

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Ιατρικής  
Παιδιατρική Κλινική  
Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Συρογιαννόπουλος**

**Μεταμόσχευση παγκρέατος σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1:  
Μελέτη παραγόντων που συμβάλλουν στην καλή λειτουργία του μοσχεύματος  
που προέρχεται από παιδιά ή ενηλίκους.**

**Σταύρος Διαμαντόπουλος  
Παιδίατρος - Παιδοενδοκρινολόγος**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ  
2009**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Γεώργιος Συρογιαννόπουλος	Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπων Καθηγητής
Γεώργιος Κουκούλης	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Νικόλαος Σκεντέρης	Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Γεώργιος Συρογιαννόπουλος	Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Γεώργιος Κουκούλης	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Νικόλαος Σκεντέρης	Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Αναστάσιος Γερμενής	Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Γεώργιος Νταλέκος	Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Γεώργιος Κουκούλης	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Ιωάννα Γριβέα	Λέκτορας Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Στους γονείς μου*

## ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Θέλω να εκφράσω θερμές ευχαριστίες σε όλους όσοι βοήθησαν στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Συρογιαννόπουλο για τη συνεχή και σταθερή του υποστήριξη καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης, την καθοδήγησή του στη δύσκολη αυτή διαδρομή και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Η συμβολή του κ. Γεωργίου Κουκούλη, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας και Ενδοκρινολογίας και μέλους της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής ήταν εξαιρετικά πολύτιμη για την κατά το δυνατόν αρτιότερη και σαφέστερη παρουσίαση των δεδομένων της παρούσας μελέτης. Θερμές ευχαριστίες επίσης στον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας κ. Γεώργιο Κουκούλη και τον Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Νικόλαο Σκεντέρη, μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής. Ακόμα ευχαριστώ τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Αναστάσιο Γερμενή, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, κ. Γεώργιο Νταλέκο, Καθηγητή Παθολογίας και κ. Ιωάννα Γριβέα, Λέκτορα Παιδιατρικής για τη συμμετοχή τους.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον προϊστάμενο και μέντορά μου Dr. Alberto Pugliese, Διευθυντή του Τμήματος Ανοσογενετικής του Ινστιτούτου Έρευνας για το Διαβήτη (Diabetes Research Institute - DRI) του Πανεπιστημίου του Μαϊάμι, και τον επικεφαλής του προγράμματος μεταμοσχεύσεων νεφρών – παγκρέατος Καθηγητή Χειρουργικής Μεταμοσχεύσεων Dr. George W Burke, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμμετέχω στη μελέτη αυτή, και για την καθημερινή τους προσφορά στην εκπαίδευσή μου.

Ευχαριστώ τους καλούς συνεργάτες και φίλους στο εργαστήριο ανοσογενετικής του DRI, Gloria Allende, Francesco Vendrame και Ainhoa Martin-Pagola των οποίων η συμβολή ήταν καθοριστική για την εκτέλεση της παρούσας μελέτης. Είμαι τέλος υπόχρεος στο προσωπικό του Προγράμματος Μεταμοσχεύσεων του Πανεπιστημίου του Μαϊάμι, Dr. Robert Cirocco, Lissett Tueros, Lois Hanson, Anne Rosen, Sandra Flores, Felisa Flores, Folasade Amole, Larisa Riveron και Carmen Gomez.

<b>Περιεχόμενα</b>	<b>Σελίδα</b>
<b>I. Γενικό μέρος</b>	<b>6</b>
1. Ιστορική αναδρομή	7
2. Ταξινόμηση και διαγνωστικά κριτήρια Σακχαρώδη Διαβήτη	10
3. Στοιχεία ανατομίας και φυσιολογίας του παγκρέατος	13
3.1 Στοιχεία ανατομίας	13
3.2 Στοιχεία φυσιολογίας	13
3.3 Έκκριση και δράση της ινσουλίνης	14
4. Επιδημιολογία	19
5. Παράγοντες κινδύνου	20
5.1 Γενετικοί παράγοντες	20
5.2 Περιβάλλον	22
6. Αιτιοπαθογένεση	25
6.1 Ανοσολογικοί μηχανισμοί	25
6.2 Μηχανισμός καταστροφής του β-κυττάρου	30
6.3 Νησιδικά αυτοαντιγόνα και αυτοαντισώματα	32
6.4 Αυτοαντιδρώντα T-λεμφοκύτταρα	34
7. Κλινική εικόνα	36
7.1 Επιπλοκές	36
7.2 Συσχέτιση με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα	37
8. Θεραπεία	38
8.1 Ινσουλινοθεραπεία	38
8.2 Θεραπείες διατήρησης ή αποκατάστασης της ενδογενούς έκκρισης ινσουλίνης	40
8.2.1 Πρόληψη ΣΔ1 σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα ή σε προδιαβητικούς ασθενείς	40
8.2.2 Μεταμόσχευση παγκρεατικών νησιδίων	43
8.2.3 Ταυτόχρονη μεταμόσχευση νεφρών παγκρέατος	44
<b>II. Ειδικό μέρος</b>	<b>56</b>
1. Εισαγωγή	57
2. Ασθενείς και μέθοδοι	58
3. Αποτελέσματα	69
4. Συζήτηση	99
<b>III. Περίληψη</b>	<b>109</b>
<b>IV. Summary</b>	<b>111</b>
<b>V. Βιβλιογραφία</b>	<b>112</b>

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. Ιστορική αναδρομή.

Ήδη από τον πρώτο προ Χριστού αιώνα ο Αρεταίος περιέγραψε την καταστροφική φύση μιας νόσου που ονόμασε διαβήτη. Η ασθένεια αυτή εξακολουθεί να είναι μια σοβαρή και συχνά θανατηφόρα νόσος. Ο Αρεταίος περιέγραψε τη νόσο ως “λιώσιμο της σάρκας και των μελών στα ούρα” αλλά οι εμπειρικές του θεραπείες δεν ήταν αποτελεσματικές. Το 17<sup>ο</sup> αιώνα ο Thomas Willis, καθηγητής του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης, διεπίστωσε τη “γλυκιά γεύση” των ούρων των διαβητικών, μια παρατήρηση που χρησιμοποιείτο για τη διάγνωση της νόσου μέχρι και τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Μέχρι τότε η μόνη μέθοδος αντιμετώπισης ήταν η νηστεία με υποθερμιδικές δίαιτες οι οποίες συχνά δεν ξεπερνούσαν τις 500 θερμίδες ημερησίως. Η νηστεία κρατούσε περισσότερο τους ασθενείς στη ζωή αλλά τους καταδίκαζε σε αδυναμία και μαρασμό.

Το 1921 ένας νεαρός χειρουργός στο Οντάριο του Καναδά ονόματι Frederick Banting και ο βοηθός του Charles Best πέτυχαν να κρατήσουν ζωντανό για 70 μέρες ένα διαβητικό σκύλο χορηγώντας του ενέσεις εκχυλίσματος βόειου εμβρυικού παγκρέατος. Μερικούς μήνες αργότερα, με τη συνδρομή των γιατρών Collip και Macleod χορήγησαν ενέσεις παγκρεατικού εκχυλίσματος στο Leonard Thompson, ένα δεκατετράχρονο αγόρι που πέθαινε από σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ). Εντός 24 ωρών η γλυκόζη αίματος του Leonard είχε μειωθεί σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα και η ζωή του είχε σωθεί.

Νέες ανακαλύψεις συνέχισαν να επεκτείνουν το προσδόκιμο επιβίωσης και να βελτιώνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών. Το 1935 έγινε η διάκριση του ΣΔ σε τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενος) και τύπου 2 (μη-ινσουλινοεξαρτώμενος). Στα τέλη



της δεκαετίας του 1930 παράχθηκαν νέοι τύποι χοίρειας και βόειας ινσουλίνης. Το 1938 εμφανίστηκε στην αγορά η πρώτη ινσουλίνη μακρύτερης διάρκειας δράσης NPH, και το 1952 η Lente. Επιπλέον τη δεκαετία του 1950 κυκλοφόρησαν τα πρώτα από του στόματος υπογλυκαιμικά για ασθενείς με ΣΔ τύπου 2.

Το 1960 κυκλοφόρησαν οι πρώτες ταινίες μέτρησης σακχάρου ούρων και το 1961 η πρώτη σύριγγα μιας χρήσης, ενώ το 1966 πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο της Μανιτόμπα του Καναδά η πρώτη παγκρεατική μεταμόσχευση. Το 1969 δημιουργήθηκε ο πρώτος “φορητός” μετρητής γλυκόζης αίματος που ζύγιζε περίπου ενάμιση κιλό και έκτοτε η πρόοδος της τεχνολογίας κατάφερε να δημιουργήσει πραγματικά φορητούς μετρητές τσέπης. Παρόμοια ήταν η εξέλιξη και στις αντλίες ινσουλίνης από τότε που πρωτοεμφανίστηκαν το 1979. Η μέτρηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης A1C εισήχθη στην κλινική πράξη το 1979.

Το 1982 η φαρμακευτική εταιρεία Eli-Lilly παρήγαγε την πρώτη βιοσυνθετική ανθρώπινη ινσουλίνη (Humulin) με τη χρήση ανασυνδυασμένου DNA, της οποίας το μόριο είναι πανομοιότυπο με αυτό της ανθρώπινης. Το 1993 ολοκληρώθηκε η δεκαετής μελέτη ελέγχου του ΣΔ και των επιπλοκών του (Diabetes Control and Complications Trial – DCCT), η οποία απέδειξε τη σημασία του αυστηρού γλυκαιμικού ελέγχου για την πρόληψη επιπλοκών του ΣΔ. Το 1996 η Eli-Lilly έθεσε σε κυκλοφορία την ινσουλίνη ταχείας δράσης lispro (Humalog), που μιμείται καλύτερα τη μεταγευματική αιχμή έκκρισης ινσουλίνης του παγκρέατος. Το 1999 στην Αλμπέρτα του Καναδά έγινε η πρώτη επιτυχής μεταμόσχευση νησιδίων με μια διαδικασία που έγινε γνωστή ως “Πρωτόκολλο του Έντμοντον”.

Παρά την αλματώδη πρόοδο του τελευταίου αιώνα, η επιστημονική κοινότητα εξακολουθεί να δίνει καθημερινό αγώνα με το χρόνο για την επίτευξη της ίασης, διατηρώντας επίκαιρο όσο ποτέ τον Ιπποκρατικό λόγο: “Ο μεν βίος βραχύς, η δε τέχνη μακρά”.

## 2. Ταξινόμηση και διαγνωστικά κριτήρια.

Ο όρος Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) περιλαμβάνει μια ετερογενή ομάδα διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης που προκαλούν υπεργλυκαιμία. Χαρακτηρίζεται από μερική ή πλήρη έλλειψη έκκρισης ινσουλίνης και σε αρκετές περιπτώσεις από διαταραχές της περιφερικής δράσης της. Ήδη από το 1997 έχει προταθεί οι όροι Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 (ΣΔ1) και Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (ΣΔ2) να αντικαταστήσουν όρους όπως ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ, μη-ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ, νεανικός διαβήτης και διαβήτης ενηλίκων (1,2).

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 (ΣΔ1) χαρακτηρίζεται από καταστροφή των ινσουλινοπαραγωγών β-κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος. Ο μηχανισμός της καταστροφής αυτής είναι στην πλειονότητα των περιπτώσεων αυτοάνοσος (ΣΔ1Α), ενώ υπάρχουν σπάνιες περιπτώσεις όπου δεν ανευρίσκονται τεκμήρια αυτοανοσίας οπότε και ο ΣΔ1 χαρακτηρίζεται ιδιοπαθής (ΣΔ1Β). Επειδή η πλειονότητα των περιπτώσεων ΣΔ1 αφορούν τον τύπο ΣΔ1Α, ο όρος ΣΔ1 αναφέρεται στον κλασικό αυτοάνοσο ΣΔ1 (2,3). Ο ΣΔ1 παρουσιάζεται συνήθως σε παιδιά και εφήβους με συμπτωματική υπεργλυκαιμία που χρήζει εξωγενούς χορήγησης ινσουλίνης. Παρότι ο ΣΔ1 ονομάζεται και Νεανικός Διαβήτης, στο 25% των ασθενών με ΣΔ1, η διάγνωση τίθεται στην ενήλικη ζωή. Έτσι με τη χρήση δεικτών αυτοανοσίας (αυτοαντισωμάτων) κάποιοι ενήλικοι ασθενείς που παλιότερα θεωρείτο ότι έπασχαν από ΣΔ2, πιστεύεται πλέον ότι πάσχουν από λανθάνοντα αυτοάνοσο διαβήτη (Latent Autoimmune Diabetes of Adulthood – LADA) (4).

Ο ΣΔ2 είναι ο συχνότερος τύπος ΣΔ και χαρακτηρίζεται από διαφόρων βαθμών έλλειψη ινσουλίνης και αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης. Επειδή με την

πάροδο του χρόνου πολλοί ασθενείς με ΣΔ2 εμφανίζουν έκπτωση της λειτουργίας και απώλεια των β-κυττάρων, η ανάγκη χορήγησης ινσουλίνης δε διαχωρίζει το ΣΔ1 από το ΣΔ2 (5). Ο ΣΔ2 συνήθως εμφανίζεται σε ενήλικους με συμπτώματα υπεργλυκαιμίας και ενίοτε με κετοξέωση. Ωστόσο, λόγω της επιδημίας παχυσαρκίας που αρχίζει να παρατηρείται πλέον από την παιδική ηλικία σε πολλές χώρες, ο ΣΔ2 αρχίζει να εμφανίζεται από την εφηβεία (5).

Με την πρόοδο της μοριακής βιολογίας έχουν εντοπιστεί μονογονιδιακά νοσήματα και σύνδρομα στα οποία υπάρχει διαταραχή της λειτουργίας του β-κυττάρου, όπως μιτοχονδριακές νόσοι, σύνδρομο Wolfram, οι διάφορες μορφές MODY και ο νεογνικός διαβήτης. Σακχαρώδης Διαβήτης μπορεί επίσης να προκληθεί από διάφορα φάρμακα, λοιμώξεις, διαταραχές του παγκρέατος (τραύμα, παγκρεατίτιδα, κυστική ίνωση, αιμοχρωμάτωση) και άλλες ενδοκρινικές παθήσεις όπως σύνδρομο Cushing, μεγαλακρία-γιγαντισμός, φαιοχρωμοκύτωμα, γλυκαγόνωμα, σωματοστατίνωμα (3).

Η διάγνωση του ΣΔ1 στηρίζεται κατ'αρχήν στη διαπίστωση υπεργλυκαιμίας και στη συνέχεια στη διαφοροποίηση του ΣΔ1 από άλλες μορφές ΣΔ, βάσει κλινικής εικόνας και εργαστηριακών ευρημάτων (1). Η υπεργλυκαιμία τεκμηριώνεται είτε με την ανεύρεση γλυκόζης πλάσματος νηστείας ίσης ή πάνω από 126 mg/dl σε τουλάχιστον δύο περιπτώσεις, είτε με ανεύρεση συμπτωμάτων υπεργλυκαιμίας (πολυουρία, πολυδιψία, απώλεια βάρους) και τυχαία γλυκόζη πλάσματος πάνω από 200 mg/dl, ή με ανεύρεση γλυκόζης πλάσματος πάνω από 200 mg/dl στο δείγμα 2 ωρών της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης (1).

Η διάκριση μεταξύ ΣΔ1 και ΣΔ2 βασίζεται στο ιστορικό, τα κλινικά και τα εργαστηριακά ευρήματα. Οι ασθενείς με ΣΔ2 είναι συνήθως υπέρβαροι ενήλικες με δείκτη μάζας σώματος πάνω από την 85<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση σε αντιδιαστολή με τους ασθενείς με ΣΔ1 που είναι συνήθως παιδιά με ιστορικό πρόσφατης απώλειας βάρους. Στους ασθενείς με ΣΔ2 μπορεί να υπάρχουν συμπτώματα και σημεία αντίστασης στην ινσουλίνη (μελανίζουσα ακάνθωση), μεταβολικού συνδρόμου και συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, γεγονός λιγότερο πιθανό στο ΣΔ1 (2,7). Η διάγνωση ΣΔ1 τεκμηριώνεται με την ανεύρεση νησιδιακών αυτοαντισωμάτων στον ορό των πασχόντων.

### **3. Στοιχεία ανατομίας και φυσιολογίας.**

#### **3.1 Στοιχεία ανατομίας.**

Το πάγκρεας είναι ένα οπισθοπεριτοναϊκό όργανο της άνω κοιλίας που βρίσκεται μεταξύ του δωδεκαδακτύλου και του σπλήνα, με εξωκρινή και ενδοκρινή λειτουργία. Η εξωκρινής μοίρα αποτελείται από παγκρεατικές κυψέλες και πόρους προερχόμενους από το ενδόδερμα του αρχηγόνου εντέρου. Η αρτηριακή αιμάτωση γίνεται με κλάδους της κοιλιακής και της άνω μεσεντερίου αρτηρίας ενώ η φλεβική απορροή καταλήγει στην πυλαία φλέβα.

#### **3.2 Στοιχεία φυσιολογίας.**

Η εξωκρινής και ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος ενέχονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Η εξωκρινής μοίρα παράγει, μεταξύ άλλων ενζύμων, την παγκρεατική αμυλάση που ευθύνεται για τη διάσπαση συμπλόκων υδατανθράκων των τροφών. Περαιτέρω πέψη οδηγεί στην παραγωγή μονοσακχαριτών που μπορούν να απορροφηθούν από το έντερο. Μετά την απορρόφηση οι μονοσακχαρίτες αποτελούν το κυρίαρχο σήμα ενεργοποίησης της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος, μαζί με πεπτίδια που εκκρίνονται από εντεροενδοκρινή κύτταρα, συμμετέχοντας έτσι στον έλεγχο της ενεργειακής ομοιοστασίας (8).

Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος βρίσκεται στα νησίδια του Langerhans, που αποτελούν συγκεντρώσεις ενδοκρινικών κυττάρων ανάμεσα στα εξωκρινή στοιχεία (Εικόνα 1Α). Περίπου 1 εκατομμύριο νησίδια υπάρχουν στο ανθρώπινο πάγκρεας, έχουν διάμετρο περίπου 50 - 300 μm και περιβάλλονται από πλούσιο δίκτυο τριχοειδών (8). Στα νησίδια αυτά παραδοσιακά θεωρείται ότι απαντούνται

τέσσερις τύποι ενδοκρινικών κυττάρων με τις αντίστοιχες παραγόμενες ορμόνες: α-κύτταρα που παράγουν γλυκαγόνη, β-κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη, δ-κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη και PP-κύτταρα που παράγουν παγκρεατικό πολυπεπτίδιο. Τα β-κύτταρα έχουν κυρίως κεντρική κατανομή σε κάθε νησίδιο και αποτελούν τον πολυπληθέστερο πληθυσμό (50-80%). Υπάρχουν ακόμα σπάνια κύτταρα D1 και κύτταρα εντεροχρωμαφίνης που παράγουν VIP και σεροτονίνη αντίστοιχα. Η γλυκαγόνη δρα κυρίως στο ήπαρ διεγείροντας τη νεογλυκογένεση, τη γλυκογονόλυση και την κετογένεση. Η σωματοστατίνη αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης και γλυκαγόνης. Το PP εκλύεται μετά πρόσληψη τροφής και επηρεάζει την όρεξη και την κινητικότητα του γαστρεντερικού (8,9). Εκτός από τις παραπάνω κύριες ορμονικές δράσεις των νησιδίων, υπάρχουν και άλλες ορμόνες και πεπτίδια, όπως η αμυλίνη, που παράγονται ή απαντώνται στα παγκρεατικά νησίδια με ενδοκρινείς και παρακρινείς δράσεις.

### **3.3 Έκκριση και δράση της ινσουλίνης.**

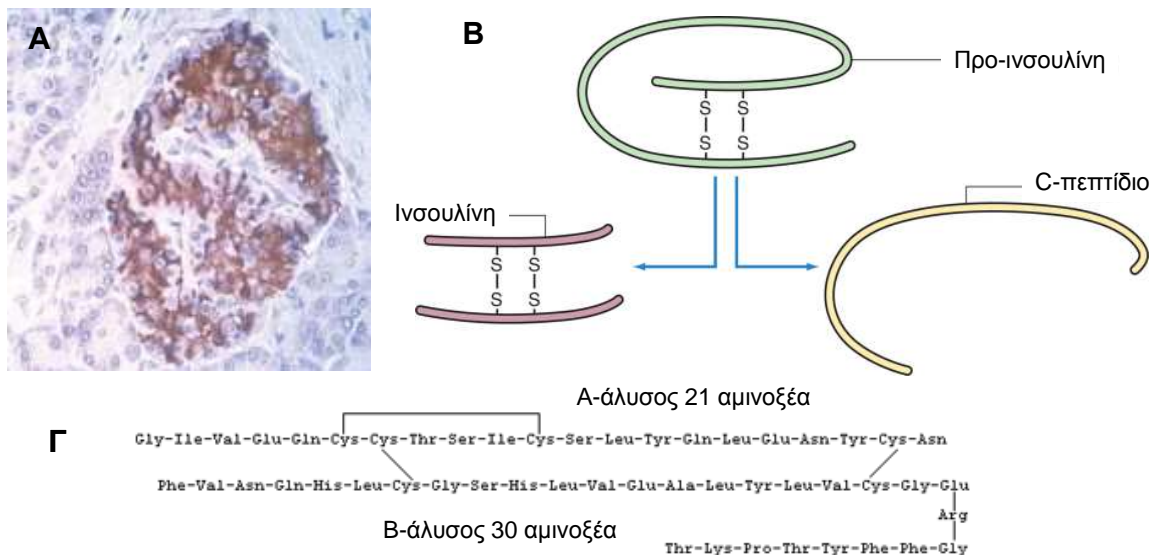
Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη με μάζα 5,8 kDa που παράγεται στα ριβοσώματα των β-κύτταρων και εκλύεται στην κυκλοφορία ως ορμόνη αποτελούμενη από δυο αλυσούς, Α και Β συνδεδεμένες μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η Α αλυσος αποτελείται από 21 αμινοξέα και η Β από 30. Παράγεται από πρωτεολυτική κατεργασία μιας μονής αλυσού αμινοξέων μεγέθους ~9 kDa, της προ-προ-ινσουλίνης. Προϊόν της πρωτεολυτικής κατεργασίας είναι και το C-πεπτίδιο, ένα πεπτίδιο που συνεκκρίνεται μαζί με την ινσουλίνη σε μοριακή αναλογία 1:1 (Εικόνα 1B). Το γονίδιο της ινσουλίνης βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 (10), και η μοριακή της σύσταση απεικονίζεται στην εικόνα 1Γ.

