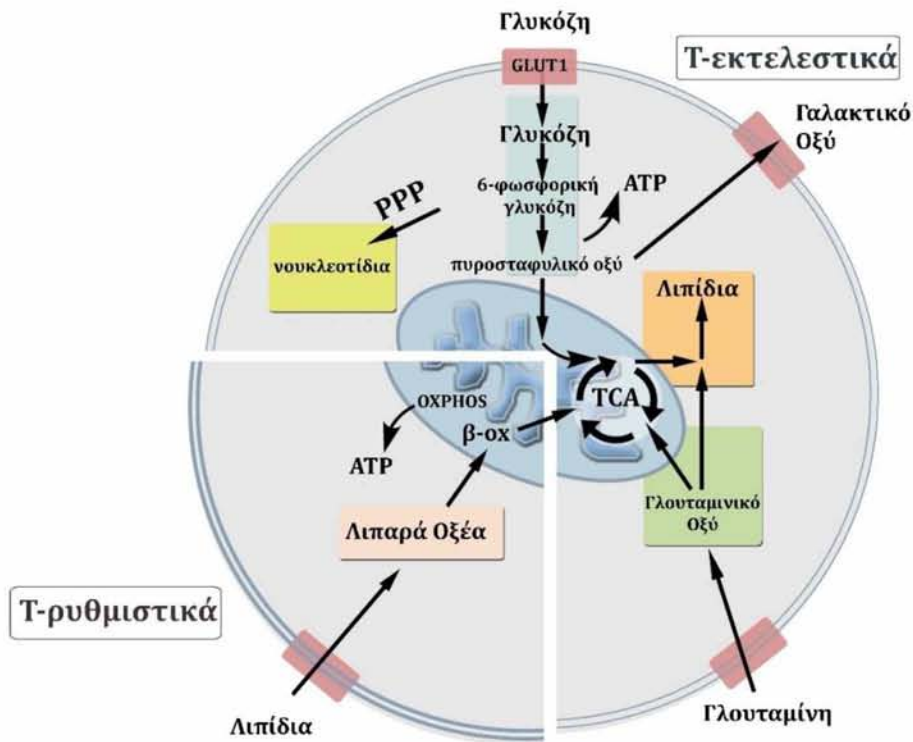
Πρόσθετα αμινοξέα, όπως η αργινίνη και η τρυπτοφάνη, μεταβολίζονται μέσω διαφόρων μεταβολικών οδών για να υποστηρίξουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αναβολική ανάπτυξη (202). Υποδεικνύοντας έναν πιθανό ανοσορυθμιστικό ρόλο για το μεταβολισμό της, η αργινίνη, έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση των συστατικών του υποδοχέα των T κυττάρων (224) και προάγει τον πολλαπλασιασμό τους (225).

Παράλληλα, όσον αφορά την τρυπτοφάνη, μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με τον ανοσορυθμιστικό ρόλο του μεταβολισμού της επικεντρώθηκε στο ένζυμο ινδολαμινο-2,3-διοξυγενάση (IDO). Αυτό είναι υπεύθυνο για το περιοριστικό στάδιο στον καταβολισμό της τρυπτοφάνης. Συνολικά, πλήθος μελετών υποδεικνύουν ένα μοντέλο στο οποίο η διαθεσιμότητα τρυπτοφάνης είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των ανοσοκυττάρων. Καταλήγουν μάλιστα στο συμπέρασμα ότι ενδέχεται να υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των ανοσοκυττάρων σχετικά με τη κατανάλωσή της τρυπτοφάνης από το μικροπεριβάλλον (226–229). Σε μια *in vitro* ανάλυση, αποδείχθηκε ότι τα T κύτταρα απαιτούν το εν λόγω αμινοξύ για να πολλαπλασιαστούν (230). Η κατανάλωση της τρυπτοφάνης από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα λοιπόν αμβλύνει την ενεργοποίησή τους (229). Αυτό συμβαίνει διότι η ανεπάρκεια

τρυπτοφάνης μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση φορτισμένων tRNAs και ενεργοποίηση της GCN2 πρωτεΐνης απόκρισης μη αναδιπλούμενων πρωτεϊνών (231). Ωστόσο, πολυάριθμες άλλες πτυχές του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικούς ρόλους στη διαμόρφωση της λειτουργίας των ανοσοκυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα αρυλο υδρογονανθράκων (AHR) (232). Μελλοντική έρευνα στον μεταβολισμό των αμινοξέων στα ανοσοκύτταρα, ιδιαίτερα για τα αμινοξέα που δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, θα μπορούσε να δώσει σημαντικές νέες γνώσεις σχετικά με τη λειτουργία των ανοσοκυττάρων.

Εν κατακλείδι, από όλα τα παράπανω διαφαίνεται ότι τα μεταβολικά σηματοδοτικά προγράμματα είναι αναπόσπαστα συνδεδεμένα με την ενεργοποίηση, διαφοροποίηση και λειτουργία των CD4⁺ T κυττάρων. Έτσι, ενώ οι κλασικές ανοσοκατασταλτικές θεραπείες στοχεύουν σε κλασσικές/μη ειδικές οδούς ενεργοποίησης T κυττάρων, θα μπορούσε να προταθεί ένα πιο επιλεκτικό μέσο ρύθμισης, που θα στοχεύει σε συγκεκριμένα μεταβολικά σηματοδοτικά προγράμματα. Ως εκ τούτου, οι εκλεκτικοί μεταβολικοί αναστολείς μπορεί να αποδειχθούν κλινικά χρήσιμοι ανοσοτροποποιητές. Στην περίπτωση της ανοσοκαταστολής, τέτοιοι παράγοντες θα είχαν το πλεονέκτημα να αναστέλλουν τη λειτουργία των εκτελεστικών CD4⁺ T κυττάρων και να ενισχύουν επίσης τη λειτουργία των ρυθμιστικών κυττάρων Treg. Σε αυτή την κατεύθυνση η στρατηγική της άμεσης αναστολής της γλυκόλυσης φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη. Έτσι, ένας ευρύς αναστολέας της γλυκόλυσης θα μπορούσε να αναστέλλει επιλεκτικά τα εκτελεστικά κύτταρα. Δεν θα επηρεάζει όμως δυσμενώς τα σωματικά ή ακόμη και τα ρυθμιστικά T κύτταρα (και τα δύο εκ των οποίων χρησιμοποιούν τη γλυκόλυση αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση

με τα εκτελεστικά) (233). Επομένως, η μελλοντική έρευνα δεν θα πρέπει να επικεντρώνεται στην αδιάκριτη ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των αποκρίσεων των Τ κυττάρων, αλλά πολύ περισσότερο στη ρύθμιση των αποκρίσεων αυτών ανάλογα με τον απαιτούμενο ανοσοποιητικό μηχανισμό. Αυτή η θεραπευτική προσέγγιση μπορεί να αξιοποιήσει την πιο ισχυρή απόκριση και να ελαχιστοποιήσει τις ανεπιθύμητες ενέργειες.



Εικόνα 1.3. Οι μεταβολικές διαφορές μεταξύ $CD4^+$ εκτελεστικών και ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων. Με την ενεργοποίησή τους τα $CD4^+$ T εκτελεστικά λεμφοκύτταρα αυξάνουν την πρόσληψη γλυκόζης, την γλυκόλυση και την γλουταμινόλυση προς κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό τους. Η γλυκόζη, όπως και το γλουταμινικό οξύ, εισέρχονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA) και προωθούν τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Το γαλακτικό οξύ παράγεται ως παραπροϊόν του γρήγορου ρυθμού της γλυκόλυσης στα εκτελεστικά T κύτταρα. Επίσης, ο μεταβολισμός της γλυκόζης στο PPP μπορεί να συμβάλλει τόσο στη σύνθεση νουκλεοτιδίων όσο και στην παραγωγή NADPH για σύνθεση λιπιδίων. Τα $CD4^+$ T ρυθμιστικά υποείδη διασπούν τα λιπαρά οξέα μέσω της β-οξειδωσης (β-οx) στα μιτοχόνδρια και παράγουν ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS).

1.5. Το διχλωροξικό οξύ (DCA)

Το DCA περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1969 (234,235) και είναι ένα μικρού μεγέθους μόριο (150 Da) με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (236) Το διχλωροξικό οξύ είναι ένα προϊόν της χλωρίωσης του νερού (237). Όταν χορηγείται δια του στόματος, με την μορφή άλατος του νατρίου απορροφάται γρήγορα και περνά τόσο την πλασματική όσο και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Επίσης, διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (237,238). Οι πρώτες έρευνες, κυρίως σε μυοσκελετικά κύτταρα, έδειξαν ότι το διχλωροξικό οξύ δρα επάγοντας την πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH), η οποία καταλύει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA (239,240). Η PDH αναστέλλεται από την κινάση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDHK) και έτσι καταστέλλεται η οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος. Με αυτόν τον τρόπο προάγεται η γλυκόλυση και η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό μέσω της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH).

Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση είναι ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο που συναντάται στο στρώμα των μιτοχονδρίων. Παρουσία ιόντων μαγνησίου και ATP, η κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την αφυδρογονάση ενώ η φωσφατάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού αντιστρέφει την αναστολή (241). Το διχλωροξικό οξύ παρεμποδίζει την PDHK. Επομένως με τη δράση του η αφυδρογονάση βρίσκεται στην μη φωσφορυλιωμένη ενεργή μορφή της (238). Κατ' επέκταση η δράση του διχλωροξικού είναι να καταστέλλει την γλυκόλυση, ενεργοποιώντας την οξείδωση του πυροσταφυλικού στα μιτοχόνδρια (242). Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί τέσσερις διαφορετικές ισομορφές της κινάσης PDHK που έχουν μεταβλητή έκφραση και ευαισθησία στην αναστολή από

το DCA. Το ισοένζυμο που εκφράζεται ιδιосуστατικά στους περισσότερους ιστούς και με την υψηλότερη ευαισθησία στο DCA είναι η ισομορφή PDHKII (243).

1.5.1 Χρήση του διχλωροξικού οξέος στην κλινική πράξη: φαρμακολογική δόση και παρενέργειες

Το φάρμακο αποαλογονώνεται σε γλυοξυλικό (το οποίο είναι ανενεργό έναντι της PDHK) μέσω της κυτοσολικής και μιτοχονδριακής zeta 1 τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GSTZ1). Η τρανσφεράση GSTZ1 είναι ένα διλειτουργικό ένζυμο το οποίο, ως ισομεράση μαλεοξικού οξέος (MAAI), καταλύει το προτελευταίο βήμα στην καταβολική οδό φαινυλαλανίνης / Q7 τυροσίνης. Το DCA δρα ως αναστολέας της GSTZ1/MAAI με αποτέλεσμα τη μειωμένη δραστικότητα και πρωτεϊνική έκφραση του ενζύμου μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση στο φάρμακο, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του στο πλάσμα (237). Τόσο η ηλικία του υποκειμένου (244) όσο και οι παραλλαγές του απλότυπου GSTZ1/MAAI (245) επηρεάζουν την κινητική του DCA στο πλάσμα και την τοξικότητα. Επιπλέον, η κάθαρση του DCA από το πλάσμα έχει βρεθεί ότι σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία τόσο σε ανθρώπους όσο και σε αρουραίους (244).

Τη δεκαετία του 1950 και 1960 μια πλειάδα από μελέτες οδήγησαν στον χαρακτηρισμό του DCA (246) ως μόριο ικανό να επιδρά στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων σε πειραματικά μοντέλα διαβήτη (234). Λίγο αργότερα ακολούθησε και η αναφορά-ορόσημο σχετικά με την επίδρασή του στη λειτουργικότητα της PDHK (235). Αυτά τα πρώιμα ευρήματα οδήγησαν σε ενδιαφέρον για τη χρήση του DCA ως αντιδιαβητικό και αντιλιπιδαιμικό φάρμακο (247), καθώς και ως φάρμακο για τη θεραπεία της μυοκαρδιακής και

εγκεφαλοαγγειακής ισχαιμίας (238,248) αλλά και επίκτητων (249,250) και συγγενών (250–252) μορφών γαλακτικής οξέωσης (253).

Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες με ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση του DCA στοχεύουν στον προσδιορισμό της βέλτιστης δόσης. Όπως αναφέρθηκε αρχικά από τους Stacropole et al. (1989), το DCA, *in vitro*, ενεργοποιεί την PDH σε συγκέντρωση 10-250 mM με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (238). Είναι αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός ότι, σύμφωνα με τους Whitehouse et al. (1973), σε μη καρκινικά κύτταρα, η *ex vivo* συγκέντρωση «κατώφλι» του DCA για επαγωγή της δραστηριότητας της PDH είναι ≤ 1 mM (235,242). Καταλήγουμε έτσι στο συμπέρασμα ότι πολύ υψηλότερες *in vitro* δόσεις μπορεί να εμφανίζουν δράσεις εκτός αυτών που αποδίδονται άμεσα στην ενεργοποίηση του εν λόγω ενζύμου. Επιπροσθέτως, *in vivo*, η αναστολή της PDK λαμβάνει χώρα ταχέως, επειδή η επαγωγική δράση του φαρμάκου είναι μετρήσιμη εντός 15-30 λεπτών μετά από μία απλή από του στόματος ή παρεντερική δόση και μειώνεται εντός 12-24 ωρών μετά τη χορήγηση (254,255). Η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας σχετίζεται χρονικά με σημαντικές μειώσεις στις συγκεντρώσεις του κυκλοφορούντος πυροσταφυλικού και γαλακτικού οξέος (254). Η μείωση του γαλακτικού στο αίμα είναι, λοιπόν, ένας χρήσιμος δείκτης για την επίδραση του DCA στη λειτουργικότητα της PDH, ενώ φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη μέχρι τουλάχιστον μια μη τοξική δόση της τάξης των 50 mg/kg στους ανθρώπους (256). Αναφέρεται, μάλιστα, ότι το DCA είναι ικανό να μειώνει τα επίπεδα γαλακτικού του αίματος σε ανθρώπους σε δόσεις τόσο χαμηλές όσο περίπου 5 mg / kg / 24h (238,257) και σε αρουραίους (που μεταβολίζουν το DCA ταχύτερα (258)) σε δόσεις περίπου 25-50 mg/kg/24 h (238). Τέλος, σε αρκετές μελέτες με ασθενείς με κληρονομική γαλακτική οξέωση στους οποίους χορηγήθηκε DCA και

ακολουθώς μετρήθηκε η δραστηριότητα της PDH σε μυϊκές βιοψίες, βρέθηκε ότι το DCA που χορηγείται σε δόσεις των 35-50 mg kg⁻¹ μειώνει τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος κατά περισσότερο από 60% και ενεργοποιεί άμεσα την PDH κατά 3-6 φορές (239,240).

Παρόλο που η φαρμακοκινητική του DCA σε υγιείς εθελοντές ακολουθεί ένα απλό μοντέλο ενός διαμερίσματος, είναι πιο πολύπλοκη σε εξαιρετικά ακραίες μη φυσιολογικές καταστάσεις όπως η σοβαρή γαλακτική οξέωση ή κίρρωση. Σε αυτό το πλαίσιο, είναι γνωστό ότι το DCA αναστέλλει τον μεταβολισμό του με έναν άγνωστο μηχανισμό και η κάθαρση του DCA μειώνεται μετά από πολλαπλές δόσεις (256). Πράγματι, αν και ο χρόνος ημιζωής στο πλάσμα μιας αρχικής από του στόματος δόσης της τάξης των 12,5-50 mg/kg DCA είναι ~ 1 ώρα, αυτός ο χρόνος αυξάνεται σε μερικές ώρες μετά από επακόλουθες δόσεις. Ωστόσο, υπάρχει ένα όριο όπου τα επίπεδα του DCA στον ορό δεν συνεχίζουν να αυξάνονται άλλο ιδιαίτερα μετά από χρόνια θεραπεία. (236). Για παράδειγμα, τα επίπεδα του DCA στον ορό, μετά από 5 χρόνια συνεχούς θεραπείας, με από του στόματος χορήγηση 25 mg/kg/ημέρα, αυξάνονται ελαφρώς μόνο, σε σύγκριση με τα επίπεδα μετά τις πρώτες δόσεις (και παραμένουν περίπου στα 100 mg/ml) (259). Αυτό που φαίνεται να εξηγεί το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι ότι το DCA πιθανόν "κλειδώνει" την PDHK σε μια παρατεταμένη ανενεργή κατάσταση. Για το λόγο αυτό η αναστολή της PDHK και κατ' επέκταση οι επιδράσεις στα επίπεδα γαλακτικού δεν είναι άμεσα αναστρέψιμα, παρά τη μείωση των επιπέδων του DCA στον ορό του αίματος (236).

Τα τελευταία 40 χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός παιδιών και ενηλίκων έχουν εκτεθεί στο DCA, συμπεριλαμβανομένων υγιών εθελοντών αλλά και ατόμων με διάφορες καταστάσεις ασθενειών. Από την πρώτη του περιγραφή το 1969 (246), το

DCA έχει βρεθεί ότι ανακουφίζει τα συμπτώματα ή τις αιμοδυναμικές συνέπειες της γαλακτικής οξέωσης όπως η σοβαρή ελονοσία, σηψαιμία, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, εγκαύματα, κίρρωση, μεταμόσχευση ήπατος και συγγενείς μιτοχονδριακές ασθένειες (236). Οι μελέτες σε καθορισμένες ομάδες ασθενών καθώς και οι τυχαιοποιημένες μελέτες χρησιμοποίησαν δόσεις που κυμαίνονται από 12,5 έως 100 mg/kg/ημέρα από το στόμα ή ενδοφλεβίως (256). Σε αυτές, αν και το DCA ήταν ευρέως αποτελεσματικό στη μείωση των επιπέδων γαλακτικού οξέος, δεν άλλαξε την πορεία της πρωτοπαθούς νόσου (για παράδειγμα της σήψης).

Επιπλέον, οι ελεγχόμενες δοκιμές χρόνιας, από του στόματος χορήγησης DCA σε ασθενείς με μιτοχονδριακές ασθένειες κατέδειξαν καλή ανεκτικότητα και ασφάλεια σε μικρά παιδιά (251,253,260), αλλά αυξημένο κίνδυνο συμπτωματικής περιφερικής νευροπάθειας σε εφήβους και ενήλικες (261), λόγω εμφανούς οξειδωτικού στρες στα περιφερικά νεύρα (262). Πράγματι, έχουν αναφερθεί περισσότερες από 40 μη τυχαιοποιημένες μελέτες DCA σε μικρές κοόρτες ασθενών. Οι πρώτες δύο τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές της χρόνιας, από του στόματος θεραπείας με DCA, σε συγγενείς μιτοχονδριακές ασθένειες αναφέρθηκαν το 2006. Στην πρώτη, μια τυφλή κλινική δοκιμή έναντι εικονικού φαρμάκου, πραγματοποιήθηκε με από του στόματος χορήγηση DCA σε δόση των 25 mg/kg/day σε 30 ασθενείς με σύνδρομο MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) (263). Οι περισσότεροι ασθενείς που έλαβαν DCA εμφάνισαν συμπτωματική περιφερική νευροπάθεια, σε σύγκριση με 4 από τους 15 που έλαβαν το εικονικό φάρμακο, οδηγώντας στον τερματισμό της μελέτης. Δεκαεπτά από τους 19 ασθενείς είχαν μερική ανάλυση των περιφερικών νευρολογικών συμπτωμάτων για 9 μήνες μετά τη διακοπή του DCA. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η περιφερική νευροπάθεια

συχνά περιπλέκει το MELAS λόγω πρωτογενών ή δευτερογενών επιδράσεων στα περιφερικά νεύρα. Για παράδειγμα, οι ασθενείς έχουν επίσης διαβήτη και σχετιζόμενη με διαβήτη περιφερική νευροπάθεια. Αντίθετα, μια άλλη τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή κλινική μελέτη με εικονικό φάρμακο σε παιδιά απέτυχε να δείξει σημαντική τοξικότητα του DCA, συμπεριλαμβανομένης της περιφερικής νευροπάθειας. Σε αυτή τη μελέτη μόνο ένα από τα 21 παιδιά με συγγενή γαλακτική οξέωση, που του χορηγήθηκε από το στόμα DCA στα 25 mg/kg/ημέρα για 6 μήνες, εμφάνισε ήπια περιφερική νευροπάθεια. Οι σειριακών μελέτες αγωγιμότητας νεύρων απέτυχαν να αποδείξουν οποιαδήποτε διαφορά στην εμφάνιση νευροπάθειας στις 2 ομάδες ασθενών (εικονικό φάρμακο έναντι DCA). Η υπνηλία και ο λήθαργος, η μυϊκή ακαμψία του άνω άκρου και ο τρόμος του χεριού αναφέρθηκαν σε έναν ασθενή σε κάθε ομάδα (260). Καταλήγοντας, η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης περιφερικής νευροπάθειας σε ενήλικες ασθενείς με MELAS μπορεί να αντιπροσωπεύει μια εγγενή προδιάθεση σε αυτή την επιπλοκή του MELAS ή στις σχετιζόμενες καταστάσεις, δηλαδή, τον σακχαρώδη διαβήτη. Επίσης, αυτή η τοξικότητα μπορεί επίσης να εξαρτάται από την ηλικία. Παρ'ολ'αυτά, η περιφερική νευροπάθεια είναι μια δυνητική παρενέργεια του DCA που φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό αναστρέψιμη.

1.5.2 Το διχλωροζικό οξύ ως νέο «μεταβολικό φάρμακο» κατά του καρκίνου

Τα καρκινικά κύτταρα καλύπτουν πολλές ή τις περισσότερες από τις βιοενεργειακές ανάγκες τους μέσω της γλυκόλυσης και όχι μέσω του μιτοχονδριακού οξειδωτικού μεταβολισμού. Αυτό είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό των όγκων που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Otto Warburg πριν από 80 χρόνια (264). Το φαινόμενο αυτό, γνωστό ως το φαινόμενο Warburg, συμβαίνει ακόμη και παρουσία

επαρκούς παροχής οξυγόνου (αερόβια γλυκόλυση) και οδηγεί σε απελευθέρωση γαλακτικού οξέος από τον όγκο (264). Την τελευταία δεκαετία το φαινόμενο Warburg έχει μελετηθεί πιο επισταμμένα υπό το φως της σύγχρονης βιολογίας και της αυξανόμενης αναγνώρισης του κεντρικού ρόλου των μιτοχονδρίων στην εξέλιξη του καρκίνου (265–270).

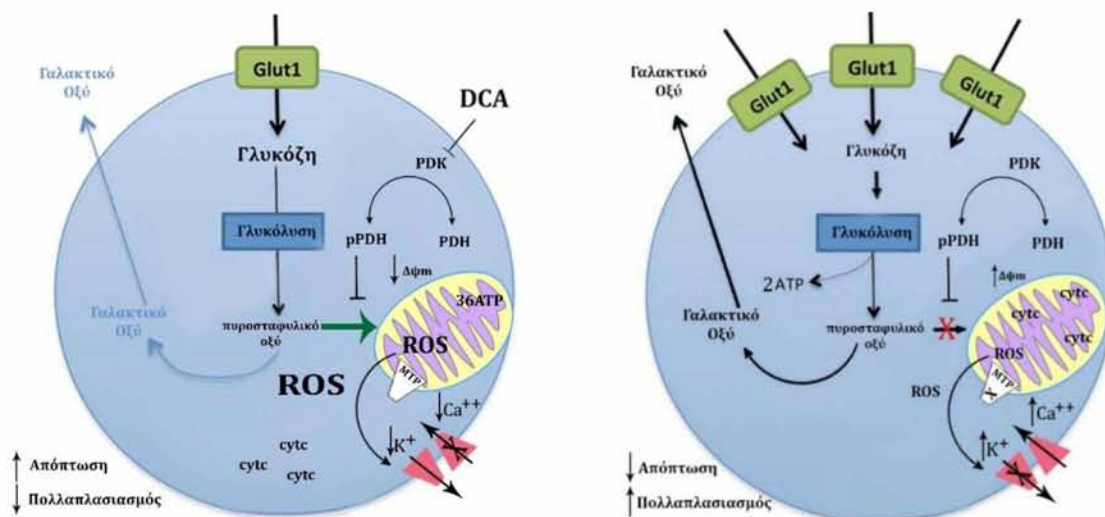
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η οξείδωση της γλυκόζης (GO) παρέχει ~ 36 μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) ανά μόριο γλυκόζης, σε σύγκριση με δύο μόρια ATP ανά γραμμομόριο γλυκόζης που παράγεται κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης (GLY). Ως εκ τούτου, αυξάνοντας την γλυκόλυση, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να είναι σε θέση να παράγουν επαρκή ποσότητα ATP (236). Για να γίνει αυτό, τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης και γλυκολυτικών ενζύμων, για να αυξήσουν την πρόσληψη γλυκόζης και να ενισχύσουν την γλυκολυτική παραγωγή ATP (271). Η μετατόπιση του μεταβολισμού της γλυκόζης από τα μιτοχόνδρια (GO) προς το κυτταρόπλασμα (GLY) καταστέλλει την απόπτωση, μια μορφή κυτταρικού θανάτου που εξαρτάται από την μιτοχονδριακή παραγωγή ενέργειας (**Εικόνα 1.4**). Πιο συγκεκριμένα, οι προ-αποπτωτικοί μεσολαβητές, όπως το κυτόχρωμα C και ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης, προστατεύονται μέσα στα μιτοχόνδρια. Η καταστολή της εισόδου του πυροσταφυλικού οξέος στα μιτοχόνδρια και συνεπώς της παραγωγής ακετυλο-CoA καταστέλλει τον κύκλο του Krebs καθώς και την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\psi_m$) καθώς και τη μείωση της παραγωγής των μιτοχονδριακών ενεργών ριζών οξυγόνου (mROS). Τα γεγονότα αυτά παρεμποδίζουν τη διάνοιξη του πόρου μεταβολής της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP) (272). Ως εκ τούτου οι παραπάνω προ-αποπτωτικοί παράγοντες δεν

απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και έτσι αναστέλλεται η απόπτωση ,ενώ επάγεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων (273) **(Εικόνα 1.4)**.