Η έκκριση της ινσουλίνης ελέγχεται από την αλληλεπίδραση θρεπτικών ουσιών, άλλων ορμονών, καθώς και του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Κομβικός αποδέκτης των παραπάνω σημάτων είναι ένας ATP-ευαίσθητος διάυλος καλίου ( $K_{ATP}$ ) που ελέγχει την πολικότητα της μεμβράνης του β-κυττάρου. Η συγκέντρωση γλυκόζης καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την έκκριση ινσουλίνης. Η γλυκόζη εισερχόμενη στο β-κύτταρο μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς GLUT2 φωσφορυλιώνεται από τη γλυκοκινάση και καταβολίζεται προκαλώντας αύξηση του λόγου ATP/ADP. Αυτό οδηγεί σε κλείσιμο του διαύλου  $K_{ATP}$ , εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, είσοδο ασβεστίου και απελευθέρωση ινσουλίνης. Το αμινοξύ λευκίνη διεγείρει το ένζυμο γλουταμική δεϋδρογενάση (GDH) που μεταβολίζει το γλουταμικό σε α-κετογλουταρικό και επίσης αυξάνει το λόγο ATP/ADP. Η σωματοστατίνη αντίθετα αναστέλλει την εξωκύττωση ινσουλίνης (Εικόνα 2). Η πολυπαραγοντική ρύθμιση έκκρισης της ινσουλίνης φαίνεται και από το γεγονός ότι η από του στόματος χορήγηση γλυκόζης οδηγεί σε μεγαλύτερη απάντηση από την αντίστοιχη ενδοφλέβια χορήγηση (10,11,12,13).

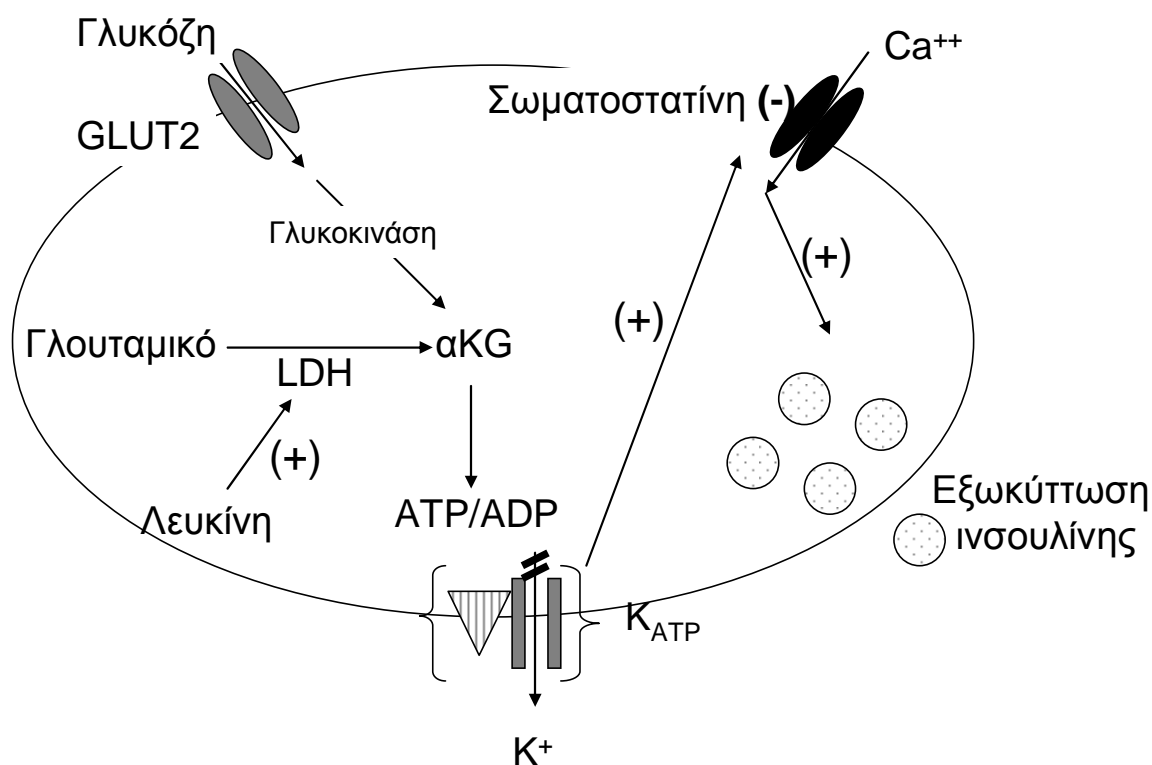
Η ινσουλίνη δρα σε κύτταρα ιστών που φέρουν τους αντιστοίχους υποδοχείς (μυϊκό, λιπώδη, ήπαρ). Ο υποδοχέας ινσουλίνης έχει δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και η σύνδεση με την ινσουλίνη οδηγεί σε ενεργοποίηση διαφόρων ενδοκυτταρίων σημάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση της εισόδου γλυκόζης στο κύτταρο και του καταβολισμού της, το σχηματισμό γλυκογόνου και την αναστολή της γλυκογονόλυσης και της νεογλυκογένεσης. Επιπλέον στους μύες διεγείρεται η πρωτεΐνοσύνθεση και στο λιπώδη ιστό καταστέλλεται η λιπόλυση και προάγεται η πρόσληψη τριγλυκεριδίων. Η



ινσουλίνη έχει δράση και στο κεντρικό νευρικό σύστημα συμμετέχοντας στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της όρεξης. Έτσι η ινσουλίνη είναι η κύρια αναβολική ορμόνη που προάγει την αποθήκευση πρωτεϊνών, λιπών και υδατανθράκων, διεγείροντας την πρόσληψη γλυκόζης, αμινοξέων και τριγλυκεριδίων από τα κύτταρα αλλά και επάγοντας τα ένζυμα που ενέχονται στη σύνθεση γλυκογόνου, πρωτεϊνών και λίπους. Παράλληλα αναστέλλει την έκφραση ή μειώνει τη δραστηριότητα των αντιστοίχων καταβολικών ενζύμων. Οι αναβολικές δράσεις της ινσουλίνης αντιστρέφονται σε περίπτωση νηστείας. Ο ΣΔ1 χωρίς θεραπεία εξελίσσεται σε μια μόνιμη καταβολική κατάσταση η οποία επιδεινώνεται αντί να βελτιώνεται με την πρόσληψη τροφής (14,15).



**Εικόνα 1.** Στοιχεία ανατομίας και φυσιολογίας του ενδοκρινούς παγκρέατος. **A:** Παγκρεατικό νησίδιο με χρώση των β-κυττάρων. **B:** Παραγωγή ινσουλίνης και C-πεπτιδίου από ένα κοινό μόριο προϊνσουλίνης. **Γ:** Αλληλουχία αμινοξέων A και B αλύσου της ινσουλίνης και σύνδεση των δύο αλύσων με δισουλφιδικούς δεσμούς.



**Εικόνα 2.** Ο μηχανισμός έκκρισης της ινσουλίνης. Κομβικό ρόλο παίζει ο διάυλος  $K_{ATP}$ . Η γλυκόζη μεταφέρεται εντός του β-κυτάρου μέσω του ινσουλινοεξαρτώμενου μεταφορέα GLUT2. Εντός του κυτάρου η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια καταβολίζεται με αποτέλεσμα την παραγωγή ATP και την αύξηση του λόγου ATP/ADP. Ο διάυλος  $K_{ATP}$  σε κατάσταση ηρεμίας είναι ανοικτός διατηρώντας ένα δυναμικό ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης  $-65mV$ . Η αύξηση του λόγου ATP/ADP οδηγεί σε κλείσιμο του διαύλου, εκπόλωση της μεμβράνης και άνοιγμα των διαύλων  $Ca^{+2}$  με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ινσουλίνης από αποθηκευμένα κυστίδια. Η διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης από αμινοξέα γίνεται μέσω ενεργοποίησης του ενζύμου γλουταμική δεϋδρογενάση (GDH) από τη λευκίνη που οδηγεί σε αυξημένο καταβολισμό γλουταμικού οξέος με αποτέλεσμα επίσης αύξηση του λόγου ATP/ADP ( $\alpha KG = \alpha$ -κετογλουταρικό).

#### 4. Επιδημιολογία.

Ο ΣΔ1 αποτελεί μια από τις συχνότερες χρόνιες νόσους με έναρξη στην παιδική ηλικία. Πάνω από το 90% των περιπτώσεων ΣΔ σε ανηλίκους και το 10%-25% των περιπτώσεων σε ενηλίκους είναι αυτοάνοσης αιτιολογίας. Η επίπτωση του ΣΔ1 εμφανίζει μεγάλη γεωγραφική διακύμανση και κυμαίνεται από περισσότερες από 35 νέες περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού στη Φινλανδία και τη Σαρδηνία μέχρι 1 ανά 100000 στην Κίνα και σε περιοχές της Νοτίου Αμερικής (16,17). Η συχνότητα του ΣΔ1 στις ΗΠΑ υπολογίζεται μεταξύ 1,7 και 2,5 περιπτώσεις ανά 1000 άτομα, και η επίπτωση μεταξύ 15 και 17 περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού ανά έτος. Παρατηρούνται δύο αιχμές αυξημένης επίπτωσης, μια μεταξύ ηλικίας 5 και 7 ετών και μια δεύτερη στα εφηβικά χρόνια (18,19).

Η συχνότητα του ΣΔ1 αυξάνει ανά τον κόσμο με την τάση αυτή να είναι εντονότερη σε χώρες με ιστορικά αυξημένη συχνότητα ΣΔ1 (17). Η αύξηση αυτή δεν εξηγείται από τις μεταβολές της κοινωνικο-οικονομικής κατάστασης. Παρότι πολλές αυτοάνοσες νόσοι προσβάλλουν συχνότερα γυναίκες, φαίνεται ότι ο ΣΔ1 προσβάλλει και τα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα. Συνολικά 10-20 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από ΣΔ1 με σημαντικό κοινωνικο-οικονομικό κόστος (17,20).

Το συνολικό κόστος του ΣΔ στις ΗΠΑ το 2002 ξεπέρασε τα 130 δισεκατομμύρια δολάρια. Από τις συνολικές περιπτώσεις ΣΔ, περίπου 15% αποδίδονται σε ΣΔ1, οι ασθενείς όμως αυτοί πιθανώς συμβάλλουν στις δαπάνες υγείας για περισσότερα χρόνια από ασθενείς με ΣΔ2 που διαγιγνώσκονται σε

μεγαλύτερη ηλικία. Το 20% των δαπανών υγείας υπολογίζεται ότι αφορούν στο ΣΔ (21).

## **5. Παράγοντες κινδύνου.**

Ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ΣΔ1 αποδίδεται στην αλληλεπίδραση πολλαπλών γενετικών, περιβαλλοντικών παραγόντων και του ανοσολογικού συστήματος.

### **5.1 Γενετικοί παράγοντες.**

Η κληρονομικότητα του ΣΔ1 δεν ακολουθεί τους Μεντελιανούς κανόνες και θεωρείται πολύπλοκη και πολυπαραγοντική. Μελέτες οικογενειών με μέλη με ΣΔ1 ή διδύμων με ΣΔ1 υποδεικνύουν το ρόλο γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ΣΔ1 φαίνεται ότι έχουν πιθανότητα περίπου 5% εμφάνισης ΣΔ1 ενώ τα μονοωογενή αδέρφια έχουν πιθανότητα περίπου 50%. Η πλειονότητα των περιπτώσεων ΣΔ1 εμφανίζεται σε άτομα χωρίς προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό. Ο πατέρας μεταφέρει στα τέκνα ελαφρώς μεγαλύτερο κίνδυνο από τη μητέρα (22,23).

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί δεκάδες γενετικοί επίτοποι που συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ1 χωρίς ωστόσο η παρουσία ενός μόνο γονιδίου να είναι αναγκαία ή ικανή συνθήκη εμφάνισης ΣΔ1. Ο επίτοπος του συμπλέγματος αντιγόνων ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (Human Lymphocyte Antigen – HLA) ήταν ο πρώτος που συσχετίστηκε με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ1 και αυτός με τη μεγαλύτερη συνεισφορά (~50%) στο γενετικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης ΣΔ1 (23,24).

Υπάρχουν τρεις κλάσεις αντιγόνων του συμπλέγματος HLA (I, II και III). Τα αντιγόνα κλάσης I (HLA A, B, C και τα λιγότερο σημαντικά E, F, G, H) απαντώνται στα περισσότερα εμπύρνηνα κύτταρα και έχουν διαλυτή μορφή που κυκλοφορεί στο πλάσμα. Συμμετέχουν στην παρουσίαση αντιγόνων σε κυτταροτοξικά CD8 κύτταρα. Τα αντιγόνα κλάσης II (HLA DR, DP, DQ και τα λιγότερο σημαντικά DM και DO) εκφράζονται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα, ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα και παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια σε βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα CD4. Αυτό είναι το πρώτο βήμα της ανοσολογικής απάντησης που περιλαμβάνει την απελευθέρωση κυτταροκινών, και την κινητοποίηση του κυτταρικού και χυμικού σκέλους. Η λειτουργία του συμπλέγματος αντιγόνων HLA και ο ρόλος του στην αυτοανοσία συζητείται παρακάτω αναλυτικότερα.

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΣΔ1 φέρουν τα αλληλία HLA DR3 ή DR4, με το 1/3 αυτών να είναι διπλοί ετεροζυγώτες DR3/DR4. Στο γενικό πληθυσμό το ποσοστό ατόμων με HLA-DR3 ή DR4 είναι 30-40%. Ο επίτοπος HLA DQ επίσης συσχετίζεται με αυξημένο ή μειωμένο κίνδυνο ΣΔ1 αναλόγως τύπου. Επίτοποι αντιγόνων της HLA κλάσης I μπορεί επίσης να ενέχονται στην παθογένεση, όπως τα αντιγόνα HLA B8, B15 και B18 (23,25).

Συσχέτιση με το ΣΔ1 εμφανίζει και ο επίτοπος IDDM2, που βρίσκεται πριν από το γονίδιο της ινσουλίνης. Ο αριθμός τυχαίων επαναλήψεων (tandem repeats) στον επίτοπο αυτό συσχετίζεται αντιστρόφως με τον κίνδυνο ΣΔ1. Άλλο γονίδιο είναι το γονίδιο του παράγοντα CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated-4), μιας επιφανειακής πρωτεΐνης που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης των Τ-λεμφοκυττάρων (24).

## 5.2 Περιβάλλον.

Ο ρόλος του περιβάλλοντος υποδεικνύεται από γεωγραφικές διαφορές στην επίπτωση του ΣΔ1, την παγκοσμίως αυξανόμενη συχνότητα και την 50% πιθανότητα εμφάνισης ΣΔ1 στο μονοωογενή δίδυμο αδελφό ασθενούς με ΣΔ1. Οι περιβαλλοντικές αυτές επιδράσεις φαίνεται ότι εμφανίζονται στα πρώτα χρόνια ζωής και ανάπτυξης. Περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται ότι επηρεάζουν και τη διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου από την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων μέχρι την κλινική εκδήλωση ΣΔ1 (3).

Έχουν προταθεί διατροφικοί και λοιμογόνοι παράγοντες κινδύνου, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν άμεσες αποδείξεις για κάτι τέτοιο. Η προστατευτική επίδραση του μητρικού θηλασμού και η συσχέτιση της πρώιμης έκθεσης σε γάλα αγελάδας με την εμφάνιση ΣΔ1 παραμένουν υπό διερεύνηση. Σε πειραματόζωα η έκθεση σε καζεΐνη αποτελεί αποδεδειγμένο παράγοντα κινδύνου (26). Σε μια μελέτη, όλα τα παιδιά με πρωτοεμφανιζόμενο ΣΔ1 που μελετήθηκαν είχαν αντισώματα έναντι της βοείου αλβουμίνης ενώ αυτό δε συνέβαινε με κανένα από τους μάρτυρες (27). Προτάθηκε ότι δομικές ομοιότητες μεταξύ της βοείου αλβουμίνης και του νησιδιακού αντιγόνου ICA προκαλούν διασταυρούμενη ευαισθητοποίηση και ενεργοποίηση της αυτοανοσίας. Υπάρχει ωστόσο σημαντικός όγκος δεδομένων που αμφισβητεί το ρόλο του αγελαδινού γάλακτος ως παράγοντα κινδύνου. Δεν έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της πρώιμης έκθεσης στο γάλα αγελάδος και της νησιδιακής αυτοανοσίας μεταξύ αδελφών ατόμων με ΣΔ1 (3). Η ενίσχυση του μητρικού θηλασμού στις ανεπτυγμένες χώρες συνοδεύεται από ταυτόχρονη αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης ΣΔ1 (28). Στα πειραματόζωα η κατανάλωση συστατικών άλλων τροφών,

όπως σόγιας και σιταριού, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση ΣΔ1 (26). Δύο μελέτες σε παιδιά ασθενών με ΣΔ1 συσχέτισαν το χρόνο έκθεσης στα δημητριακά και τη γλουτένη με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ1 (29,30).

Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ΣΔ1 παγκοσμίως παρατηρείται στη Φινλανδία. Το γεγονός αυτό έχει συσχετιστεί με τη μειωμένη έκθεση στον ήλιο και τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D και ασβεστίου (31). Η βιταμίνη D έχει ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες που ίσως παίζουν ρόλο στην παθογένεση του ΣΔ1, όπως έχει φανεί από μελέτες σε πειραματόζωα και *in vitro*. Περιγεννητικοί παράγοντες όπως προεκλαμψία, αναπνευστική δυσχέρεια, λοιμώξεις, καισαρική τομή, βάρος γέννησης, διάρκεια κύησης και ηλικία μητέρας επίσης συσχετίζονται με την εμφάνιση ΣΔ1 (3).

Η παράλληλη αύξηση της συχνότητας αλλεργικών παθήσεων και άσθματος με αυτή του ΣΔ1 ίσως δείχνει την απώλεια προστατευτικών παραγόντων του περιβάλλοντος. Σύμφωνα με μια υπόθεση, η έκθεση σε λοιμογόνους παράγοντες στην πρώιμη παιδική ηλικία είναι απαραίτητη για την ωρίμανση του ανοσολογικού συστήματος. Χωρίς την έκθεση αυτή υποστηρίζεται ότι ο ανοσολογικός έλεγχος της αυτοανοσίας ή της αλλεργίας μπορεί να αποτύχει (32). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από σημαντικά δεδομένα σε πειραματόζωα, όχι όμως στον άνθρωπο.

Η συγγενής ερυθρά σχετίζεται με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων και ΣΔ1 αλλά όχι και η λοίμωξη με ερυθρά μετά τη γέννηση (33,34). Μελέτες από τη Σκανδιναβία υποδεικνύουν ότι η λοίμωξη της μητέρας από εντεροϊό ίσως αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης ΣΔ1 στο κύημα. Οι μητέρες παιδιών με ΣΔ1 έχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων έναντι εντεροϊών κατά την



κύηση (35). Στον αντίποδα, η συχνότητα λοίμωξης από εντεροϊούς σε εγκύους και στα πρώτα χρόνια ζωής μειώνεται (36). Νησιδιακά αυτοαντισώματα ανιχνεύονται μετά τη λοίμωξη από τους ιούς της παρωτίτιδας, ιλαράς, ανεμευλογιάς και Rota (33). Δεν αποκλείεται πάντως άτομα επιρρεπή σε αυτοάνοσες αντιδράσεις να είναι πιο επιρρεπή σε λοιμώξεις από τους παραπάνω ιούς. Ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων παραμένει υπό διερεύνηση.

## **6. Αιτιοπαθογένεση.**

Το παθογενετικό μοντέλο που τυγχάνει μεγαλύτερης αποδοχής υποστηρίζει ότι τα γενετικά προδιαθετειμένα άτομα εκτίθενται σε κάποιο περιβαλλοντικό εκλυτικό παράγοντα της αυτοάνοσης αντίδρασης έναντι των β-κυττάρων.

### **6.1 Ανοσολογικοί μηχανισμοί.**

Το ανοσολογικό σύστημα είναι επιφορτισμένο με την αναγνώριση ξένων αντιγόνων και την καταστροφή τους. Κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία αυτή παίζει η οικογένεια των πρωτεϊνών του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας που κωδικοποιούνται από μια περιοχή του χρωμοσώματος 6p. Η γενετική ανάλυση του Συμπλέγματος Μείζονος Ιστοσυμβατότητας (MHC) κατέδειξε την παρουσία πολλαπλών γονιδίων στους επιτόπους MHC κλάσης I (HLA-A, HLA-B, και HLA-C) και MHC κλάσης II (HLA-DR, HLA-DQ, και HLA-DP). Τα γονίδια αυτά χαρακτηρίζονται από το μεγαλύτερο βαθμό πολυμορφισμού σε ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα και ο πολυμορφισμός αυτός συμβάλλει στη λειτουργία τους. Οι πρωτεΐνες του MHC διευκολύνουν την αναγνώριση ξένων παθογόνων συνδέοντας πεπτίδια που παράγονται από την επεξεργασία πρωτεϊνών των παθογόνων αυτών και συμβάλλοντας στην παρουσίασή τους στα Τ-λεμφοκύτταρα (ΤΛΚ).

Οι πρωτεΐνες του MHC είναι υπεύθυνες για την παρουσίαση πεπτιδικών αντιγόνων στον υποδοχέα των Τ-λεμφοκυττάρων TCR. Οι πρωτεΐνες MHC κλάσης I εκφράζονται στα περισσότερα εμπύρηννα κύτταρα και παρουσιάζουν πεπτίδια στα κυτταροτοξικά CD8 ΤΛΚ. Η παρουσίαση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα το θάνατο του

κυττάρου που παρουσιάζει το αντιγόνο. Οι πρωτεΐνες MHC κλάσης II εκφράζονται από εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως μακροφάγα, δενδριτικά και Β-λεμφοκύτταρα και παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια σε CD4 ΤΛΚ. Η παρουσίαση αυτή κινητοποιεί την ανοσολογική αντίδραση (3,23).