Επιπλέον, η μείωση των mROS στην καρκίνο έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των ευαίσθητων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό καναλιών K^+ της πλασματικής μεμβράνης και συγκεκριμένα του $Kv1.5$ (274). Η προκύπτουσα μείωση στην αγωγιμότητα K^+ προκαλεί αύξηση στο ενδοκυττάριο K^+ , η οποία συμβάλλει στην καταστολή της απόπτωσης, αφού τα ιόντα K^+ είναι ένας αναστολέας των κασπασών (275), κύριων μορίων τελεστών της κυτταρικής απόπτωσης (276). Η αναστολή του $Kv1.5$ έχει επίσης ως αποτέλεσμα την εκπόλωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και την ενεργοποίηση των καναλιών ασβεστίου τύπου L, αυξάνοντας το ενδοκυττάριο ασβέστιο. Το ασβέστιο μπορεί να ενεργοποιήσει πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη μιτοχονδριακή αναδιαμόρφωση, όπως ο παράγοντας NFAT (277). Αυτός είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που αυξάνει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 (B cell lymphoma-2) και ελαττώνει την έκφραση του $Kv1.5$, διατηρώντας έτσι συνθήκες ανθεκτικές στην απόπτωση (278) **(Εικόνα 1.4)**.

Υπάρχουν ενδείξεις σε κλινικές μελέτες καθώς και σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα, ότι το DCA μπορεί να συμβάλλει στη θεραπεία του καρκίνου εφόσον οδηγεί σε αυξημένη παροχή πυροσταφυλικού οξέος στα μιτοχόνδρια. Συγκεκριμένα, το DCA αύξησε το GO και εκπόλωσε τα μιτοχόνδρια, επιστρέφοντας το δυναμικό της μεμβράνης προς τα επίπεδα των μη καρκινικών κυττάρων, χωρίς να επηρεάσει τα μιτοχόνδρια των μη καρκινικών κυττάρων. Είναι αξιοσημείωτο ότι όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων "κανονικοποιήθηκαν" μετά την αύξηση του GO και της εκπόλωσης των μιτοχονδρίων. Τελικά, η απόπτωση

επάχθηκε με εκροή τόσο του κυτοχρώματος c όσο και του παράγοντα διέγερσης απόπτωσης από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα (236) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4. Μηχανισμός δράσης του DCA σε καρκινικά κύτταρα. Αριστερά: Στα

καρκινικά κύτταρα η καταστολή της εισόδου του πυροσταφυλικού οξέος στα μιτοχόνδρια καταστέλλει τόσο τον κύκλο του Krebs όσο και την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτό έχει ως συνέπεια την μείωση στην παραγωγή ROS και την αύξηση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\psi_m$) με αποτέλεσμα την αναστολή της διάνοιξης του πόρου MPTP. Καταστέλλεται έτσι η κυτταρική απόπτωση δεδομένου ότι προ-αποπτωτικοί μεσολαβητές, όπως το κυτόχρωμα C, δεν απελευθερώνονται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, η μείωση των μιτοχονδριακών ενεργών ριζών οξυγόνου (mROS) έχει επίσης ως αποτέλεσμα την αναστολή των ευαίσθητων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό καναλιών K^+ στη πλασματική μεμβράνη και συγκεκριμένα του $Kv1.5$. Η προκύπτουσα μείωση στην αγωγιμότητα K^+ προκαλεί αύξηση στο ενδοκυττάριο K^+ , η οποία συμβάλλει στην καταστολή της απόπτωσης καθώς και στην ενεργοποίηση των καναλιών ασβεστίου. Η επαγόμενη αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου μπορεί να ενεργοποιήσει πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη μιτοχονδριακή αναδιαμόρφωση. Δεξιά:

Έχει δειχθεί ότι μετά τη χορήγηση DCA όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων "κανονικοποιούνται" λόγω της αύξησης του GO και της εκπόλωσης των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης.

1.5.3 Ανοσοτροποποιητική δράση του διχλωροξικού οξέος.

Είδαμε ότι τα Tregs χρησιμοποιούν τη μιτοχονδριακή οξειδωση ενώ τα Teffs μετατρέπουν το πυροσταφυλικό οξύ, που προέρχεται από τη γλυκόζη, σε γαλακτικό. Ως εκ τούτου, το σημείο διακλάδωσης μεταξύ της γλυκόλυσης και της οξειδωσης της γλυκόζης (που ελέγχεται από την PDHK) αποτελεί έναν πιθανό στόχο για τη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ Teffs και Tregs (209). Σε αυτό το πλαίσιο, το DCA επάγει την εισροή πυροσταφυλικού οξέος στα μιτοχόνδρια, αυξάνοντας την αναλογία οξειδωσης της γλυκόζης προς τη γλυκόλυση (236). Έτσι, αναμένεται ότι μπορεί να καταστείλει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και να εκτρέψει τη διαφοροποίησή τους προς Tregs.

Στο πλαίσιο αυτό, σε *in vivo* μοντέλο μυών με άσθμα έχει βρεθεί ότι η χορήγηση 5 mg/ποντικό DCA μπορεί να αναστείλλει τη φλεγμονή των αεραγωγών. Αυτό συσχετίστηκε με μια ταυτόχρονη μείωση στην IL-5 και IL-13. Παράλληλα, CD4⁺ T κύτταρα απομονώθηκαν από τον σπλήνα ποντικών με άσθμα και ποντικών μαρτύρων και διεγέρθηκαν με αντι-CD3 και αντι-CD28 αντισώματα για 48 ώρες. Τα T κύτταρα από τα ποντίκια με άσθμα παράγαγαν υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού. Αυτή την παραγωγή ανέστειλε το DCA κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση (ήδη από 2 mM) ενώ μειώθηκε και η παραγωγή IL-5. Στην ίδια μελέτη, σε CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από υγιή άτομα καθώς και από ασθενείς με άσθμα διεγερμένα με

αντι-CD3 και αντι-CD28 αντισώματα, το DCA ανέστειλε: α) την παραγωγή γαλακτικού (με 2mM DCA), β) τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (με 20mM DCA), και την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών IL-5, IFN-γ (με 2mM DCA) και IL-17 (με 20mM DCA). Παράλληλα αυξήθηκε η παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL -10 (με 20mM DCA) και η έκφραση του Foxp3 (με 2mM DCA) στα παραπάνω κύτταρα. Έτσι, η αναστολή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων και της παραγωγής κυτοκινών θα μπορούσε εν μέρει να μεσολαβείται από τα επαγόμενα FoxP3⁺ T κύτταρα (279).

Επίσης, σε *in vivo* μοντέλο μυών της προκαλούμενης από κολλαγόνο αρθρίτιδας (CIA), ημερήσια δόση 3 mg DCA/ποντικό ανά ημέρα καθυστέρησε την έναρξη αλλά και την πρόοδο της ασθένειας. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτό το αποτέλεσμα παρατηρήθηκε μόνο σε θηλυκά ποντίκια, στα οποία η καταστροφική δράση της φλεγμονής στο οστό παρεμποδίστηκε σχεδόν πλήρως με τη χορήγηση του φαρμάκου. Ειδικότερα, οι ευεργετικές επιδράσεις του DCA στην αρθρίτιδα ήταν πιθανότατα εξαιτίας της αρνητικής ρύθμισης των Β-λεμφοκυττάρων που παράγουν αντι-CII αντισώματα μιας και τα ποντίκια που έλαβαν DCA εμφάνισαν πράγματι σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων, χωρίς να επηρεάζεται ωστόσο η απόκριση των T κυττάρων. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτό μπορεί να είναι ένα αποτέλεσμα που προκαλείται μέσω της μείωσης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-6. Η IL-6 είναι μια προ-αρθριτογόνος κυτοκίνη η οποία επηρεάζει τα Β κύτταρα, προάγοντας τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα, την παραγωγή αντισωμάτων και την αλλαγή τάξης ανοσοσφαιρινών (280–282). Πράγματι, σε θηλυκά ποντίκια, που έλαβαν DCA, παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα της IL-6 στον ορό του αίματος, σε σύγκριση με ποντίκια στα οποία

χορηγήθηκε νερό. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αποκάλυψαν για πρώτη φορά ότι η αρθρίτιδα μπορεί να ανασταλεί με χορήγηση DCA με τρόπο που εξαρτάται από τα οιστρογόνα (283).

Σε μια άλλη μελέτη, η αναστολή της αναγωγής του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό, δεν ήταν αποτελεσματική για την πρόληψη ή την επανεμφάνιση αυτοάνοσης παθολογίας σε B6.NZM.Sle1.Sle2.Sle3 (TC) ποντίκια επιρρεπή στο λύκο όταν αυτά έλαβαν 2 mg / ml DCA διαλυμένα σε πόσιμο νερό. Παρόλα αυτά, το DCA (10 mM) ανέστειλε την παραγωγή της IL-17A και αύξησε την έκφραση του Foxp3 σε CD4⁺ T κύτταρα που απομονώθηκαν από ποντίκια του παραπάνω μοντέλου. Παράλληλα μείωσε σημαντικά την αερόβια γλυκόλυση αυξάνοντας ταυτόχρονα την OXPHOS στα κύτταρα αυτά. Εντούτοις, το DCA ενίσχυσε σημαντικά το ποσοστό των Th1 κυττάρων και συνεπώς την παραγωγή της IFN-γ (284). Η IFN-γ είναι η κυρίαρχη κυτοκίνη που εμπλέκεται στη παθολογία των TC ποντικών (285). Η ενίσχυση λοιπόν της παραγωγής της από το DCA είναι πιθανώς ένας σημαντικός λόγος για τον οποίο η θεραπεία με αυτόν τον μεταβολικό αναστολέα δεν ήταν αποτελεσματική (284). Στο ίδιο πλαίσιο μία πρόσφατη πρωτεωμική μελέτη σε Th1 ανθρώπινα κύτταρα επιβεβαιώνει αυτά τα αποτελέσματα δείχνοντας ότι πράγματι η μιτοχονδριακή οξείδωση της γλυκόζης εμπλέκεται άμεσα στην παραγωγή της IFNγ (286). Έτσι, σε μοντέλα αυτο ή αλλο-ανοσίας που κυριαρχούνται από άλλους τύπους εκτελεστικών T κυττάρων και κατ'επέκταση κυτοκινών το DCA θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματικό.

Εκτός από την επίδραση του DCA στα T-λεμφοκύτταρα υπάρχουν κάποιες επιπλέον ενδείξεις σχετικά με την ανοσοτροποποιητική δράση του στα μακροφάγα. Σε αυτό το πλαίσιο, είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των φλεγμονωδών M1 μακροφάγων

εξαρτάται από την αερόβια γλυκόλυση όπως ακριβώς και των Teffs, ενώ η ενεργοποίηση των ρυθμιστικών M2 ή Mregs μακροφάγων συνεπάγεται την αύξηση της οξειδωσης λιπαρών οξέων όπως συμβαίνει και στα Tregs (287,288). Σε μια πρόσφατη *in vitro* μελέτη το DCA (20mM) κατέστειλε τη διαφοροποίηση ανθρώπινων μονοκυττάρων (M-Mφs) προς ρυθμιστικά, παράγοντας σημαντικά χαμηλότερες ποσότητες της αντιφλεγμονώδους IL-10 και υψηλότερες ποσότητες της προφλεγμονώδους IL-6, σε σύγκριση με M-Mφs που διαφοροποιήθηκαν απουσία DCA (289). Σε αντιδιαστολή με τα δεδομένα αυτά, τα στοιχεία μιας νέας, *in vitro* έρευνας έδειξαν ότι το DCA (10mM) μπορεί να καταστείλει τη μετανάστευση πρωτευνόντων περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικών (TEPMs). Επιπλέον, κατέστειλε (1,5 g / l πόσιμου νερού) τη συσσώρευση μακροφάγων σε ιστούς όγκων σε μοντέλο με κύτταρα Lewis πνευμονικού καρκινώματος (LL2). Ακόμη, σε *in vivo* πειράματα της ίδιας μελέτης, το DCA (10 mM) ανέστειλε τη μετανάστευση μακροφάγων σε matrigels που περιέχουν το υπερκείμενο υπολειμμάτων νεκρωτικών κυτταρικών. Τέλος, μελετώντας την επίδραση του DCA στη σήψη, οι ίδιοι ερευνητές, αποκάλυψαν ότι το DCA (100mg / kg ή PBS) κατέστειλε σημαντικά την έκφραση του φλεγμονώδους IL-1b σε μακροφάγα, ενώ βελτίωσε την δριμύτητα της κατάστασης σοκ που επάγεται μετά από ενέσιμη χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) (290). Επομένως, φαίνεται ότι το DCA αν και μπορεί να εμποδίσει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς ρυθμιστικά υποείδη, μπορεί ωστόσο να αναστείλλει την δράση των φλεγμονωδών M1 κυττάρων από ήδη διαφοροποιημένα μακροφάγα.

Όσον αφορά στα B λεμφοκύτταρα, είναι γνωστό ότι μετά από αντιγονική διέγερση, ο παράγοντας BAFF μπορεί να ενεργοποιήσει την οδό σηματοδότησης PI3K/Akt, η οποία αυξάνει την έκφραση του GLUT1 και άρα τον μεταβολισμό της

γλυκόζης στα κύτταρα αυτά (291,292). Σε αυτό το πλαίσιο, σε πρόσφατη μελέτη το DCA κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων σε B κύτταρα ποντικού. Επιπροσθέτως, κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό και την έκκριση αντισωμάτων σε ανθρώπινα B κύτταρα μετά από ενεργοποίηση με τον προσδέτη του TLR9, τον ODN. Στην ίδια μελέτη, ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου RAG1 (που δεν διαθέτουν ενδογενή αντισώματα), αφού ακτινοβολήθηκαν, ανασυστάθηκαν με άγριου τύπου μυελό των οστών και κατόπιν τους χορηγήθηκε νερό ελέγχου ή πόσιμο νερό που περιέχει DCA (2g/l δύο φορές την εβδομάδα). Δείχθηκε ότι η ανάκτηση των ολικών IgG αντισωμάτων στον ορό του αίματος των ζώων καταστάλθηκε απότομα με χορήγηση DCA μετά από 20 ημέρες ανασύστασης. Μέσα σε 70 ημέρες, όμως, τα επίπεδα IgG στους ποντικούς που έλαβαν DCA έφθασαν σε κανονικά επίπεδα. Στη συνέχεια, στην ίδια μελέτη, εξετάστηκε η *in vivo* εξάρτηση της παραγωγής αντισωμάτων από τους υψηλούς ρυθμούς γλυκόλυσης σε ποντικούς που ανοσοποιήθηκαν με NP-οβαλβουμίνη και υποβλήθηκαν σε αγωγή με φυσιολογικό νερό ελέγχου ή πόσιμο νερό που περιείχε DCA (2g/l δύο φορές την εβδομάδα). Τα επίπεδα των αντισωμάτων στον ορό του αίματος αξιολογήθηκαν μετά από 15 και 19 ημέρες όπου και βρέθηκε ότι η παραγωγή αντι-NP αντισωμάτων καταστάλθηκε μετά από χορήγηση DCA (293).

Στο ίδιο πλαίσιο, η ερευνητική μας ομάδα, σε προηγούμενη μελέτη, διερεύνησε την επίδραση του DCA επί της χυμικής αλλο-ανοσίας (294). Συγκεκριμένα, σε *in vitro* μοντέλο αλλοανοσίας (μονόδρομη MLRs), το DCA (1 mM) αύξησε την παραγωγή αλλοαντισωμάτων (238). Αυτό αφενός μπορεί να αποδοθεί στην άμεση επίδραση του DCA στα B κύτταρα. Δεδομένου ότι τα πλασματοκύτταρα εξαρτώνται κυρίως από τον κύκλο Krebs για την κάλυψη των υψηλών ενεργειακών αναγκών τους (220,295–297),

η επαγόμενη από DCA αυξημένη είσοδος πυροσταφυλικού στα μιτοχόνδρια μπορεί να ενίσχυσε την ικανότητά τους να παράγουν αντισώματα. Αφετέρου, δεν μπορεί να αποκλειστεί η έμμεση επίδραση του φαρμάκου. Συγκεκριμένα, κατά τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων στις MLRs, η ενισχυμένη αερόβια γλυκόλυση παρήγαγε μεγάλες ποσότητες γαλακτικού. Το γαλακτικό οξύ ενισχύει την έκφραση της αργινάσης-1 στα μυελοειδικά κατασταλτικά κύτταρα (298) και ως επακόλουθο καταστέλλεται η παραγωγή αντισωμάτων (299,300). Με τη μείωση της παραγωγής γαλακτικού οξέος, το DCA μπορεί, λοιπόν, να μειώσει την έκφραση της αργινάσης-1 και κατά συνέπεια να ενίσχυσε την παραγωγή αντισωμάτων.

Επιπλέον, αρκετές *in vivo* μελέτες έχουν εξάγει ποικίλα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση του DCA στην χυμική ανοσία. Συγκεκριμένα, σε προηγούμενη μελέτη αποδείχθηκε ότι οι ανοσοσφαιρίνες IgG και IgM αυξήθηκαν σε MLR ποντικών (επιρρεπείς σε λύκο) μετά από χορήγηση DCA, υποδηλώνοντας ανοσοποιητική ενεργοποίηση σε αυτό το στέλεχος.(301). Στην ίδια μελέτη, σε φυσιολογικά στελέχη ποντικών B6C3F1, μόνο τα επίπεδα IgG3 αυξήθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση DCA, γεγονός που συμβαδίζει με τα υψηλά επίπεδα συγκεκριμένων φλεγμονωδών κυτοκινών που παρατηρήθηκαν στα ποντίκια αυτά. Είναι γνωστό ότι η αλλαγή τάξης σε IgG3 επάγεται από IFN γ (302). Έτσι, προσδιορίστηκε κατά πόσο η χορήγηση DCA επάγει κατά προτίμηση τη διαφοροποίηση συγκεκριμένων υποπληθυσμών T-λεμφοκυττάρων που όπως αναφέρθηκε παραπάνω παράγουν συγκεκριμένες κυτοκίνες. Για το σκοπό αυτό σπληνοκύτταρα που απομονώθηκαν από τα παραπάνω ζώα διεγέρθηκαν με αντισώματα ενάντια στο αντιγόνο CD3 του υποδοχέα των T-κυττάρων και έναντι του συνδिएγερτικού υποδοχέα CD28. Η θεραπεία με DCA μείωσε στατιστικά σημαντικά την έκκριση IL-4 από λεμφοκύτταρα

αμφότερων των MRL και B6C3F1 ποντικών. Σε καλλιέργειες από ποντικούς MRL που υποβλήθηκαν σε αγωγή με DCA, η έκκριση της αντιφλεγμονώδους IL-10 ήταν σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με καλλιέργειες από ποντικούς που δεν δέχθηκαν DCA. Αντίθετα, σε καλλιέργειες από ποντίκια B6C3F1 που υπέστησαν αγωγή με DCA, η έκκριση IFN γ αυξήθηκε σημαντικά. Το συμπέρασμα ήταν ότι η θεραπεία με DCA των MRL ποντικών αύξησε τις αποκρίσεις των Th2 κυττάρων, ενώ στους ποντικούς B6C3F1 δεν υπήρχαν προφανείς επιδράσεις στις αποκρίσεις των Th2 αλλά σε αυτές των Th1 κυττάρων. Έτσι, οι αποκρίσεις αντισωμάτων και στα δύο στελέχη φαίνεται να ενισχύθηκαν με το DCA. Η παραγωγή διαφορετικών IgG υποτύπων σε κάθε μοντέλο προτείνει ότι οι διάφορες κυτοκίνες φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα στην μετάπτωση τάξης των ανοσοσφαιρινών (301).

Συμπερασματικά, δεδομένου του μηχανισμού δράσης του DCA στο μεταβολισμό των κυττάρων, καθώς και το προφίλ ασφάλειας του, μαζί με κάποιες πρώτες ενδείξεις ότι έχει ανοσοτροποιοτική δράση, το DCA θα μπορούσε να είναι ένας καλός υποψήφιος για ανοσορρύθμιση στον τομέα της μεταμόσχευσης. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, δεν έχει μελετηθεί αναλυτικά η επίδραση του DCA στο μεταβολισμό των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων ή στη διαφοροποίησή τους προς τα διαφορετικά υποείδη τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλο αλλοανοσίας. Μια τέτοια μελέτη πιθανώς θα έθετε τις βάσεις για τη δυνατότητα χρήσης του μη τοξικού αυτού φαρμάκου ως ανοσοκατασταλτικό στο πεδίο των μεταμοσχεύσεων.

1.6 Σκοπός εργασίας

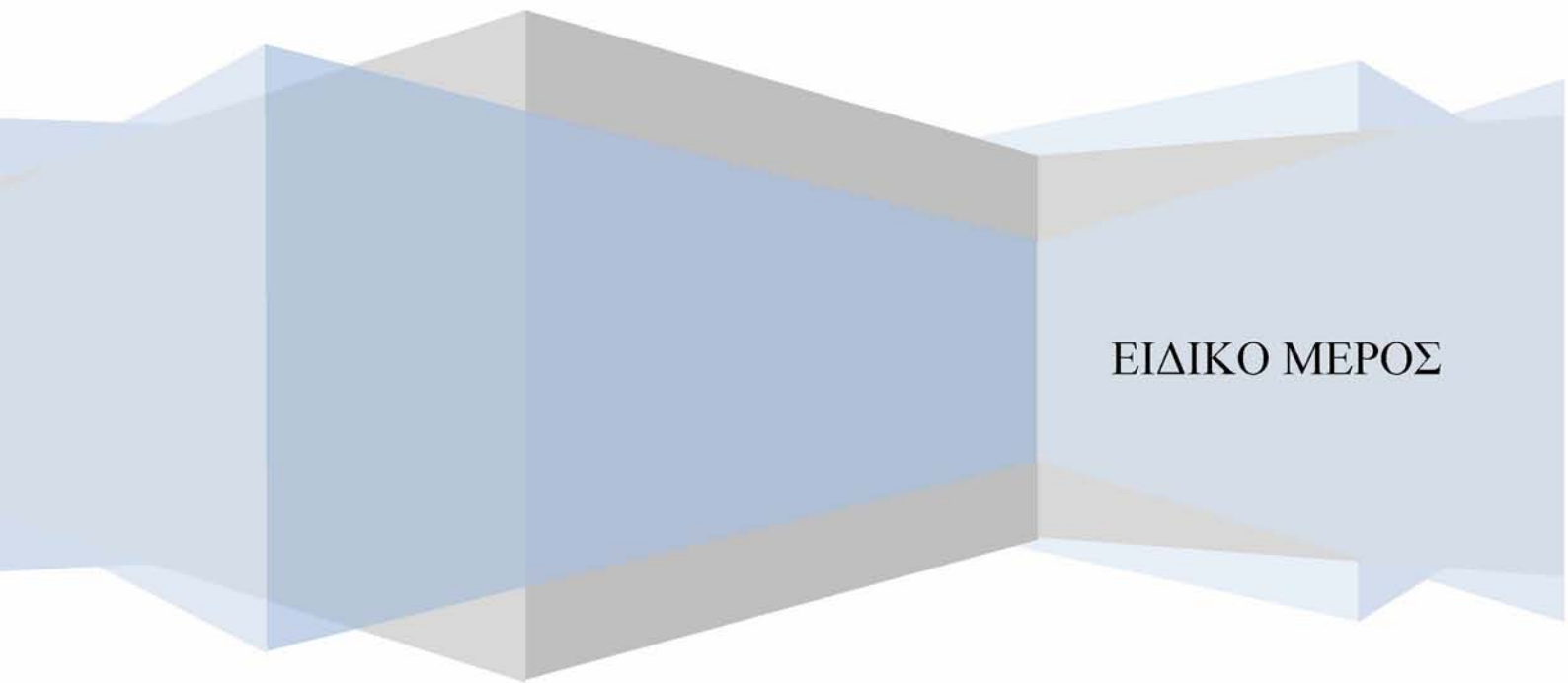
Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να διερευνηθεί η ανοσοτροποιοτική δράση του DCA σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-

λεμφοκύτταρα σε *in vitro* μοντέλο αλλο-ανοσίας (MLRs). Συγκεκριμένα, οι επιμέρους στόχοι είναι η μελέτη της επίδρασης του φαρμάκου:

- i. στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- ii. στον μεταβολισμό των κυττάρων αυτών,
- iii. στη διαφοροποίησή τους προς Tregs ή Teffs και
- iv. στην κυτταρική απόπτωση.

Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, τα Tregs χρησιμοποιούν την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την οξείδωση λιπαρών οξέων για την παραγωγή ενέργειας ενώ τα Teffs χρησιμοποιούν την αερόβια γλυκόλυση. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, υποθέτουμε ότι η επίδραση του DCA σε MLR θα έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των αλλοδραστικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων προς Tregs. Η υπόθεση στηρίζεται στο γεγονός ότι το DCA δρά στον κυτταρικό μεταβολισμό και παρεμποδίζει τη γλυκόλυση, αντιστρέφοντας το φαινόμενο Warburg. Αυτό αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα, τα T κύτταρα να μεταβολίζουν τη γλυκόζη στα μιτοχόνδρια μέσω της οξειδωτικής οδού, αντί της αερόβιας γλυκόλυσης και τελικά να εκτρέπεται η διαφοροποίησή τους προς Tregs.

Τελικός σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να προσθέσει νέα επιστημονικά δεδομένα για μια ενδεχόμενη ανοσοκατασταλτική δράση του DCA. Τα δεδομένα αυτά θα αποτελέσουν σημαντικό και απαραίτητο βήμα προς τη διεξαγωγή τόσο πειραματικών όσο και κλινικών μελέτων. Απώτερος στόχος είναι η εύρεση νέων, ασφαλέστερων και αποτελεσματικότερων θεραπευτικών λύσεων στον τομέα των μεταμοσχεύσεων.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό και εθελοντές δότες

Για τη δημιουργία αμφίδρομης μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης (MLR) χρησιμοποιήθηκαν μονοπύρρηνα κύτταρα από περιφερικό αίμα υγιών ατόμων. Συγκεκριμένα, δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από 5 υγιείς εθελοντές, μη συγγενείς (3 άρρενες και 2 θήλειες, ηλικία 33-42 ετών) οι οποίοι ήταν άτομα από το Τμήμα Νεφρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα, Ελλάδα). Η κατάσταση της υγείας τους επιβεβαιώθηκε με τον έλεγχο του ιατρικού ιστορικού τους παράλληλα με τη διεξαγωγή εργαστηριακών εξετάσεων καθώς και με εξέταση της φυσικής τους κατάστασης στα πλαίσια της πραγματοποίησης ελέγχου ρουτίνας από έμπειρο γιατρό. Για κάθε ένα από τα προαναφερθέντα άτομα που εγγράφηκε στη μελέτη διενεργήθηκε διαδικασία συναίνεσης τους σχετικά με το πρωτόκολλο μελέτης και η επιτροπή δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το ενέκρινε (απόφαση με αρ. πρ. 558/10-2-2017).

2.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC)

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απομόνωση λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα με την εφαρμογή φυγοκεντρήσεως πυκνότητας σε κλίση φικόλης (Ficoll) και μετριζιμίδης (Hypaque). Η Φικόλη είναι συνθετική ουσία υψηλού μοριακού βάρους. Λειτουργία της μετριζιμίδης είναι να δημιουργεί πυκνότητα και ώσμωση τέτοια ώστε να απομακρύνονται όλα τα υπόλοιπα υποειδη κυττάρων εκτός από τα λεμφοκύτταρα. Οι διάφοροι τύποι κυττάρων λόγω διαφορετικής πυκνότητας της μάζας τους καθιζάνουν με διαφορετική ταχύτητα στα παρασκευάσματα της Ficoll-

paque. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο ότι τα λεμφοκύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα.

Το δείγμα (αίμα) που λαμβάνεται, τοποθετείται αμέσως σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό. Το δείγμα αυτό αραιώνεται με υλικό ιστοκαλλιέργειας και επιστοιβάζεται προσεκτικά στην επιφάνεια του υγρού στρώματος φικόλης (Ficoll-Hypaque). Η φικόλη έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από εκείνη των λεμφοκυττάρων, αλλά μικρότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων (π.χ. ουδετεροφίλων). Μετά από φυγοκέντρηση, τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα διέρχονται διαμέσου της φικόλης για να σχηματίσουν ίζημα στον πυθμένα του σωληνάριου, ενώ τα λεμφοκύτταρα και ελάχιστα μονοπύρηνα παραμένουν πάνω από το στρώμα της φικόλης, στη μεσοστοιβάδα. Έτσι, μπορούν να παραληφθούν από το στρώμα διαχωρισμού. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC).

Όλες οι αιμοποιητικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε βιολογικό θάλαμο νηματικής ροής Επιπέδου II (hood), κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες, ενώ το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος από κάθε εθελοντή με σκοπό τη δημιουργία αμφίδρομης μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης (MLR) ήταν αναλυτικά το παρακάτω:

- Λήψη 20 ml περιφερικού αίματος (PB, peripheral blood) σε κωνικό σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό υλικό (ηπαρίνη 10 IU/ml)
- Επιστοιβάξη του δείγματος σε ίσο όγκο διαχωριστικού μέσου φικόλης (Ficoll Hypaque, 1.077 g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) σε κωνικά σωληνάρια
- Φυγοκέντρηση στα 1600 rpm/min για 25 min σε θερμοκρασία 18-20°C

- Λήψη της στοιβάδας των μονοπύρηνων με πιπέτα Pasteur και μεταφορά της σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο
- Προσθήκη ίσης ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI που περιέχει τα εξής διαλύματα: καλλιεργητικό μέσο RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) με 2mM L-γλουταμίνη, 10mM HEPES, 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS; Sigma - Aldrich) και 1% αντιβιοτικό - αντιμυκητιασικό διάλυμα (Sigma - Aldrich)
- Φυγοκέντρηση στα 1400 rpm/min για 10 min στους 18-20°C
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων με τη χρήση οπτικής μικροσκοπίας (Axiovert 40C; Carl Zeis AG, Oberkochen, Germany) και τη βοήθεια αιμοκυταρόμετρου (Neubauer; Paul Marienfeld GmbH & Co., KG., Lauda-Königshofen, Germany) σε διάλυμα Trypan blue (διάλυμα φωσφορικών ιόντων - PBS, pH 7.4 ± 0.1, με χρωστική trypan blue 0,4% ; Sigma – Aldrich). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται 10 μL του εναιωρήματος κυττάρων και 90 μl διαλύματος Trypan blue. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται σε 4 αντιδιαμετρικές περιοχές της πλάκας Neubauer και η συγκέντρωση των κυττάρων ανα ml, υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} / 4 \times 10 \text{ (συντελεστής αραιώσης)} \times 10^4 \text{ (κύτταρα/ml)}$$

2.3 Δημιουργία αμφίδρομης μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης (MLR)

Κατά τη μεταμόσχευση αλλογενών μοσχευμάτων είναι γνωστό ότι μεταφέρεται σημαντικός αριθμός μονοπύρηνων κυττάρων του δότη στον λήπτη, οδηγώντας σε

αμφοτερόπλευρες ανοσολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ λεμφοκυττάρων δότη και λήπτη (303). Για να μελετηθεί λεπτομερώς η ανοσοτροποποιητική δράση του διχλωροξικού οξέος σε τέτοιου είδους αντιδράσεις αλλογενών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε η αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR). Πρόκειται για μια σημαντική *ex vivo* ανοσολογική μέθοδος, που προσομοιάζει σε *in vivo* συνθήκες μεταμόσχευσης (304).

Συγκεκριμένα, μετά την απομόνωση τους, μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος από κάθε εθελοντή καλλιεργήθηκαν διασταυρούμενα με αντίστοιχου αριθμού κύτταρα ενός δεύτερου εθελοντή για την δημιουργία αμφίδρομης μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης (MLR), με ή χωρίς την παρουσία υδατικού διαλύματος διχλωροξικού οξέος 1mM, για 7 μέρες, σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI. Η προαναφερθείσα συγκέντρωση διχλωροξικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε, σύμφωνα πάντα με τη βιβλιογραφία, θεωρείται επαρκής για να αναστείλει τρία από τα τέσσερα ισοένζυμα της PDK, τα PDK1, PDK2 και PDK4 (305). Τέλος, η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο (επωαστικός θάλαμος) στους 37 °C και με 5% CO₂, ενώ η αρχική πυκνότητα ενοφθαλμισμού (inoculation density) διαφέρει ανά περίπτωση και αναφέρεται σε επόμενες παραγράφους.

2.4 Μαγνητικός διαχωρισμός CD4⁺ T λεμφοκυττάρων με την τεχνική MACS (magnetic cell sorting)

Για την μελέτη της επίδρασης του DCA στον πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων οι συν-καλλιέργειες (MLRs) πραγματοποιήθηκαν σε πηγαδάκια (wells) πλακιδίων 12 θέσεων με αρχική πυκνότητα ενοφθαλμισμού (inoculation density) 1x10⁶ κύτταρα / well με 5x10⁵ κύτταρα / well

από κάθε ένα από τους 2 εθελοντές που συμμετείχαν στην κάθε MLR. Μετά από 7 ημέρες ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία για το μαγνητικό διαχωρισμό ανθρώπινων αλλοδραστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων από κάθε MLR, όπως προβλέπεται από το πρωτόκολλο του αντίστοιχου πακέτου (CD4⁺ T cell isolation kit, Human (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany):

2.4.1 Προετοιμασία δείγματος

- Μεταφορά του περιεχομένου από κάθε well σε erpendorf
- Φυγοκέντρηση στα 5000 rpm/min για 10 min στους 4°C.
- Συλλογή του υπερκειμένου σε νέο erpendorf για περαιτέρω μετρήσεις,
- Επανάληψη της ίδιας πλύσης για μια ακόμη φορά,
- Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 40μl MACS διαλύματος (PBS εμπλουτισμένο με 0.5% αλβουμίνη βοείου ορού - BSA και 2mM Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ – EDTA) για συγκέντρωση κυττάρων <math><10^7</math>.

2.4.2 Σήμανση των κυττάρων

- Στα 40μl του εναιωρήματος των κυττάρων προστίθενται 10μl CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail (περιέχει μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των υποδοχέων CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ και CD235a συνδεδεμένα με βιοτίνη και δεσμεύουν όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς μη-στόχους, διάφορους δηλαδή των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων) για συγκέντρωση κυττάρων <math><10^7</math>.
- Μετά από καλή ανάδευση ακολουθεί επώαση για 5min στους 4°C (ψυγείο).

- Στα 50μl του ελαιωρήματος των κυττάρων προστίθενται 30μl MACS διαλύματος και ακολουθεί καλή ανάδευση
- Σήμανση των κυττάρων με προσθήκη 20μl CD4⁺ T Cell Microbead Cocktail (περιέχει μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της βιοτίνης συνδεδεμένα με μικροσφαιρίδια - Microbeads)
- Καλή ανάδευση και επώαση για 10min στους 4°C (ψυγείο).
- Στα 100μl του ελαιωρήματος των κυττάρων προστίθενται 400μl MACS διαλύματος και ακολουθεί καλή ανάδευση (για στήλες LS όπως στην περίπτωση μας απαιτούνται 500-1000 μl τελικού διαλύματος).

2.4.3 Μαγνητικός διαχωρισμός

- Τοποθέτηση της στήλης LS στο μαγνητικό πεδίο του MACS διαχωριστή (Vario MACS)
- Εέπλυμα της στήλης με 3ml MACS διαλύματος
- «Φόρτωμα» των 500μl ελαιωρήματος κυττάρων και πέρασμα αυτών από τη στήλη
- Εέπλυμα της στήλης με 3ml MACS διαλύματος (με τις πλύσεις συλλέγεται το μη σημασμένο κλάσμα του πληθυσμού, δηλαδή τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα).
- Απομάκρυνση της στήλης από τον διαχωριστή, τοποθέτηση αυτής σε ειδικό σωληνάριο και προσθήκη 5ml MACS διαλύματος. Με τη βοήθεια ενός ειδικού εμβόλου συλλέγεται ο πληθυσμός των κυττάρων που κατακρατήθηκαν στη στήλη (έκλυση CD4⁺ T κυττάρων).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση του ελαιωρήματος των κυττάρων, καταμέτρηση αυτών και αναγωγή στη επιθυμητή συγκέντρωση.

2.5 Υπολογισμός της κατανάλωσης γλυκόζης και της παραγωγής γαλακτικού οξέος σε αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR)

Για την μελέτη της επίδρασης του DCA στο μεταβολικό μονοπάτι της αερόβιας γλυκόλυσης οι συν-καλλιέργειες (MLRs) πραγματοποιήθηκαν σε πηγαδάκια (wells) πλακιδίων 12 θέσεων με αρχική πυκνότητα ενοφθαλμισμού (inoculation density) 1×10^6 κύτταρα / well με 5×10^5 κύτταρα / well από κάθε ένα από τους 2 εθελοντές που συμμετείχαν στην κάθε MLR. Μετά από 7 ημέρες το περιεχόμενο από κάθε πηγαδάκι συλλέχθηκε σε κατάλληλο κωνικό φιαλίδιο (ependorf). Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος στα 5000 rpm/min για 10 min στους 4°C και το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο ependorf. Στο συγκεκριμένο υπερκείμενο των κυτταροκαλλιιεργειών υπολογίστηκε τόσο η κατανάλωση γλυκόζης όσο και η παραγωγή του τελικού προϊόντος της αερόβιας γλυκόλυσης γαλακτικού οξέος (306) σε κάθε αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR).

Ο υπολογισμός της κατανάλωσης γλυκόζης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του γλυκοζόμετρου Element, Infopia, Titusville, USA, αφαιρώντας την συγκέντρωση της γλυκόζης που ανιχνεύτηκε στο υπερκείμενο των κυτταροκαλλιιεργειών στο τέλος κάθε πειράματος, από την συγκέντρωση που περιείχε πριν την χρήση το πλήρες καλλιιεργητικό μέσο RPMI. Την ίδια στιγμή, η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, σε 100μL δείγματος υπερκειμένου των κυτταροκαλλιιεργειών, υπολογίστηκε με τη χρήση του αναλυτή αερίων αίματος Blood Gas Analyzer Czito Medical (Moscow, Russia). Πραγματοποιήθηκαν οχτώ ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω αναφέρονται στη μέση τιμή των τριών μετρήσεων.

2.6 Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της μεθόδου BrdU

Για την μελέτη της συνολικής επίδρασης του DCA στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της σύνθεσης DNA με τη ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) πρόσληψης βρωμοδεοξουριδίνης (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Σε αυτήν την περίπτωση οι συν-καλλιέργειες με ή χωρίς την παρουσία 1mM DCA πραγματοποιήθηκαν σε πηγαδάκια (wells) πλακιδίων 96 θέσεων με αρχική πυκνότητα ενοφθαλμισμού (inoculation density) 1×10^5 κύτταρα / well (5×10^4 από κάθε ένα από τους 2 εθελοντές) με τελικό όγκο διαλύματος πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI 100μl/well. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος της οπτικής πυκνότητας που προέκυψε από τρία πηγάδια τα οποία περιείχαν όλα τα αντιδραστήρια χωρίς τα κύτταρα. Στη συνέχεια τα πιάτα τοποθετήθηκαν σε επωστήρα με θερμοκρασία 37 °C και 5 % CO₂ για 7 ημέρες.

Δώδεκα ώρες πριν την λήξη του πειράματος τοποθετήθηκαν 10μL διαλύματος BrdU σε κάθε πηγαδάκι (τελική συγκέντρωση ανά πηγάδι 10μM), δηλαδή αντιδραστηρίου 2-βρωμο-2-δεοξουριδίνης (Roche GmbH, Mannheim, Germany) αραιωμένου σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI (1:100). Τα πιάτα παρέμειναν στον επωστήρα μέχρι τη λήξη του πειράματος (δηλαδή το πέρας 7 ημερών), ώστε η BrdU να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται. Στη συνέχεια, η πλάκα φυγοκεντρήθηκε στα 300 g για 10 min και μετά από αναρρόφηση του καλλιεργητικού μέσου (υπερκείμενο) τα κύτταρα (ίζημα) αφέθηκαν να στεγνώσουν στους 60°C για τουλάχιστον 1h και αμέσως μετά προστέθηκαν 200 μL διαλύματος FixDenat (Roche GmbH, Mannheim, Germany). Το συγκεκριμένο διάλυμα

προκαλεί αποδιάταξη του DNA με στόχο να βελτιστοποιηθεί η σύνδεση της 2-βρωμο-2-δεοξυουριδίνης με το αντίστοιχο αντίσωμα που θα προστεθεί στη συνέχεια. Μετά το πέρας 30 λεπτών επώασης σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C), το περιεχόμενο των πηγαδιών αναρροφήθηκε και προσθέσαμε 100 μ L από το διάλυμα του αντισώματος anti-BrdU POD working solution σε καθένα από τα πηγάδια της πλάκας. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε με αραιώση του λυοφιλοποιημένου μονοκλωνικού αντισώματος Anti-BrdU-POD (Roche GmbH, Mannheim, Germany) προσδεμένου σε υπεροξειδάση σε 1.1 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και ακολούθησε ανάμιξη για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα που προέκυψε (AntiBrdU-stock solution) αραιώθηκε σε συγκέντρωση 1:100 με το διάλυμα Anti-BrdU dilution solution (Roche GmbH, Mannheim, Germany). Το τελευταίο αυτό στάδιο για την παρασκευή του διαλύματος Anti-BdU-working solution πραγματοποιήθηκε πέντε λεπτά πριν την τοποθέτησή του στα πιάτα των κυτταροκαλλιιεργειών, στα οποία διατηρήθηκε 120 λεπτά. Κατά το χρονικό διάστημα αυτό τα πιάτα τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα και σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C. Ακολούθησε αναρρόφηση του διαλύματος Anti-BrdU-working solution και τρεις πλύσεις σε κάθε πηγάδι με 200 μ l διαλύματος washing buffer (Roche GmbH, Mannheim, Germany), αραιωμένο με αποστειρωμένο νερό σε αναλογία 1:10. Μετά από κάθε πλύση και πριν την επόμενη πραγματοποιούνταν αναρρόφηση του περιεχομένου του κάθε πηγαδιού. Μετά από την τελευταία πλύση το περιεχόμενο του κάθε πηγαδιού αναρροφήθηκε και σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού τοποθετήθηκαν 100 μ L υποστρώματος του ενζύμου της υπεροξειδάσης 3,3',5,5'-τετραμεθυλ-βενζιδινίου (TMB) (Roche GmbH, Mannheim, Germany) σε κάθε πηγάδι για πέντε έως τριάντα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C, ώστε παρουσία της υπεροξειδάσης του αντισώματος το διάλυμα να μετατραπεί σε χρώματος μπλε. Η

πρόοδος της αντίδρασης αναστάληκε μετά την παρέλευση 5-30 λεπτών, με την προσθήκη 25 μL διαλύματος θειϊκού οξέος (stop solution) (Roche GmbH, Mannheim, Germany), η οποία μετέτρεψε το διάλυμα σε κάθε πηγάδι από μπλε σε κίτρινο. Η μέτρηση έγινε με το φασματοφωτόμετρο ELISA-reader Microplate Reader PR2100, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Redmond, WA, U.S.A και οι τιμές της οπτικής απορρόφησης έγιναν σε μήκος κύματος 450 nm, με φίλτρο αναφοράς τα 650 nm (blank). Οι τιμές οπτικής πυκνότητας του δείγματος αναφοράς αφαιρέθηκαν από αυτές των υπολοίπων ομάδων ενώ μετέπειτα οι τιμές των MLRs παρουσία DCA κανονικοποιήθηκαν με τις τιμές των ομάδων ελέγχου (MLRs απουσία DCA). Πιο συγκεκριμένα ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού (%) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο: **Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού (%) = (οπτική πυκνότητα των MLR με DCA : οπτική πυκνότητα των MLR δίχως DCA) x 100**. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν οχτώ διαφορετικές MLRs εις τριπλούν και τα αποτελέσματα αναφέρονται στη μέση τιμή των τριών μετρήσεων για κάθε μία από αυτές.

2.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η αρχή του χρωματομετρικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα η μέθοδος Bradford, στηρίζεται στη χρωστική Coomassie brilliant Blue (CBB) G- 250. Η συγκεκριμένη χρωστική CBB G- 250, έχει βρεθεί ότι έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στα μόρια των πρωτεϊνών. Πιο αναλυτικά, η χρωστική Coomassie brilliant Blue G- 250, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη κατάσταση και σε όξινο περιβάλλον έχει καστανό χρώμα και επιπλέον έχει την ιδιότητα να απορροφά στα 465nm. Όταν η συγκεκριμένη χρωστική δεσμευτεί στα μόρια των πρωτεϊνών και δημιουργηθεί το σύμπλοκο πρωτεΐνης – χρωστικής, τότε έχουμε την εμφάνιση ενός

κυανού χρώματος καθώς και μια μεταβολή του μέγιστου απορρόφησης στα 595nm, η οποία και μετράται φωτομετρικά. Η συγκεκριμένη μέθοδος προσδιορισμού των πρωτεϊνών αποτελεί μία αρκετά απλή μέθοδο, καθώς απαιτεί μια απλή ανάμιξη του πρωτεϊνικού διαλύματος με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής. Επιπλέον η μέθοδος Bradford αποτελεί και μια αρκετά ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδο προσδιορισμού των πρωτεϊνών, καθώς επιτρέπει τον προσδιορισμό έως και 1 μg πρωτεΐνης.

2.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Μετά το μαγνητικό διαχωρισμό ανθρώπινων αλλοδραστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων από κάθε MLR υπολογίστηκε η συγκέντρωση των κυττάρων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Axiovert 40C; Carl Zeis AG, Oberkochen, Germany) και τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (Neubauer; Paul Marienfeld GmbH & Co., KG., Lauda-Königshofen, Germany) με διάλυμα χρωστικής Trypan blue (Sigma – Aldrich), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.

Ίσος αριθμός CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων από κάθε MLR (5×10^5 κύτταρα) υποβλήθηκε σε λύση χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο εκχύλισης πρωτεΐνης ιστού T-PER (Thermo Fisher Scientific, Inc.) συμπληρωμένο με διάλυμα αναστολέων πρωτεάσεων όπως 4 - (2 - αμινο-αιθυλο) βενζολο-σουλφονυλο φθορίδιο, φαινυλο-μεθανο-σουλφονυλο-φθορίδιο, βεστατίνη, E-64, λευπεπτίνη, απροτινίνη και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, καθώς και με διάλυμα αναστολέων όξινων και αλκαλικών φωσφατάσεων (Sigma-Aldrich) αλλά και πρωτεϊνικών φωσφατάσεων σερίνης/θρεονίνης (PP1, PP2A, και PP2B) όπως και τυροσίνης (Roche Diagnostics).

2.7.2 Προετοιμασία διαλυμάτων- αντιδραστηρίων

Τα διαλύματα που απαιτούνταν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών ήταν:

1. **Πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης βοδιού (Bovine Serum Albumin- BSA) προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς:** Αρχικά ζυγίσαμε 0,1 gr BSA και τα διαλύσαμε σε 10 ml διπλά απεσταγμένου νερού (τελική συγκέντρωση διαλύματος 10mg/ml). Κατόπιν χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το αντιδραστήριο εκχύλισης πρωτεΐνης ιστού T-PER συμπληρωμένο με διαλύματα αναστολέων πρωτεάσεων και φωσφατάσεων όπως περιγράφεται παραπάνω παρασκευάσαμε σε κατάλληλα κωνικά φιαλίδια (eppendorf) μια σειρά διαλυμάτων αλβουμίνης με τελικές συγκεντρώσεις **2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.250 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml** και **0 mg/ml**.
2. **Αντιδραστήριο Bradford- Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma-Aldrich).**

2.7.3 Πρωτόκολλο Μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος πραγματοποιείται σε πλάκα 96 φρεατίων και ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Sigma-Aldrich).