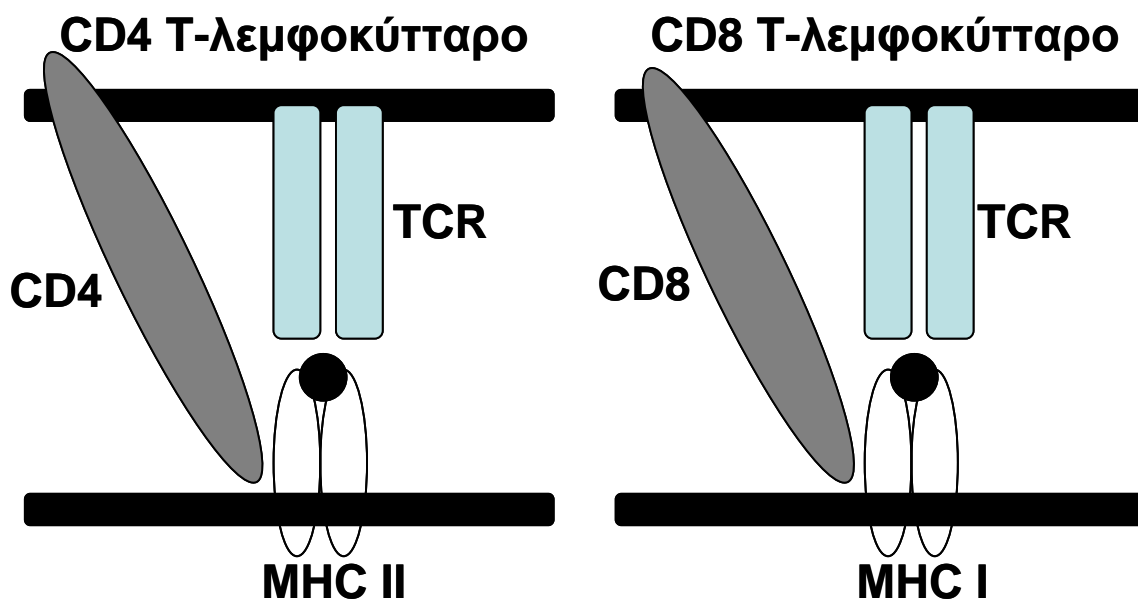
Συγκεκριμένοι HLA τύποι φαίνεται ότι διευκολύνουν την παρουσίαση νησιδιακών αυτοαντιγόνων (23). Η ικανότητα των HLA μορίων να παρουσιάζουν αντιγόνα εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων τους. Αντικατάσταση ενός αμινοξέος σε ορισμένες κρίσιμες περιοχές μπορεί να μεταβάλλει δραματικά τη σύνδεση των σχετικών αυτοαντιγόνων και κατά συνέπεια την προδιάθεση για ΣΔ1. Περισσότεροι από 90% των ασθενών με ΣΔ1 φέρουν το γονότυπο HLA-DR3,DQB1\*0201 ή τον DR4,DQB1\*0302, έναντι 40% των μαρτύρων. Επιπλέον το 30% των ασθενών με ΣΔ1 φέρουν και τους δύο γονοτύπους. Αντίστροφα, το HLA αλληλίο DQB1\*0602 είναι προστατευτικό έναντι της εμφάνισης ΣΔ1. Μεταξύ συγγενών ασθενών με ΣΔ1 που είχαν θετικά αυτοαντισώματα ICA, ΣΔ1 εμφανίστηκε στο 44% αυτών που δεν έφεραν το αλληλίο έναντι μηδενός αυτών που έφεραν το αλληλίο (37).

Η σύνδεση του συμπλέγματος MHC II- πεπτιδίου με τον TCR υποδοχέα του CD4 ΤΛΚ αποτελεί το πρώτο βήμα ενεργοποίησης της ειδικής ανοσίας (εικόνα 3). Για την ενεργοποίηση του ΤΛΚ απαιτείται ένα επιπλέον σήμα συνδιέγερσης (πχ μεταξύ CD28 και CD40, εικόνα 4). Η διέγερση του ΤΛΚ οδηγεί σε παραγωγή Ιντερλευκίνης 2 (IL2). Η IL2, δρώντας στον υποδοχέα της CD25, οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση των CD4 και τελικά κινητοποίηση των CD8

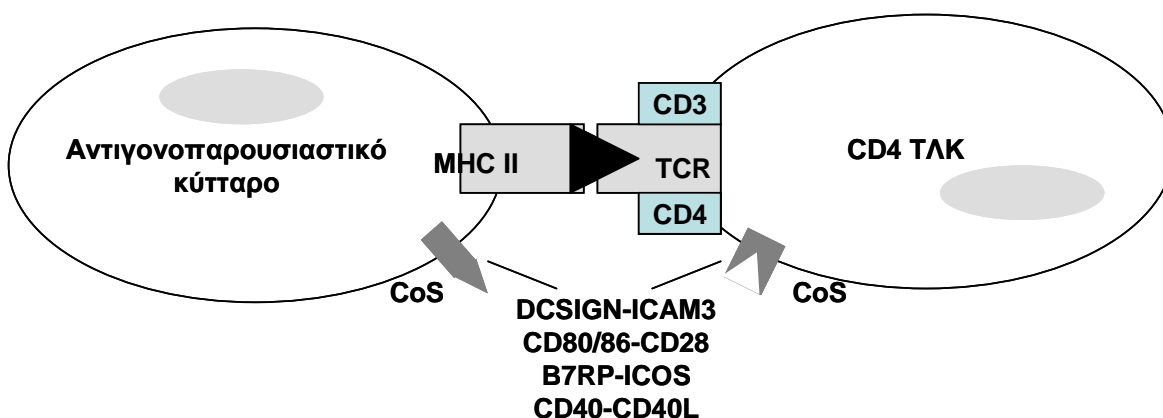
κυτταροτοξικών, CD4 ΤΛΚ καθυστερούμενης υπερευαισθησίας, Β-λεμφοκυττάρων και ΤΛΚ μνήμης.

Παράλληλα με την ενεργοποίηση που αποσκοπεί στην καταστροφή του αλλοαντιγόνου, κινητοποιείται και ο μηχανισμός περιορισμού της ανοσολογικής αντίδρασης στον οποίο κεντρικό ρόλο παίζει ένας υποπληθυσμός CD4/CD25 ΤΛΚ που αποκαλούνται ανοσορυθμιστικά ΤΛΚ (T regulatory cells, T-regs, εικόνα 5). Θεωρείται ότι τα κύτταρα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στον τερματισμό της ανοσολογικής αντίδρασης όταν αυτή δεν είναι πλέον απαραίτητη, αλλά και στον έλεγχο των αυτοάνοσων αντιδράσεων (38).

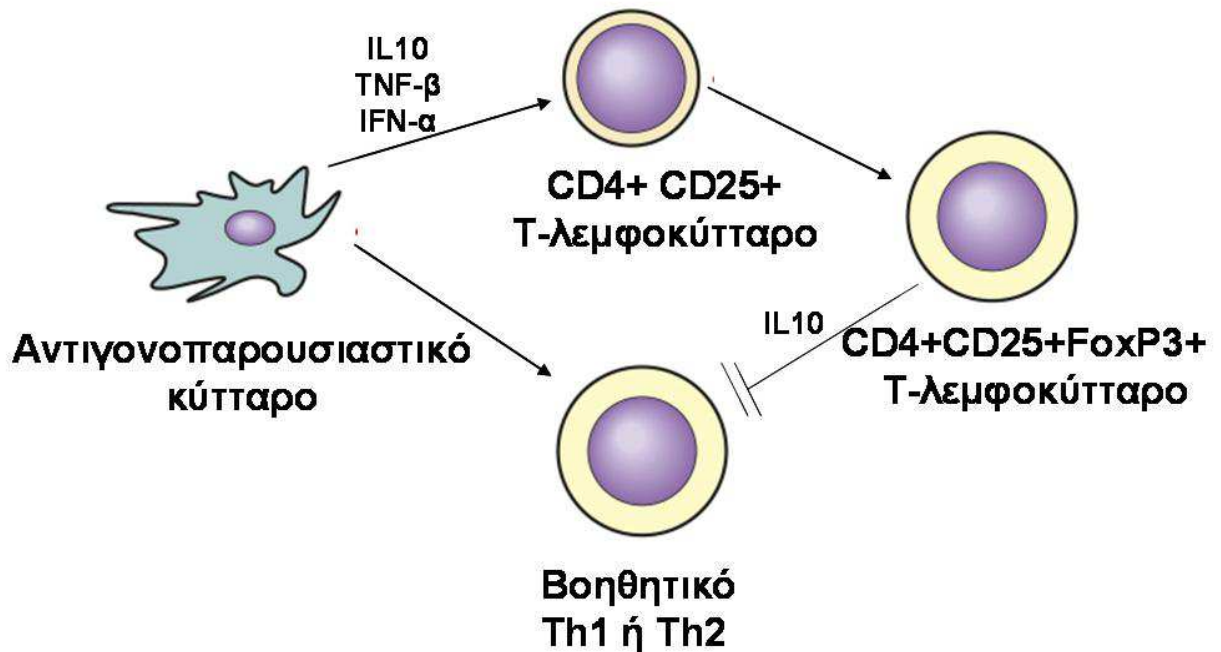
Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ΤΛΚ παίζει το γονίδιο FoxP3. Η εισαγωγή αυτού του γονιδίου σε ΤΛΚ προκαλεί τη διαφοροποίησή τους σε T-regs που εκφράζουν το CD25 και αναστέλλουν την ενεργοποίηση άλλων ΤΛΚ. Τα T-regs αυτά δεν παράγουν IL2 αλλά αντίθετα ανταγωνίζονται τη σύνδεσή της IL2 με άλλα ΤΛΚ. Στον άνθρωπο μεταλλάξεις του FoxP3 προκαλούν το σύνδρομο IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome – φυλοσύνδετο σύνδρομο ανοσολογικής δυσλειτουργίας, πολυενδοκρινοπάθειας, εντεροπάθειας) του οποίου κυρίαρχη εκδήλωση είναι η εμφάνιση ΣΔ1 σε πολύ μικρή ηλικία (39).



**Εικόνα 3.** Ο ρόλος των MHC I/II στην παρουσίαση αντιγόνων.



**Εικόνα 4.** Το μοντέλο του διπλού σήματος για την ενεργοποίηση των ΤΛΚ. Το πρώτο σήμα είναι αντιγονοειδικό και παρέχεται από την αλληλεπίδραση του συμπλέγματος MHC-αντιγόνου με τον υποδοχέα των Τ-λεμφοκυττάρων TCR. Το δεύτερο σήμα συνδιέγερσης (CoS) παρέχεται από την αλληλεπίδραση επιφανειακών μορίων των ΤΛΚ με αντίστοιχα μόρια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Η ύπαρξη μόνο του πρώτου σήματος χωρίς το δεύτερο ίσως οδηγεί σε απενεργοποίηση ή ανεργία των ΤΛΚ.



**Εικόνα 5.** Ανοσορυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (T-regs) παράγονται κατά την αλληλεπίδραση αντιγονοπαρουσιαστικών και T-λεμφοκυττάρων, με τη συμμετοχή κυτταροκινών IL-10, TGF-β, and IFN-α. Τα T-regs εκκρίνουν IL10 και αναστέλλουν διεγερμένα T-λεμφοκύτταρα με παρόμοια αντιγονοειδικότητα. Η επίτευξη ανοχής σε αυτοαντιγόνα διακρίνεται σε κεντρική και περιφερική. Κεντρική ανοχή επιτυγχάνεται για τα ΤΛΚ κατά τη διαδικασία ωρίμανσης τους στο θύμο, όπου με τη διαδικασία της αρνητικής επιλογής τα ΤΛΚ που εμφανίζουν ειδικότητα για αυτοαντιγόνα οδηγούνται σε απόπτωση. Περιφερική ανοχή επιτυγχάνεται πιθανώς με διάφορους τρόπους, όπως η αρνητική επιλογή στην περιφέρεια, η έλλειψη δεύτερου σήματος συνδιέγερσης από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, η επίδραση ανοσορυθμιστικών T-regs. Η αποτυχία της ανοσολογικής ανοχής στο ΣΔ1 οδηγεί στη καταστροφή των β-κυττάρων.

## 6.2 Μηχανισμός καταστροφής του β-κυττάρου στο ΣΔ1.

Το πιο διαδεδομένο μοντέλο ΣΔ1 στα πειραματόζωα είναι αυτό του ποντικιού NOD (Non Obese Diabetic mouse). Στα ποντίκια NOD και άλλα πειραματόζωα τα T-λεμφοκύτταρα παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων, ενώ η συμβολή άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού όπως των Β-λεμφοκυττάρων είναι μάλλον απαραίτητη για την έναρξη και διατήρηση της αυτοανοσίας (37). Φαίνεται ότι η αυτοάνοση διαδικασία του ΣΔ1 ξεκινά με διαταραχή της σχέσης μεταξύ παθογόνων και ανοσορυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (T regulatory, T-regs) (38).

Στα πειραματικά μοντέλα ΣΔ1 παρατηρείται επιλεκτική καταστροφή των ινσουλινοπαραγωγών β-κυττάρων. Σε βιοψίες παγκρέατος από νεοδιαγνωσμένους ασθενείς ανευρίσκεται μεγάλη ετερογένεια στις παθολογοανατομικές βλάβες των νησιδίων. Είναι δυνατό στην ίδια τομή να υπάρχουν εντελώς φυσιολογικά νησιδία, νησιδία με εκτεταμένη διήθηση (νησιδίιτιδα), αλλά και ψευδοατροφικά νησιδία με πλήρη απώλεια των β-κυττάρων και διατήρηση των υπολοίπων νησιδιακών κυττάρων. Έτσι, τα β-κύτταρα του παγκρέατος αποτελούν το στόχο της αυτοάνοσης αντίδρασης στο ΣΔ1 και η διήθηση των νησιδίων από κύτταρα φλεγμονής (νησιδίιτιδα) οδηγεί μετά μια μακρά χρονική περίοδο σε απώλεια των περισσότερων β-κυττάρων (37,40).

Ο θάνατος του β-κυττάρου πιθανότατα οφείλεται στην επίδραση των ενεργοποιημένων μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων και των μεσολαβητών που παράγονται από αυτά. Η *in vitro* έκθεση σε κυτταροκίνες όπως η Ιντερλευκίνη-1β, η Ιντερφερόνη-γ και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF προκαλεί διαταραχή στην

εκκριτική ικανότητα των β-κυττάρων και αν παραταθεί, κυτταρικό θάνατο. Ο θάνατος του παγκρεατικού β-κυττάρου είναι κυρίως αποπτωτικός με μια πλειάδα προ- και αντι-αποπτωτικών οδών να ενέχονται στο τελικό αποτέλεσμα (40-43).

Οι μηχανισμοί που συντελούν στο θάνατο του β-κυττάρου περιλαμβάνουν (39-43):

- Αυτοαντιδρώντα Τ-λεμφοκύτταρα (ΑΑΤΛΚ) έναντι νησιδιακών αντιγόνων. Τα ΑΑΤΛΚ αυτά περιλαμβάνουν (α) CD4 ΤΛΚ της υποομάδας Th1, που προκαλούν ιστική βλάβη μέσω ενεργοποίησης μακροφάγων και (β) CD8 κυτταροτοξικά ΤΛΚ που προκαλούν άμεσα το θάνατο των β-κυττάρων και εκλύουν κυτταροκίνες που ενεργοποιούν τα μακροφάγα. Στα πρώιμα στάδια της νόσου τα νησίδια εμφανίζουν κυτταρική νέκρωση και λεμφοκυτταρική διήθηση από CD4 και CD8 ΤΛΚ. Τα εναπομένοντα β-κύτταρα ενδέχεται να εκφράζουν αντιγόνα MHC II, ίσως λόγω της τοπικής παραγωγής Ιντερφερόνης-γ (IFN-γ). Τα ΤΛΚ που διηθούν τα νησίδια είναι ΑΑΤΛΚ με ειδικότητα έναντι διαφόρων επιτόπων, μεταξύ των οποίων τα αντιγόνα GAD, ινσουλίνη και IA2. Ο ρόλος των ΑΑΤΛΚ αυτών είναι υπό διερεύνηση, όπως και η αιτία που οδηγεί σε απώλεια της ανοσολογικής ανοχής έναντι των αντιστοιχών αυτοαντιγόνων.

- Τοπικά παραγόμενες κυτταροκίνες προκαλούν βλάβη στα β-κύτταρα. Ενέχονται η IFN-γ, ο TNF και η IL1 που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Οι κυτταροκίνες αυτές επάγουν την απόπτωση των β-κυττάρων in vitro ενώ σε πειραματόζωα η διαδικασία αυτή μπορεί να παρεμποδιστεί με τη χορήγηση ανταγωνιστών των κυτταροκινών αυτών.



- Νησιδιακά αυτοαντισώματα ανιχνεύονται στην πλειονότητα των ασθενών με ΣΔ1. Τα αντισώματα αυτά φαίνεται ότι δεν αποτελούν απλά παραπροϊόν της κυτταρικής βλάβης αλλά ίσως συμμετέχουν στην ανοσολογική καταστροφή. Υπάρχουν τέλος δεδομένα που υποστηρίζουν το ρόλο των Β-λεμφοκυττάρων στην ανοσολογική βλάβη, χωρίς αυτά να θεωρούνται απαραίτητα, αλλά και των ΝΚ-κυττάρων (40).

### **6.3 Νησιδιακά αυτοαντιγόνα και αυτοαντισώματα.**

#### Αυτοαντισώματα.

Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργοποίηση του αυτοάνοσου μηχανισμού καταστροφής των β-κυττάρων προηγείται της κλινικής εκδήλωσης ΣΔ1 κατά σημαντικό χρονικό διάστημα. Η πρόδρομη αυτή φάση χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση νησιδιακών αυτοαντισωμάτων. Τα νησιδιακά αυτοαντισώματα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη είναι τα εξής (3,43):

Αντισώματα έναντι της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος (Glutamic Acid Decarboxylase – GAD65). Πρόκειται για αντισώματα έναντι μιας πρωτεΐνης 65 kDa που απαντάται στα συναπτικά μικροκυστίδια των β-κυττάρων αλλά και σε ανάλογα κυστίδια νευρωνικών κυττάρων του ΚΝΣ. Ανιχνεύονται με ραδιοδεσμευτική μέθοδο (RBA) ή με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA).

Αντισώματα έναντι της φωσφατάσης της τυροσίνης (Insulinoma Antigen 2 IA2), μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης 40 kDa που ανευρίσκεται στα εκκριτικά κυστίδια νευροενδοκρινικών κυττάρων. Ανιχνεύονται με ραδιοδεσμευτική μέθοδο (RBA).

Αντισώματα έναντι ινσουλίνης (IAA). Η ινσουλίνη είναι το μοναδικό πεπτίδιο που απαντάται αποκλειστικά στα β-κύτταρα. Τα αντισώματα IAA ανιχνεύονται με ραδιοδεσμευτική μέθοδο (RBA) με ανταγωνισμό υγρής φάσης. Υπάρχουν ενδείξεις από ευρήματα σε πειραματόζωα (ποντίκια NOD) αλλά και ανθρώπους ότι το σημαντικότερο νησιδιακό αυτοαντιγόνο είναι η ινσουλίνη (3,40). Σε μια άλλη μελέτη, ποντίκια NOD που εξέφραζαν γενετικά τροποποιημένη ινσουλίνη δεν ανέπτυξαν νησιδίτιδα ή ΣΔ1 (44). Επιπλέον τα IAA εμφανίζονται νωρίς στη φυσική πορεία της νόσου (43) και η χορήγηση ινσουλίνης με στόχο την αποευσθητοποίηση καθυστερεί την εξέλιξη της νόσου σε προδιαβητικά ποντίκια και πιθανώς ανθρώπους (45).

Αντισώματα έναντι νησιδιακών αντιγόνων (ICA). Αποτελούν μείγμα αντισωμάτων έναντι διαφόρων αντιγόνων του παγκρέατος, κυρίως GAD και IA2. Ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε τομές ανθρωπίνου παγκρέατος. Ο καθορισμός της οροθετικότητας ενός δείγματος γίνεται με ημιποσοτικό τρόπο και εμπεριέχει υποκειμενικότητα στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Έτσι η μέθοδος αυτή εμφανίζει επίσης μεγάλη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων τόσο όταν χρησιμοποιούνται παγκρέατα διαφορετικών δοτών όσο και όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές τομές του ίδιου παγκρέατος.

Για τους παραπάνω λόγους οι ραδιοδεσμευτικές μέθοδοι για την ανίχνευση GAD, IA2 και IAA αντισωμάτων έχουν εξελιχθεί σε μέθοδοι εκλογής για την ανίχνευση ατόμων σε κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ1.

Το αντίσωμα έναντι του διαύλου κατιόντων ZnT8 μετράται επίσης με RBA και μπορεί να ανιχνεύεται σε προδιαβητικά ή διαβητικά άτομα με ΣΔ1 που είναι αρνητικά

στα άλλα αυτοαντισώματα. Προς το παρόν μετράται μόνο για ερευνητικούς λόγους αλλά ενδέχεται στο μέλλον να βρει εφαρμογή στην κλινική πράξη (46).

Η κλινική εκδήλωση ΣΔ1 υπολείπεται χρονικά της εμφάνισης αυτοανοσίας καθώς απαιτείται καταστροφή τουλάχιστον του 50%-80% των β-κυττάρων για να εμφανιστεί υπεργλυκαιμία (3). Η εμφάνιση αυτοαντισωμάτων έναντι νησιδιακών αντιγόνων αποτελεί καθιερωμένο δείκτη κινδύνου εμφάνισης αλλά και διάγνωσης ΣΔ1 σε ασθενείς με υπεργλυκαιμία. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες η δυνατότητα πρόβλεψης της εμφάνισης ΣΔ1 έχει βελτιωθεί σημαντικά με τη χρήση γενετικών, ανοσολογικών και μεταβολικών δεικτών. Η εμφάνιση των αντί-GAD, -IA2 και IAA μπορεί να γίνει από τη βρεφική ηλικία και να προηγείται της κλινικής εκδήλωσης ΣΔ1 αρκετά χρόνια. Η ανίχνευση ενός αυτοαντισώματος σε κλινικά υγιή άτομα έχει ~10% θετική προγνωστική αξία, δύο αυτοαντισωμάτων ~50% και τριών ~80% για τα επόμενα 5 χρόνια (43).