1. Αναδεύουμε το αντιδραστήριο Bradford και το αφήνουμε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση (διατηρείται στους 2-8 °C).
2. Προετοιμάζουμε τα πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης βοδιού όπως περιγράφεται στην παράγραφο **2.7.2**.

3. Προετοιμάζουμε τα δείγματα με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.1. με μία κατά προσέγγιση τελική συγκέντρωση πρωτεϊνών **0,1-1,4 mg/ml**.

4. Στην πλάκα 96 φρεατίων προσθέτουμε, σε ξεχωριστά πηγάδια, 5 μl από κάθε πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βοδιού καθώς και από κάθε άγνωστης συγκέντρωσης δείγμα.

5. Προσθέτουμε 250 μl αντιδραστηρίου Bradford ανά φρεάτιο και αναμειγνύουμε καλά σε αναδευτήρα για ~ 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-45 λεπτά και στη συνέχεια, μετράμε την κάθε πλάκα στο φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (Microplate Reader PR2100, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Redmond, WA, U.S.A), σε μήκος κύματος 595 nm, αφού μηδενίσουμε με το τυφλό.

7. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη σε γραφική παράσταση με τις τιμές των απορροφήσεων στον άξονα ψ και τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων (pg/mL) στον άξονα χ. Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη. Αν τα δείγματα έχουν αραιωθεί υπολογίζουμε την τελική συγκέντρωση πολλαπλασιάζοντας με τον συντελεστή αραιώσης. Απορρίπτουμε τιμές που ξεφεύγουν της γραμμικότητας της καμπύλης για μεγαλύτερη ακρίβεια.

2.8 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων με πολλές εφαρμογές στη μοριακή βιολογία, βιοχημεία, πρωτεϊνική χημεία, φαρμακολογία, εγκληματολογία κ.α. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό

της καθαρότητας ενός δείγματος, για τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο του μοριακού βάρους (M.B.). Τα δείγματα που φέρουν φορτίο και μπορεί να είναι από ολόκληρα κύτταρα έως πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), αμινοξέα, φαρμακευτικές ουσίες, οργανικά οξέα και πολλά άλλα.

Η βασική αρχή της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου, ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει είτε σε χαρτί, είτε σε φιλμ, είτε σε πηκτές (gels). Οι πιο γνωστές είναι η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου και η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτές αγαρόζης, αντίστοιχα.

2.8.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πηκτή Πολυακρυλαμιδίου

Το ακρυλαμίδιο, που χρησιμοποιείται συνήθως για τη δημιουργία των πηκτών ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, είναι εξαιρετικά τοξικό και επιπλέον παρουσιάζει αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι χημικά αδρανείς και διάφανες με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) με το αντιδραστήριο N,N- μέθυλενο – δις – ακριλαμίδιο (bis – ακριλαμίδιο, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Πιο

συγκεκριμένα, η παρουσία του N,N- μέθυλενο – δις – ακρυλαμιδίου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία γεφυρών μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών του ακρυλαμιδίου, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία ενός τρισδιάστατου πολυμερούς πλέγματος με πόρους. Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς πλέγματος εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού και είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των μονομερών του ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιείται με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών, ενώ ως δότης ελευθέρων ριζών χρησιμοποιείται συνήθως το υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium PerSulfate, APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$). Σχεδόν ταυτόχρονα με το APS, κατά τη διαδικασία δημιουργίας του πολυμερούς, προστίθεται και ο καταλύτης N,N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), ο οποίος και καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού, αποσυνθέτοντας το υπερθειϊκό ιόν και δίνοντας μια ελεύθερη ρίζα. Η αντίδραση που περιγράφεται παραπάνω είναι η εξής: $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + \text{e}^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{\cdot-}$.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου μπορεί να συμβεί είτε απουσία είτε παρουσία μετουσιωτικών παραγόντων. Στην περίπτωση ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου απουσία μετουσιωτικών παραγόντων, οι πρωτεΐνες παραμένουν ενεργές και διατηρούν την ανώτερη διαμόρφωσή τους. Στη δεύτερη περίπτωση ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, παρουσία μετουσιωτικών παραγόντων, οι μετουσιωτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται συνήθως, είναι το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS) και η ουρία. Στην περίπτωση αυτή, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και λαμβάνουν τυχαία διαμόρφωση.

Κατά τη δημιουργία των πηκτών πολυακρυλαμιδίου, το μίγμα πολυμερισμού (ακρυλαμίδιο, bis- ακρυλαμίδιο, Tris- HCl, SDS, APS, TEMED) μπορεί να τοποθετηθεί είτε σε γυάλινους σωλήνες, οδηγώντας στη δημιουργία κυλινδρικών

πηκτών, είτε ανάμεσα σε δύο επίπεδα γυαλιά με σφραγισμένα τα πλαϊνά τους άκρα, οδηγώντας στη δημιουργία επίπεδων πηκτών. Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις πηκτών τα δείγματα τοποθετούνται σε οπές, οι οποίες δημιουργούνται με τη βοήθεια μιας πλαστικής οδοντωτής μήτρας που τοποθετείται στο επάνω μέρος της πηκτής και αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό.

Γενικά η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου μπορεί να είναι είτε συνεχής, είτε ασυνεχής. Κατά το σύστημα συνεχούς ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα τόσο στην πηκτή, όσο και στα δοχεία των ηλεκτροδίων και επιπλέον η πηκτή κατασκευάζεται με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου. Κατά το σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές πηκτές που τοποθετούνται η μία πάνω από την άλλη, και οι οποίες διαφέρουν ως προς τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου και το ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχουν: η πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και η πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η πηκτή επιστοίβαξης (επάνω μέρος ασυνεχούς πηκτής πολυακρυλαμιδίου) έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από την πηκτή διαχωρισμού (κάτω μέρος ασυνεχούς πηκτής πολυακρυλαμιδίου), στην οποία γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος. Η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και το διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα επιτρέπει δείγματα με μεγάλους όγκους να «συμπυκνώνονται» στην πρώτη πηκτή (stacking gel) πριν «εισέλθουν» στη δεύτερη πηκτή, όπου και διαχωρίζονται. Η διαδικασία αυτή βελτιώνει κατά πολύ την ανάλυση, καθώς όλο το δείγμα ξεκινάει να αναλύεται από το ίδιο σημείο. Αντίθετα, τα συστήματα συνεχούς ηλεκτροφόρησης, με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, επιβάλλουν τη συγκέντρωση του δείγματος σε πολύ μικρό όγκο από την αρχή.

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS – PAGE, SDS – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες SDS – PAGE, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση τη μοριακή τους μάζα. Ως αποδιατακτικό μέσο χρησιμοποιείται το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες (1,4g ανά g πρωτεΐνης). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της τριτοταγούς και δευτεροταγούς δομής. Τα σύμπλοκα πρωτεϊνών – SDS που δημιουργούνται είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή. Επιπλέον η δέσμευση του ανιονικού απορρυπαντικού στις πρωτεΐνες έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του φορτίου όλων των πρωτεϊνών, οι οποίες και φορτίζονται αρνητικά εξαιτίας της προσθήκης των θειικών ομάδων του θειικού δωδεκυλίου. Το τελευταίο εξαλείφει την επιρροή του φορτίου στην κινητικότητα των πρωτεϊνών και με τον τρόπο αυτό οι πρωτεΐνες κινούνται μόνο με βάση τη μοριακή τους μάζα. Επίσης, γίνεται δυνατή η ανάλυση όλων των πρωτεϊνών του δείγματος, καθώς τώρα κινούνται όλες προς το ίδιο ηλεκτρόδιο (άνοδο), ενώ διαφορετικά οι πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικά σημεία (pI) μεγαλύτερα του 6,8 θα μετακινούνταν προς την κάθοδο και θα χάνονταν.

Η SDS - PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες ανήκει στις μεθόδους ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης. Το μέγεθος του υπό μελέτη πρωτεϊνικού δείγματος προσδιορίζεται με τη βοήθεια δεικτών μοριακών βαρών δηλαδή μείγματα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού μεγέθους (protein ladder) που χρησιμοποιούνται ως σημεία αναφοράς. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF και ανίχνευση με ανάλυση κατά Western (χρήση ειδικών αντισωμάτων).

2.8.3 Πρωτόκολλο Μεθόδου

Σε όλα τα πειράματά μας η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με προκατασκευασμένη πηκτή πολυακρυλαμιδίου πάχους 1.0 mm (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 15-well, Thermo Fischer Scientific, Inc.) στην οποία αφού τοποθετηθεί κατάλληλα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (XCell SureLock™ Mini-Cell, Thermo Fischer Scientific) προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X) (Thermo Fischer Scientific, Inc.) αραιωμένο 20 φορές με διπλά αποσταγμένο νερό. Κατόπιν, αφαιρείται η χτένα με προσοχή ώστε να μην καταστραφούν τα πηγαδάκια και η πηκτή είναι έτοιμη για να φορτωθούν τα δείγματα. Η αντίστοιχη χωρητικότητα πηγαδιών ανέρχεται συνήθως μέχρι τα 20μl / πηγαδάκι.

Σε σωλίνες τύπου erpendorf παρασκευάζονται για κάθε δείγμα 16 μl συνολικού διαλύματος τα οποία και φορτώνονται στα πηγαδάκια αμέσως μετά την προετοιμασία τους. Τα 16μl διαλύματος δείγματος που παρασκευάζουμε περιέχουν :

1. 1,6μl αναγωγικό μέσο NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fischer Scientific, Inc.), το οποίο περιέχει διθειοθρεϊτόλη (DTT), αναγωγική ουσία που σπάει τους δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις κυστεΐνες των πρωτεϊνών και με τον τρόπο αυτό συμβάλει στην πλήρη μετουσίωσή τους,
2. 4μl ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), Thermo Fischer Scientific) το οποίο περιέχει θειϊκό δωδεκυλεστέρα λιθίου και επιτρέπει τη μέγιστη δραστηριότητα του αναγωγικού παράγοντα καθώς και κυανούν της βρωμοφαινόλης, μια χρωστική με

αρνητικά φορτισμένα μόρια (άρα θα μετακινηθεί προς την άνοδο) που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την πορεία της ηλεκτροφόρησης,

3. κατάλληλη ποσότητα δείγματος (διαφέρει από δείγμα σε δείγμα) στην οποία περιέχονται 10 μg πρωτεΐνης (ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά δείγμα γίνεται με τη μέθοδο Bradford όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7),
4. ενώ ο υπόλοιπος όγκος του διαλύματος μέχρι τα τελικά 16 μL συμπληρώνεται με διπλά απεσταγμένο νερό.

Κατόπιν, τα δείγματα θερμαίνονται για 10 λεπτά στους 70°C ώστε το SDS να προσδεθεί στις πρωτεΐνες και να δράσει η αναγωγική ουσία. Στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται για μερικά δευτερόλεπτα (spin) ώστε να απομακρυνθούν οι αδιάλυτες ουσίες (καθώς επηρεάζουν αρνητικά την ανάλυση) και να συλλεχθεί από τα τοιχώματα όλη η ποσότητα του δείγματος η οποία και φορτώνεται στα πηγαδάκια. Παράλληλα φορτώνουμε σε ξεχωριστό πηγαδάκι 5 μl δείκτη μοριακών βαρών (MagicMark XP Western Protein Standard, Thermo Fischer Scientific) και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση κάτω από σταθερή τάση 170-200 Volts για περίπου μισή ώρα έως τη στιγμή που ο δείκτης φθάσει στο τέλος της πηκτής διαχωρισμού προς την άνοδο. Στη συγκεκριμένη διδακτορική εργασία η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την υλοποίηση της παραπάνω τεχνικής, είναι η επίπεδη συσκευή ηλεκτροφόρησης της εταιρείας Thermo Fischer Scientific, PowerEase 500 Electrophoresis Power Supply. Οι διάφορες ζώνες, τα πολυπεπίδια δηλαδή που μετακινούνται μέσα στην πηκτή, ανιχνεύονται κατόπιν με ανοσοανίχνευση .

2.9 Ανάλυση κατά Western (Ανοσοαποτύπωμα)

2.9.1 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη

Οι πρωτεΐνες, που ηλεκτροφορούνται σε μία πηκτή SDS-PAGE, βρίσκονται πλέον σε μορφή συμπλόκου με το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου και επομένως φορτίζονται αρνητικά. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στο σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει την πηκτή SDS-PAGE και τη μεμβράνη, έχει ως αποτέλεσμα την κίνηση του συμπλόκου πρωτεΐνης-SDS προς την άνοδο, την έξοδο του συμπλόκου από την πηκτή και τελικά την καθήλωση του στο πλέγμα της μεμβράνης, εξαιτίας των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του συμπλόκου πρωτεΐνης-SDS και της μεμβράνης. Με τη συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπεται η ανίχνευση των πρωτεϊνών που είναι καθηλωμένες στη μεμβράνη νιτροκυταρίνης ή PVDF, με τη χρήση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων (ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος).

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε στα δικά μας πειράματα για την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από μία πηκτή SDS-PAGE σε μία μεμβράνη PVDF (Thermo Fischer Scientific, Inc.), ξεκινά με την εμβάπτιση της μεμβράνης στο διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) για λίγα λεπτά. Στην περίπτωση της μεμβράνης PVDF απαιτείται η ενεργοποίησή της σε διάλυμα μεθανόλης 100% για περίπου 1 min, πριν την εμβάπτισή της στο διάλυμα μεταφοράς. Η σύσταση του διαλύματος μεταφοράς που χρησιμοποιείται είναι η εξής: 50 ml (5% v/v) NuPAGE® Transfer Buffer (20X) (Thermo Fischer Scientific, Inc.), 100 ml (10% v/v) 100% μεθανόλη και 850 ml διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O).

Στη συνέχεια τόσο η πηκτή SDS-PAGE, όσο και η μεμβράνη τοποθετούνται στη ειδική συσκευή ηλεκτρομεταφοράς. Συγκεκριμένα, θα πρέπει η μεμβράνη να είναι τοποθετημένη στη συσκευή προς την πλευρά του θετικού πόλου (άνοδο), ενώ η πηκτή να είναι προσανατολισμένη στην πλευρά του αρνητικού πόλου (κάθοδο), αφού το σύμπλοκο πρωτεΐνης-SDS είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως κινείται προς το θετικό πόλο. Η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή είναι η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς XCell II™ Blot Module της εταιρείας Thermo Fischer Scientific. Τέλος πρέπει να επισημανθεί ότι η ηλεκτρομεταφορά λαμβάνει χώρα με ρεύμα τάσης 30 volt για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

2.9.2 Ανοσοανίχνευση

Η μέθοδος της ανοσοανίχνευσης είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που είναι καθηλωμένες πάνω σε ειδικές μεμβράνες με τη βοήθεια ενός αντισώματος. Η αρχή της συγκεκριμένης μεθοδολογίας βασίζεται στο γεγονός ότι η εκάστοτε πρωτεΐνη, η οποία είναι καθηλωμένη πάνω σε μία μεμβράνη και η οποία αποτελεί το αντιγόνο, έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το ειδικό ως προς αυτήν αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα). Στη συνέχεια το πρώτο αντίσωμα (οι ανοσοσφαιρίνες IgG) αναγνωρίζεται από ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο δεσμεύεται. Επιπλέον, το δεύτερο αυτό αντίσωμα είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο - δείκτη, το οποίο αντιδρώντας εξωγενώς με το εξειδικευμένο υπόστρωμά του, δίνει μια χαρακτηριστική χρωμοαντίδραση, η οποία καταδεικνύει και τη ζώνη του αντιγόνου πάνω στη μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατός ο εντοπισμός μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης πάνω στη μεμβράνη.

Συγκεκριμένα, μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF, παραλαμβάνεται η αντίστοιχη μεμβράνη. Ακολουθεί ένα δεκάλεπτο ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης και κατόπιν μεταφέρεται σε διάλυμα κορεσμού (blocking buffer). Η μεμβράνη αφήνεται για επώαση στο διάλυμα κορεσμού και σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση, για τουλάχιστον μισή ώρα, ώστε οι ελεύθερες ρίζες της μεμβράνης να μην αλληλεπιδράσουν με το αντίσωμα που θα προστεθεί στη συνέχεια. Η σύσταση του διαλύματος πλύσης καθώς και του διαλύματος κορεσμού έχει ως εξής:

1. Υδατικό διάλυμα πλύσης:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 20x (Thermo Fischer Scientific, Inc.), 5 % v/v
- Tween – 20, 0,1 % v/v

2. Διάλυμα Κορεσμού:

Σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, 5% w/v σε διάλυμα πλύσης

Στη συνέχεια, η μεμβράνη αφαιρείται από το διάλυμα κορεσμού και αφού προηγηθούν τρεις δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα πλύσης μεταφέρεται στο διάλυμα αντισώματος A (σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, 1% w/v σε διάλυμα πλύσης), στο οποίο προστίθεται και το κατάλληλο πρώτο αντίσωμα, στην επιθυμητή αραιώση. Η μεμβράνη αφήνεται για επώαση στο συγκεκριμένο διάλυμα υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 4°C.

Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, η μεμβράνη αφαιρείται από το διάλυμα αντισώματος A και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης. Το ξέπλυμα της μεμβράνης γίνεται με διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις για συνολικά 1 ½ ώρα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα αντισώματος A, στο οποίο αυτή τη

φορά προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση. Στα πειράματα μας το δεύτερο αντίσωμα ήταν πάντα ανοσοσφαιρίνες IgG εναντίον κουνελιού (anti-rabbit) συζευγμένες με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου, για τον εντοπισμό της ζώνης του αντιγόνου στη μεμβράνη (Cell signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), και χρησιμοποιείται πάντα σε αραιώση 1:1000. Η επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα αντισώματος A, το οποίο περιέχει το δεύτερο αντίσωμα, γίνεται για περίπου μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Ακολουθούν διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης συνολικής διάρκειας δύο ωρών περίπου με το διάλυμα πλύσης.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence-ECL) και τη χρήση ειδικού πακέτου της GenScript (Luminosensor Plus Chemiluminescent HRP Substrate kit, GenScript, Piscataway, NJ, USA). Όλη η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο και έχει ως εξής:

- Προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου υπεροξειδάση του χρένου στη μεμβράνη και επώαση για 5 λεπτά
- Έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ σε διάφορους χρόνους μέσα σε ειδική κασετίνα (Kodak)
- Ξέπλυμα του φιλμ στα ακόλουθα διαλύματα διαδοχικά: Developer για την εμφάνιση του σήματος και κατόπιν Fixer για σταθεροποίηση του σήματος,
- Η μεμβράνη ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό και αφού στεγνώσει φυλάσσεται σε σκοτεινό χώρο στους 4°C.
- Τέλος, η *in silico* ανάλυση των πρωτεϊνικών μπαντών της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Image J (version 1.49; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Στο πλαίσιο αυτό η β-ακτίνη

χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου για την ομαλοποίηση των επιπέδων της πρωτεϊνικής έκφρασης όλων των παραγόντων που ανιχνεύτηκαν επιβεβαιώνοντας ότι η φόρτωση πρωτεΐνης είναι η ίδια σε όλη την γέλη.

Για επανάληψη της ανοσοανίχνευσης με το ίδιο αντίσωμα ή για επώαση με διαφορετικό (reprobing) στην ήδη χρησιμοποιημένη μεμβράνη, ακολουθείται διαδικασία αποσύνδεσης (stripping) των αντισωμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham το οποίο περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Ξέπλυμα της μεμβράνης για τουλάχιστον 5 λεπτά με διάλυμα πλύσης για να απομακρυνθεί η περίσσεια του υποστρώματος που προσθέσαμε σε προηγούμενη ανοσοανίχνευση,
- Επώαση της μεμβράνης για 20 λεπτά σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος αποσύνδεσης των αντισωμάτων Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fischer Scientific, Inc.)
- Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα κορεσμού για τουλάχιστον μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση,
- Επώσεις με το πρώτο και κατόπιν με το δεύτερο αντίσωμα όπως περιγράφονται παραπάνω και τέλος
- Επανάληψη της μεθόδου της χημειοφωταύγειας για ανίχνευση των πρωτεϊνικών αντιγόνων τους ενδιαφέροντος μας

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή για την πραγματοποίηση της παραπάνω μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πρωταρχικά αντισώματα στις αντίστοιχες αραιώσεις όπως αναφέρονται:

1. Πολυκλώνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του υποδοχέα-μεταφορέα της γλυκόζης 1 (GLUT1) (1:200; #sc-7903; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA),
2. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της εξοκινάσης 2 (HKII) (1:1.000; #2867; Cell Signaling Technology, Inc.)
3. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της γαλακτικής δεϋδρογενάσης A (LDH-A) (1:1.000; #2012; Cell Signaling Technology, Inc.)
4. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ενεργής πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH) (1:1.000; #2784; Cell Signaling Technology Inc.)
5. Πολυκλώνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της φωσφορυλιωμένης (ανενεργής) στη σερίνη 293 πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (p-PDH) (1:100; #orb6670; Biorbyt, Cambridge, UK)
6. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του μεταγραφικού παράγοντα c-myc (1:500; #5605; Cell Signaling Technology, Inc.)
7. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του μεταγραφικού παράγοντα-δείκτη των ρυθμιστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων FoxP3 (1:500; #5605; Cell Signaling Technology, Inc.)
8. Πολυκλώνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του μεταγραφικού παράγοντα-δείκτη του Th17 υποείδους των εκτελεστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων ROR γ t (1:100; #orb6888; Biorbyt)
9. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του μεταγραφικού παράγοντα-δείκτη του Th1 υποείδους των εκτελεστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων T-bet (1:500; #5852; Cell Signaling Technology, Inc.)

10. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του μεταγραφικού παράγοντα-δείκτη του Th2 υποείδους των εκτελεστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων GATA-3 (1:500; #5852; Cell Signaling Technology, Inc.)
11. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ματισμένης κασπάσης 3 (cleaved caspase 3) (1:500; #9664; Cell Signaling Technology, Inc.)
12. Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της β-ακτίνης (1:2,500; #4967; Cell Signaling Technology, Inc.).

2.10 Στατιστική ανάλυση

Η έκδοση 13.0 του προγράμματος SPSS, Inc., Chicago, IL, USA χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση στατιστικών αναλύσεων. Η κανονικότητα κάθε μεταβλητής εκτιμήθηκε μέσω του τεστ Kolmogorov-Smirnoff. Η κατανάλωση γλυκόζης και η παραγωγή γαλακτικού οξέος, εκτιμήθηκε με τη σύγκριση των μέσων τιμών με τη χρήση του t-test ζεύγους δειγμάτων (paired-samples t-test). Στις υπόλοιπες μεταβλητές, η επίδραση του DCA εκτιμήθηκε με κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τις τιμές που ελήφθησαν από κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί απουσία DCA. Πιο συγκεκριμένα, πρώτα εκτιμήθηκε ο λόγος της τιμής που ελήφθη από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DCA προς την τιμή που ελήφθη από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία αυτού. Τέλος, διεξήχθη t-test ενός δείγματος (one sample t-test) συγκρίνοντας τις τιμές κάθε περίπτωσης με την τιμή ενός και μόνο δείγματος.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση και το $P < 0,05$ θεωρήθηκε ότι υποδεικνύει μια στατιστικά σημαντική διαφορά. Υπολογίστηκε επίσης το τυπικό σφάλμα εκτίμησης του μέσου όρου.

Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

3.1 Το DCA μειώνει την κατανάλωση γλυκόζης και την αερόβια γλυκόλυση σε αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR)

Ο υπολογισμός της κατανάλωσης γλυκόζης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του γλυκοζόμετρου Element, Inforia, Titusville, USA. Πιο συγκεκριμένα, αφαιρέθηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης που ανιχνεύτηκε στο υπερκείμενο των κυτταροκαλλιεργειών στο τέλος κάθε πειράματος, από την συγκέντρωση που περιείχε πριν την χρήση το πλήρες καλλιεργητικό μέσο RPMI. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι σε MLRs χωρίς DCA η κατανάλωση γλυκόζης ήταν 160 ± 28 mg/dL., ενώ η προσθήκη του φαρμάκου την μείωσε στατιστικά σημαντικά σε 89 ± 33 mg/dL ($p < 0.001$, **Σχήμα 3.1A**).