Η ανίχνευση νησιδιακών αυτοαντισωμάτων σε παιδιά με πρωτοεμφανιζόμενη υπεργλυκαιμία σε συνδυασμό με άλλα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα, τεκμηριώνει τη διάγνωση του αυτοάνοσου ΣΔ1 (Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1Α). Τα αντισώματα αυτά μπορεί να επιμένουν για αρκετά χρόνια μετά τη διάγνωση, σταδιακά όμως οι τίτλοι τους μειώνονται και γίνονται μη ανιχνεύσιμοι σε πολλούς ασθενείς.

#### **6.4 Αυτοαντιδρώντα T-λεμφοκύτταρα.**

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός T-λεμφοκυττάρων που αντιδρούν έναντι συγκεκριμένου άλλο- ή αυτοαντιγόνου είναι τεχνικά δύσκολες διαδικασίες που τα τελευταία χρόνια βρήκαν εφαρμογή στη μελέτη των ανοσολογικών αντιδράσεων σε

λοιμώξεις αλλά και σε αυτοάνοσες παθήσεις (42). Τα κύτταρα αυτά κυκλοφορούν σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στο περιφερικό αίμα γεγονός που καθιστά αδύνατη την απευθείας ανίχνευσή τους με κυτταρομετρία ροής (41). Έτσι απαιτείται αντιγονική διέγερση με τα κατάλληλα αυτοαντιγόνα. Η ανάπτυξη της χρώσης ΤΛΚ με τετραμερή επιτρέπει την ταυτοποίηση και περαιτέρω ανάλυση αυτοαντιδρώντων CD4 ή CD8 ΤΛΚ. Επιπλέον, επειδή έχουν μέχρι στιγμής δημιουργηθεί τετραμερή/πενταμερή συγκεκριμένων μόνο HLA II/HLAI τύπων, η αναζήτηση ΑΑΤΛΚ μπορεί να γίνει μόνο σε ασθενείς με ταυτόσημο HLA τύπο ώστε τα ΤΛΚ τους να μπορούν να αναγνωρίσουν και να συνδεθούν με το αντίστοιχο HLA μόριο του τετραμερούς (41).

Τα Τ-λεμφοκύτταρα ενέχονται στην απόπτωση των β-κυττάρων στο ΣΔ1 και αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ έναντι νησιδιακών αντιγόνων ανιχνεύονται σε ασθενείς με ΣΔ1 και προδιαβητικά άτομα (47,48). Έχει επίσης δειχθεί ότι CD8 ΤΛΚ αντιδρώντα έναντι ινσουλίνης ανιχνεύονται σε ασθενείς με ΣΔ1 που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση παγκρεατικών νησιδίων κατά το χρόνο που εμφανίζουν έκπτωση της λειτουργίας των μεταμοσχευθέντων νησιδίων και υπεργλυκαιμία (4). Η φυσική πορεία και διακύμανση των ΑΑΤΛΚ στο ΣΔ1 είναι περίπλοκη και υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι ακολουθεί κάποια αυξομοίωση, αποτελεί δε αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας σε εξέλιξη. Αν και η αναζήτηση των κυττάρων αυτών δεν εφαρμόζεται ακόμη ευρέως στην κλινική πράξη, αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας για την αποσαφήνιση των ανοσολογικών μηχανισμών του ΣΔ1 (42).

## **7. Κλινική εικόνα.**

Κατά την κλινική εκδήλωση της νόσου, τα ευρήματα είναι συνάρτηση της δραματικά μειωμένης ενδογενούς έκκρισης ινσουλίνης. Κλασσικά είναι τα συμπτώματα της πολυουρίας, πολυδιψίας και απώλειας βάρους ενώ πολλοί ασθενείς με ΣΔ1 πρωτοεμφανίζονται με διαβητική κετοξέωση.

### **7.1 Επιπλοκές.**

Η μελέτη DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) (49) έδειξε τη σημασία του γλυκαιμικού ελέγχου για την αποφυγή επιπλοκών του ΣΔ1. Οι επιπλοκές του ΣΔ1 εκπορεύονται από την μικροαγγειοπάθεια που προκαλεί η νόσος σε όργανα στόχους όπως οι οφθαλμοί (αμφιβληστροειδοπάθεια), οι νεφροί (Διαβητική Νεφροπάθεια που καταλήγει σε Νεφρική Ανεπάρκεια) και τα περιφερικά νεύρα (Διαβητική Νευροπάθεια), τη μακροαγγειοπάθεια που αποτελεί τη συχνότερη αιτία θνητότητας (στεφανιαία νόσος και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια) και αποδίδονται στην υπεργλυκαιμία. Ο ΣΔ1 είναι το συχνότερο αίτιο Χρονίας Νεφρικής Ανεπάρκειας (ΧΝΑ) και ευθύνεται για το 1/3 όλων των περιπτώσεων ΧΝΑ τελικού σταδίου (2,49).

Η επιθυμητή τιμή στόχος της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης HbA1C προκειμένου να επιτευχθεί μείωση της συχνότητας των επιπλοκών του ΣΔ1 είναι <7% ενώ σε όσους ασθενείς είναι αυτό εφικτό πρέπει να επιδιώκεται HbA1C κάτω του 6%. Η μελέτη DCCT έδειξε ότι μια περίοδος εντατικοποιημένου μεταβολικού ελέγχου διάρκειας τουλάχιστον 6 ετών είχε μακροχρόνια ευνοϊκή επίπτωση στη μείωση των μικροαγγειοπαθητικών επιπλοκών. Το φαινόμενο αυτό της “μεταβολικής μνήμης” ίσως παρατηρείται και σε ασθενείς με ΣΔ1 που υποβάλλονται σε ΜΝΠ,

εφόσον το παγκρεατικό μόσχευμα εξασφαλίζει ευγλυκαιμία για αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

Η αρνητική ψυχοκοινωνική επίπτωση του ΣΔ σε παιδιά και εφήβους εκδηλώνεται κυρίως με κατάθλιψη που συνήθως παρατηρείται τον πρώτο χρόνο μετά τη διάγνωση. Τα κορίτσια εφηβικής ηλικίας κινδυνεύουν περισσότερο από επανειλημμένα επεισόδια κατάθλιψης. Η κατάθλιψη φαίνεται ότι συσχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και επανειλημμένες νοσηλείες. Τα κορίτσια εφηβικής ηλικίας έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης διαταραχής της όρεξης (50).

## **7.2 Συσχέτιση με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.**

Η συνύπαρξη άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων είναι συχνό εύρημα σε ασθενείς με ΣΔ1. Η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα προσβάλλει μέχρι και το 25% των ασθενών με ΣΔ1 και συνιστάται ετήσιος έλεγχος θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων. Αντιεπινεφριδιακά αντισώματα, επινεφριδιακή ανεπάρκεια, αυτοάνοση πολυενδοκρinoπάθεια, και εντεροπάθεια από γλουτένη επίσης απαντώνται με αυξημένη συχνότητα (3).

## **8. Θεραπεία.**

Η βάση της θεραπείας του ΣΔ1 είναι η αντιμετώπιση από ομάδα ειδικών που περιλαμβάνει γιατρούς, νοσηλευτές, διαιτολόγους και ψυχολόγους με εξειδίκευση στην εκπαίδευση και αντιμετώπιση ασθενών με ΣΔ. Οι τρεις βασικοί άξονες της θεραπείας είναι η ινσουλινοθεραπεία, το πρόγραμμα διατροφής και η ψυχολογική υποστήριξη της οικογένειας (2,3). Δεν υπάρχει συγκεκριμένο σχήμα ινσουλινοθεραπείας και διατροφής που να εφαρμόζεται σε όλους τους ασθενείς. Αντίθετα αυτά πρέπει να εξατομικεύονται για να καλύψουν τα ειδικά χαρακτηριστικά και τις ανάγκες των ατόμων με ΣΔ. Στόχος της εξατομίκευσης είναι η εξασφάλιση του κατά το δυνατόν φυσιολογικότερου τρόπου ζωής με ταυτόχρονη επίτευξη των γλυκαιμικών στόχων (2).

### **8.1 Ινσουλινοθεραπεία.**

Η παραγωγή συνθετικών ινσουλινών με ειδικά χαρακτηριστικά έχει αλλάξει σημαντικά τα χρησιμοποιούμενα σχήματα ινσουλινοθεραπείας. Η παραδοσιακή “κρυσταλλική ινσουλίνη” αντικαθίσταται από ινσουλίνες ταχείας δράσης που μιμούνται καλύτερα τη μεταγευματική αιχμή (ινσουλίνες lispro, aspart και glulisine). Οι βραδείας δράσης ινσουλίνες lente έχουν αντικατασταθεί από τις ινσουλίνες glargine και detemir, ενώ παραμένει η ενδιάμεσης δράσης ισοφανική (NPH). Τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά των ινσουλινών αυτών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Τα βασικά σχήματα χορήγησης ινσουλίνης είναι το συμβατικό με δύο ημερήσιες δόσεις μείγματος ινσουλίνης ταχείας δράσης και NPH προ πρωινού και βραδυνού γεύματος, και το νεώτερο basal-bolus σχήμα με χορήγηση ινσουλίνης

ταχείας δράσης προ γευμάτων και μακράς διάρκειας άπαξ ή δις ημερησίως. Παραλλαγή του σχήματος basal-bolus είναι η χρήση αντλίας ινσουλίνης για τη συνεχή υποδόρια έγχυση ινσουλίνης ταχείας δράσης σε χαμηλό μεταβαλλόμενο βασικό ρυθμό (basal) με επιπλέον δόσεις (bolus) για την κάλυψη των γευμάτων. Η ασφάλεια και επιτυχία της ινσουλινοθεραπείας εξαρτώνται από τη συχνή μέτρηση των επιπέδων γλυκόζης αίματος από τους ίδιους τους ασθενείς ή την οικογένειά τους. Επίσης η εφαρμογή των καταλλήλων διαιτητικών οδηγιών και ενός προγράμματος σωματικής άσκησης συμβάλλουν σημαντικά στην επίτευξη γλυκαιμικού ελέγχου (2).

<b>Είδος Ινσουλίνης</b>	<b>Έναρξη δράσης (h)</b>	<b>Μέγιστη δράση (h)</b>	<b>Διάρκεια αποτελεσματικής δράσης (h)</b>
<b>Ταχείας δράσης</b>			
Insulin lispro (Humalog)	¼	½- 1 ¼	3-4
Insulin aspart (NovoLog)	¼	½ -1 ¼	3-4
Insulin glulisine (Apidra)	¼	½ -1 ¼	3-4
<b>Βραχείας δράσης</b>			
Regular (κρυσταλλική)	½	2-3	3-6
<b>Ενδιάμεσης διάρκειας</b>			
NPH (ισοφανική)	2-4	6-10	10-16
<b>Μακράς διάρκειας</b>			
Insulin glargine (Lantus)	3-4	8-16	18-20
Insulin detemir (Levemir)	3-4	6-8	14

**Πίνακας 1.** Είδη και φαρμακολογικά χαρακτηριστικά συνθετικών ινσουλινών.



## **8.2 Θεραπείες διατήρησης ή αποκατάστασης της ενδογενούς έκκρισης ινσουλίνης.**

Παρά τις μεγάλες προόδους που έχουν επιτευχθεί στην αντιμετώπιση της ασθένειας, ο ΣΔ παραμένει μια χρόνια νόσος με τεράστιες ψυχοκοινωνικές και σωματικές επιπτώσεις τόσο στους ίδιους τους ασθενείς όσο και τις οικογένειές τους, αλλά και σημαντική οικονομική επιβάρυνση των συστημάτων υγείας. Επιπλέον, η ινσουλινοθεραπεία δεν μπορεί να αποτρέψει πλήρως τις επιπλοκές του ΣΔ1 και η εντατικοποίησή της συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο επεισοδίων υπογλυκαιμίας. Για τους λόγους αυτούς υπάρχει παγκοσμίως μεγάλο ενδιαφέρον για την ανακάλυψη θεραπειών που θα αποκαθιστούν την ενδογενή έκκριση ινσουλίνης ή θα προλαμβάνουν τη μείωσή της (51).

### **8.2.1 Πρόληψη ΣΔ1 σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα ή σε προδιαβητικούς ασθενείς.**

Το γεγονός ότι ακόμη και με εντατική ινσουλινοθεραπεία λιγότερο από 5% των ασθενών επιτυγχάνουν τους γλυκαιμικούς στόχους, έχει οδηγήσει σε εντατικοποίηση της προσπάθειας πρόληψης ή πρώιμης θεραπείας του ΣΔ1. Θεωρητικά, σε άτομα που δεν έχουν ακόμα εμφανίσει ενεργοποίηση της αυτοανοσίας ο στόχος είναι η διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής, ενώ σε άτομα με τεκμήρια αυτοανοσίας στόχος είναι η επαγωγή ύφεσης της αυτοάνοσης αντίδρασης, η διατήρηση της ύφεσης και αν είναι δυνατό η επανεγκατάσταση ανοσολογικής ανοχής. Οι πειραματικές θεραπείες που στοχεύουν στην πρόληψη της αυτοανοσίας και βρίσκονται υπό διερεύνηση, επιδιώκουν την ανοσοκαταστολή, την ανοσορρύθμιση ή συνδυασμό αυτών.

**Ανοσοκαταστολή.** Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντί-CD3 συνδέεται με τον αντίστοιχο υποδοχέα των ΤΛΚ και καταστέλλει την ανοσολογική αντίδραση προκαλώντας ανεργία σε ενεργοποιημένα ΤΛΚ. Μελέτες σε NOD ποντίκια έδειξαν ότι ένα βραχύ σχήμα χορήγησης αντί-CD3 προκάλεσε παρατεταμένη ύφεση του ΣΔ1 χωρίς να απαιτούνται επαναχορηγήσεις (52). Επιπλέον, εβδομάδες μετά τη θεραπεία η ανοσολογική αντίδραση σε εξωγενή αντιγόνα ήταν φυσιολογική. Η τροποποίηση της Fc περιοχής του αντισώματος απέτρεψε τη μαζική “έκπλυση” των ΤΛΚ. Φαίνεται ότι ο μηχανισμός δράσης του τροποποιημένου αντί-CD3 στα ποντίκια εκτός από την παροδική “έκπλυση” των παθογόνων ΤΛΚ, περιλαμβάνει επαγωγή μιας υπό-ομάδας ΤΛΚ με χαρακτηριστικά T-regs που συμβάλλουν στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής (52).

Μελέτες χορήγησης μονοκλωνικών αντί-CD3 αντισωμάτων σε νεοδιαγνωσμένους ασθενείς με ΣΔ1 έδειξαν σημαντική διατήρηση της έκκρισης του C-πεπτιδίου ένα χρόνο αργότερα (52,53). Κατά τη θεραπεία αυτή υπήρχαν ωστόσο ενδείξεις επανενεργοποίησης λοίμωξης με τον ιό Epstein-Barr. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η χορήγηση αντί-CD3 δεν είναι απλά ανοσοκατασταλτική αλλά ότι παράλληλα επάγει και μακροχρόνιες μεταβολές στο λόγο CD4/CD8 και στα T-regs (53). Η δυνατότητα επίτευξης μακροχρόνιας ύφεσης χωρίς σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες σε ανθρώπους διερευνάται (54).

Το αντίσωμα Rituximab έναντι των Β-λεμφοκυττάρων έχει αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα έναντι άλλων αυτοάνοσων παθήσεων και η εφαρμογή του στο ΣΔ1 δοκιμάστηκε σε ποντίκια NOD. Η χορήγηση Rituximab κατά το χρόνο εμφάνισης υπεργλυκαιμίας είχε ως αποτέλεσμα αντιστροφή της υπεργλυκαιμίας

(55). Ο παράγοντας αυτός έχει χρησιμοποιηθεί και σε πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νησιδίων με αποτέλεσμα τη διατήρηση της λειτουργίας αυτών (56). Μια μελέτη αντισώματος έναντι του υποδοχέα της IL2 σε συνδυασμό με θεραπεία με MMF είναι σε εξέλιξη (54).

**Ανοσορύθμιση.** Μέχρι σήμερα έχουν γίνει προσπάθειες ανοσορύθμισης με χορήγηση νικοτιναμιδίου (ENDIT) (57), ινσουλίνης από του στόματος και ινσουλίνης παρεντερικά (DPT-1) (58), χωρίς ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Μόνο μεταξύ των ασθενών με υψηλούς τίτλους αυτοαντισωμάτων ινσουλίνης, η από του στόματος χορήγηση ινσουλίνης σχετιζόταν με σημαντική καθυστέρηση της εμφάνισης ΣΔ1. Η αποτελεσματικότητα της αποευαισθητοποίησης με αντιγόνο GAD διερευνάται (59). Η επαγωγή ανοσορυθμιστικών T-regs ελπίζεται να συμβάλλει στην επίτευξη πρόληψης.

**Βλαστοκύτταρα.** Η χρήση βλαστοκυττάρων για την αντιμετώπιση του ΣΔ αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Επιδιώκεται η επίτευξη καλλιέργειας και παραγωγής β-κυττάρων in vitro, ενώ διερευνάται επίσης η επίδραση της χορήγησής τους σε νεοδιαγνωσμένους ασθενείς με ΣΔ. Σε μια πρόσφατη μελέτη (60), έφηβοι και νεαροί ενήλικες με νεοεμφανιζόμενο ΣΔ, αλλά χωρίς να έχουν παρουσιάσει κετοξέωση, υποβλήθηκαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχηγόνων αιμοποιητικών κυττάρων μετά από χημειοθεραπεία καταστολής του μυελού τους. Δώδεκα από τους 20 ασθενείς παρέμειναν ελεύθεροι εξωγενούς ινσουλίνης για τουλάχιστον 2 χρόνια. Δεν είναι σαφής ο μηχανισμός με τον οποίο τα βλαστοκύτταρα συνέβαλλαν στο αποτέλεσμα αυτό.

### **8.2.2 Μεταμόσχευση παγκρεατικών νησιδίων.**

Η μεταμόσχευση παγκρεατικών νησιδίων είναι μια ελάχιστα επεμβατική διαδικασία και αποτελεί θεωρητικά θεραπεία ίασης του ΣΔ1, υπάρχουν ωστόσο σοβαροί περιορισμοί στη διαθεσιμότητα παγκρεατικών νησιδίων για μεταμόσχευση ενώ για κάθε νησιδιακή μεταμόσχευση χρειάζονται συνήθως νησίδια από περισσότερα του ενός παγκρεατικά μοσχεύματα (61). Επιπλέον, παρότι η βελτίωση των ανοσοκατασταλτικών πρωτοκόλλων έχει οδηγήσει σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η ανεξαρτησία από την ινσουλίνη στους ασθενείς αυτούς φτάνει το 70% τον πρώτο χρόνο και στη συνέχεια μειώνεται δραματικά φτάνοντας μόλις το 15% πέντε χρόνια μετά τη μεταμόσχευση (61,62). Τα αίτια της μείωσης αυτής πιθανώς σχετίζονται με απόρριψη ή υποτροπή της αυτοάνοσης καταστροφής, απόπτωση των νησιδιακών κυττάρων ή τοξική δράση των ανοσοκατασταλτικών (61). Η βελτίωση της διαθεσιμότητας νησιδίων με περαιτέρω βελτίωση της τεχνικής απομόνωσης από παγκρέατα δοτών ή με την παραγωγή νησιδίων στο εργαστήριο από βλαστοκύτταρα ή κύτταρα παγκρεατικών πόρων και η εξέλιξη στις τεχνικές ανοσοκαταστολής ή επίτευξης ανοσολογικής ανοχής ενδέχεται στο μέλλον να καταστήσουν τη μεταμόσχευση νησιδίων θεραπεία εκλογής.

### **8.2.3 Ταυτόχρονη μεταμόσχευση νεφρών παγκρέατος.**

Η μεταμόσχευση νεφρών είναι η θεραπεία εκλογής σε ασθενείς με ΧΝΑ. Σε ασθενείς με ΣΔ1 και ΧΝΑ η θεραπεία που οδηγεί σε ίαση του ΣΔ και διόρθωση της νεφρικής ανεπαρκείας είναι η ταυτόχρονη Μεταμόσχευση Νεφρών Παγκρέατος (ΜΝΠ) (2). Η επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος είναι καλύτερη όταν γίνεται ταυτόχρονη μεταμόσχευση νεφρών, απ' ό,τι αν γίνει μετάχρονη ή μεμονωμένη (63).

Τα πλεονεκτήματα της ΜΝΠ είναι καλύτερη ποιότητα ζωής, ανεξαρτησία από χορήγηση ινσουλίνης με επίτευξη ευγλυκαιμίας χωρίς κίνδυνο υπογλυκαιμίας ή κετοξέωσης, διακοπή των διαιτητικών περιορισμών, σταθεροποίηση ή μερική αναστροφή των επιπλοκών, απεξάρτηση από την αιμοκάθαρση και αποφυγή επανεμφάνισης διαβητικής νεφροπάθειας στο νεφρικό μόσχευμα (63,64). Οι κίνδυνοι της διαδικασίας συνίστανται στον περιεγχειρητικό κίνδυνο και την ανάγκη λήψης χρόνιας ανοσοκαταστολής. Η ΜΝΠ επιτυγχάνει καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο από οποιαδήποτε άλλη διαθέσιμη θεραπεία σήμερα. Τα παραπάνω έχουν οδηγήσει την Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρεία (ADA) να θεωρεί τη ΜΝΠ ως αποδεκτή χειρουργική επέμβαση σε ασθενείς με ΣΔ1 που είναι υποψήφιοι για μεταμόσχευση νεφρού.

Τα κριτήρια/ενδείξεις εισαγωγής στη μεταμοσχευτική λίστα είναι (65):

- Ηλικία 18 – 55 ετών.
- Ιστορικό ΣΔ1.
- Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια λόγω διαβητικής νεφροπάθειας.
- Ικανότητα συμμόρφωσης με τη φαρμακευτική αγωγή και αντίληψης των κινδύνων της επέμβασης.

- Απουσία άλλων αντενδείξεων για χειρουργική επέμβαση ή χορήγηση ανοσοκαταστολής

Ο δότης ιδανικά πρέπει να είναι μεταξύ 10 και 45 ετών, χωρίς ιστορικό διαβήτη, παγκρεατίτιδας ή χειρουργικής επέμβασης στην κοιλιά.

Από το 1966 που έγινε η πρώτη ΜΝΠ μέχρι σήμερα έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στις χειρουργικές τεχνικές, στην ανοσοκαταστολή, στην αποφυγή απόρριψης αλλά και στην επιβίωση των μοσχευμάτων. Οι ποικίλες χειρουργικές τεχνικές μεταμόσχευσης του παγκρέατος διαφέρουν ως προς τα παρακάτω:

Παροχέτευση της εξωκρινούς μοίρας: εντερική έναντι ουροδόχου κύστης. Η εντερική παροχέτευση αν και σχετίζεται με λιγότερα ουρολογικά προβλήματα, ουρολοιμώξεις, επεισόδια αφυδάτωσης και επεισόδια παγκρεατίτιδας, έχει τον κίνδυνο σοβαρότερων επιπλοκών λόγω πιθανής διαρροής από την αναστόμωση. Επιπλέον επειδή το μόσχευμα τοποθετείται συνήθως ψηλότερα στην κοιλιά, είναι δυσκολότερα προσβάσιμο για βιοψία.

Το κυριότερο πλεονέκτημα της παροχέτευσης της εξωκρινούς μοίρας του παγκρεατικού μοσχεύματος στην ουροδόχο κύστη είναι η δυνατότητα παρακολούθησης των επιπέδων αμυλάσης ούρων ως δείκτη απόρριψης. Επιπλέον, ο κίνδυνος σοβαρών επιπλοκών λόγω διαρροής από την αναστόμωση είναι σημαντικά μικρότερος και το μόσχευμα είναι ευκολότερα προσβάσιμο για βιοψία, ακόμα και κυστεοσκοπικά. Όμως, αυτή η μη φυσιολογική αναστόμωση συσχετίζεται με περισσότερες μεταβολικές διαταραχές (αφυδάτωση) και προβλήματα από το ουροποιητικό.

Συστηματική έναντι πυλαίας παροχέτευσης της φλεβικής κυκλοφορίας του μοσχεύματος. Τα περισσότερα παγκρεατικά μοσχεύματα τοποθετούνται όπως και τα νεφρικά στην πύελο, χρησιμοποιώντας τα λαγόνια αγγεία για αιμάτωση. Η προσέγγιση αυτή εξασφαλίζει χαμηλότερη συχνότητα θρόμβωσης του μοσχεύματος, ευκολότερη πρόσβαση για βιοψία και δυνατότητα εντερικής ή κυστικής παροχέτευσης της εξωκρινούς μοίρας, αλλά οδηγεί και σε υπερινσουλιναίμια στη συστηματική κυκλοφορία με πιθανές συνέπειες στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Η πυλαία παροχέτευση ακολουθεί τη φυσιολογική οδό που οδηγεί σε φυσιολογικά επίπεδα ινσουλίνης και βελτιωμένο μεταβολισμό λιποπρωτεϊνών αλλά η συχνότητα θρόμβωσης είναι υψηλότερη και η πρόσβαση για βιοψία δυσκολότερη. Επιπλέον μπορεί να συνδυαστεί μόνο με εντερική παροχέτευση της εξωκρινούς μοίρας.

Η μεταμόσχευση νεφρού στη ΜΝΠ γίνεται με τεχνική ίδια αυτής που χρησιμοποιείται στη μεμονωμένη μεταμόσχευση νεφρού, και το μόσχευμα τοποθετείται ετερόπλευρα του παγκρεατικού μοσχεύματος.

**Πρώιμες επιπλοκές ΜΝΠ.** Οι πρώιμες επιπλοκές της ΜΝΠ περιλαμβάνουν αιμορραγία, λοίμωξη, οξεία απόρριψη, θρόμβωση και παγκρετίτιδα. Η θρόμβωση του παγκρεατικού μοσχεύματος είναι μια καταστροφική για το μόσχευμα επιπλοκή που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του μοσχεύματος. Εμφανίζεται συνήθως τις πρώτες εβδομάδες μετά τη ΜΝΠ. Ενδέχεται να αφορά το αρτηριακό ή φλεβικό μέρος και χαρακτηρίζεται από απότομη εμφάνιση υπεργλυκαιμίας με χαμηλά επίπεδα αμυλάσης. Η φλεβική θρόμβωση χαρακτηρίζεται από απότομη εμφάνιση υπεργλυκαιμίας με ψηλά επίπεδα αμυλάσης, οίδημα του μοσχεύματος και κοιλιακό

άλγος (63,65,66). Η υπερηχογραφία του μοσχεύματος με Doppler βοηθά στη διάγνωση και η αντιμετώπιση συνίσταται σε παγκρεατεκτομή.

#### **Επιπλοκές του μοσχεύματος που παροχετεύεται στην ουροδόχο κύστη.**

Παρότι η κυστική παροχέτευση θεωρείται γενικώς ασφαλέστερη, η απώλεια των εκκρίσεων της εξωκρινούς μοίρας στα ούρα μπορεί να προκαλέσει ουρολοίμωξη, στένωση ουρήθρας, ουρηθρίτιδα, βαλανίτιδα, αιματουρία ή διαρροή από την αναστόμωση. Λόγω της απώλειας παγκρεατικού υγρού υψηλής περιεκτικότητας σε διπτανθρακικά υπάρχει κίνδυνος οξέωσης, υπονατριαιμίας και αφυδάτωσης.

**Ανοσοκαταστολή και ΜΝΠ.** Εκτός από την υπεροξεία απόρριψη που παρατηρείται σε ασθενείς ήδη ευαισθητοποιημένους έναντι του μοσχεύματος και γίνεται μέσω αντισωμάτων και συμπληρώματος, η απόρριψη συμπαγών οργάνων γίνεται μέσω CD4 T-λεμφοκυττάρων, κυτταροτοξικών CD8 T-λεμφοκυττάρων και B-λεμφοκυττάρων (67,68). Στη φλεγμονώδη αντίδραση συμμετέχουν μακροφάγα, ουδετερόφιλα και NK κύτταρα. Βιολογικοί παράγοντες (κυρίως αντισώματα) που στοχεύουν τα κύτταρα αυτά δοκιμάζονται για την αντιμετώπιση επεισοδίων απόρριψης (65,66).

Η οξεία απόρριψη του παγκρεατικού μοσχεύματος χαρακτηρίζεται από γενικευμένη φλεγμονώδη διήθηση της εξωκρινούς μοίρας και των νησιδίων από ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα (εικόνα 5B) καθώς και από σημαντικές αγγειακές φλεγμονώδεις βλάβες (ενδοθηλίτιδα ή αρτηρίτιδα, εικόνα 5Γ). Ο όρος “χρόνια απόρριψη” χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αποφρακτική αγγειοπάθεια του μοσχεύματος με πάχυνση και εναποθέσεις του τοιχώματος. Παρατηρείται διήθηση από μονοκύτταρα και εκτεταμένη ίνωση (Εικόνα 5Δ).



Στη ΜΝΠ τα επεισόδια απόρριψης εκδηλώνονται αρχικά με αύξηση της κρεατινίνης ορού που ακολουθείται από μείωση της αμυλάσης ούρων και στο τέλος αύξηση της γλυκόζης αίματος. Σε όλους τους ασθενείς μείωση της αμυλάσης ούρων κατά 25% από τις συνήθεις τιμές θεωρείται ένδειξη χορήγησης θεραπείας για απόρριψη. Η παγκρεατική απόρριψη συχνά συνοδεύεται από εμπύρετο, αύξηση της αμυλάσης ορού και πτώση του pH ούρων. Η θεραπεία της απόρριψης συχνά αρχίζει πριν την επιβεβαίωση από τη βιοψία (65).

Σημαντικό ρόλο στην απόρριψη παίζει η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων (67,68). Οι ενδοκυτταριοί μηχανισμοί ενεργοποίησής τους διακρίνονται σε πρώιμους και όψιμους. Οι πρώιμοι μηχανισμοί αναφέρονται σε ενδοκυτταριες διαβιβαστικές οδούς που προηγούνται της μεταγραφής mRNA και οι όψιμοι σε μηχανισμούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Για την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων απαιτούνται όπως προαναφέρθηκε η σύνδεση του συμπλέγματος MHC-αντιγόνου (1<sup>ο</sup> σήμα) με τον υποδοχέα TCR και το δεύτερο σήμα συνδιέγερσης (πχ CD28 ή CD40 -2<sup>ο</sup> σήμα). Το σήμα αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ενδοκυτταρίων οδών που οδηγούν στη μεταγραφή γονιδίων που μετέχουν στην ανοσολογική αντίδραση (67).

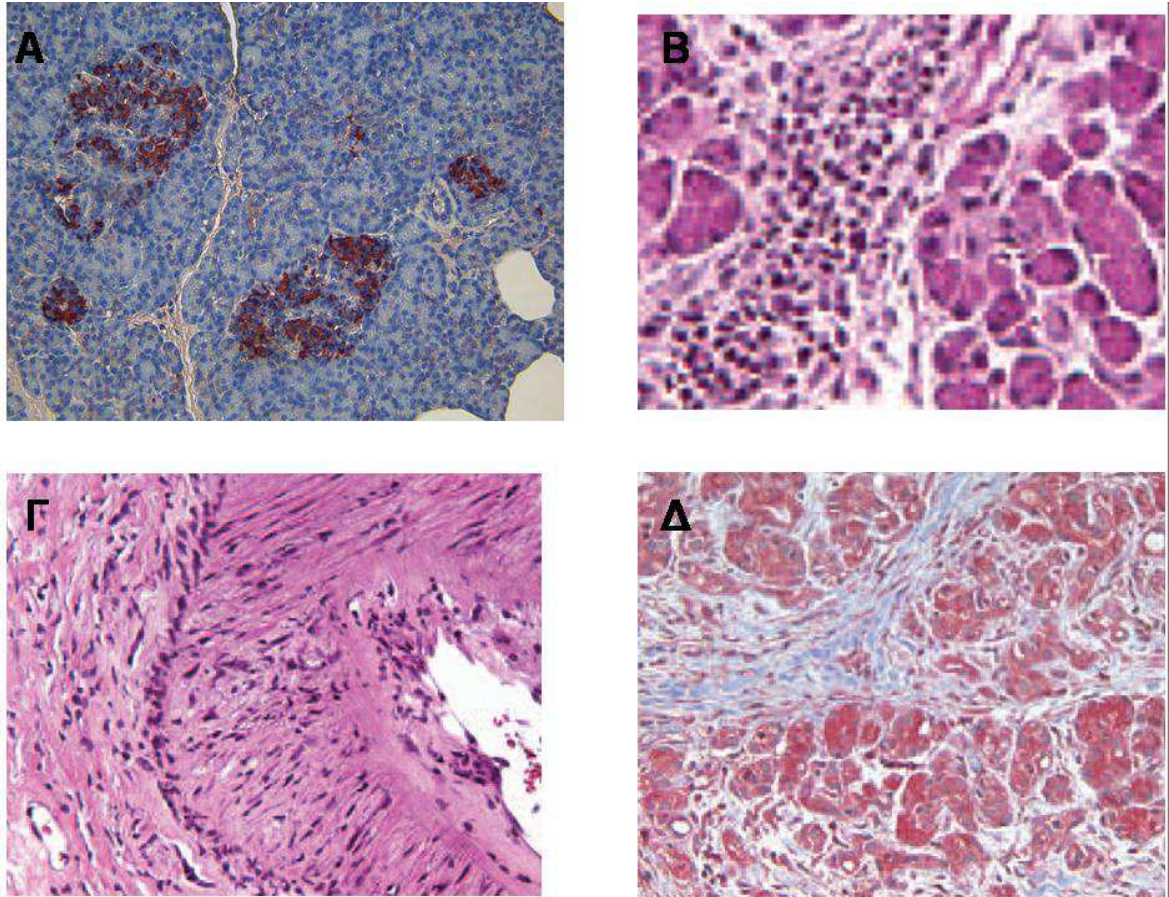
Η ανοσοκατασταλτική αγωγή συντήρησης δρα είτε περιορίζοντας τις ενδοκυτταριες διαβιβαστικές οδούς, είτε περιορίζοντας την ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού με αντιμεταβολίτες ή αναστολείς της *de novo* σύνθεσης νουκλεοτιδίων. Η σύνδεση του συμπλέγματος MHC-αντιγόνου ακολουθείται από μετάδοση του 1<sup>ου</sup> σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου με συμμετοχή του CD3, όπου ενεργοποιείται η οδός της *ras*-MAP κινάσης και άλλων κινασών με αποτέλεσμα

την είσοδο ιόντων ασβεστίου ( $Ca^{+2}$ ). Η είσοδος  $Ca^{+2}$  ενεργοποιεί την πρωτεϊνική φωσφατάση καλσινευρίνη. Η καλσινευρίνη ενεργοποιεί παράγοντες μεταγραφής γονιδίων κυτταροκινών που συμμετέχουν στην ανοσολογική αντίδραση. Η καλσινευρίνη αποτελεί μόριο-στόχο της κυκλοσπορίνης και του tacrolimus (68).

Ένα άλλο πρώιμο ανοσοκατασταλτικό, η ραπαμυκίνη (sirolimus) αναστέλλει τον  $Ca^{+2}$  εξαρτώμενο πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων και την ενεργοποίησή τους από την IL2. Η έκφραση της IL2 θεωρείται χαρακτηριστικό των ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων, ελέγχεται από πολλαπλούς παράγοντες μεταγραφής και απαιτεί περισσότερα του ενός σήματα από διαφορετικές ενδοκυττάρειες οδούς για να ενεργοποιηθεί. Η δράση της IL2 θεωρείτο κομβική στην ανοσολογική απόρριψη, με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν φαρμακολογικοί αναστολείς του υποδοχέα της (daclizumab). Μελέτες σε ποντίκια ωστόσο δείχνουν ότι απόρριψη μπορεί να συμβεί και απουσία IL2 (68).

Η αναστολή των οψίμων μηχανισμών στοχεύει στον ταχύ κυτταρικό πολλαπλασιασμό που ακολουθεί την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Η αζαθειοπρίνη, κυκλοφωσφαμίδη και μεθοτρεξάτη είναι ανοσοκατασταλτικά με τέτοια δράση. Το παράγωγο του μυκοφαινολικού οξέος MMF (mycophenolate mofetil) είναι ένας σχετικά νέος αναστολέας της de novo σύνθεσης πουρινών. Έτσι το MMF παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων χωρίς όμως να καταστέλλει το μυελό. Το MMF έχει καλύτερη ειδικότητα από την αζαθειοπρίνη και τείνει να την αντικαταστήσει σε πολλά ανοσοκατασταλτικά πρωτόκολλα (63,68).

Γενικευμένη ανοσοκαταστολή με παρεμπόδιση πρώιμης και όψιμης ενεργοποίησης επιτυγχάνεται με τα κορτικοστεροειδή και γι'αυτό συγχορηγούνται με



**Εικόνα 5.** Παθολογοανατομικά ευρήματα από βιοψίες παγκρεατικών μοσχευμάτων.

**A.** Φυσιολογικός ιστός χωρίς σημεία λεμφοκυτταρικής διήθησης και με φυσιολογική χρώση των νησιδίων για ινσουλίνη. **B.** Λεμφοκυτταρική διήθηση διαφραγματίου και λοβιδίων σε οξεία απόρριψη. **Γ.** Πάχυνση και κυτταρική διήθηση τοιχώματος αγγείου σε οξεία απόρριψη. **Δ.** Εκτεταμένη ίνωση με καταστροφή της αρχιτεκτονικής σε χρόνια απόρριψη.

ειδικούς αναστολείς της πρώιμης και όψιμης ενεργοποίησης που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Το καθιερωμένο σχήμα της χορηγούμενης ανοσοκαταστολής στη ΜΝΠ έχει προσαρμοστεί την τελευταία 15ετία στην εισαγωγή νέων ανοσοκατασταλτικών στην κλινική πράξη (63,65).

Η αρχική θεραπεία επαγωγής περιλαμβάνει το μονοκλωνικό αντίσωμα ΟΚΤ3 ή τη θυμογκλομπουλίνη. Η θεραπεία συντήρησης περιλαμβάνει συνήθως τρεις παράγοντες: στεροειδή, tacrolimus και MMF. Παλιότερα χρησιμοποιείτο περισσότερο η κυκλοσπορίνη αντί του tacrolimus και η αζαθειοπρίνη αντί του MMF. Την τελευταία δεκαετία στη θεραπεία επαγωγής έχει προστεθεί και το daclizumab (64).

**Πρόγνωση ασθενών ΜΝΠ.** Οι λήπτες ΜΝΠ εμφανίζουν μέσο προσδόκιμο επιβίωσης 15 έτη μεγαλύτερο από ασθενείς με ΣΔ1 που μπαίνουν στη λίστα αναμονής αλλά δε λαμβάνουν ΜΝΠ. Το προσδόκιμο επιβίωσης είναι κατά 10 έτη μεγαλύτερο από ασθενείς με ΣΔ1 που υποβάλλονται μόνο σε μεταμόσχευση νεφρού. Το προσδόκιμο επιβίωσης είναι ακόμη καλύτερο στις νεαρότερες ηλικιακές ομάδες ληπτών ΜΝΠ. Μόνο μειονέκτημα είναι η μεγαλύτερη θνητότητα της άμεσης μετεγχειρητικής περιόδου σε σύγκριση με αντίστοιχους ασθενείς ΣΔ1 που δε λαμβάνουν ΜΝΠ. Την τελευταία εικοσαετία σημειώθηκε σημαντική βελτίωση της επιβίωσης του παγκρεατικού μοσχεύματος σε σύγκριση με τη δεκαετία του 1980 (85% από 75% επιβίωση μοσχεύματος ενός έτους). Αυτή η μεταβολή οφείλεται τόσο σε μείωση του ποσοστού τεχνικής αποτυχίας (από 12% σε 6%) όσο και του ποσοστού ανοσολογικής αποτυχίας (από 7% σε 2%) (63,65,66). Σε μια μελέτη (63) η επιβίωση του νεφρικού μοσχεύματος ανήλθε σε 88% τον πρώτο χρόνο και 81%

τέσσερα χρόνια μετά τη ΜΝΠ. Η επιβίωση ασθενούς αντίστοιχα ήταν 92% και 88% και του παγκρεατικού μοσχεύματος 92% και 87% (63,64,66).

#### **Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση μοσχευμάτων και ασθενών.**

Ηλικία. Η επιβίωση των ασθενών είναι μεγαλύτερη όταν η ΜΝΠ γίνεται σε ηλικία κάτω των 45 ετών, ωστόσο η επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος φαίνεται πως δε διαφέρει στις δύο ηλικιακές ομάδες, γεγονός που πιθανώς αντανακλά το μικρότερο κίνδυνο απόρριψης σε μεγαλύτερη ηλικία (63).

Αγγειακή νόσος. Η επιβίωση ασθενών, παγκρεατικού και νεφρικού μοσχεύματος χωρίς συνυπάρχουσα αγγειακή νόσο βρέθηκε σε μια μελέτη 85%, 76%, και 83% αντίστοιχα 1 έτος μετά ΜΝΠ, και 79%, 68%, και 70% τέσσερα έτη μετά τη ΜΝΠ. Σε αντιδιαστολή, σε ασθενείς χωρίς αγγειακή νόσο η επιβίωση ασθενών, παγκρεατικού και νεφρικού μοσχεύματος ήταν 97%, 81%, and 94% στο ένα έτος και, 95%, 75%, και 89% (66).

Ιστοσυμβατότητα δότη – λήπτη. Είναι γνωστή η θετική συσχέτιση μεταξύ της επίτευξης υψηλού βαθμού ιστοσυμβατότητας και της επιβίωσης του νεφρικού μοσχεύματος σε μεμονωμένες μεταμοσχεύσεις νεφρού. Στην περίπτωση της μεταμόσχευσης παγκρέατος ωστόσο υπάρχει ο θεωρητικός κίνδυνος το HLA-DR συμβατό παγκρεατικό μόσχευμα να πυροδοτήσει τη λανθάνουσα αυτοανοσία στο λήπτη αφού είναι γνωστό ότι τα αντιγόνα του συμπλέγματος HLA-DR έχουν σημαντικό ρόλο στην αυτοάνοση αντίδραση του ΣΔ1. Οι περισσότερες μελέτες δε δείχνουν ότι η επίτευξη υψηλού βαθμού ιστοσυμβατότητας βελτιώνει την επιβίωση και για το λόγο αυτό δεν επιδιώκεται (66,69). Φαίνεται ότι η εξοικονόμηση χρόνου που επιτυγχάνεται όταν δεν επιδιώκεται ιστοσυμβατότητα, αλλά και η πρόοδος της

ανοσοκαταστολής τα τελευταία χρόνια υπερκαλύπτουν το όποιο πλεονέκτημα επιβίωσης μπορεί να προσδίδει η επίτευξη συμβατότητας (65).

Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση του μοσχεύματος είναι η ηλικία του δότη, ο χρόνος που παρέρχεται από την αφαίρεση του μοσχεύματος μέχρι τη μεταμόσχευση, ο τραυματικός θάνατος και η ύπαρξη αγγειακής νόσου στο δότη (66).

### **Ο ρόλος της αυτοανοσίας στη ΜΝΠ.**

Όπως προαναφέρθηκε, ο χρόνος ημίσειας επιβίωσης του παγκρεατικού μοσχεύματος σε ασθενείς με ΣΔ1 που υποβάλλονται σε ΜΝΠ, φτάνει σήμερα τα 12 έτη με 85% επιβίωση του μοσχεύματος κατά το 1<sup>ο</sup> έτος (54,70). Η δυσλειτουργία του παγκρεατικού μοσχεύματος μετά τη μεταμόσχευση μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες όπως η χρόνια απόρριψη, σε ορισμένες περιπτώσεις όμως ίσως οφείλεται σε επανεμφάνιση της αυτόανοσης καταστροφής των νησιδίων του μοσχεύματος, σε υποτροπή δηλαδή του ΣΔ1.