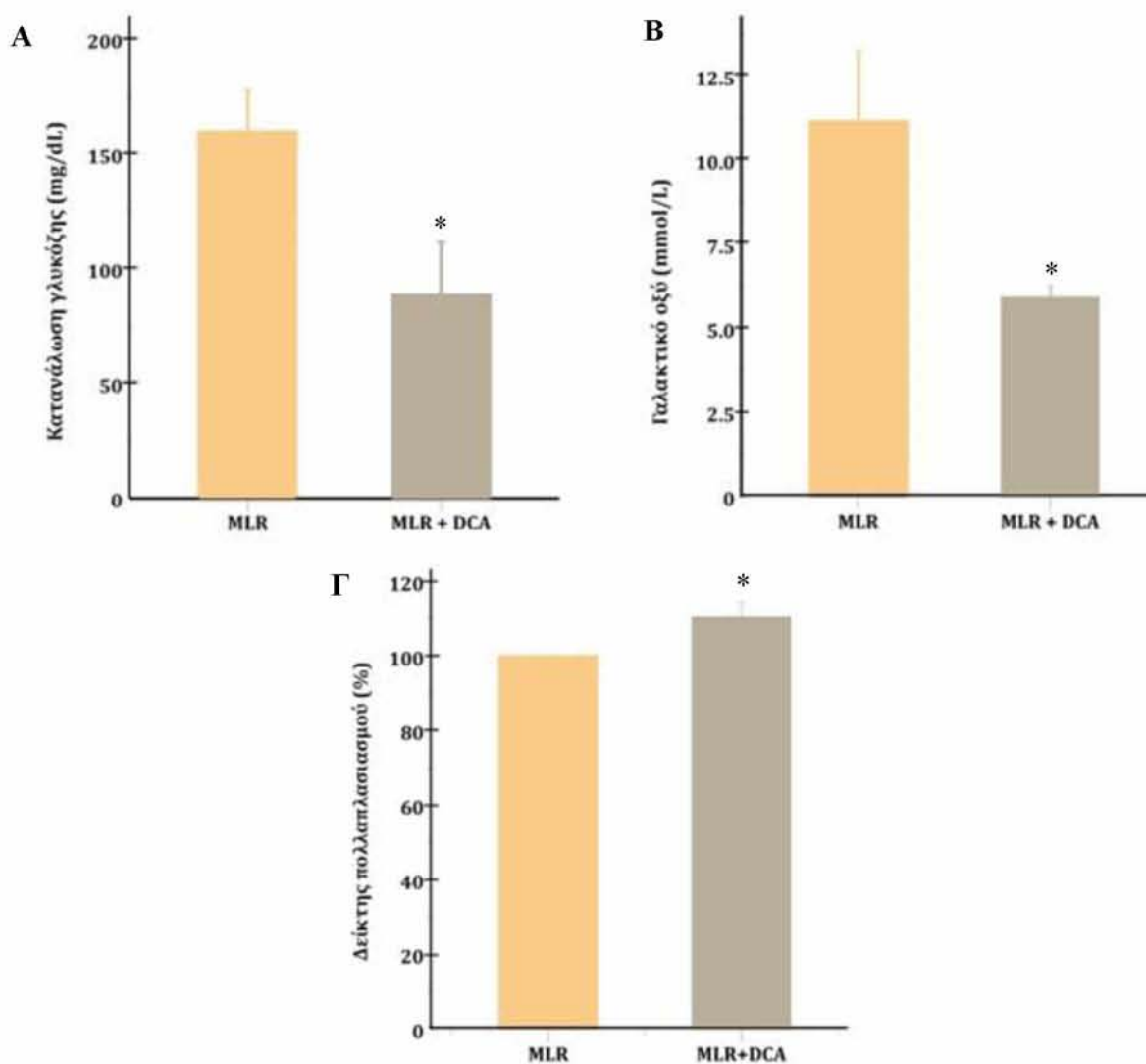
Επίσης, το DCA ανέστειλε την αερόβια γλυκόλυση, όπως εκτιμήθηκε με την μέτρηση του τελικού προϊόντος της [γαλακτικό οξύ (306)] στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών με τη χρήση του αναλυτή αερίων αίματος Blood Gas Analyzer Czito Medical (Moscow, Russia). Πιο συγκεκριμένα, σε MLRs χωρίς DCA η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος ήταν 11 ± 3 mmol/L., ενώ η προσθήκη του μείωσε στατιστικώς σημαντικά τη συγκέντρωσή του σε $6 \pm 0,5$ mmol/L ($P < 0.001$, **Σχήμα 3.1B**).

Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν οχτώ ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω αναφέρονται στη μέση τιμή των τριών μετρήσεων.

3.2 Το DCA ασκεί αμελητέα επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR)

Για την μελέτη της συνολικής επίδρασης του DCA στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της σύνθεσης DNA με τη ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) πρόσληψης βρωμοδεοξουριδίνης. Αρχικά, οι τιμές οπτικής πυκνότητας του δείγματος αναφοράς (Blank) αφαιρέθηκαν από αυτές των υπολοίπων ομάδων. Έπειτα, οι τιμές των MLRs παρουσία DCA κανονικοποιήθηκαν με τις τιμές των ομάδων ελέγχου (MLRs απουσία DCA). Πιο συγκεκριμένα ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MLRs παρουσία DCA υπολογίστηκε διαιρώντας την τιμή οπτικής πυκνότητας των παραπάνω συγκαλλιέργειών με την αντίστοιχη τιμή των MLRs απουσία DCA. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράστηκαν ποσοστιαία (%) προς την ομάδα θετικού ελέγχου, η οποία ορίστηκε αυθαίρετα ως 100 %. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν οχτώ διαφορετικές MLRs εις τριπλούν και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω αναφέρονται στη μέση τιμή των τριών μετρήσεων.

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι σε MLRs το DCA αύξησε τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (cell proliferation index) με συντελεστή $1,10 \pm 0,04$ (**Εικόνα 3.1Γ**). Αν και στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$), τέτοιου είδους αύξηση (της τάξης του 10%) θα μπορούσε να θεωρηθεί αμελητέα.



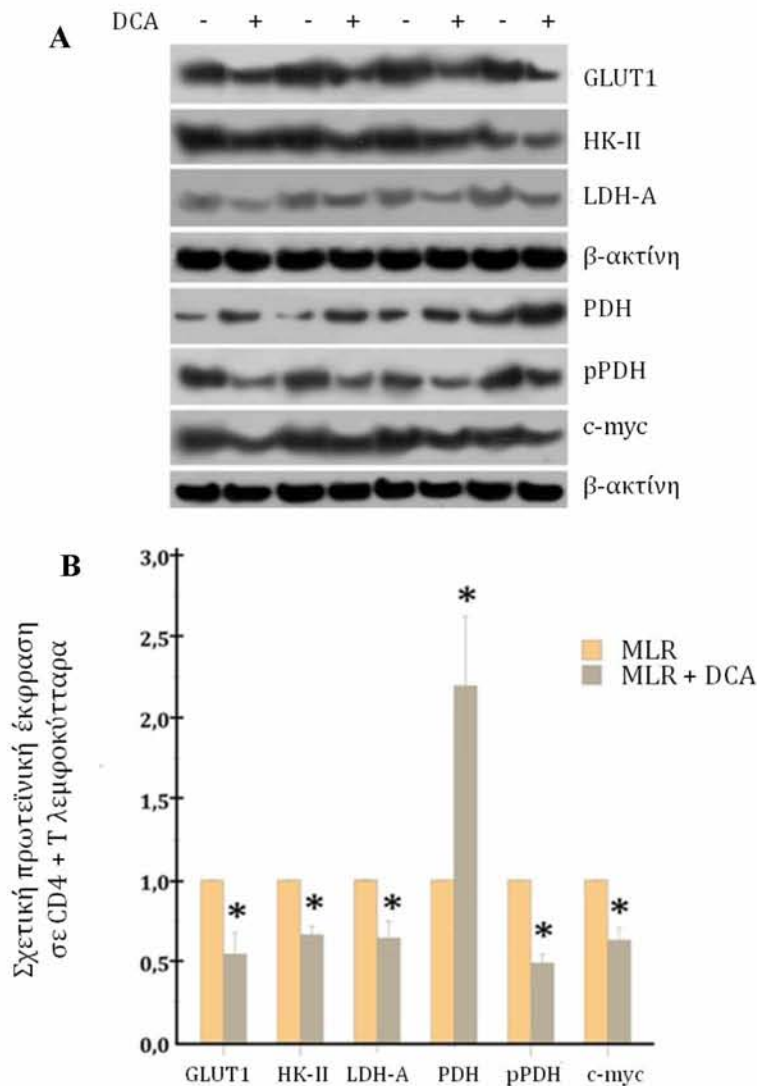
Εικόνα 3.1 Η επίδραση του διγλωροξικού οξέος στην κατανάλωση γλυκόζης, στην παραγωγή γαλακτικού οξέος και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR). Το DCA μείωσε στατιστικά σημαντικά την κατανάλωση γλυκόζης όπως αυτή υπολογίστηκε μετά την αφαίρεση της συγκέντρωσης που ανιχνεύτηκε στο υπερκείμενο των κυτταροκαλλιεργειών μετά το τέλος του πειράματος από την συγκέντρωση που περιείχε πριν την χρήση το καλλιεργητικό μέσο (Α). Το DCA κατέστειλε στατιστικά σημαντικά την αερόβια γλυκόλυση δεδομένης της μειωμένης συγκέντρωσης του τελικού της προϊόντος, γαλακτικού οξέος, στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών μετά την προσθήκη του φαρμάκου (Β). Τέλος, η επίδραση του DCA στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων εκτιμήθηκε ανοσοενζυμικά με τη χρήση βρωμο-δεοξουριδίνης και θεωρείται αμελητέα δεδομένου ότι προκλήθηκε μια αύξηση της τάξης του 10% στον δείκτη πολλαπλασιασμού (Γ). Πραγματοποιήθηκαν οχτώ ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν και τα αποτελέσματα αναφέρονται στη μέση τιμή των τριών μετρήσεων. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε 2 τυπικά σφάλματα, $*= p < 0,05$.

3.3 Το DCA σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα ευνοεί τη μείωση της κατανάλωσης γλυκόζης και αερόβιας γλυκόλυσης, με παράλληλη αύξηση της εισόδου του πυροσταφυλικού οξέος στον κύκλο του Krebs.

Για την μελέτη της επίδρασης του DCA στον μεταβολισμό των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων εκτιμήθηκαν, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, τα επίπεδα της σχετικής πρωτεϊνικής έκφρασης μεταφορέων και ενζύμων που εμπλέκονται στην γλυκόλυση, σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό από κάθε MLR.

Τα αποτελέσματα από οχτώ ανεξάρτητα πειράματα έδειξαν ότι σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα το DCA μείωσε την πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα-μεταφορέα της γλυκόζης 1 (GLUT1) (307) με συντελεστή $0,55 \pm 0,18$ ($p < 0,001$), της εξοκινάσης 2 (HKII) [το πρώτο ένζυμο που δρα στο μεταβολικό μονοπάτι της αερόβιας γλυκόλυσης (308)] με συντελεστή $0,66 \pm 0,07$ ($P < 0,001$) και της γαλακτικής δεϋδρογενάσης A (LDH-A) [ένζυμο που μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ σε γαλακτικό κατά την αερόβια γλυκόλυση (306)] με συντελεστή $0,64 \pm 0,15$ ($p < 0,01$) (**Σχήματα 3.2A & 3.2B**). Αντίθετα, το DCA αύξησε τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης της ενεργής πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, (PDH) [ένζυμο που μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε ακετύλο-συνένζυμο A και ελέγχει την έναρξη του κύκλου του Krebs αντί της αερόβιας γλυκόλυσης (309)] με συντελεστή $2,20 \pm 0,61$ ($p = 0,001$). Ταυτόχρονα, το εν λόγω φάρμακο μείωσε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης-ανενεργής πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (p-PDH) με συντελεστή $0,49 \pm 0,08$ ($p < 0,001$) (**Σχήματα 3.2A & 3.2B**). Τέλος το DCA μείωσε

την έκφραση του c-myc [μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει την έκφραση πολλών από τους παραπάνω πρωτεϊνικούς παράγοντες σε T-λεμφοκύτταρα όπως π.χ. των GLUT1, HKII και LDH-A (207)] με συντελεστή $0,63 \pm 0,11$ ($P < 0,001$) (**Σχήματα 3.2A & 3.2B**).

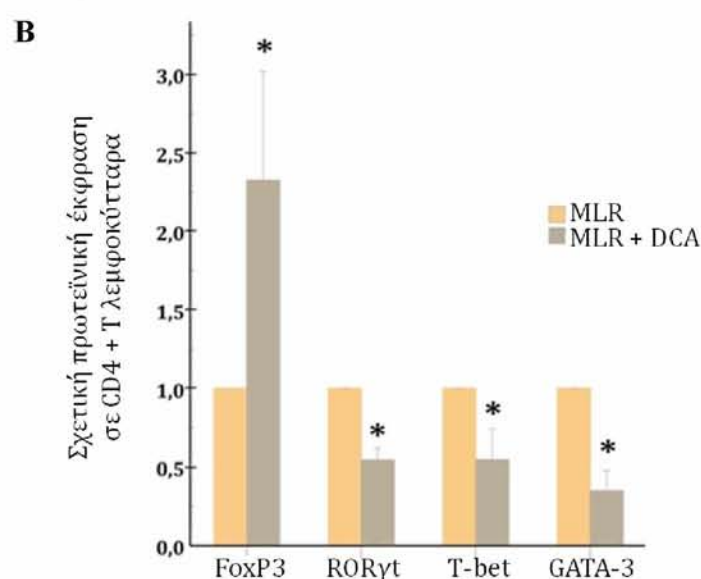
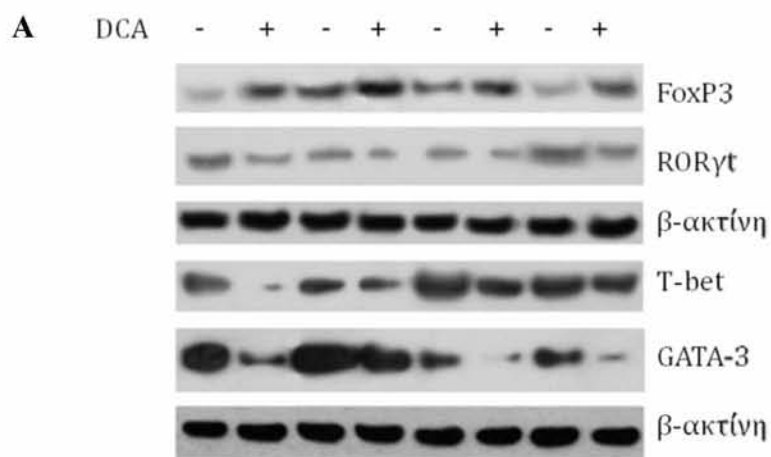


Εικόνα 3.2 Η επίδραση του DCA στη σχετική πρωτεϊνική έκφραση συγκεκριμένων ενζύμων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση σε ανθρώπινα, αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα απομονωμένα από μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR). Το DCA μειώνει τα επίπεδα των GLUT1, HKII, LDH-A, p-PDH και c-Myc, ενώ αυξάνει αυτά της PDH σε αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, όπως αυτά υπολογίστηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Αυτές οι επαγόμενες από το DCA μεταβολές δείχνουν ότι το DCA μειώνει την κατανάλωση γλυκόζης, ενώ εκτρέπει τον μεταβολισμό της από την αερόβια γλυκόλυση προς τον κύκλο του Krebs σε αλλοδραστικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Πραγματοποιήθηκαν οχτώ ανεξάρτητα πειράματα και τέσσερα από αυτά απεικονίζονται στην εικόνα A. Τα αποτελέσματα της Εικόνας B αναφέρονται στη μέση τιμή των οχτώ μετρήσεων ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε 2 τυπικά σφάλματα, * = $p < 0,05$.

3.4 Το DCA σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα ευνοεί τη διαφοροποίηση τους προς T-ρυθμιστικά και αναστέλλει τη διαφοροποίησή τους προς τα εκτελεστικά υποείδη Th17, Th1 και Th2.

Για την μελέτη της επίδρασης του DCA στην διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων εκτιμήθηκαν, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, τα επίπεδα της σχετικής πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων, που αποτελούν δείκτες της διαφοροποίησής τους προς Teffs ή Tregs, σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό από κάθε MLR.

Τα αποτελέσματα από οχτώ ανεξάρτητα πειράματα έδειξαν ότι το DCA προωθεί τη διαφοροποίηση των παραπάνω κυττάρων προς το υποσύνολο των Tregs, δεδομένης της αυξημένης έκφρασης του FoxP3, μεταγραφικού παράγοντα-δείκτη του εν λόγω κυτταρικού πληθυσμού (98), με συντελεστή $2,32 \pm 0,98$ ($p = 0,007$) (**Σχήματα 3.3A & 3.3B**). Αντιθέτως, φαίνεται ότι το DCA αναστέλλει τη διαφοροποίηση των αλλοδραστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων προς Teffs, όπως τα Th17, Th1 και Th2, δεδομένου ότι μειώνει την έκφραση των αντίστοιχων μεταγραφικών παραγόντων ROR γ t, T-bet και GATA-3 (98) με συντελεστές $0,54 \pm 0,11$ ($p < 0,001$), $0,55 \pm 0,28$ ($p = 0,003$) και $0,35 \pm 0,18$ ($p < 0,001$) αντίστοιχα (**Σχήματα 3.3A & 3.3B**).

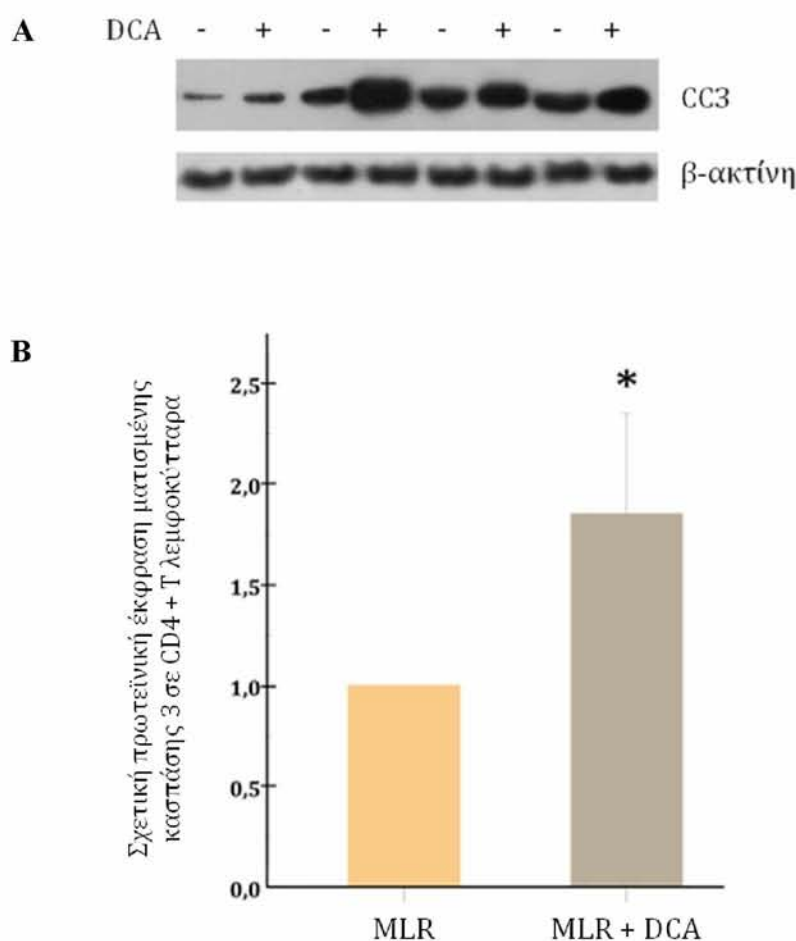


Εικόνα 3.3 Η επίδραση του DCA στη σχετική πρωτεϊνική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων-δεικτών που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των υποειδών των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T κύτταρα, μετά την απομόνωση τους από αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR). Το DCA μείωσε την έκφραση του FoxP3, ενώ αύξησε την έκφραση των RORγt, T-bet και GATA-3 σε απομονωμένα από MLRs ανθρώπινα, αλλοδραστικά CD4⁺ T κύτταρα, όπως υπολογίστηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Αυτές οι επαγόμενες από το DCA μεταβολές δείχνουν ότι το DCA ευνοεί την διαφοροποίηση των CD4⁺ T κυττάρων προς T-ρυθμιστικά έναντι των T εκτελεστικών Th17, Th1 και Th2. Πραγματοποιήθηκαν οχτώ ανεξάρτητα πειράματα και τέσσερα από αυτά απεικονίζονται στην εικόνα A. Τα αποτελέσματα της Εικόνας B αναφέρονται στη μέση τιμή των οχτώ μετρήσεων ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε 2 τυπικά σφάλματα, * = $p < 0,05$.

3.5 Το DCA επάγει την κυτταρική απόπτωση σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα

Για την μελέτη της επίδρασης του DCA στον πολλαπλασιασμό των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων εκτιμήθηκαν, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, τα επίπεδα της σχετικής πρωτεϊνικής έκφρασης της ματισμένης (ενεργοποιημένης) κασπάσης-3 σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό από κάθε MLR. Ο συγκεκριμένος πρωτεϊνικός παράγοντας αποτελεί έναν από τους πιο αξιόπιστους αποπτωτικούς δείκτες, καθώς σε αυτόν συγκλίνουν όλα τα αποπτωτικά μονοπάτια (276).

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν οχτώ ανεξάρτητα πειράματα στα οποία βρέθηκε ότι το DCA επάγει την απόπτωση στα κύτταρα αυτά, εφόσον αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ματισμένης (ενεργοποιημένης) κασπάσης-3 με συντελεστή $1,85 \pm 0,70$ ($p = 0,011$) (Σχήματα 3.4A & 3.4B).



Εικόνα 3.4 Η επίδραση του DCA στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ενεργοποιημένης-ματισμένης κασπάσης-3 (CC3) σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, μετά την απομόνωση τους από αμφίδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR). Το DCA μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της ενεργοποιημένης-ματισμένης κασπάσης-3 σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, όπως αυτά υπολογίστηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το DCA προκαλεί κυτταρική απόπτωση στον εν λόγω κυτταρικό πληθυσμό. Πραγματοποιήθηκαν οχτώ ανεξάρτητα πειράματα και τέσσερα από αυτά απεικονίζονται στην εικόνα A. Τα αποτελέσματα της Εικόνας B αναφέρονται στη μέση τιμή των οχτώ μετρήσεων ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε 2 τυπικά σφάλματα, * = $p < 0,05$.

Κεφάλαιο 4. Συμπεράσματα

Σήμερα, η μεταμόσχευση νεφρού είναι διαδεδομένη θεραπεία για την νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (310,311). Ωστόσο, η απόρριψη των μοσχευμάτων παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα ενώ και οι διαθέσιμοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες συμβάλλουν στη νοσηρότητα και θνησιμότητα των ασθενών (13). Το κλειδί για τη βελτίωση της ανοσοκαταστολής είναι να αποκλείονται επιλεκτικά οι ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι του μοσχεύματος χωρίς να παρεμποδίζονται άλλες προστατευτικές ανοσολογικές λειτουργίες ή να προκαλείται μη ειδική τοξικότητα (13). Στο πλαίσιο αυτό, σημαντικό ρόλο θα μπορούσε να παίξει η αξιοποίηση φυσικών μηχανισμών ανοσολογικής ρύθμισης. Για το λόγο αυτό, η παρούσα διατριβή στοχεύει στη διερεύνηση φαρμακολογικών παραγόντων που ευνοούν την ανοσολογική ανοχή του μοσχεύματος, ενισχύοντας συγκεκριμένους υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων, όπως τα ρυθμιστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα. Συγκεκριμένα, διερευνάται ο ρόλος της τροποποίησης του μεταβολισμού των T κυττάρων, ο οποίος σύμφωνα με αρκετές προηγούμενες μελέτες, είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τη λειτουργικότητα τους (209,211,312).

Στο παρόν πόνημα, αξιολογήθηκε σε ανθρώπινες MLRs η ανοσοτροποποιητική δράση του DCA. Βρέθηκε ότι μεταβάλλει την έκφραση συγκεκριμένων ενζύμων της γλυκολυτικής οδού, αναστέλλοντας έτσι την αερόβια γλυκόλυση σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε ότι το DCA, αφενός, μειώνει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων T-bet, GATA-3 και RORγt, δεικτών διαφοροποίησης T κύτταρων προς εκτελεστικά υποείδη Th1, Th2 και Th17

αντίστοιχα, και αφετέρου, αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, δείκτη διαφοροποίησης των ρυθμιστικών Tregs (98).

Σε προηγούμενη πιλοτική μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας αποδείξαμε ότι το DCA στη θεραπευτική συγκέντρωση των 0,33 mM και στη συγκέντρωση 1 mM είναι σχεδόν μη τοξικό για τα αδρανή λεμφοκύτταρα. Παρομοίως και στην αμφίδρομη MLR, η κυτταροτοξικότητα του DCA ήταν ελάχιστη. Συνεπώς μπορεί να αποκλεισθεί η σοβαρή τοξική δράση του DCA στα αλλοδρασικά T-κύτταρα (313).