Το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε αρχικά σε μεταμόσχευση παγκρέατος μεταξύ διδύμων και αδελφών με ταυτόσημα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA. Μετά τις μεταμοσχεύσεις αυτές δεν είχε χορηγηθεί καθόλου ανοσοκαταστολή ή είχε χορηγηθεί μειωμένη λόγω ομολογίας των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας δότη και λήπτη. Η ταχεία επανεμφάνιση (εντός εβδομάδων) υπεργλυκαιμίας χωρίς σημεία απόρριψης, με ταυτόχρονη παρουσία νησιδίτιδος, απώλεια β-κυττάρων και ανίχνευση αυτοαντισωμάτων συνηγορούσαν υπέρ της υποτροπής ΣΔ1 (71-73). Σε μια άλλη αναφορά ένας ασθενής που υποβλήθηκε σε ΜΝΠ από αδελφό με ομόλογα HLA αντιγόνα ανέπτυξε υποτροπή ΣΔ1 παρότι λάμβανε ανοσοκαταστολή με

αζαθειοπρίνη και και πρεδνιζόνη, αυτό όμως συνέβη 8 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση (73). Δυο νησιδιακά αυτοαντισώματα εμφανίστηκαν 5 και 8 χρόνια μετά τη ΜΝΠ και η βιοψία παγκρέατος έδειξε νησιδίτιδα με επιλεκτική απώλεια β-κυττάρων. Η παρατεταμένη χρονική περίοδος που μεσολάβησε από τη ΜΝΠ μέχρι την υποτροπή ΣΔ1 στην περίπτωση αυτή υποδεικνύει ότι η ανοσοκαταστολή μπορεί να καθυστέρησε τη διαδικασία αυτή και ότι η επανεμφάνιση της αυτοανοσίας και του ΣΔ1 καθυστερούν σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (74-76).

Ορισμένες μελέτες συσχέτισαν την ύπαρξη νησιδιακών αυτοαντισωμάτων με τη δυσλειτουργία του μοσχεύματος, χωρίς όμως να παραθέτουν δεδομένα από βιοψίες και να μπορούν να αποκλείσουν την ύπαρξη απόρριψης (74-77). Υπάρχει μια αναφορά δύο ασθενών που υποβλήθηκαν σε ΜΝΠ και είχαν ενδείξεις υποτροπής ΣΔ1 , όπως επιλεκτική απώλεια β-κυττάρων στη βιοψία και νησιδιακά αυτοαντισώματα (78). Οι δύο αυτοί ασθενείς έλαβαν κυκλοσπορίνη, στεροειδή και αζαθειοπρίνη. Κατά την επανεμφάνιση υπεργλυκαιμίας ο ένας ασθενής ήταν οροθετικός για GAD και IA2 και ο δεύτερος αρνητικός. Ο πρώτος ασθενής είχε μερική ομολογία ενός αλληλίου HLA-A και ενός HLA-DR με το δότη ενώ στο δεύτερο δεν υπήρχε ομολογία για τα ζεύγη αντιγόνων ιστοσυμβατότητας HLA-A, HLA-B και HLA-DR. Η βιοψία του παγκρεατικού μοσχεύματος έδειξε επιλεκτική απώλεια β-κυττάρων και στους δυο ασθενείς και νησιδίτιδα στον πρώτο, τρεις μήνες μετά την επανεμφάνιση υπεργλυκαιμίας και 29 μήνες μετά τη ΜΝΠ. Σε καμία από τις αναφορές αυτές δεν είχε διερευνηθεί η ύπαρξη αυτοαντιδρώντων β-κυττάρων στο περιφερικό αίμα κατά την έκπτωση της λειτουργίας του παγκρεατικού μοσχεύματος. Η υποτροπή της αυτοάνοσης καταστροφής στα νησίδια του παγκρεατικού

μοσχεύματος θεωρείται σπάνια, δεν έχει περιγραφεί επαρκώς και δεν παρακολουθείται συνήθως σε λήπτες ΜΝΠ.



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Στόχος

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν η υποτροπή αυτοανοσίας μπορεί να εξηγήσει την απώλεια της έκκρισης ινσουλίνης σε ασθενείς με ιστορικό Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1 (ΣΔ1) που έχουν υποβληθεί σε ταυτόχρονη μεταμόσχευση νεφρών-παγκρέατος (ΜΝΠ) και λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική αγωγή. Η ανοσολογική διερεύνηση περιελάμβανε αναδρομική και προοπτική μελέτη αυτοαντισωμάτων καθώς και προοπτική μελέτη αυτοαντιδρώντων Τ-λεμφοκυττάρων. Η παρακολούθηση συνεχίστηκε για σημαντικό χρονικό διάστημα μετά τη διάγνωση της υποτροπής ΣΔ1 και την τροποποίηση της ανοσοκατασταλτικής αγωγής για να αντιμετωπιστεί η υποτροπή αυτή. Διερευνήθηκαν επίσης ορισμένα λειτουργικά χαρακτηριστικά των αυτοαντιδρώντων Τ-λεμφοκυττάρων που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς αυτούς αλλά και η ανταπόκριση των ασθενών ΜΝΠ που εμφάνιζαν υποτροπή ΣΔ1 στην τροποποίηση της ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Η διερεύνηση περιελάμβανε επίσης τα νησιδιακά αυτοαντισώματα των αντιστοιχών δοτών. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ανάλογη αναφορά στη βιβλιογραφία και επιδίωξη της παρούσας μελέτης ήταν να τεκμηριώσει την αναγκαιότητα της παρακολούθησης δεικτών αυτοανοσίας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΜΝΠ και να συνεισφέρει στην υπάρχουσα γνώση για το μηχανισμό ανοσολογικής καταστροφής του β-κυττάρου αλλά και το ρόλο της ανοσοκατασταλτικής αγωγής.

## 2. Ασθενείς και μέθοδοι

**2.1 Ασθενείς.** Από το 1990 έχουν πραγματοποιηθεί περισσότερες από 350 ταυτόχρονες μεταμοσχεύσεις νεφρών-παγκρέατος στο Πανεπιστήμιο του Μαϊάμι με δεκαετή επιβίωση των ληπτών σε ποσοστό 83% και του μοσχεύματος κατά 76%. Όλοι οι ασθενείς είχαν ΣΔ1 με μη ανιχνεύσιμο C-πεπτιδίο κατά τη γευματική δοκιμασία Sustacal προ της μεταμόσχευσης. Η δοκιμασία Sustacal είναι μια παραλλαγή της από του στόματος δοκιμασίας ανοχής της γλυκόζης κατά την οποία αντί φόρτισης με γλυκόζη γίνεται από του στόματος φόρτιση με γεύμα υγρής μορφής που περιέχει συγκεκριμένη ποσότητα υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών (79,80). Επίπεδα C-πεπτιδίου <0.8 ng/ml στα 120 λεπτά της δοκιμασίας σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα κριτήρια που αναφέρονται παρακάτω συνέβαλλαν στην αιτιολογική ταξινόμηση της υπεργλυκαιμίας.

Σε όλες τις μεταμοσχεύσεις η εξωκρινής μοίρα του παγκρέατος παροχετεύτηκε στην ουροδόχο κύστη, γεγονός που επέτρεπε την παρακολούθηση της αμυλάσης ούρων ως δείκτη της λειτουργίας της εξωκρινούς μοίρας του μοσχεύματος. Η φλεβική αιμάτωση του μοσχεύματος παροχετεύτηκε στη συστηματική κυκλοφορία. Η εμφάνιση υπεργλυκαιμίας χωρίς σημεία απόρριψης χαρακτήριζε τους ασθενείς με πιθανή υποτροπή του ΣΔ1. Οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη χορήγησαν γραπτή συγκατάθεση για τη διερεύνηση της υποτροπής του ΣΔ1.

Από τους πτωματικούς δότες ΜΝΠ για τους οποίους αναζητήθηκαν αναδρομικά δείγματα ορού για τη μέτρηση νησιδιακών αυτοαντισωμάτων, υπήρχαν 135 διαθέσιμα δείγματα δοτών, ενώ από τους λήπτες μελετήθηκαν 254 ασθενείς

(122 γυναίκες και 132 άνδρες) που υποβλήθηκαν σε ΜΝΠ, για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμες διαδοχικές μετρήσεις αυτοαντισωμάτων τουλάχιστον ανά τρίμηνο και διάρκεια παρακολούθησης τουλάχιστον 2 έτη. Μελετήθηκε η επίπτωση GAD και IA2 αυτοαντισωμάτων προ της μεταμόσχευσης και κατά την παρακολούθηση. Διαθέσιμα στοιχεία για τον τύπο του συμπλέγματος HLA υπήρχαν για 252 λήπτες. Η ηλικία των δοτών όπως και η ηλικία εμφάνισης ΣΔ1 στους λήπτες, ο χρόνος από τη διάγνωση του ΣΔ1 μέχρι τη ΜΝΠ, η ηλικία των δοτών τη στιγμή της ΜΝΠ και ο χρόνος παρακολούθησης μετά τη ΜΝΠ παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Ηλικία των δοτών ΜΝΠ, ηλικία εμφάνισης ΣΔ1 στους λήπτες, χρόνος από τη διάγνωση του ΣΔ1 μέχρι τη ΜΝΠ, ηλικία των δοτών τη στιγμή της μεταμόσχευσης και χρόνος παρακολούθησης των ληπτών μετά τη ΜΝΠ.

	Δότες		Λήπτες	
	Ηλικία εμφάνισης ΣΔ1	Ηλικία ΜΝΠ	Ηλικία	Διάρκεια παρακολούθησης
Διάμεση τιμή (έτη)	24	12	39	5.6
Ελαχίστη – Μεγίστη τιμή (έτη)	3 - 51	0.8 – 21	22 – 49	2 – 15.9

**2.2 Κριτήρια ταξινόμησης ασθενών ΜΝΠ.** Η ταξινόμηση των ληπτών ΜΝΠ ως προς την παρουσία ευγλυκαιμίας ή υπεργλυκαιμίας και η περαιτέρω ταξινόμηση των ασθενών με υπεργλυκαιμία, έγινε με βάση την κλινική εικόνα και την παρακολούθηση εργαστηριακών παραμέτρων:

Υπεργλυκαιμία:

- Γλυκόζη πλάσματος νηστείας  $\geq 126\text{mg/dl}$ , ή τυχαία γλυκόζη πλάσματος  $\geq 200\text{mg/dl}$  και παρουσία συμπτωμάτων υπεργλυκαιμίας.

Ευγλυκαιμία:

- Απουσία υπεργλυκαιμίας όπως ανωτέρω περιγράφεται.

Η περαιτέρω ταξινόμηση των ασθενών με υπεργλυκαιμία έγινε ως εξής:

Παγκρεατική απόρριψη (ΠΑ):

- Παρουσία υπεργλυκαιμίας όπως ανωτέρω περιγράφεται.

- Προοδευτική μείωση των επιπέδων αμυλάσης ούρων, σημείο έκπτωσης της λειτουργίας της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος και απόρριψης.

- Έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας με αύξηση των επιπέδων κρεατινίνης.

- Σημεία απόρριψης σε βιοψία νεφρού και όπου ήταν δυνατό βιοψία παγκρέατος, ήτοι γενικευμένη λεμφοκυτταρική διήθηση της εξωκρινούς μοίρας του παγκρεατικού μοσχεύματος, του τοιχώματος των παγκρεατικών αγγείων και των διαφραγματίων και τελικά ίνωση και καταστροφή της αρχιτεκτονικής του παγκρεατικού μοσχεύματος.

- Απουσία αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ.

Η παρουσία υπεργλυκαιμίας και τουλάχιστον δύο από τα υπόλοιπα κριτήρια ήταν απαραίτητα για τη διάγνωση της ΠΑ.

Υπεργλυκαιμία με χαρακτηριστικά ΣΔ τύπου 2 (ΣΔ2):

- Παρουσία υπεργλυκαιμίας όπως ανωτέρω περιγράφεται.
- Απουσία παγκρεατικής απόρριψης, όπως ανωτέρω περιγράφεται.
- Διατήρηση των επιπέδων C-πεπτιδίου νηστείας και 120 λεπτά μετά δοκιμασία Sustacal σε τουλάχιστον φυσιολογικά ή και αυξημένα επίπεδα.

Για τη διάγνωση ΣΔ2 ήταν απαραίτητο να εκπληρώνονται όλα τα ανωτέρω κριτήρια.

#### Πιθανή υποτροπή ΣΔ1:

- Παρουσία υπεργλυκαιμίας όπως ανωτέρω περιγράφεται.
- Απουσία παγκρεατικής απόρριψης όπως ανωτέρω περιγράφεται.
- Επίπεδα C-πεπτιδίου νηστείας και στα 120 λεπτά μετά το γεύμα με Sustacal <0,8 ng/ml.
- Υλικό βιοψίας παγκρεατικού μοσχεύματος με ευρήματα ανοσολογικής καταστροφής μόνο των νησιδίων (νησιδίτιδα), χωρίς σημεία απόρριψης ή / και ανεύρεση αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ.

Για τη διάγνωση της υποτροπής ΣΔ1 ήταν απαραίτητο να εκπληρώνονται όλα τα ανωτέρω κριτήρια.

**2.3 Προσδιορισμός τίτλων αυτοαντισωμάτων.** Η μέτρηση τίτλων νησιδιακών αυτοαντισωμάτων γινόταν εντός ενός μηνός πριν τη ΜΝΠ και ανά τρίμηνο μετά τη ΜΝΠ. Η διάρκεια παρακολούθησης μετά τη ΜΝΠ ήταν τουλάχιστον 2 έτη. Τα αυτοαντισώματα έναντι των GAD, IA-2 και ινσουλίνης μετρήθηκαν με ραδιοανοσολογικές μεθόδους πιστοποιημένες από την Immunology of Diabetes Society και το CDC (81,82). Τα επίπεδα αυτοαντισωμάτων εκφράζονται ως λόγος του δείκτη αυτοαντισωμάτων του ασθενούς προς τον αντίστοιχο δείκτη του ορίου που καθοριζόταν για τους μάρτυρες σε κάθε σειρά μετρήσεων. Λόγος μεγαλύτερος

του 1 υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα. Μετρήσεις αυτοαντισωμάτων έγιναν αναδρομικά από διατηρημένα δείγματα δοτών και ληπτών και προοπτικά από δείγματα που συνελέγησαν κατά την παρακολούθηση των ασθενών.

Αναλυτικότερα, για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκε μια ραδιοδεσμευτική τεχνική στην οποία σε 5μl ορού του ασθενή προστίθεντο 25μl PBS-Tween 1% (PBST), με τα αντίστοιχα ραδιοσημασμένα αντιγόνα, και ακολουθούσε επώαση μέχρι την επόμενη μέρα. Τα σχηματιζόμενα ανοσοσυμπλέγματα απομονώνονταν με την προσθήκη Πρωτεΐνης A (Protein A - Sepharose, Biovision, Mountain View, CA) σε 50μl PBST και ανάδευση για 45 λεπτά, πλύσιμο x 5 με PBST, και στη συνέχεια μεταφορά σε πλάκες Optiplate 96 βοθρίων (Applied Biosystems, Foster City, CA) με 45 μl PBST και 30 μl Microscint 20 (Packard Instrument Co., Meriden, Connecticut, USA). Οι ραδιενεργές κρούσεις μετρήθηκαν σε μετρητή Top Count (Packard Instrument Co.). Σε κάθε σειρά μετρήσεων ορός του ίδιου ασθενή μετρούνταν σε 3 διαφορετικά βοθρία και υπολογιζόταν ο μέσος όρος κρούσεων, ενώ υπήρχαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, καθώς και κενά βοθρία. Διευκρινίζεται ότι για τη μέτρηση των IAA προηγήθηκε ανταγωνισμός υγρής φάσης πριν την εφαρμογή Πρωτεΐνης A. Η ευαισθησία και ειδικότητα των μετρήσεων GAD, IA2 και IAA ήταν αντίστοιχα 84%/72%, 92%/91% και 48%/96%.

**2.4 Καθορισμός του τύπου των αντιγόνων του συστήματος HLA.** Ο τύπος των αντιγόνων του συστήματος HLA δότη και λήπτη καθορίζονταν από το Τμήμα Μεταμοσχεύσεων με κλασσικές ορολογικές μεθόδους (83,84) πριν τη ΜΝΠ. Τα αρχεία των ασθενών που υποβλήθηκαν σε ΜΝΠ και των αντιστοιχών δοτών χρησιμοποιήθηκαν για να καταγραφεί ο HLA τύπος δότη και λήπτη.

**2.5 Ανάλυση υλικού βιοψίας παγκρεατικών μοσχευμάτων.** Η ανάλυση του υλικού βιοψίας των παγκρεατικών μοσχευμάτων έγινε σε ασθενείς που παρουσίασαν υπεργλυκαιμία μετά από γραπτή συγκατάθεση. Σε δείγματα παγκρεατικού ιστού μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη, έγινε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (A&H), καθώς και ανοσοϊστοχημική χρώση με αντισώματα έναντι ινσουλίνης, γλυκαγόνου, CD3, CD4, CD20, και CD8, στο Παθολογοανατομικό τμήμα του Νοσοκομείου Jackson Memorial.

**2.6 Παρακολούθηση της λειτουργίας του παγκρεατικού μοσχεύματος.** Η ενδοκρινής λειτουργία του παγκρεατικού μοσχεύματος παρακολουθείτο με έλεγχο των επιπέδων του C-πεπτιδίου με ραδιοανοσομετρία διπλού αντισώματος. Ο συντελεστής μεταβλητότητας της μέτρησης και μεταξύ των μετρήσεων ήταν 4.8% και 8.1% αντίστοιχα. Οι φυσιολογικές τιμές του C-πεπτιδίου ήταν 0,8-4 ng/ml. Τα επίπεδα του C-πεπτιδίου είναι συνήθως υψηλότερα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ΜΝΠ συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες λόγω της συστηματικής παροχέτευσης της φλεβικής ροής του παγκρέατος (85). Η εξωκρινής λειτουργία του μεταμοσχευμένου παγκρέατος παρακολουθείτο με μέτρηση της αμυλάσης ούρων, καθώς στους ασθενείς αυτούς η εξωκρινής μοίρα παροχετεύεται στην ουροδόχο κύστη. Η λειτουργία του νεφρικού μοσχεύματος παρακολουθείτο με τον έλεγχο των επιπέδων κρεατινίνης ορού.

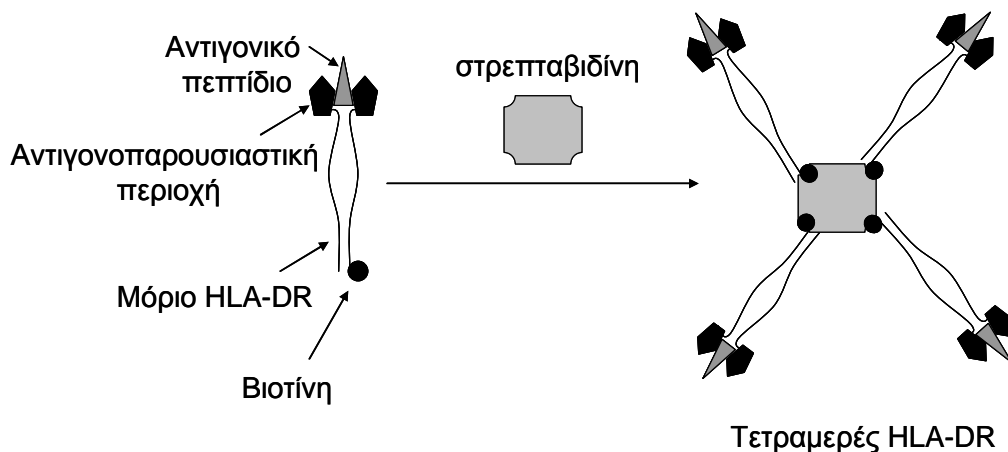
**2.7 Χαρακτηριστικά των αυτοαντιδρώντων T-λεμφοκυττάρων.** Η μελέτη των χαρακτηριστικών των αυτοαντιδρώντων T-λεμφοκυττάρων (AATΛΚ) γινόταν σε ασθενείς που εμφάνιζαν υπεργλυκαιμία χωρίς σημεία παγκρεατικής απόρριψης ή ΣΔ2. Τα αυτοαντιδρώντα T-λεμφοκύτταρα αναζητήθηκαν σε δείγματα περιφερικού



αίματος και σε λεμφαδένες του παγκρεατικού μοσχεύματος που λήφθηκαν κατά την παγκρεατική βιοψία, όποτε το υλικό αυτό ήταν διαθέσιμο. Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος μέτρησης με τετραμερή/πενταμερή (Benaroya Research Institute) που επιτρέπουν την ταυτοποίηση αυτοαντιδρώντων Τ-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων.

Τα τετραμερή/πενταμερή είναι χιμαιρικά μόρια, σεσημασμένα με φθορίζουσα χρωστική που αποτελούνται από 4 HLA-DR ή 5 HLA-A μόρια φορτισμένα με πεπτιδία αυτοαντιγόνων. Έχουν δημιουργηθεί τετραμερή ή πενταμερή μόρια HLA για ορισμένους μόνο τύπους HLA. Καθώς ο HLA-DR/A τύπος του τετραμερούς /πενταμερούς πρέπει να ταυτίζεται με τον HLA-DR/A τύπο του ασθενή, προκειμένου ο υποδοχέας TCR των αυτοαντιδρώντων Τ-λεμφοκυττάρων του ασθενή να μπορεί να συνδεθεί με το σύμπλοκο πεπτιδίου - τετραμερούς/πενταμερούς (47,86), τα AATLK αυτά είναι δυνατό να αναζητηθούν μόνο σε ασθενείς με το συγκεκριμένο γονότυπο HLA. Στην αντιγονοπαρουσιαστική περιοχή των τετραμερών/πενταμερών τοποθετείται το αντιγονικό πεπτιδίο. Στην παρούσα μελέτη τα τετραμερή HLA-DR έφεραν στην αντιγονοειδική μεταβλητή περιοχή τους το πεπτιδίο GAD555-557, ενώ τα πενταμερή HLA-A2 το πεπτιδίο IGRP152-160. Στη β-άλυσσο της μη μεταβλητής περιοχής του HLA μορίου προστίθεται ένα μόριο βιοτίνης. Στη συνέχεια προστίθεται στρεπταβιδίνη σεσημασμένη με φθορίζουσα χρωστική. Η στρεπταβιδίνη έχει θέσεις που δεσμεύουν βιοτίνη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκων στρεπταβιδίνης με 4 ή 5 μόρια HLA (Σχήμα 1). Έτσι λεμφοκύτταρα σεσημασμένα με τετραμερή/πενταμερή μπορούν να καταμετρηθούν με κυτταρομετρία ροής. Η πραγματική συχνότητα αυτοαντιδρώντων ΤLK έναντι συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων

είναι εξαιρετικά χαμηλή στο περιφερικό αίμα (περίπου 1:40000 με 1:100000). Για το λόγο αυτό απαιτείται καλλιέργεια και αντιγονική διέγερση για την αύξηση των αντιγονοαντιδρώντων πληθυσμών σε μετρήσιμα επίπεδα (περίπου 0,1-2% του συνολικού αριθμού των ΤΛΚ). Μετά 12-14 μέρες καλλιέργειας, απομονώθηκαν τα Τ-λεμφοκύτταρα, έγινε σήμανση με συγκεκριμένα τετραμερή, αντί-CD4 και αντί-CD25 μονοκλωνικά αντισώματα και στη συνέχεια ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Τα αυτοαντιγόνα επελέγησαν βάσει της διαθεσιμότητας των αντιστοίχων τετραμερών HLA των οποίων ο τύπος ταυίζονταν με αυτόν των ασθενών και βάσει της



**Σχήμα 1.** Η δομή του τετραμερούς HLA-DR. Το HLA-DR μόριο αποτελείται από την α- και β-άλυσσο. Οι δύο αλυσσοι σχηματίζουν την αντιγονοπαρουσιαστική περιοχή όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο. Στο άκρο της β-αλύσου συνδέεται ένα μόριο βιοτίνης, ενώ με τη χρήση φθοριοσημασμένης στρεπταβιδίνης, ενός μορίου με υψηλή συνάφεια στη βιοτίνη, σχηματίζονται σημασμένα τετραμερή που ανιχνεύονται στην κυτταρομετρία ροής. Ανάλογη είναι η αρχή δημιουργίας πενταμερών HLA-A2.

παρουσίας των αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ έναντι των αντιγόνων αυτών σε ασθενείς με ΣΔ1 και προδιαβητικούς ασθενείς (47,86,87).

Για την διερεύνηση των χαρακτηριστικών των ΑΑΤΛΚ επελέγησαν τρεις ασθενείς ΜΝΠ που εμφάνισαν υπεργλυκαιμία λόγω πιθανής υποτροπής ΣΔ1. Οι ασθενείς επελέγησαν επειδή ο HLA τύπος τους επέτρεπε την αναζήτηση ΑΑΤΛΚ, αλλά και επειδή στους συγκεκριμένους ασθενείς κατέστη δυνατό να γίνει βιοψία παγκρεατικού μοσχεύματος και επανειλημμένες αιμοληψίες για την αναζήτηση ΑΑΤΛΚ. Οι ασθενείς αυτοί εφεξής θα αποκαλούνται Ασθενής 1, Ασθενής 2 και Ασθενής 3.

Ανίχνευση αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ στους ΜΝΠ Ασθενείς 1 και 3. Οι δύο αυτοί ασθενείς ελέγχθηκαν επανειλημμένα για GAD αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ. Μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (ΜΠΑ) απομονώθηκαν με κλασματική φυγοκέντρηση (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway). Τρία με τέσσερα εκατομμύρια ΜΠΑ καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υπόστρωμα (10% ανθρώπινο ορό σε RPMI με L-γλουταμίνη και HEPES με 1mM πυροσταφυλικό, 0,01 U/ml Πενικιλίνη και 0,01μg/ml Στρεπτομυκίνη) σε πλάκες καλλιέργειας με 24 βοθρία. Προστέθηκαν επίσης ως ανοσοδιεγερτικά πεπτίδια GAD555-557, και/ή αιμαγλουτινίνη HA306-318, (ένα πεπτίδιο προερχόμενο από το αντιγόνο αιμαγλουτινίνης της ινφλουένζας) ως θετικός μάρτυρας, σε συγκέντρωση 10μg/ml. Για αρνητικός μάρτυρας δεν χρησιμοποιήθηκε κανένα πεπτίδιο, είτε χρησιμοποιήθηκε ένα πεπτίδιο του αντιγόνου OspA της *Borrelia burgdorferi*, καθώς η ύπαρξη αντίδρασης έναντι του πεπτιδίου αυτού είναι εξαιρετικά σπάνια στο γενικό πληθυσμό.

Τα ΜΠΑ καλλιεργήθηκαν για 12-14 μέρες. Την 7<sup>η</sup> , 9<sup>η</sup> και 11<sup>η</sup> μέρα προστέθηκε Ιντερλευκίνη-2 (IL-2, Hemagen Diagnostics Inc, Columbia, MD, 1:20 τελική αραίωση). Από τα καλλιεργημένα ΜΠΑ 100000-300000 χρησιμοποιήθηκαν για χρώση με τετραμερές. Τα κύτταρα πλύθηκαν με D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), αυξήθηκε η συγκέντρωσή τους σε 2-6 εκατ. ανά ml και 50 μl χρησιμοποιήθηκαν για τετραμερή χρώση. Τα τετραμερή προστέθηκαν σε κάθε δείγμα σε συγκέντρωση 10 μg/ml , επώαστηκαν για 2,5 ώρες στους 37°C, στη συνέχεια εφαρμόστηκαν αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική και το δείγμα παρέμεινε σε πάγο για 15-30 λεπτά. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: αντί-CD4 (Becton Dickinson-BD, San Jose, CA), αντί-Vb 5.1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) και αντί-CD25 (BD ή eBioscience, San Diego CA). Η κυτταρομετρία ροής έγινε με συσκευή BD FACSCalibur μετά πλύσιμο με D-PBS που περιείχε 1% FBS (Hyclone, Logan, VT). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής έγινε με το πρόγραμμα CellQuest (BD, Franklin Lakes, NJ).

Παραγωγή και ανάλυση κλώνων ΤΛΚ από τους Ασθενείς 1 και 3. Κλώνοι ΤΛΚ διαχωρίστηκαν με απομόνωση κυττάρων θετικών για τετραμερή χρώση με τη χρήση διαχωριστή FACSVantage. Δεκατρείς με 16 μέρες μετά την αρχική in vitro διέγερση έγινε τετραμερής χρώση και τα θετικά κύτταρα συγκεντρώθηκαν σε πλάκες 96 βοθρίων που περιείχαν 100μl καλλιεργητικού υποστρώματος. Σε κάθε βοθρίο τοποθετήθηκαν επίσης 100000 ακτινοβολημένα ΜΠΑ, 5μg/ml φυτοαιμαγλουτίνη (PHA, Sigma, St Louis, MO) και την επόμενη μέρα 160 U/ml IL2 (Chiron, Emeryville, CA). Η διέγερση με PHA γινόταν εναλλάξ με αντιγόνο-ειδική διέγερση κατά την οποία ακτινοβολημένα ΜΠΑ εκτεθειμένα σε 10μg/ml αντιγόνου προστίθεντο στις

καλλιέργειες εναλλάξ με PHA. Μετά 2 ή 3 κύκλους ενίσχυσης η ειδικότητα των κλώνων ΤΛΚ επιβεβαιωνόταν με κλασσικές δοκιμασίες πρόσληψης ραδιενεργού θυμιδίνης σε ποικίλλουσες συγκεντρώσεις των καταλλήλων πεπτιδίων.

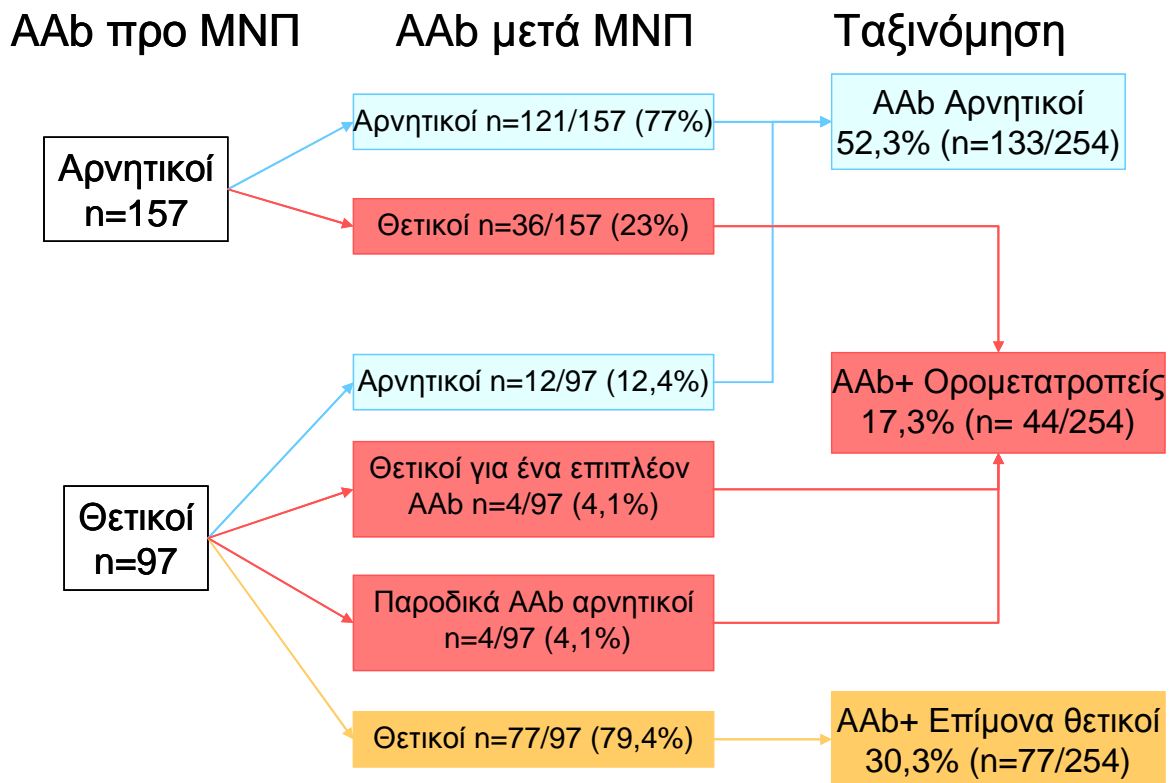
Ανίχνευση αυτοαντιγονοειδικών CD8 ΤΛΚ στον Ασθενή 2. Διερευνήθηκε η παρουσία IGRP-αυτοαντιδρώντων CD8-ΤΛΚ με τη χρήση ενός πενταμερούς HLA-A2 κλάσης I, καθώς για τον γονότυπο των HLA αντιγόνων κλάσης II της ασθενούς δεν υπήρχαν διαθέσιμα τετραμερή. Η διαδικασία ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως για τα τετραμερή, με τη διαφορά ότι στην αρχή της καλλιέργειας προστέθηκαν 20 ng ανασυνδυασμένης ανθρώπινης Ιντερλευκίνης-7 (IL7, Chiron, Emeryville, CA) και 10 ng IL2 προστίθεντο στα βοθρία κάθε 2<sup>η</sup> μέρα από την 4<sup>η</sup> μέρα καλλιέργειας. Τα περιεχόμενα των βοθρίων ανακαλλιεργήθηκαν με φρέσκα ΜΠΑ την 14<sup>η</sup> μέρα. Την 19<sup>η</sup> μέρα ένα μέρος των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση κυτταροτοξικότητας και τα υπόλοιπα για πενταμερή χρώση. Τα πενταμερή ήταν HLA-A\*0201 φορτισμένα με αντιγόνο ινφλουένζας MP58 ή IGRP152-160 (Proimmune Ltd. Oxford, UK).

**2.8 Μικροσκόπηση.** Οι αντικειμενοφόρες πλάκες που υποβλήθηκαν σε ανοσοϊστοχημική χρώση απεικονίστηκαν με μικροσκόπιο Leica DMLB συνδεδεμένο με ψηφιακή κάμερα Leica DFC-420C και λογισμικό IM50 Image Manager. Για τον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Zeiss Axiovert 200M με κάμερα Hamamatsu ORCA-ER και λογισμικό Zeiss Axiovision 4.6.3.

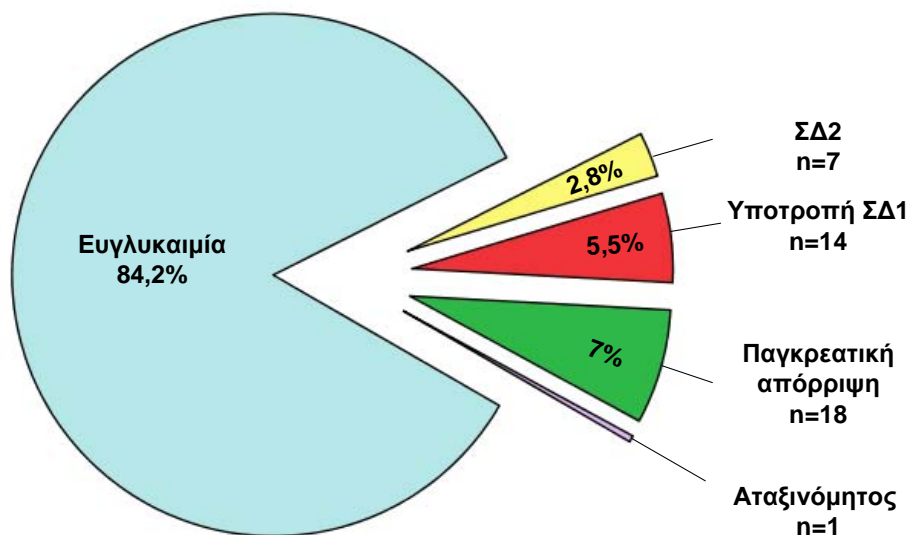
### 3. Αποτελέσματα

**3.1 Παρακολούθηση των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων των ληπτών πριν και μετά τη ΜΝΠ και συσχέτιση με την επανεμφάνιση υπεργλυκαιμίας.** Μελετήθηκε η επίπτωση GAD και IA2 αυτοαντισωμάτων πριν τη μεταμόσχευση και κατά την παρακολούθηση (2-15,9 έτη, μέση διάρκεια 5,6±2 έτη). Το 52% (133/254) των ασθενών ήταν οροαρνητικοί κατά την παρακολούθηση, το 30% (77/254) ήταν οροθετικοί σε ένα τουλάχιστον αυτοαντίσωμα πριν τη ΜΝΠ, το οποίο συνέχισε να ανιχνεύεται μετά τη ΜΝΠ και το 17% (44/254) εμφάνισαν ορομετατροπή, δηλαδή ήταν οροαρνητικοί για τουλάχιστον έξι μήνες μετά τη μεταμόσχευση και στη συνέχεια έγιναν οροθετικοί. Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των ασθενών με βάση την παρουσία νησιδιακών αυτοαντισωμάτων πριν και μετά τη μεταμόσχευση. Κατά την παρακολούθηση, 40 ασθενείς (16%) επανεμφάνισαν υπεργλυκαιμία ενώ 214 (84%) παρέμειναν ευγλυκαιμικοί. Μεταξύ των υπεργλυκαιμικών ασθενών 7 είχαν κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά ΣΔ2, 18 χρόνια παγκρεατική απόρριψη (ΠΑ), 14 χαρακτηριστικά υποτροπής ΣΔ1 και ένας ασθενής δεν κατέστη δυνατό να ταξινομηθεί. Η ταξινόμηση αυτή παρουσιάζεται σχηματικά στο Διάγραμμα 2.

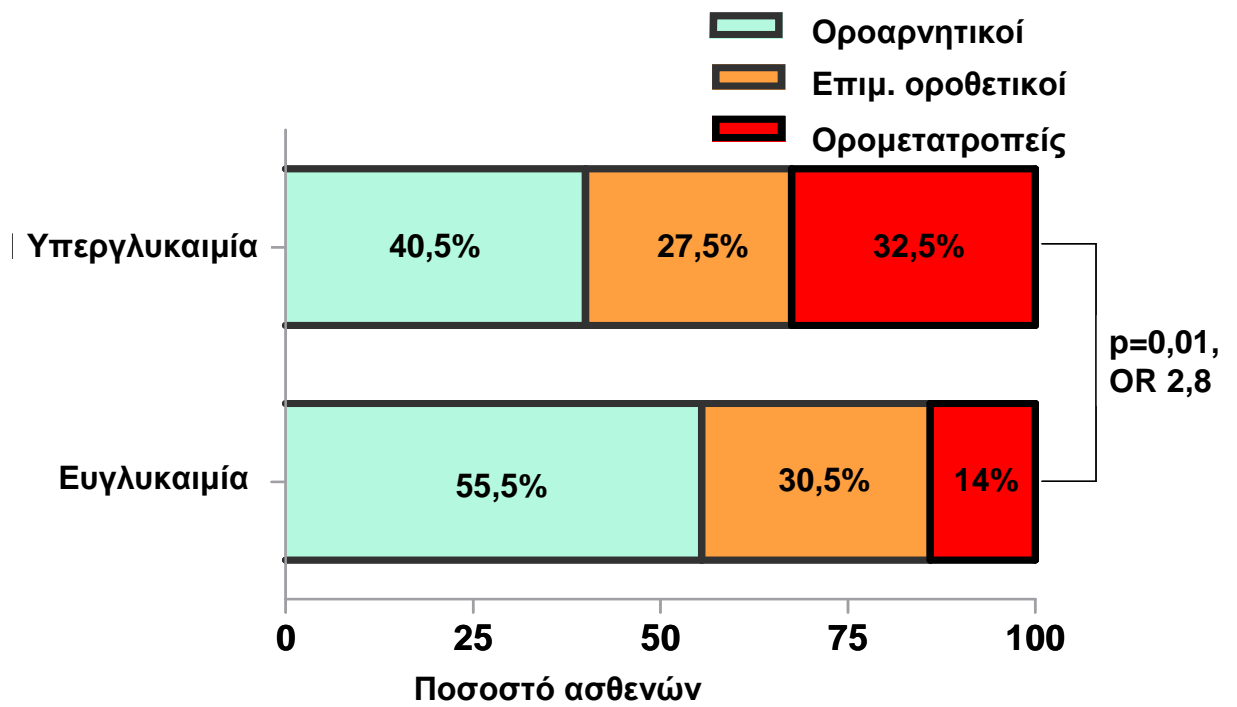
Στις καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier, περισσότεροι ασθενείς μεταξύ αυτών με ορομετατροπή εμφάνισαν υπεργλυκαιμία κατά την παρακολούθηση απ'ότι μεταξύ αυτών που παρέμειναν οροαρνητικοί ( $p=0,01$ , Διάγραμμα 4). Μεταξύ των ασθενών με υπεργλυκαιμία, 14 ταξινομήθηκαν ως έχοντες υποτροπή ΣΔ1, 7 είχαν κλινική πορεία συμβατή με ΣΔ2, 18 είχαν χρόνια παγκρεατική απόρριψη, ενώ σε μια περίπτωση υπεργλυκαιμίας δεν κατέστη δυνατό να γίνει ταξινόμηση.



**Διάγραμμα 1.** Ταξινόμηση ασθενών ΜΝΠ με βάση την ανίχνευση νησιδιακών αυτοαντισωμάτων (ΑΑb) πριν και μετά τη μεταμόσχευση.