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι σε MLR το DCA μείωσε την κατανάλωση γλυκόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες αυξάνονται σημαντικά μετά την ενεργοποίηση των CD4⁺ T-κυττάρων (209,312). Επιπλέον, αν και στατιστικώς σημαντική, μια πολλή μικρή (10%) αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που προκαλείται στις MLRs από το DCA, θα μπορούσε να θεωρηθεί αμελητέα. Αυτό είναι πιθανώς το αποτέλεσμα της χαμηλής, μη τοξικής συγκέντρωσης DCA, που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη, η οποία προσομοιάζει τη συγκέντρωσή του κατά τη θεραπεία της συγγενούς γαλακτικής οξέωσης (238,253,314). Εντούτοις, σε ένα μοντέλο ενεργοποίησης CD4⁺ T κυττάρων με αντισώματα αντι-CD3/CD28, το DCA ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αν και αυτό συνέβη στην υπερφαρμακολογική συγκέντρωση των 20 mM (279). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, μια πρόσφατη μελέτη στην οποία μακροφάγα που έχουν υποβληθεί σε προκατεργασία με γαλακτικό οξύ (15 mM) απουσία DCA δείχθηκε ότι μπορούν να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό των CD8⁺ T-κυττάρων, τα μεταβολικά χαρακτηριστικά των οποίων, μοιάζουν με αυτά των CD4⁺ (315). Αυτό φαίνεται να συνοδεύεται από αύξηση στην έκφραση του ενζύμου αργινάση 1 (ARG1) και κατ'επέκταση αύξηση της κατανάλωσης της αργινίνης από τα μακροφάγα. Κάτι

τέτοιο οδηγεί σε αύξηση μεταβολιτών της αργινίνης, όπως το αντιδρών άζωτο (RNS) και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) στο μικροπεριβάλλον της φλεγμονής. Λόγω των ανωτέρω γεγονότων τα ενεργοποιημένα CD8⁺ T-κύτταρα καταστέλλουν την έκφραση της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K), ενώ την ίδια στιγμή ενεργοποιούν τη μη-κατασταλμένη-2 κινάση γενικού ελέγχου (GCN2K), ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην απόκριση σε στρες λόγω στέρησης αμινοξέων (316). Έτσι τα εν λόγω κύτταρα οδηγούνται στη διακοπή του πολλαπλασιασμού τους και στην κυτταρική απόπτωση (317,318). Από την άλλη πλευρά, στην ίδια μελέτη μακροφάγα μετά από έκθεση σε γαλακτικό οξύ παρουσία DCA (2 mM, 5mM ή 10mM) αύξησαν τον πολλαπλασιασμό των CD8⁺ T-κυττάρων (298). Συνεπώς, αν και δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί για τους διάφορους υποτύπους των CD4⁺ T-κυττάρων, το DCA πιθανόν να επάγει έμμεσα τον πολλαπλασιασμό τους σε MLRs, ενισχύοντας τη δραστηριότητα των μακροφάγων με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση μένει προς διερεύνηση.

Οι μηχανισμοί, που σχετίζονται με την αναστολή της κατανάλωσης γλυκόζης και της αερόβιας γλυκόλυσης από το DCA, εξετάστηκαν σε CD4⁺ T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από τις MLRs. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των GLUT1, HKII, LDH-A, PDH και p-PDH. Μετά από κατεργασία με DCA, τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα γλυκόζης GLUT1 και του πρώτου ενζύμου της γλυκολυτικής οδού, HKII (306), μειώθηκαν σημαντικά στα CD4⁺ T-κύτταρα. Έτσι, η μειωμένη κατανάλωση γλυκόζης στα κύτταρα που έχουν υποστεί κατεργασία με DCA θα μπορούσε να αποδοθεί τόσο στη μειωμένη εισροή γλυκόζης στο κύτταρο όσο και στην επιβράδυνση της γλυκόλυσης. Όπως άλλωστε έχει δειχθεί σε πρόσφατη μελέτη, η αναστολή της HKII από τη 2-δεοξυγλυκόζη καταστέλλει

αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του εν λόγω κυτταρικού υποπληθυσμού (279). Επιπλέον, σε απομονωμένα από MLRs CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, βρέθηκε ότι το DCA μειώνει την LDH-A, η οποία μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό και ακετυλ-CoA και ελέγχει την είσοδό του στον κύκλο του Krebs (306). Παράλληλα, το DCA μείωσε το επίπεδο της φωσφορυλιωμένης και άρα αδρανοποιημένης p-PDH (309). Κάτι τέτοιο θεωρείται αναμενόμενο εφόσον το DCA είναι ένας αναστολέας της κινάσης της δεϋδεογονάσης του πυροσταφυλικού (PDK) (238). Τέλος, σχετικά με την αύξηση του επιπέδου της PDH, μια μελέτη σε άλλους κυτταρικούς τύπους έχει δείξει ότι το DCA ενισχύει πράγματι τη δραστηριότητά της (254). Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός της συγκεκριμένης δράσης του φαρμάκου παραμένει άγνωστος. Συνοψίζοντας, όλες οι ανωτέρω επαγόμενες από το DCA μεταβολές ευνοούν την εκτροπή του μεταβολισμού της γλυκόζης από την αερόβια γλυκόλυση στον κύκλο του Krebs. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με ό,τι απαιτείται για τον πολλαπλασιασμό των CD4⁺ T-κυττάρων και την διαφοροποίησή τους σε Teffs (209,312).

Συνεχίζοντας, για να εκτιμηθεί, ο τρόπος με τον οποίο το DCA ασκεί την επίδρασή του στην έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών, μετρήθηκαν τα επίπεδα του c-Myc σε CD4⁺ T-κύτταρα που απομονώθηκαν από MLRs. Είναι γνωστό, ότι ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc ελέγχει τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό μετά την ενεργοποίηση των T-κυττάρων, αυξάνοντας μεταξύ άλλων την έκφραση των GLUT1, HKII και LDH-A (207). Πράγματι, η κατεργασία των MLRs με DCA μείωσε σημαντικά την έκφραση του c-Myc στα CD4⁺ T-κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει έναν ρόλο για τον c-Myc στον καθορισμό του μεταβολικού προφίλ που χαρακτηρίζει τον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό των T κυττάρων. Σε αυτό το πλαίσιο βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση των T κυττάρων επάγει την έκφραση σε επίπεδο

πρωτεΐνης τόσο του c-Myc όσο και του HIF1α εντός 2 ωρών (207,210). Ωστόσο, ο c-Myc είναι απαραίτητος για την θετική ρύθμιση του γλυκολυτικού μηχανισμού και των υποστρωμάτων που είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό της γλουταμίνης (207,209). Η σίγαση του c-Myc καταργεί την ικανότητα των ενεργοποιημένων T κυττάρων να πραγματοποιήσουν γλυκόλυση και να ξεκινήσουν τον καταβολισμό της γλουταμίνης (207). Επιπλέον, η έλλειψη c-Myc ελαττώνει την έκφραση του αντιμεταφορέα της γλουταμίνης CD98 (ένα ετεροδιμερές SLC3A2 και SLC7A5), ο οποίος μειώνει τη δραστηριότητα του mTORC1 (209). Η απουσία του c-Myc σε ενεργοποιημένα T κύτταρα αναστέλλει τη γλουταμινόλυση και την επακόλουθη δημιουργία νουκλεοτιδίων και πολυαμινών που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό (207). Ωστόσο, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επαγόμενη από το DCA μείωση της έκφρασης του παράγοντα c-Myc μένει να διασαφηνιστούν.

Ο ακριβής λόγος για τον οποίο τα πολλαπλασιαζόμενα λεμφοκύτταρα αλλάζουν τον ενεργειακό τους μεταβολισμό από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην αερόβια γλυκόλυση παραμένει ασαφής. Μια εξήγηση μπορεί να είναι ότι η αερόβια γλυκόλυση παρέχει στα κύτταρα μακρομοριακά πρόδρομα μόρια και NADH σε επίπεδα που δεν μπορούν να καλυφθούν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση (206). Αυτό αποδεικνύεται και από την παρατήρηση ότι αναστολή της γλυκόλυσης με 2DG, παρουσία εναλλακτικών υποστρωμάτων του κύκλου του Krebs (ασπαρτικό και οξικό άλας), εμποδίζει τον επαγόμενο από PHA (Πολυϋδροξυαλκανοϊκά) πολλαπλασιασμό, παρά τη διατήρηση επαρκούς ικανότητας παραγωγής ενέργειας. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ένας ισορροπημένος συνδυασμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και αερόβιας γλυκόλυσης είναι ο πιο αποτελεσματικός και γρήγορος τρόπος για να ικανοποιηθούν οι υψηλές ενεργειακές ανάγκες των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων

(206). Πράγματι, τα εκτελεστικά T κυτταρα διατηρούν επίσης το OXPHOS σε συνδυασμό με τη γλυκόλυση, ακόμα και μετά την πλήρη διαφοροποίησή τους (207,319,320). Ωστόσο, εάν αυτό απαιτείται για την βέλτιστη ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό τους μόνο ή και για τη ρύθμιση της λειτουργικότητάς τους, δεν είναι σαφές. Η τελική διευκρίνιση της σημασίας των ιδιαίτερων μεταβολικών οδών θα είναι ενδεχομένως το κλειδί για την ανάπτυξη τεχνικών που στοχεύουν το μεταβολισμό των T κυττάρων στη μεταμόσχευση.

Ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας ελέγχου της διαφοροποίησης των CD4⁺ T κυττάρων στα διάφορα υποσύνολα είναι οι κυτοκίνες, που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής τους. Οι ιντερλευκίνες IL-12, IL-4 και IL-6 ενεργοποιούν τους σηματοδοτικούς τελεστές και επαγωγείς της μεταγραφής 4, 6 και 3 (Signal transducer and activator of transcription; STAT4, STAT6 και STAT3). Αυτοί επάγουν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων T-bet, GATA-3 και RORγt με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των CD4⁺ T κυττάρων στις T_H1, T_H2 και T_H17, αντιστοίχως. Από την άλλη πλευρά, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGF-β) μέσω των SMAD2-SMAD4 επάγει την έκφραση του παράγοντα FoxP3 με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των CD4⁺ T κυττάρων σε Tregs (98). Τα εκτελεστικά CD4⁺ T-κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα του μεταφορέα γλυκόζης GLUT1 και εξαρτώνται από το μεταβολισμό της γλυκόζης, ενώ τα Tregs εκφράζουν χαμηλά επίπεδα GLUT1 και εξαρτώνται από την οξείδωση των λιπιδίων (211). Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη ότι το DCA μειώνει τα επίπεδα του μεταφορέα GLUT1 και αναστέλλει την αερόβια γλυκόλυση, αξιολογήθηκε η επίδρασή του στους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες των Th1, Th2, Th17 και Treg υποομάδων. Στα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα των MLRs που έχουν υποστεί κατεργασία με DCA, τα επίπεδα

των T-bet, GATA-3 και RORγt μειώθηκαν σημαντικά υποδεικνύοντας ότι το DCA αναστέλλει τη διαφοροποίηση των CD4⁺ στα Teff υποσύνολα Th1, Th2 και Th17 αντίστοιχα. Αντιστρόφως, η χορήγηση DCA αύξησε την έκφραση του παράγοντα FoxP3 υποδεικνύοντας ότι ευνοεί τη διαφοροποίηση των CD4⁺ κυττάρων σε Tregs. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μειωμένη έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης και συστατικών της γλυκολυτικής οδού στα Tregs μπορεί να περιορίσει μερικώς τον μεταβολισμό της γλυκόζης στα Tregs κύτταρα (321). Η υψηλή έκφραση του παράγοντα CPT1A και κατ' επέκταση της οξείδωσης των λιπιδίων παρέχει στα Tregs ευελιξία στις πηγές θρεπτικών συστατικών και ενέργειας. Αυτή η ευελιξία μπορεί να είναι σημαντική για την επίτευξη της καταστολής των Teff κυττάρων in vivo (321). Επομένως, είναι σημαντικό ότι τα Tregs έχουν ένα μεταβολικό προφίλ διαφορετικό από αυτό των Teffs και πιθανόν οι διαφορές αυτές να είναι απαραίτητες για την ικανότητα των Tregs να παραμένουν λειτουργικά. Στο ίδιο πλαίσιο, μια πρόσφατη μελέτη αξιολόγησε την επίδραση του DCA στη διαφοροποίηση των Tregs. Ωστόσο, σε αυτή, τα CD4⁺ T-κύτταρα διεγέρθηκαν με αντίσωμα έναντι των CD3/CD28 και χρησιμοποιήθηκαν πολύ υψηλές και μάλιστα τοξικές συγκεντρώσεις DCA (238). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αυξημένη διαφοροποίηση των Tregs σε συγκεντρώσεις DCA της τάξης των 2 και 20 mM, ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή ιντερλευκίνης 10 (IL-10) στη συγκέντρωση των 20 mM DCA (279). Σε μια προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας σε αμφίδρομες MLRs το DCA αύξησε σημαντικά, σχεδόν 10 φορές, την παραγωγή της ανοσοκατασταλτικής κυτοκίνης IL-10, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η αύξηση IL-10 και FoxP3 ήταν ίδια παρότι οι συγκεντρώσεις DCA ήταν χαμηλότερες και σαφώς μη τοξικές (0,33mM και

1mM DCA) (313). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η IL-10 παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα Tregs (322–325), είναι δελεαστικό να υποθέσουμε ότι η αυξημένη παραγωγή IL-10 από αλλοδραστικά λεμφοκύτταρα στα οποία χορηγήθηκε DCA υποδεικνύει ότι αυτή η ουσία επάγει τη διαφοροποίηση των Tregs. Εντούτοις, αξίζει να αναφερθεί ότι η IL-10 παράγεται επίσης και από άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως μονοκύτταρα, B-κύτταρα και άλλους υπότυπους T-κυττάρων που υπάρχουν στο *in vitro* σύστημα της MLR (322–325). Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη, CD4⁺ CD25⁻T κύτταρα ποντικού συνκαλλιεργήθηκαν με ακτινοβολημένα κύτταρα σπλήνα με αντίσωμα αντι-CD3 υπό συνθήκες που ευνοούν τη διαφοροποίησή τους προς Th1, Th17 και Tregs, απουσία και παρουσία 10 mM DCA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η χορήγηση DCA δεν επηρέασε τη διαφοροποίηση ή λειτουργία των Th1, ενώ η παραγωγή ιντερφερόνης (IFN- γ) και η έκφραση του παράγοντα T-bet ήταν παρόμοια ανεξάρτητα από τη χορήγηση. Αντίθετα, το DCA ανέστειλε την παραγωγή IL-17 σε κύτταρα καλλιεργημένα σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη Th17 υποειδών και κατέστειλε την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα ROR γ T. Αντίστροφα, κατεργασία των Tregs με DCA αύξησε την έκφραση του FoxP3 σε σύγκριση με τον μάρτυρα και διατήρησε ή αύξησε ενδεχομένως την *in vitro* κατασταλτική ικανότητα των Tregs. Ακολούθως, η έκφραση των 4 ισομορφών PDHK εξετάστηκε στα υποσύνολα των CD4⁺ T κυττάρων. Τα T κύτταρα εκφράζουν PDHK1 και PDHK3, με την PDHK1 να είναι η κυρίαρχη ισομορφή. Σε αμφότερα τα επίπεδα RNA και πρωτεΐνης, τα Th17 εξέφρασαν τα υψηλότερα επίπεδα PDHK1, ακολουθούμενα από τα Tregs, ενώ στα Th1 τα επίπεδα έκφρασης PDHK1 ήταν χαμηλά. Ως εκ τούτου, η PDHK1 εκφράζεται διαφορετικά στα υποσύνολα των CD4⁺ T κυττάρων και μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού των κυττάρων αυτών. Στην ίδια μελέτη εξέτασαν την

ικανότητα του DCA να καταστέλλει τις φλεγμονώδεις ασθένειες στις οποίες εμπλέκονται Th17 κύτταρα σε μοντέλο ποντικού φλεγμονώδους εντερικής νόσου (IBD) καθώς και σε μοντέλο πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (EAE) ποντικού. Οι ποντικοί έλαβαν φυσιολογικό νερό ή τους χορηγήθηκαν 2 g/l DCA στο πόσιμο νερό καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στο μοντέλο IBD που προκαλείται από Th1 και Th17 κύτταρα, παρόλο που τα Th17 μειώθηκαν, η χορήγηση DCA δεν οδήγησε σε μείωση των κυττάρων Th1, όπως μετράται από το ποσοστό των CD4⁺ T κυττάρων που παράγουν IFN- γ . Παρά την αναστολή των κυττάρων Th17, η χορήγηση DCA δεν εμπόδισε την φλεγμονή του εντέρου ή την πρόοδο της νόσου, πιθανώς λόγω της λειτουργικής Th1 απόκρισης. Όσον αφορά το μοντέλο EAE, ενώ τα Th1 κύτταρα μπορούν να συνεισφέρουν, αυτό το μοντέλο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από Th17. Η αναστολή της PDHK από τη χορήγηση DCA μείωσε σημαντικά τα κλινικά συμπτώματα της EAE σε όλη τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου. Τα T κύτταρα που απομονώθηκαν από βουβωνικούς παροχτευμένους λεμφαδένες μειώθηκαν σε αριθμό και εμφάνισαν αύξηση της έκφρασης του παράγοντα FoxP3 και μείωση της παραγωγής IL-17, γεγονός που συμφωνεί με τα *in vitro* ευρήματά τους (321). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα διακριτά μεταβολικά προγράμματα των υποσυνόλων των CD4⁺ κυττάρων είναι ουσιώδη για κάθε υποσύνολο και μπορούν να αξιοποιηθούν για να στοχεύσουν συγκεκριμένους πληθυσμούς T κυττάρων για θεραπευτικούς σκοπούς στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων.

Τέλος εξετάστηκε το σημαντικότερο ερώτημα εάν το DCA επάγει την απόπτωση στα CD4⁺ T-κύτταρα που απομονώθηκαν από τις MLRs. Για το σκοπό αυτό αξιολογήθηκε το επίπεδο της ενεργοποιημένης ματισμένης κασπάσης-3, στην οποία συγκλίνουν όλες σχεδόν οι αποπτωτικές οδοί (276). Το DCA αύξησε σημαντικά τα

επίπεδα της ματισμένης κασπάσης-3 και συνεπώς είναι πιθανό ότι επάγει την απόπτωση σε αλλοδραστικά T κύτταρα. Έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι το DCA μπορεί να καταστείλει την αερόβια γλυκόλυση των καρκινικών κυττάρων, να μεταβάλει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και να προκαλέσει την παραγωγή ROS με αποτέλεσμα τη γήρανση και απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (326,327). Αν και στην παρούσα μελέτη δεν το ελέγξαμε λεπτομερώς, είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ενώ τα Tregs μετατρέπουν αποτελεσματικά τη γλυκόζη σε γαλακτικό και έχουν μειωμένη μιτοχονδριακή μάζα, τα Tregs που διατηρούν μεγαλύτερη μιτοχονδριακή μάζα, έχουν υψηλότερη αναπνευστική ικανότητα και κατά προτίμηση οξειδώνουν το πυροσταφυλικό που προέρχεται από τη γλυκόζη (321). Η αυξημένη αναπνευστική ικανότητα έχει συσχετιστεί με αυξημένη κυτταρική βιωσιμότητα (320), ενώ η γλυκόλυση μπορεί να περιορίσει τη μακροβιότητα των κυττάρων (328). Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν πρόσφατα τους Pearce et al. (2013) να προτείνουν ένα μοντέλο στο οποίο τα περισσότερα εκτελεστικά T κύτταρα νεκρώνονται σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών λόγω της βιοενεργειακής τους αστάθειας. Αυτό σημαίνει ότι η έλλειψη μιτοχονδριακής συντήρησης τα καθιστά ανίκανα να υποστηρίξουν την OXPHOS, όταν τα σήματα ενεργοποίησης που διατηρούν τη γλυκόλυση μειώνονται. Από την άλλη πλευρά, η ενισχυμένη μιτοχονδριακή μάζα στα κύτταρα Tregs τους προσδίδει ένα βιοενεργειακό πλεονέκτημα που γρήγορα τροφοδοτεί την επακόλουθη επανενεργοποίησή τους (206).

Στο ίδιο πλαίσιο, προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι τα Tregs είναι πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες (στρες λόγω ROS) σε σύγκριση με τα Tregs (329–331). Παράλληλα με το οξειδωτικό στρες, τα Tregs είχαν ένα μεγάλο αποθεματικό αναγμένης γλουταθειόνης (GSH) καθώς και υψηλά επίπεδα οξειδωμένης

γλουταθειόνης (GSSG) σε σύγκριση με τα Th1 και Th17 (321). Αυτό υποδηλώνει ότι τα Tregs έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να χειρίζονται τις ROS και να χρησιμοποιούν αυτή τη δεξαμενή της GSH σε μεγαλύτερη έκταση από τα Teffs. Τα Tregs έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχουν υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικής θειορεδοξίνης-1, συμβάλλοντας επίσης στην ρύθμιση της οξειδοαναγωγής των Tregs (332).

Στο ίδιο πλαίσιο, σε άλλη μελέτη, αξιολογήθηκαν οι άμεσες επιδράσεις του DCA στα CD4⁺ T κύτταρα που απομονώθηκαν από κύτταρα σπλήνα ποντικού, τα οποία ενεργοποιήθηκαν με αντισώματα αντι-CD3/CD28 και καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες που ευνοούσαν την ανάπτυξη Treg ή Th17. Σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα, οι ερευνητές δεν έδειξαν μεταβολή των επιπέδων ATP, κάτι που αποκλείει την επαγωγή απόπτωσης λόγω χορήγησης DCA (333). Αυτή η απόκλιση μπορεί να προήλθε από τη διαφορά των ειδών των κυττάρων (κύτταρα από ποντίκι στην περίπτωση τους έναντι ανθρώπινων κυττάρων στην περίπτωσή μας) και από το *in vitro* σύστημα που χρησιμοποίησαν για να ελέγξουν την υπόθεσή τους (T κύτταρα ενεργοποιημένα μόνο με αντισώματα αντι-CD3/CD28 στην περίπτωση τους ή MLR- T κύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά APC- στην περίπτωσή μας). Ανεξάρτητα από τον υπεύθυνο μηχανισμό, η επαγόμενη από DCA απόπτωση αλλοδραστικών CD4⁺ T κυττάρων που δείξαμε στην παρούσα διατριβή θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι είναι ανοσοκατασταλτική.

Κεφάλαιο 5. Σύνοψη Αποτελεσμάτων

Έρευνες των τελευταίων ετών στο πεδίο των μεταμόσχευσεων προσανατολίζονται στην διερεύνηση ουσιών που επιτυγχάνουν την στοχευμένη διαφοροποίηση των αλλοδραστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων προς ρυθμιστικά (Tregs) έναντι των εκτελεστικών (Teffs). Δεδομένου ότι τα εκτελεστικά υποείδη CD4⁺ T κυττάρων αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές της απόρριψης αλλογενών μοσχευμάτων, ενώ αντίθετα, τα ρυθμιστικά συμβάλλουν στην ανοχή του μοσχεύματος, τέτοιες ουσίες, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ανοσοκατασταλτικά. Σε αυτό το πλαίσιο, στην παρούσα διατριβή δείξαμε για πρώτη φορά ότι σε ανθρώπινα αλλοδραστικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, το DCA αναστέλλει την αερόβια γλυκόλυση, επάγει την απόπτωση και ευνοεί τη διαφοροποίησή τους προς το υποσύνολο Treg. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορεί το DCA να είναι ένας πολλά υποσχόμενος ανοσοκατασταλτικός παράγοντας στον τομέα της μεταμόσχευσης, ειδικότερα με δεδομένα 1) τη απλή δομή του, 2) τη χαμηλή τιμή του και 3) το ότι έχει χρησιμοποιηθεί σε ανθρώπους για περισσότερο από 30 χρόνια με σχετικά χαμηλή τοξικότητα. Η ρύθμιση του μεταβολισμού των λεμφοκυττάρων από το DCA απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Η κατανόησή της μπορεί να παρέχει νέες κατευθύνσεις για την επαγωγή ενός ανοσολογικά ανεκτικού φαινοτύπου, που είναι σημαντικός όχι μόνο σε μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων αλλά και σε αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις ασθένειες.

Κεφάλαιο 6. Βιβλιογραφία

1. Zeidel ML, Hoenig MP, Palevsky PM. A New CJASN Series: Renal Physiology for the Clinician. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2014 Jul 7;9(7):1271.
2. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015 Apr 27;209(2):199–210.
3. Sahay M, Kalra S, Bandgar T. Renal endocrinology: The new frontier. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(2):154–5.
4. Robson L. The kidney – an organ of critical importance in physiology. *J Physiol*. 2014 Sep 15;592(Pt 18):3953–4.
5. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primer*. 2017 Nov 23;3:17088.
6. Pottel H, Hoste L, Yayo E, Delanaye P. Glomerular Filtration Rate in Healthy Living Potential Kidney Donors: A Meta-Analysis Supporting the Construction of the Full Age Spectrum Equation. *Nephron*. 2017;135(2):105–19.
7. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999 Dec 2;341(23):1725–30.
8. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JLR. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2005 Jun;16(6):1859–65.
9. Tennankore KK, Kim SJ, Baer HJ, Chan CT. Survival and hospitalization for intensive home hemodialysis compared with kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2014 Sep;25(9):2113–20.
10. Nieto T, Inston N, Cockwell P. Renal transplantation in adults. *BMJ*. 2016 Nov 30;355:i6158.
11. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011 Nov;11(11):2279–96.
12. Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi M-C. Effector Mechanisms of Rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]*. 2013 Nov [cited 2019 Feb 7];3(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3808773/>
13. Kalluri HV, Hardinger KL. Current state of renal transplant immunosuppression: Present and future. *World J Transplant*. 2012 Aug 24;2(4):51–68.

14. Liu Z, Fan H, Jiang S. CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunol Rev.* 2013 Mar;252(1):183–91.
15. Villard J. Immunity after organ transplantation. *Swiss Med Wkly.* 2006 Feb 4;136(5–6):71–7.
16. Held PJ, Kahan BD, Hunsicker LG, Liska D, Wolfe RA, Port FK, et al. The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants. *N Engl J Med.* 1994 Sep 22;331(12):765–70.
17. Takemoto SK, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM. Twelve Years' Experience with National Sharing of HLA-Matched Cadaveric Kidneys for Transplantation. *N Engl J Med.* 2000 Oct 12;343(15):1078–84.
18. Opelz G. New immunosuppressants and HLA matching. *Transplant Proc.* 2001 Mar;33(1–2):467–8.
19. Lakkis FG, Lechler RI. Origin and biology of the allogeneic response. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Aug 1;3(8).
20. SÁNCHEZ–FUEYO A, STROM TB. Immunologic Basis of Graft Rejection and Tolerance Following Transplantation of Liver or Other Solid Organs. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 Jan [cited 2019 Feb 7];140(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3866688/>
21. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG. CD4 T cell–mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest.* 2000 Oct 15;106(8):1003–10.
22. DeWolf S, Sykes M. Alloimmune T cells in transplantation. *J Clin Invest.* 2017 Jun 30;127(7):2473–81.
23. Barnett N, Dorling A, Mamode N. B cells in renal transplantation: pathological aspects and therapeutic interventions. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Mar 1;26(3):767–74.
24. Karahan GE, Claas FHJ, Heidt S. B Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jan 10 [cited 2019 Feb 7];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5222792/>
25. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature.* 1989 Mar 30;338(6214):383–4.
26. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol.* 2006 Oct;18(5):263–75.
27. Mackay F, Figgett WA, Saulep D, Lepage M, Hibbs ML. B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev.* 2010 Sep;237(1):205–25.

28. Cannons JL, Qi H, Lu KT, Dutta M, Gomez-Rodriguez J, Cheng J, et al. Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity*. 2010 Feb 26;32(2):253–65.
29. Qi H, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL, Germain RN. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):764–9.
30. Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):489–94.
31. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:487–513.
32. Tarlinton DM. Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunol Cell Biol*. 2008 Feb;86(2):133–8.
33. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol*. 2012 Apr 17;8(6):348–57.
34. Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med*. 1970 Jan 15;282(3):111–7.
35. Lee P-C, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee P-H, Hung C-J, Chen Y-L, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*. 2002 Oct 27;74(8):1192–4.
36. Le Pavec J, Suberbielle C, Lamrani L, Feuillet S, Savale L, Dorfmueller P, et al. De-novo donor-specific anti-HLA antibodies 30 days after lung transplantation are associated with a worse outcome. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2016;35(9):1067–77.
37. Tran A, Fixler D, Huang R, Meza T, Lacelle C, Das BB. Donor-specific HLA alloantibodies: Impact on cardiac allograft vasculopathy, rejection, and survival after pediatric heart transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2016 Jan;35(1):87–91.
38. Kaneku H, O’Leary JG, Banuelos N, Jennings LW, Susskind BM, Klintmalm GB, et al. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013 Jun;13(6):1541–8.
39. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Briley KP, Bolin P, Kendrick WT, et al. Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. *Transplantation*. 2014 Mar 15;97(5):494–501.

40. Arnold M-L, Heinemann FM, Horn P, Ziemann M, Lachmann N, Mühlbacher A, et al. 16(th) IHIW: anti-HLA alloantibodies of the of IgA isotype in re-transplant candidates. *Int J Immunogenet.* 2013 Feb;40(1):17–20.
41. van den Bosch TPP, Kannegieter NM, Hesselink DA, Baan CC, Rowshani AT. Targeting the Monocyte-Macrophage Lineage in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol.* 2017;8:153.
42. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jun;14(6):392–404.
43. van Kooten C, Daha MR. Cytokine cross-talk between tubular epithelial cells and interstitial immunocompetent cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001 Jan;10(1):55–9.
44. Girlanda R, Kleiner DE, Duan Z, Ford E a. S, Wright EC, Mannon RB, et al. Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2008 Mar;8(3):600–7.
45. Bergler T, Jung B, Bourier F, Kühne L, Banas MC, Rümmele P, et al. Infiltration of Macrophages Correlates with Severity of Allograft Rejection and Outcome in Human Kidney Transplantation. *PloS One.* 2016;11(6):e0156900.
46. Xu L, Collins J, Drachenberg C, Kukuruga D, Burke A. Increased macrophage density of cardiac allograft biopsies is associated with antibody-mediated rejection and alloantibodies to HLA antigens. *Clin Transplant.* 2014 May;28(5):554–60.
47. Om A, Baquero A, Raja R, Kim P, Bannett AD. The prognostic significance of the presence of monocytes in glomeruli of renal transplant allografts. *Transplant Proc.* 1987 Feb;19(1 Pt 2):1618–22.
48. Copin MC, Noel C, Hazzan M, Janin A, Pruvot FR, Dessaint JP, et al. Diagnostic and predictive value of an immunohistochemical profile in asymptomatic acute rejection of renal allografts. *Transpl Immunol.* 1995 Sep;3(3):229–39.
49. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, et al. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol JASN.* 1999 Jul;10(7):1582–9.
50. Ozdemir BH, Demirhan B, Güngen Y. The presence and prognostic importance of glomerular macrophage infiltration in renal allografts. *Nephron.* 2002 Apr;90(4):442–6.
51. Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int.* 2005 Oct;68(4):1866–74.

52. Fahim T, Böhmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S, et al. The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2007 Feb;7(2):385–93.
53. Kozakowski N, Böhmig GA, Exner M, Soleiman A, Huttary N, Nagy-Bojarszky K, et al. Monocytes/macrophages in kidney allograft intimal arteritis: no association with markers of humoral rejection or with inferior outcome. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2009 Jun;24(6):1979–86.
54. Kwan T, Wu H, Chadban SJ. Macrophages in renal transplantation: Roles and therapeutic implications. *Cell Immunol.* 2014 Oct;291(1–2):58–64.
55. Sentís A, Kers J, Yapici U, Claessen N, Roelofs JJTH, Bemelman FJ, et al. The prognostic significance of glomerular infiltrating leukocytes during acute renal allograft rejection. *Transpl Immunol.* 2015 Nov;33(3):168–75.
56. Prodjosudjadi W, Daha MR, Gerritsma JS, Florijn KW, Barendregt JN, Bruijn JA, et al. Increased urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 during acute renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 1996 Jun;11(6):1096–103.
57. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 2014;6:13.
58. Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, Tomiuk S, Miqueu P, Zuhayra M, et al. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2011 Sep 1;187(5):2072–8.
59. Hutchinson JA, Brem-Exner BG, Riquelme P, Roelen D, Schulze M, Ivens K, et al. A cell-based approach to the minimization of immunosuppression in renal transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2008 Aug;21(8):742–54.
60. Hutchinson JA, Riquelme P, Brem-Exner BG, Schulze M, Matthäi M, Renders L, et al. Transplant acceptance-inducing cells as an immune-conditioning therapy in renal transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2008 Aug;21(8):728–41.
61. Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, et al. The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Semin Immunol.* 2013 Nov 15;25(4):252–62.
62. von Boehmer H. Positive selection of lymphocytes. *Cell.* 1994 Jan 28;76(2):219–28.

63. Bradley LM. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J Exp Med*. 1994 Dec 1;180(6):2401–6.
64. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell*. 1999 Oct 1;99(1):23–33.
65. Clement LT. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: Markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol*. 1992 Jan 1;12(1):1–10.
66. Steinman RM. The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991 Apr 1;9(1):271–96.
67. Knosp CA, Johnston JA. Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology*. 2012 Feb;135(2):101–11.
68. Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- β for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3–precursors. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4293–302.
69. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655–69.
70. Lord GM, Rao RM, Choe H, Sullivan BM, Lichtman AH, Luscinskas FW, et al. T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3432–9.
71. Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2004 Oct;16(5):550–7.
72. D’Elios MM, Josien R, Manghetti M, Amedei A, de Carli M, Cuturi MC, et al. Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney Int*. 1997 Jun;51(6):1876–84.
73. Tsaour I, Gasser M, Aviles B, Lutz J, Lutz L, Grimm M, et al. Donor antigen-specific regulatory T-cell function affects outcome in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2011 May;79(9):1005–12.
74. Quapp R, Madsen N, Cameron L. Characterization of the promoter of human CRTh2, a prostaglandin D2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 30;363(4):948–53.
75. Fontana I, Barocci S, Ravetti J. Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts. *Clin Transplant* [Internet]. [cited 2019 Feb 12]; Available from:

https://www.academia.edu/24849879/Cytokine_mRNA_expression_in_chronicall_y_rejected_human_renal_allografts

76. Goldman M, Le Moine A, Braun M, Flamand V, Abramowicz D. A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends Immunol.* 2001 May;22(5):247–51.
77. Waaga AM, Gasser M, Kist-van Holthe JE, Najafian N, Müller A, Vella JP, et al. Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. *J Clin Invest.* 2001 Apr 1;107(7):909–16.
78. Zelenika D, Adams E, Mellor A, Simpson E, Chandler P, Stockinger B, et al. Rejection of H-Y disparate skin grafts by monospecific CD4+ Th1 and Th2 cells: no requirement for CD8+ T cells or B cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1998 Aug 15;161(4):1868–74.
79. Barbara JA, Turvey SE, Kingsley CI, Spriewald BM, Hara M, Witzke O, et al. Islet allograft rejection can be mediated by CD4+, alloantigen experienced, direct pathway T cells of TH1 and TH2 cytokine phenotype. *Transplantation.* 2000 Dec 15;70(11):1641–9.
80. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1849–61.
81. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17–producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):950–7.
82. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17–producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):639–46.
83. Deteix C, Attuil-Audenis V, Duthey A, Patey N, McGregor B, Dubois V, et al. Intragraft Th17 infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 May 1;184(9):5344–51.
84. Loverre A, Tataranni T, Castellano G, Divella C, Battaglia M, Ditunno P, et al. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2011 Jun;11(6):1248–59.
85. Fábrega E, López-Hoyos M, Segundo DS, Casafont F, Pons-Romero F. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2009;15(6):629–33.
86. Chen L, Ahmed E, Wang T, Wang Y, Ochando J, Chong AS, et al. TLR Signals Promote IL-6/IL-17-Dependent Transplant Rejection. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):6217–25.

87. Reynolds JM, Pappu BP, Peng J, Martinez GJ, Zhang Y, Chung Y, et al. Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):692–702.
88. Evans HG, Suddason T, Jackson I, Taams LS, Lord GM. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 23;104(43):17034–9.
89. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, et al. T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *J Immunol*. 2004 Jul 1;173(1):68–78.
90. Crotty S. Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). *Annu Rev Immunol*. 2011 Apr 23;29(1):621–63.
91. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *J Exp Med*. 2000 Dec 4;192(11):1545–52.
92. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*. 2001 Jun 18;193(12):1373–81.
93. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. Cxc Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function. *J Exp Med*. 2000 Dec 4;192(11):1553–62.
94. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009 May;30(5):646–55.
95. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*. 2009 Mar 20;30(3):324–35.
96. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:741–66.
97. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, et al. The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity*. 2009 Sep;31(3):457–68.
98. O’Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010 Feb 26;327(5969):1098–102.

99. Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, et al. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol*. 1999 Jun;29(6):2037–45.
100. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell*. 1996 Dec;87(6):1037–47.
101. Arnold CN, Campbell DJ, Lipp M, Butcher EC. The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):100–9.
102. Saito T, Kitayama D, Sakamoto A, Tsuruoka N, Arima M, Hatano M, et al. Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. *Immunobiology*. 2008 Aug 29;213(7):545–55.
103. Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, Motallebzadeh R, Qureshi MS, Rehakova S, et al. Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Mar 15;188(6):2643–52.
104. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1995 Aug 1;155(3):1151–64.
105. Furtado GC, Lafaille MAC de, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4+ Regulatory T Cell Function. *J Exp Med*. 2002 Sep 16;196(6):851–7.
106. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):459–65.
107. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899):271–5.
108. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985–8.
109. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009 May;30(5):636–45.
110. Broere F, Wieten L, Klein Koerkamp EI, van Roon JAG, Guichelaar T, Lafeber FPJG, et al. Oral or nasal antigen induces regulatory T cells that suppress arthritis and proliferation of arthritogenic T cells in joint draining lymph nodes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Jul 15;181(2):899–906.

111. Wang L, Toda M, Saito K, Hori T, Horii T, Shiku H, et al. Post-immune UV irradiation induces Tr1-like regulatory T cells that suppress humoral immune responses. *Int Immunol*. 2008 Jan;20(1):57–70.
112. Ludwig-Portugall I, Hamilton-Williams EE, Gottschalk C, Kurts C. Cutting edge: CD25⁺ regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Oct 1;181(7):4447–51.
113. Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):170.
114. Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O’Shea JJ, et al. CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *J Exp Med*. 2008 Sep 1;205(9):1975–81.
115. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4⁺ CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875–86.
116. DiPaolo RJ, Brinster C, Davidson TS, Andersson J, Glass D, Shevach EM. Autoantigen-Specific TGF β -Induced Foxp3⁺ Regulatory T Cells Prevent Autoimmunity by Inhibiting Dendritic Cells from Activating Autoreactive T Cells. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4685–93.
117. Hu M, Wang C, Zhang GY, Saito M, Wang YM, Fernandez MA, et al. Infiltrating Foxp3⁺ Regulatory T Cells From Spontaneously Tolerant Kidney Allografts Demonstrate Donor-Specific Tolerance. *Am J Transplant*. 2013 Nov 1;13(11):2819–30.
118. Bickerstaff AA, Wang J-J, Pelletier RP, Orosz CG. Murine Renal Allografts: Spontaneous Acceptance Is Associated with Regulated T Cell-Mediated Immunity. *J Immunol*. 2001 Nov 1;167(9):4821–7.
119. Miyajima M, Chase CM, Alessandrini A, Farkash EA, Della Pelle P, Benichou G, et al. Early Acceptance of Renal Allografts in Mice Is Dependent on Foxp3⁺ Cells. *Am J Pathol*. 2011 Apr 1;178(4):1635–45.
120. Chung BH, Oh HJ, Piao SG, Hwang HS, Sun IO, Choi SR, et al. Clinical significance of the ratio between FOXP3 positive regulatory T cell and interleukin-17 secreting cell in renal allograft biopsies with acute T-cell-mediated rejection. *Immunology*. 2012;136(3):344–51.
121. Hoerning A, Koss K, Datta D, Boneschansker L, Jones CN, Wong IY, et al. Subsets of human CD4⁺ regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3. *Eur J Immunol*. 2011 Aug 1;41(8):2291–302.

122. Lin WX, Christiansen D, Fu LL, Roberts MA, Sandrin MS, Ierino FL. Foxp3+ T cells in peripheral blood of renal transplant recipients and clinical correlations. *Nephrology*. 2012;17(4):415–22.
123. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 2006 Feb 15;81(3):398–407.
124. Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25+ T Cells in Human Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun 1;14(6):1643–51.
125. Schaier M, Seissler N, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Zeier M, et al. DRhigh+CD45RA–-Tregs Potentially Affect the Suppressive Activity of the Total Treg Pool in Renal Transplant Patients. *PLOS ONE*. 2012;7(3):e34208.
126. Bishop GA, Ierino FL, Sharland AF, Hall BM, Alexander SI, Sandrin MS, et al. Approaching the promise of operational tolerance in clinical transplantation. *Transplantation*. 2011 May 27;91(10):1065–74.
127. Jankowska-Gan E, Sollinger HW, Pirsch JD, Cai J, Pascual J, Haynes LD, et al. Successful reduction of immunosuppression in older renal transplant recipients who exhibit donor-specific regulation. *Transplantation*. 2009 Aug 27;88(4):533–41.
128. VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*. 2000 Jan 1;106(1):145–55.
129. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med*. 2002 Jun 3;195(11):1499–505.
130. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting Edge: TGF- β Inhibits Th Type 2 Development Through Inhibition of GATA-3 Expression. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):4773–7.
131. DiPaolo RJ, Brinster C, Davidson TS, Andersson J, Glass D, Shevach EM. Autoantigen-Specific TGF β -Induced Foxp3+ Regulatory T Cells Prevent Autoimmunity by Inhibiting Dendritic Cells from Activating Autoreactive T Cells. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4685–93.
132. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, et al. Presence of FoxP3+ Regulatory T Cells Predicts Outcome of Subclinical Rejection of Renal Allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Oct 1;19(10):2020–6.
133. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, et al. HLA-Mismatched Renal Transplantation without Maintenance Immunosuppression. *N Engl J Med*. 2008 Jan 24;358(4):353–61.

134. Pilat N, Wekerle T. Mechanistic and therapeutic role of regulatory T cells in tolerance through mixed chimerism. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Dec 1;15(6):725–30.
135. Nova-Lamperti E, Romano M, Christakoudi S, Runglall M, McGregor R, Mobillo P, et al. Reduced TCR-signalling contributes to impaired Th17 responses in tolerant kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2018 Jan;102(1):e10–7.
136. Ma L, Zhang H, Hu K, Lv G, Fu Y, Ayana DA, et al. The imbalance between Tregs, Th17 cells and inflammatory cytokines among renal transplant recipients. *BMC Immunol*. 2015 Sep 23;16:56.
137. Sánchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology*. 2011 Jan;140(1):51–64.
138. Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3390–5.
139. Koulmanda M, Bhasin M, Hoffman L, Fan Z, Qipo A, Shi H, et al. Curative and beta cell regenerative effects of alpha1-antitrypsin treatment in autoimmune diabetic NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21;105(42):16242–7.
140. Lewis EC, Mizrahi M, Toledano M, Defelice N, Wright JL, Churg A, et al. alpha1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21;105(42):16236–41.
141. Bamoulid J, Staeck O, Halleck F, Khadzhyrov D, Paliege A, Brakemeier S, et al. Immunosuppression and Results in Renal Transplantation. *Eur Urol Suppl*. 2016 Dec;15(9):415–29.
142. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2004 Dec 23;351(26):2715–29.
143. Pascual J. Steroid avoidance or withdrawal in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Dec 1;16(6):600–5.
144. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. Epstein FH, editor. *N Engl J Med*. 1997 Apr 10;336(15):1066–71.
145. Haller MC, Kammer M, Kainz A, Baer HJ, Heinze G, Oberbauer R. Steroid withdrawal after renal transplantation: a retrospective cohort study. *BMC Med* [Internet]. 2017 Jan 12 [cited 2019 Feb 13];15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5228116/>

146. Budde K, Dürr M, Liefeldt L, Neumayer H-H, Glander P. Enteric-coated mycophenolate sodium. *Expert Opin Drug Saf*. 2010 Nov 1;9(6):981–94.
147. Kuypers DRJ, Meur YL, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, et al. Consensus Report on Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Feb 1;5(2):341–58.
148. Arns W, Cibrik D, Walker R, Mourad G, Budde K, Mueller E, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplant Patients Treated With Mycophenolate Mofetil: Review of the Literature. *Transplantation*. 2006 Oct 1;82(8):1004–12.
149. Knight SR, Morris PJ. Does the Evidence Support the Use of Mycophenolate Mofetil Therapeutic Drug Monitoring in Clinical Practice? A Systematic Review: *Transplantation*. 2008 Jun;85(12):1675–85.
150. Srinivas TR, Kaplan B, Meier-Kriesche H-U. Mycophenolate mofetil in solid-organ transplantation. *Expert Opin Pharmacother*. 2003 Dec 1;4(12):2325–45.
151. Maripuri S, Kasiske BL. The role of mycophenolate mofetil in kidney transplantation revisited. *Transplant Rev*. 2014 Jan 1;28(1):26–31.
152. Hirsch HH, Randhawa P, the AST Infectious Diseases Community of Practice. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation: BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13(s4):179–88.
153. Sawinski D, Goral S. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Feb 1;30(2):209–17.
154. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013 Aug 27;96(4):333–60.
155. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko Š, Nashan B, Gürkan A, et al. Reduced Exposure to Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation. *N Engl J Med*. 2007 Dec 20;357(25):2562–75.
156. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ*. 2005 Oct 8;331(7520):810.
157. Almeida CC, Silveira MR, De Araújo VE, De Lemos LLP, De Oliveira Costa J, Reis CAL, et al. Safety of Immunosuppressive Drugs Used as Maintenance Therapy in Kidney Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pharmaceuticals*. 2013 Oct;6(10):1170–94.

158. Silva HT, Yang HC, Abouljoud M, Kuo PC, Wisemandle K, Bhattacharya P, et al. One-Year Results with Extended-Release Tacrolimus/MMF, Tacrolimus/MMF and Cyclosporine/MMF in De Novo Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2007 Mar;7(3):595–608.
159. van Gelder T, Silva HT, de Fijter JW, Budde K, Kuypers D, Tyden G, et al. Comparing mycophenolate mofetil regimens for de novo renal transplant recipients: the fixed-dose concentration-controlled trial. *Transplantation*. 2008 Oct 27;86(8):1043–51.
160. Presser D, Sester U, Mohrbach J, Janssen M, Köhler H, Sester M. Differential kinetics of effector and regulatory T cells in patients on calcineurin inhibitor-based drug regimens. *Kidney Int*. 2009 Sep;76(5):557–66.
161. Ma A, Qi S, Wang Z, Massicotte E, Dupuis M, Daloz P, et al. Combined therapy of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with low-dose sirolimus, but not calcineurin inhibitors, preserves suppressive function of regulatory T cells and prolongs allograft survival in mice. *Int Immunopharmacol*. 2009 May;9(5):553–63.
162. Caproni M, Torchia D, Antiga E, Volpi W, del Bianco E, Fabbri P. The effects of tacrolimus ointment on regulatory T lymphocytes in atopic dermatitis. *J Clin Immunol*. 2006 Jul;26(4):370–5.
163. Raczyńska D, Ślizień M, Bzoma B, Dębska-Ślizień A, Glasner L, Raczyńska K. A 10-year monitoring of the eyesight in patients after kidney transplantation. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Feb;97(6):e9822.
164. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2009 Nov;9 Suppl 3:S1-155.
165. Bhayana S, Baisantry A, Kraemer TD, Wrede C, Hegermann J, Bräsen J-H, et al. Autophagy in kidney transplants of sirolimus treated recipients. *J Nephropathol*. 2017 Mar;6(2):90–6.
166. Sabbatini M, Ruggiero G, Palatucci AT, Rubino V, Federico S, Giovazzino A, et al. Oscillatory mTOR inhibition and Treg increase in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2015;182(2):230–40.
167. Kim KW, Chung BH, Kim B-M, Cho M-L, Yang CW. The effect of mammalian target of rapamycin inhibition on T helper type 17 and regulatory T cell differentiation in vitro and in vivo in kidney transplant recipients. *Immunology*. 2015 Jan;144(1):68–78.
168. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo M-G. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+

- regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Dec 15;177(12):8338–47.
169. Battaglia M, Stabilini A, Draghici E, Gregori S, Mocchetti C, Bonifacio E, et al. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes*. 2006 Jan;55(1):40–9.
 170. Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2007 Jul;7(7):1722–32.
 171. Hendrikx TK, Velthuis JHL, Klepper M, van Gurp E, Geel A, Schoordijk W, et al. Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4 CD25 FoxP3 T cells in renal recipients. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2009 Sep;22(9):884–91.
 172. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo M-G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4743–8.
 173. Zeiser R, Leveson-Gower DB, Zambricki EA, Kambham N, Beilhack A, Loh J, et al. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):453–62.
 174. Murakami N, Riella LV, Funakoshi T. Risk of Metabolic Complications in Kidney Transplantation After Conversion to mTOR Inhibitor: A Systematic Review and Meta-Analysis: Complications Post-mTORi Conversion. *Am J Transplant*. 2014 Oct;14(10):2317–27.
 175. Kaplan B, Qazi Y, Wellen JR. Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors. *Transplant Rev*. 2014 Jul 1;28(3):126–33.
 176. Huyghe E, Zairi A, Nohra J, Kamar N, Plante P, Rostaing L. Gonadal impact of target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) in male patients: an overview. *Transpl Int*. 2007;20(4):305–11.
 177. Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, Waiser J, Lachmann N, Schönemann C, et al. Donor-Specific HLA Antibodies in a Cohort Comparing Everolimus With Cyclosporine After Kidney Transplantation. *Am J Transplant*. 2012 May 1;12(5):1192–8.
 178. Braun M, Young J, Reiner CS, Poster D, Krauer F, Kistler AD, et al. Low-Dose Oral Sirolimus and the Risk of Menstrual-Cycle Disturbances and Ovarian Cysts: Analysis of the Randomized Controlled SUISSE ADPKD Trial. *PLOS ONE*. 2012;7(10):e45868.

179. Prévaille X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, et al. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation*. 2001 Feb 15;71(3):460–8.
180. Haudebourg T, Poirier N, Vanhove B. Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl Int*. 2009;22(5):509–18.
181. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood*. 1998 Apr 1;91(7):2360–8.
182. Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, Heymanns J, Radsak K, Sprenger H, et al. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation*. 1997 Nov 27;64(10):1432–7.
183. Ruzek MC, Neff KS, Luong M, Smith KA, Culm-Merdek K, Richards SM, et al. In Vivo Characterization of Rabbit Anti-Mouse Thymocyte Globulin: A Surrogate for Rabbit Anti-Human Thymocyte Globulin: *Transplantation*. 2009 Jul;88(2):170–9.
184. Tang Q, Leung J, Melli K, Lay K, Chuu EL, Liu W, et al. Altered balance between effector T cells and FOXP3+ HELIOS+ regulatory T cells after thymoglobulin induction in kidney transplant recipients. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2012 Dec;25(12):1257–67.
185. Opelz G, Naujokat C, Daniel V, Terness P, Döhler B. Disassociation Between Risk of Graft Loss and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma With Induction Agents in Renal Transplant Recipients. *Transplantation*. 2006 May 1;81(9):1227–33.
186. Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER, Fan J, Liu Z, Cai JW, et al. Anti-CD25 treatment and FOXP3-positive regulatory T cells in heart transplantation. *Transpl Immunol*. 2007 Jul;18(1):13–21.
187. Ciancio G, Burke G, Gaynor J, Carreno M, Cirocco R, Mathew J, et al. A Randomized Trial of Three Renal Transplant Induction Antibodies: Early Comparison of Tacrolimus, Mycophenolate Mofetil, and Steroid Dosing, and Newer Immune-Monitoring1. *Transplantation*. 2005 Aug 1;80(4):457–65.
188. Ciancio G, Burke G, Gaynor J, Sageshima J, Herrada E, Tueros L, et al. Campath-1H Induction Therapy in African American and Hispanic First Renal Transplant Recipients: 3-Year Actuarial Follow-Up. *Transplantation*. 2008 Feb 1;85(4):507–16.
189. Pascual J, Pirsch J, Odorico J, Torrealba J, Djamali A, Becker Y, et al. Alemtuzumab Induction and Antibody-Mediated Kidney Rejection After Simultaneous Pancreas-Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2009 Jan 1;87(1):125–32.

190. Pascual J, Mezhich J, Djamali A, Levenson G, Chin L, Torrealba J, et al. Alemtuzumab Induction and Recurrence of Glomerular Disease After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2007 Jun 1;83(11):1429–34.
191. Woodle ES, First MR, Pirsch J, Shihab F, Gaber AO, Van Veldhuisen P, et al. A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial comparing early (7 day) corticosteroid cessation versus long-term, low-dose corticosteroid therapy. *Ann Surg*. 2008 Oct;248(4):564–77.
192. Haynes R, Harden P, Judge P, Blackwell L, Emberson J, Landray MJ, et al. Alemtuzumab-based induction treatment versus basiliximab-based induction treatment in kidney transplantation (the 3C Study): a randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2014 Nov;384(9955):1684–90.
193. Hanaway MJ, Woodle ES, Mulgaonkar S, Peddi VR, Kaufman DB, First MR, et al. Alemtuzumab Induction in Renal Transplantation. *N Engl J Med*. 2011 May 19;364(20):1909–19.
194. Morgan RD, O’Callaghan JM, Knight SR, Morris PJ. Alemtuzumab induction therapy in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2012 Jun 27;93(12):1179–88.
195. Cherikh W, Kauffman H, McBride M, Maghirang J, Swinnen L, Hanto D. Association of the type of induction immunosuppression with posttransplant lymphoproliferative disorder, graft survival, and patient survival after primary kidney transplantation. *Transplantation*. 2003 Nov 1;76(9):1289–93.
196. Pascual J, Royuela A, Galeano C, Crespo M, Zamora J. Very early steroid withdrawal or complete avoidance for kidney transplant recipients: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Feb 1;27(2):825–32.
197. Webster A, Playford E, Higgins G, Chapman J, Craig J. Interleukin 2 receptor antagonists for renal transplant recipients: a meta-analysis of randomized trials. *Transplantation*. 2004 Jan 1;77(2):166–76.
198. Mathis AS, Egloff G, Ghin HL. Calcineurin inhibitor sparing strategies in renal transplantation, part one: Late sparing strategies. *World J Transplant*. 2014 Jun 24;4(2):57–80.
199. Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, Bresnahan B, Garcia VD, Kothari J, et al. Three-Year Outcomes from BENEFIT, a Randomized, Active-Controlled, Parallel-Group Study in Adult Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2012 Jan 1;12(1):210–7.
200. Issa F, Wood KJ. CD4+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Dec;15(6):757–64.

201. Brandacher G, Margreiter R, Fuchs D. Clinical relevance of indoleamine 2,3-dioxygenase for alloimmunity and transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008 Feb;13(1):10–5.
202. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016 Sep;16(9):553–65.
203. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2013 Mar 21;31:259–83.
204. Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey J-L, Zamboni N, Westermann B, et al. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*. 2012 Jul 6;337(6090):93–6.
205. Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen Y-C, et al. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science*. 2012 Jul 6;337(6090):96–100.
206. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):633–43.
207. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*. 2011 Dec 23;35(6):871–82.
208. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*. 2002 Jun;16(6):769–77.
209. Pollizzi KN, Powell JD. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jul;14(7):435–46.
210. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, et al. HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med*. 2011 Jul 4;208(7):1367–76.
211. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Mar 15;186(6):3299–303.
212. Huynh A, DuPage M, Priyadarshini B, Sage PT, Quiros J, Borges CM, et al. Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability. *Nat Immunol*. 2015 Feb;16(2):188–96.
213. Shrestha S, Yang K, Guy C, Vogel P, Neale G, Chi H. Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses. *Nat Immunol*. 2015 Feb;16(2):178–87.

214. Wei J, Long L, Yang K, Guy C, Shrestha S, Chen Z, et al. Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis. *Nat Immunol*. 2016 Mar;17(3):277–85.
215. Mukhopadhyay R, Jia J, Arif A, Ray PS, Fox PL. The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem Sci*. 2009 Jul;34(7):324–31.
216. Chang C-H, Curtis JD, Maggi LB, Faubert B, Villarino AV, O’Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1239–51.
217. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun*. 2015 Mar 26;6:6692.
218. Lee J, Walsh MC, Hoehn KL, James DE, Wherry EJ, Choi Y. Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Apr 1;192(7):3190–9.
219. Carr EL, Kelman A, Wu GS, Gopaul R, Senkevitch E, Aghvanyan A, et al. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jul 15;185(2):1037–44.
220. Crawford J, Cohen HJ. The essential role of L-glutamine in lymphocyte differentiation in vitro. *J Cell Physiol*. 1985 Aug;124(2):275–82.
221. Nakaya M, Xiao Y, Zhou X, Chang J-H, Chang M, Cheng X, et al. Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation. *Immunity*. 2014 May 15;40(5):692–705.
222. Dang CV. MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Aug 1;3(8).
223. Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, Lee Y-S, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):762–5.
224. Finkbeiner MR, Astanehe A, To K, Fotovati A, Davies AH, Zhao Y, et al. Profiling YB-1 target genes uncovers a new mechanism for MET receptor regulation in normal and malignant human mammary cells. *Oncogene*. 2009 Mar 19;28(11):1421–31.
225. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1568–73.
226. Yoshida R, Hayaishi O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Aug;75(8):3998–4000.

227. Yoshida R, Imanishi J, Oku T, Kishida T, Hayaishi O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jan;78(1):129–32.
228. Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Parallel induction of tetrahydrobiopterin biosynthesis and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells and cell lines by interferon-gamma. *Biochem J*. 1989 Sep 15;262(3):861–6.
229. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999 May 3;189(9):1363–72.
230. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*. 2002 Dec;107(4):452–60.
231. Liu H, Huang L, Bradley J, Liu K, Bardhan K, Ron D, et al. GCN2-dependent metabolic stress is essential for endotoxemic cytokine induction and pathology. *Mol Cell Biol*. 2014 Feb;34(3):428–38.
232. Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Matino D, Servillo G, Brunacci C, et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature*. 2014 Jul 10;511(7508):184–90.
233. Bettencourt IA, Powell JD. Targeting metabolism as a novel therapeutic approach to autoimmunity, inflammation and transplantation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 Feb 1;198(3):999–1005.
234. Stacpoole PW, Felts JM. Diisopropylammonium dichloroacetate (DIPA) and sodium dichloroacetate (DCA): effect on glucose and fat metabolism in normal and diabetic tissue. *Metabolism*. 1970 Jan;19(1):71–8.
235. Whitehouse S, Randle PJ. Activation of pyruvate dehydrogenase in perfused rat heart by dichloroacetate (Short Communication). *Biochem J*. 1973 Jun;134(2):651–3.
236. Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer*. 2008 Oct 7;99(7):989–94.
237. Stacpoole PW. The dichloroacetate dilemma: environmental hazard versus therapeutic goldmine--both or neither? *Environ Health Perspect*. 2011 Feb;119(2):155–8.
238. Stacpoole PW. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism*. 1989 Nov;38(11):1124–44.

239. Howlett RA, Heigenhauser GJ, Hultman E, Hollidge-Horvat MG, Spriet LL. Effects of dichloroacetate infusion on human skeletal muscle metabolism at the onset of exercise. *Am J Physiol*. 1999 Jul;277(1 Pt 1):E18-25.
240. Parolin ML, Spriet LL, Hultman E, Matsos MP, Hollidge-Horvat MG, Jones NL, et al. Effects of PDH activation by dichloroacetate in human skeletal muscle during exercise in hypoxia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Oct;279(4):E752-761.
241. Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochem J*. 2001 Aug 15;358(Pt 1):69-77.
242. Kankotia S, Stacpoole PW. Dichloroacetate and cancer: new home for an orphan drug? *Biochim Biophys Acta*. 2014 Dec;1846(2):617-29.
243. Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 May;284(5):E855-862.
244. Shroads AL, Guo X, Dixit V, Liu H-P, James MO, Stacpoole PW. Age-dependent kinetics and metabolism of dichloroacetate: possible relevance to toxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Mar;324(3):1163-71.
245. Shroads AL, Langae T, Coats BS, Kurtz TL, Bullock JR, Weithorn D, et al. Human Polymorphisms in the Glutathione Transferase Zeta 1/Maleylacetoacetate Isomerase Gene Influence the Toxicokinetics of Dichloroacetate. *J Clin Pharmacol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2019 Feb 20];52(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3786668/>
246. Stacpoole PW. Review of the pharmacologic and therapeutic effects of diisopropylammonium dichloroacetate (DIPA). *J Clin Pharmacol J New Drugs*. 1969 Oct;9(5):282-91.
247. Stacpoole PW, Moore GW, Kornhauser DM. Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med*. 1978 Mar 9;298(10):526-30.
248. Bersin RM, Stacpoole PW. Dichloroacetate as metabolic therapy for myocardial ischemia and failure. *Am Heart J*. 1997 Nov;134(5 Pt 1):841-55.
249. Stacpoole PW, Harman EM, Curry SH, Baumgartner TG, Misbin RI. Treatment of lactic acidosis with dichloroacetate. *N Engl J Med*. 1983 Aug;309(7):390-6.
250. Stacpoole PW, Wright EC, Baumgartner TG, Bersin RM, Buchalter S, Curry SH, et al. A controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of lactic acidosis in adults. The Dichloroacetate-Lactic Acidosis Study Group. *N Engl J Med*. 1992 Nov 26;327(22):1564-9.

251. Stacpoole PW, Gilbert LR, Neiberger RE, Carney PR, Valenstein E, Theriaque DW, et al. Evaluation of long-term treatment of children with congenital lactic acidosis with dichloroacetate. *Pediatrics*. 2008 May;121(5):e1223-1228.
252. Berendzen K, Theriaque DW, Shuster J, Stacpoole PW. Therapeutic potential of dichloroacetate for pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Mitochondrion*. 2006 Jun;6(3):126-35.
253. Abdelmalak M, Lew A, Ramezani R, Shroads AL, Coats BS, Langae T, et al. Long-term safety of dichloroacetate in congenital lactic acidosis. *Mol Genet Metab*. 2013 Jun;109(2):139-43.
254. Evans OB, Stacpoole PW. Prolonged hypolactatemia and increased total pyruvate dehydrogenase activity by dichloroacetate. *Biochem Pharmacol*. 1982 Apr 1;31(7):1295-300.
255. Curry SH, Chu PI, Baumgartner TG, Stacpoole PW. Plasma concentrations and metabolic effects of intravenous sodium dichloroacetate. *Clin Pharmacol Ther*. 1985 Jan;37(1):89-93.
256. Stacpoole PW, Nagaraja NV, Hutson AD. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *J Clin Pharmacol*. 2003 Jul;43(7):683-91.
257. Lu KP, Liou YC, Zhou XZ. Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol*. 2002 Apr;12(4):164-72.
258. Stacpoole PW, Henderson GN, Yan Z, Cornett R, James MO. Pharmacokinetics, metabolism and toxicology of dichloroacetate. *Drug Metab Rev*. 1998 Aug;30(3):499-539.
259. Mori M, Yamagata T, Goto T, Saito S, Momoi MY. Dichloroacetate treatment for mitochondrial cytopathy: long-term effects in MELAS. *Brain Dev*. 2004 Oct;26(7):453-8.
260. Stacpoole PW, Kerr DS, Barnes C, Bunch ST, Carney PR, Fennell EM, et al. Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children. *Pediatrics*. 2006 May;117(5):1519-31.
261. Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Jhung S, Sano MC, Shungu DC, et al. Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology*. 2006 Feb 14;66(3):324-30.
262. Calcutt NA, Lopez VL, Bautista AD, Mizisin LM, Torres BR, Shroads AL, et al. Peripheral neuropathy in rats exposed to dichloroacetate. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Sep;68(9):985-93.
263. Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Jhung S, Sano MC, Shungu DC, et al. Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology*. 2006 Feb 14;66(3):324-30.

264. Warburg OH, Biologie K-W-I für. Über den Stoffwechsel der Tumoren. J. Springer; 1926. 276 p.
265. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov;4(11):891–9.
266. Yeung SJ, Pan J, Lee M-H. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2008 Dec;65(24):3981–99.
267. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029–33.
268. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):85–95.
269. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 May;11(5):325–37.
270. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
271. Sutendra G, Michelakis ED. Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol* [Internet]. 2013 Mar 7 [cited 2019 Feb 20];3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3590642/>
272. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Jan;2(1):67–71.
273. Halestrap A. Biochemistry: a pore way to die. *Nature*. 2005 Mar 31;434(7033):578–9.
274. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*. 2007 Jan;11(1):37–51.
275. Remillard CV, Yuan JX-J. Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Jan;286(1):L49-67.
276. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 2015 Apr;22(4):526–39.
277. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jun;5(6):472–84.

278. Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 3;104(27):11418–23.
279. Ostroukhova M, Goplen N, Karim MZ, Michalec L, Guo L, Liang Q, et al. The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2012 Feb 1;302(3):L300–7.
280. Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Aug;82(16):5490–4.
281. Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K, Akira S, Nakano N, Ohno S, et al. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(19):7547–51.
282. Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, Kosco-Vilbois MH. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med*. 1998 Nov 16;188(10):1895–906.
283. Bian L, Josefsson E, Jonsson I-M, Verdrengh M, Ohlsson C, Bokarewa M, et al. Dichloroacetate alleviates development of collagen II-induced arthritis in female DBA/1 mice. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R132.
284. Yin Y, Choi S-C, Xu Z, Zeumer L, Kanda N, Croker BP, et al. Glucose Oxidation Is Critical for CD4⁺ T Cell Activation in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 2016 Jan 1;196(1):80–90.
285. Yin Y, Choi S-C, Xu Z, Perry DJ, Seay H, Croker BP, et al. Normalization of CD4⁺ T cell metabolism reverses lupus. *Sci Transl Med*. 2015 Feb 11;7(274):274ra18.
286. Glick GD, Rossignol R, Lyssiotis CA, Wahl D, Lesch C, Sanchez B, et al. Anaplerotic Metabolism of Alloreactive T Cells Provides a Metabolic Approach To Treat Graft-Versus-Host Disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Nov 1;351(2):298–307.
287. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab*. 2006 Jul 1;4(1):13–24.
288. Huang SC-C, Everts B, Ivanova Y, O'Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol*. 2014 Sep;15(9):846–55.

289. Suzuki H, Hisamatsu T, Chiba S, Mori K, Kitazume MT, Shimamura K, et al. Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. *Immunol Lett.* 2016;176:18–27.
290. Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, et al. HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat Commun.* 2016 18;7:11635.
291. Doughty CA, Bleiman BF, Wagner DJ, Dufort FJ, Mataraza JM, Roberts MF, et al. Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood.* 2006 Jun 1;107(11):4458–65.
292. Dufort FJ, Bleiman BF, Gumina MR, Blair D, Wagner DJ, Roberts MF, et al. Cutting edge: IL-4-mediated protection of primary B lymphocytes from apoptosis via Stat6-dependent regulation of glycolytic metabolism. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007 Oct 15;179(8):4953–7.
293. Caro-Maldonado A, Wang R, Nichols AG, Kuraoka M, Milasta S, Sun LD, et al. Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2014 Apr 15;192(8):3626–36.
294. Eleftheriadis T, Pissas G, Mavropoulos A, Liakopoulos V, Stefanidis I. Comparison of the effect of the aerobic glycolysis inhibitor dichloroacetate and of the Krebs cycle inhibitor LW6 on cellular and humoral alloimmunity. *Biomed Rep.* 2017 Nov;7(5):439–44.
295. Garcia-Manteiga JM, Mari S, Godejohann M, Spraul M, Napoli C, Cenci S, et al. Metabolomics of B to plasma cell differentiation. *J Proteome Res.* 2011 Sep 2;10(9):4165–76.
296. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee A-H, Qian S-B, Zhao H, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity.* 2004 Jul;21(1):81–93.
297. Lam WY, Becker AM, Kennerly KM, Wong R, Curtis JD, Llufrío EM, et al. Mitochondrial Pyruvate Import Promotes Long-Term Survival of Antibody-Secreting Plasma Cells. *Immunity.* 2016 19;45(1):60–73.
298. Ohashi T, Akazawa T, Aoki M, Kuze B, Mizuta K, Ito Y, et al. Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity. *Int J Cancer.* 2013 Sep 1;133(5):1107–18.
299. Lelis FJN, Jaufmann J, Singh A, Fromm K, Teschner AC, Pöschel S, et al. Myeloid-derived suppressor cells modulate B-cell responses. *Immunol Lett.* 2017;188:108–15.

300. Simioni PU, Fernandes LG, Tamashiro WM. Downregulation of L-arginine metabolism in dendritic cells induces tolerance to exogenous antigen. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2017 Mar;30(1):44–57.
301. Cai P, Boor PJ, Khan MF, Kaphalia BS, Ansari G a. S, Konig R. Immuno- and hepato-toxicity of dichloroacetic acid in MRL(+/+) and B(6)C(3)F(1) mice. *J Immunotoxicol*. 2007 Apr;4(2):107–15.
302. Snapper CM, McIntyre TM, Mandler R, Pecanha LM, Finkelman FD, Lees A, et al. Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med*. 1992 May 1;175(5):1367–71.
303. Siu JHY, Surendrakumar V, Richards JA, Pettigrew GJ. T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2018;9:2548.
304. Sato T, Deiwick A, Raddatz G, Koyama K, Schlitt HJ. Interactions of allogeneic human mononuclear cells in the two-way mixed leucocyte culture (MLC): influence of cell numbers, subpopulations and cyclosporin. *Clin Exp Immunol*. 1999 Feb;115(2):301–8.
305. Bowker-Kinley MM, Davis IW, Wu P, Harris AR, Popov MK. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J*. 1998 Jan 1;329(1):191–6.
306. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011 Oct 10;27(1):441–64.
307. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*. 2010;NA-NA.
308. Roberts DJ, Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ*. 2015 Feb;22(2):248–57.
309. Sutendra G, Michelakis ED. Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2019 Feb 6];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2013.00038/full>
310. Arend SM, Mallat MJ, Westendorp RJ, van der Woude FJ, van Es LA. Patient survival after renal transplantation; more than 25 years follow-up. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 1997 Aug;12(8):1672–9.
311. Russell JD, Becroft ML, Ludwin D, Churchill DN. The quality of life in renal transplantation--a prospective study. *Transplantation*. 1992 Oct;54(4):656–60.

312. Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2005 Nov;5(11):844–52.
313. Eleftheriadis T, Pissas G, Karioti A, Antoniadis G, Antoniadis N, Liakopoulos V, et al. Dichloroacetate at therapeutic concentration alters glucose metabolism and induces regulatory T-cell differentiation in alloreactive human lymphocytes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2013;24(4):271–276.
314. Stacpoole PW, Kurtz TL, Han Z, Langae T. Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Nov;60(13–14):1478–87.
315. Palmer CS, Hussain T, Duette G, Weller TJ, Ostrowski M, Sada-Ovalle I, et al. Regulators of Glucose Metabolism in CD4+ and CD8+ T Cells. *Int Rev Immunol.* 2016;35(6):477–88.
316. Berlanga JJ, Santoyo J, de Haro C. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 α kinase. *Eur J Biochem.* 1999 Oct 1;265(2):754–62.
317. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004 Oct;4(10):762–74.
318. Grohmann U, Bronte V. Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunol Rev.* 2010 Jul;236:243–64.
319. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, et al. Mitochondria Are Required for Antigen-Specific T Cell Activation through Reactive Oxygen Species Signaling. *Immunity.* 2013 Feb 21;38(2):225–36.
320. van der Windt GJW, Everts B, Chang C-H, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, et al. Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8+ T Cell Memory Development. *Immunity.* 2012 Jan 27;36(1):68–78.
321. Gerriets VA, Kishton RJ, Nichols AG, Macintyre AN, Inoue M, Ilkayeva O, et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4+ T cell subsets and inflammation. *J Clin Invest.* 2015 Jan 2;125(1):194–207.
322. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):5771–7.
323. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich J-M, et al. Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity.* 2011 Apr 22;34(4):566–78.
324. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity.* 2008 Apr 11;28(4):546–58.

325. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Oct 1;21(5):331–44.
326. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, et al. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature.* 2013 Jun 6;498(7452):109–12.
327. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 2010 May 12;2(31):31ra34.
328. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8⁺ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest.* 2013 Oct;123(10):4479–88.
329. Mouggiakakos D, Johansson CC, Kiessling R. Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood.* 2009 Apr 9;113(15):3542–5.
330. Won HY, Jang EJ, Lee K, Oh S, Kim HK, Woo HA, et al. Ablation of peroxiredoxin II attenuates experimental colitis by increasing FoxO1-induced Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2013 Oct 15;191(8):4029–37.
331. Kim H-R, Lee A, Choi E-J, Kie J-H, Lim W, Lee HK, et al. Attenuation of experimental colitis in glutathione peroxidase 1 and catalase double knockout mice through enhancing regulatory T cell function. *PloS One.* 2014;9(4):e95332.
332. Mouggiakakos D, Johansson CC, Jitschin R, Böttcher M, Kiessling R. Increased thioredoxin-1 production in human naturally occurring regulatory T cells confers enhanced tolerance to oxidative stress. *Blood.* 2011 Jan 20;117(3):857–61.
333. Makita N, Ishiguro J, Suzuki K, Nara F. Dichloroacetate induces regulatory T-cell differentiation and suppresses Th17-cell differentiation by pyruvate dehydrogenase kinase-independent mechanism. *J Pharm Pharmacol.* 2017;69(1):43–51.