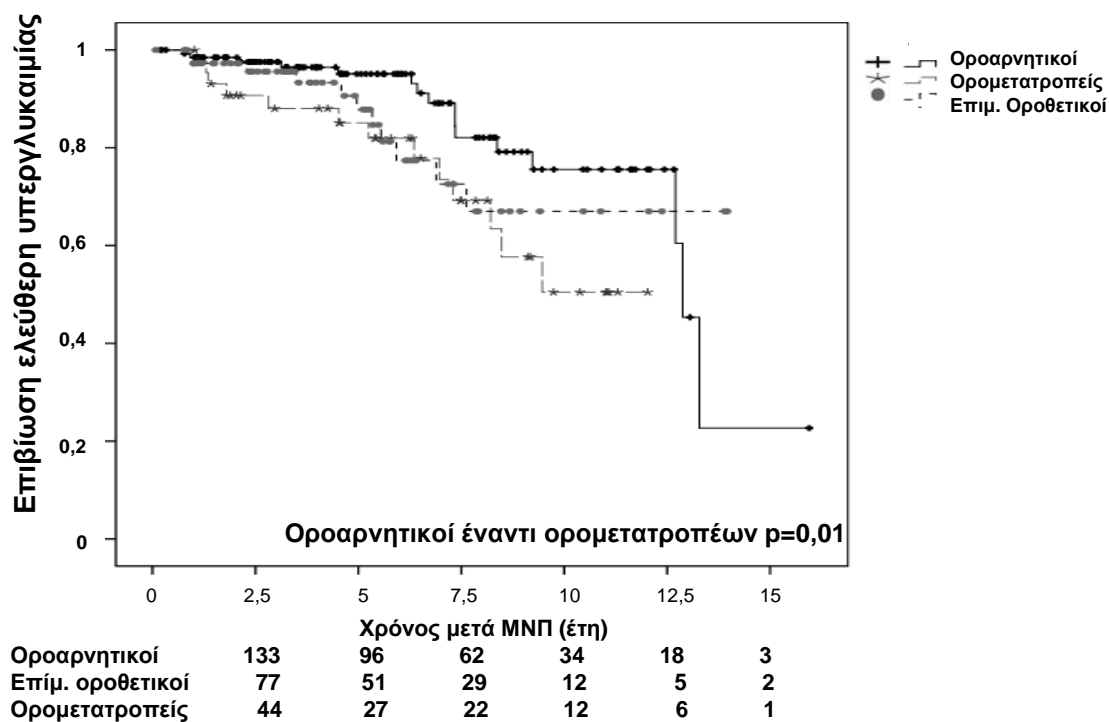


**Διάγραμμα 2.** Κλινικοεργαστηριακή ταξινόμηση ασθενών βάσει γλυκαιμικού ελέγχου.



**Διάγραμμα 3.** Ανίχνευση νησιδιακών αυτοαντισωμάτων σε υπεργλυκαιμικούς και ευγλυκαιμικούς ασθενείς.

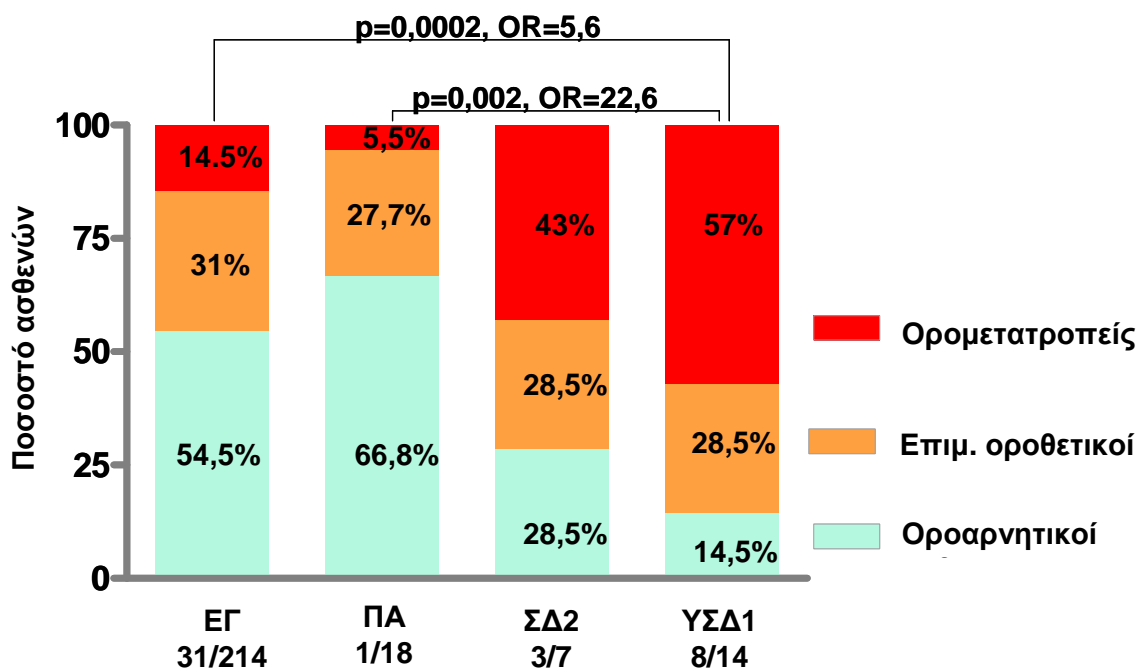




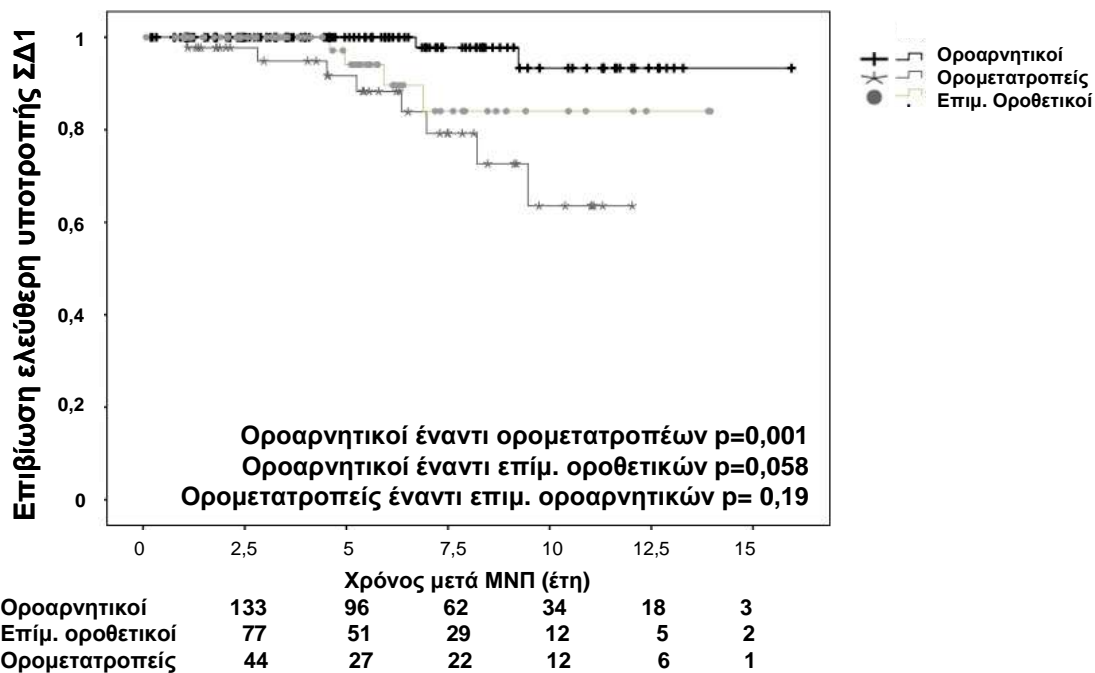
**Διάγραμμα 4.** Επιβίωση ελεύθερη υπεργλυκαιμίας μεταξύ οροαρνητικών, ορομετατροπέων και επίμονα οροθετικών. Στο κάτω μέρος του διαγράμματος παρατίθεται ο αριθμός ασθενών που παρέμεινε στην ανάλυση μετά τον αντίστοιχο χρόνο παρακολούθησης.

Οι περισσότεροι ασθενείς με υποτροπή του ΣΔ1 (12/14) ήταν οροθετικοί για νησιδιακά αυτοαντισώματα, όπως επίσης 5/7 ασθενείς με ΣΔ2 και 6/18 ασθενείς με ΠΑ. Οκτώ από τους 44 (18%) ασθενείς με ορομετατροπή εμφάνισαν υποτροπή ΣΔ1, έναντι 4/77 (5,2%) των ασθενών με επιμένουσα οροθετικότητα από πριν τη μεταμόσχευση ( $p=0.04$ ), και 2/133 (1,5%) των οροαρνητικών ασθενών ( $p=0,0001$ ), (Διάγραμμα 5).

Η ελεύθερη υποτροπής του ΣΔ1 επιβίωση ήταν μειωμένη στους ορομεταροπείς (Διάγραμμα 6), ενώ οι καμπύλες ελεύθερης ΣΔ2 επιβίωσης ή ελεύθερης ΠΑ επιβίωσης ήταν αλληλοεπικαλυπτόμενες ανεξαρτήτως παρουσίας ή όχι νησιδιακών αυτοαντισωμάτων. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο Cox Proportional Hazards, η ορομετατροπή συσχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υποτροπής ΣΔ1, ανεξαρτήτως της παρουσίας αυτοαντισωμάτων προ της ΜΝΠ ( $HR=13,6$ ,  $p<0,0001$ ).



**Διάγραμμα 5.** Παρουσία νησιδιακών αυτοαντισωμάτων μεταξύ ομάδων ασθενών με ευγλυκαιμία, παγκρεατική απόρριψη, κλινική εικόνα ΣΔ2 και κλινική υποτροπή ΣΔ1. ΕΓ: ευγλυκαιμία. ΠΑ: παγκρεατική απόρριψη. ΣΔ2: Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2. ΥΣΔ1: Υποτροπή Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1.



**Διάγραμμα 6.** Επιβίωση ελεύθερη υποτροπής ΣΔ1 μεταξύ οροαρνητικών, ορομετατροπέων και επίμονα οροθετικών ασθενών. Στο κάτω μέρος του διαγράμματος παρατίθεται ο αριθμός ασθενών που παρέμεινε στην ανάλυση μετά τον αντίστοιχο χρόνο παρακολούθησης.

**3.2 Η παρουσία του γονοτύπου HLA-DR3/4 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ορομετατροπή νησιδιακών αυτοαντισωμάτων και εμφάνιση υποτροπής ΣΔ1 μετά ΜΝΠ.** Από τους 254 ασθενείς για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμες διαδοχικές μετρήσεις αυτοαντισωμάτων, οι 252 είχαν διαθέσιμα στοιχεία του HLA τύπου τους.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η εμφάνιση ορομετατροπής συσχετίζεται με το γονότυπο HLA-DR3/4, επελέγησαν για περαιτέρω ανάλυση 175 ασθενείς που ήταν είτε οροαρνητικοί, είτε ορομετατροπείς με το σκεπτικό ότι αμέσως μετά τη ΜΝΠ και οι δύο ομάδες δεν είχαν ανιχνεύσιμα νησιδιακά αυτοαντισώματα. Από τους ασθενείς αυτούς 146 (83%) παρέμειναν ευγλυκαιμικοί κατά τη ΜΝΠ, 10 (5,7%) είχαν κλινικεργαστηριακά χαρακτηριστικά υποτροπής ΣΔ1, 13 (7,4%) είχαν ΠΑ, 5 (2,9%) είχαν χαρακτηριστικά ΣΔ2 και ένας δεν κατέστη δυνατό να ταξινομηθεί.

Ο HLA DR τύπος των ασθενών αυτών είχε την εξής κατανομή :

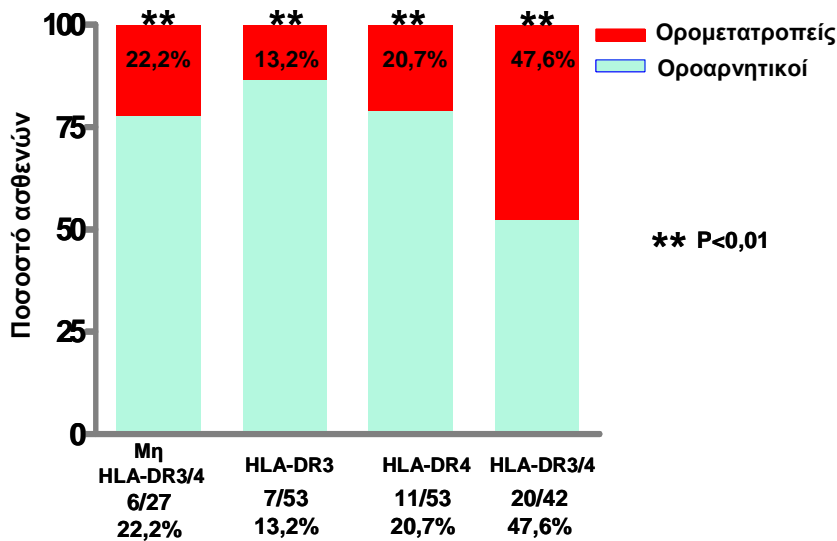
Μη HLA-DR3 ή 4: 27/175 (15.4%)

HLA-DR3/X: 53/175 (30.3%)

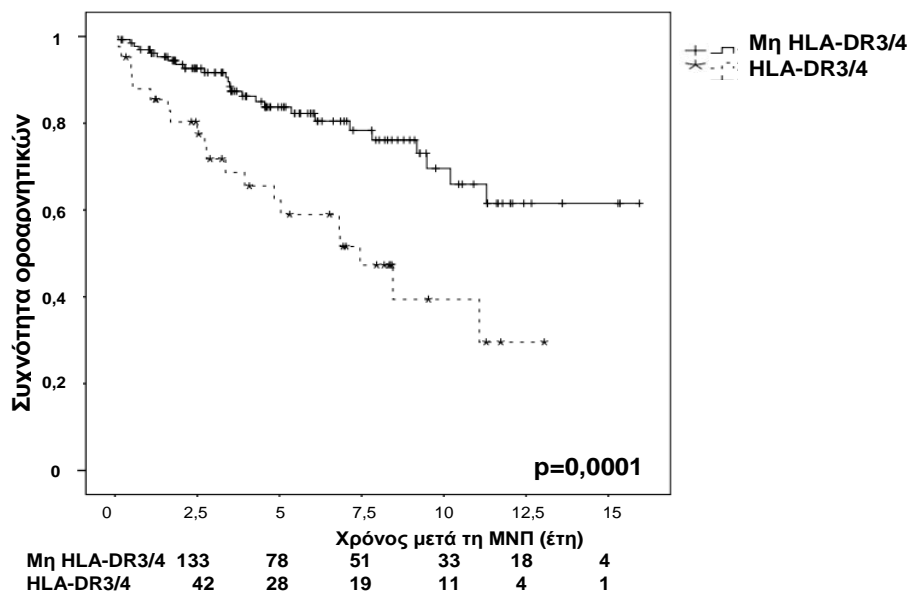
HLA-DR4/X: 53/175 (30.3%)

HLA-DR3/4: 42/175 (24%)

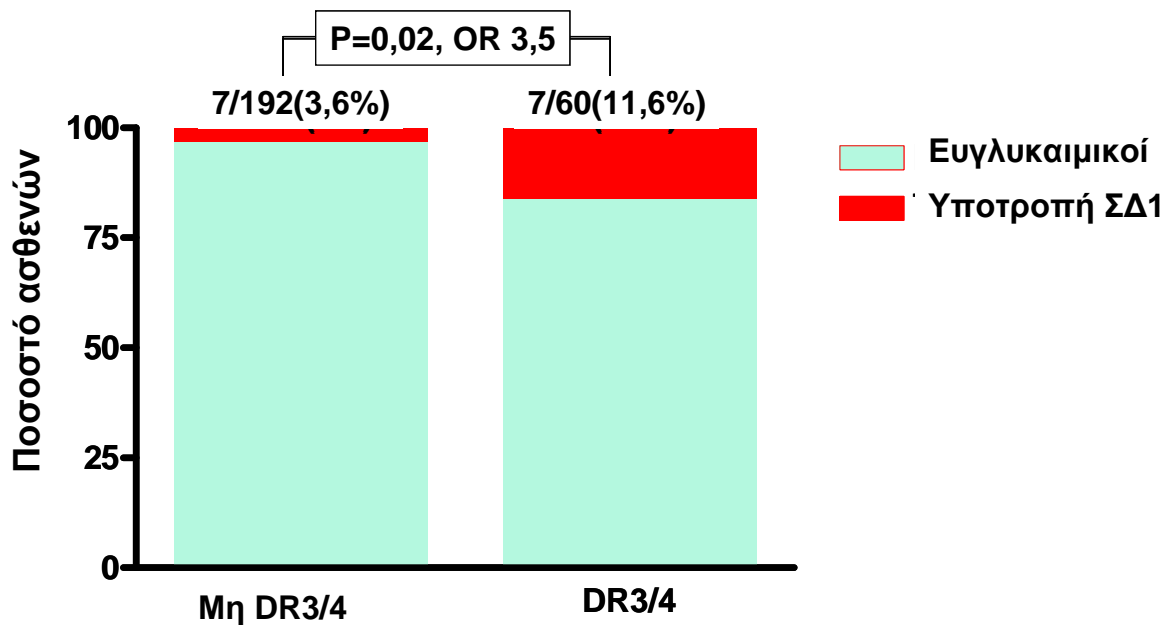
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7, είκοσι από τους 44 (54%) ασθενείς με ορομετατροπή έφεραν τα αλληλία HLA-DR3/4 (διπλοί ετεροζυγώτες), έναντι 22/131 (17%) των ασθενών που ήταν οροαρνητικοί ( $p=0.0001$ ,  $OR=4.5$ ). Ορομετατροπή εμφανίστηκε σε 20/42 (47,6%) με το γονότυπο HLA-DR3/4, έναντι 24/133 (18%) των ασθενών χωρίς αυτό ( $p=0.0001$ , Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης;  $p=0.0002$ ,  $OR=4.2$ ,  $X^2$ ).



**Διάγραμμα 7.** Συχνότητα ορομετατροπής μεταξύ ασθενών με διαφορετικούς HLA-DR τύπους.



**Διάγραμμα 8.** Επιβίωση ελεύθερη ορομετατροπής μεταξύ ασθενών με ή χωρίς τα αλληλία υψηλού κινδύνου HLA-DR3/4. Στο κάτω μέρος του διαγράμματος παρατίθεται ο αριθμός ασθενών που παρέμεινε στην ανάλυση μετά τον αντίστοιχο χρόνο παρακολούθησης.



**Διάγραμμα 9.** Συχνότητα υποτροπής ΣΔ1 μεταξύ ασθενών με ή χωρίς τα αλληλία υψηλού κινδύνου HLA-DR3/4.

Ανάμεσα στους ασθενείς που δεν ήταν διπλοί ετεροζυγώτες υπήρχαν 53 με τύπο HLA-DR3, άλλοι 53 με τύπο HLA-DR4 και 23 με κανένα από τα δύο αυτά αλληλία υψηλού κινδύνου. Ακόμα και αν οι ασθενείς που δεν έφεραν κανένα από τα δύο αλληλία εξαιρούνταν, οι διπλοί ετεροζυγώτες με τύπο HLA-DR3/4 εμφάνιζαν ορομετατροπή συχνότερα από ασθενείς με DR3 ή DR4 μόνο ( $p=0.0001$ , ανάλυση Kaplan-Meier;  $p=0.0002$ ,  $OR=4.4$ ,  $\chi^2$ ). Ανάμεσα στους ασθενείς που εμφάνισαν υποτροπή ΣΔ1, 60% ήταν διπλοί ετεροζυγώτες. Έτσι στο σύνολο των ασθενών,

7/60 (11,6%) ασθενών με γονότυπο HLA-DR3/4 εμφάνισαν ΣΔ1 έναντι 7/192 (3,6%) χωρίς αυτόν ( $p=0.01$ , Kaplan-Meier;  $p=0.02$ , OR=3,6, Fisher).

**3.3 Ο ρόλος της συμβατότητας αντιγόνων HLA δότη και λήπτη στην επιβίωση του μοσχεύματος.** Κάθε δότης και λήπτης φέρει τρία ζεύγη αλληλίων HLA, συνεπώς κάθε ζεύγος δότη-λήπτη μπορεί να έχει από 0 ως 6 κοινά αλλήλια. Στην ομάδα που μελετήθηκε υπήρχαν 64 λήπτες χωρίς κοινό αλλήλιο HLA με το δότη, 97 λήπτες με 1/6 κοινό αλλήλιο, 62 λήπτες με 2/6 κοινά αλλήλια, 21 λήπτες με 3/6 κοινά αλλήλια και 8 λήπτες με 4/6 κοινά αλλήλια. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά εμφάνισης υπεργλυκαιμίας μεταξύ των ομάδων αυτών. Μεταξύ όμως των δοτών που μοιράζονταν με τους λήπτες τουλάχιστον ένα αλλήλιο υψηλού κινδύνου DR3 ή DR4, η συχνότητα επανεμφάνισης υπεργλυκαιμίας φαινόταν να είναι μεγαλύτερη (20/85, 23,5%) έναντι των ληπτών που δεν είχαν κοινό DR3 ή DR4 με το δότη (20/169, 11,8% -  $p=0,02$ , OR=2,3). Υπήρχε μια ασθενής που είχε κοινά με το δότη τα αλλήλια DR3 και DR4 και ήταν η ασθενής που εμφάνισε υπεργλυκαιμία που δεν κατέστη δυνατό να ταξινομηθεί.

#### **3.4 Περιγραφή ασθενών με πιθανή υποτροπή του ΣΔ1.**

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η επανενεργοποίηση της αυτοανοσίας αποτελεί σημαντικό παράγοντα διαταραχής της λειτουργίας του παγκρεατικού μοσχεύματος και πρόκλησης υπεργλυκαιμίας σε ορισμένους ασθενείς ΜΝΠ, παρά τη χορηγούμενη ανοσοκαταστολή. Για την καλύτερη περιγραφή της υποτροπής του ΣΔ1 σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΜΝΠ, επελέγησαν οι Ασθενείς 1, 2 και 3. Οι ασθενείς αυτοί επελέγησαν επειδή ο HLA τύπος τους επέτρεπε την αναζήτηση ΑΑΤΛΚ, αλλά και επειδή στους συγκεκριμένους ασθενείς κατέστη δυνατό να γίνει

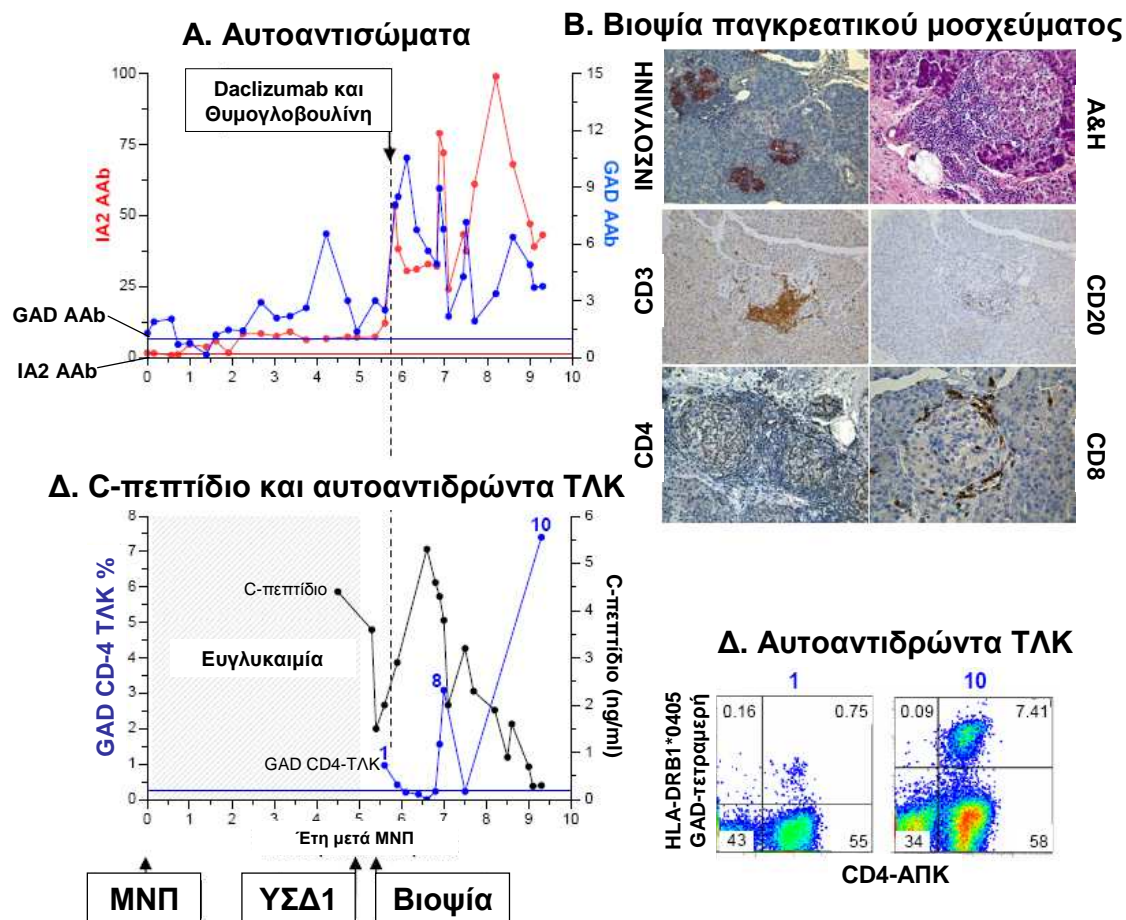


βιοψία παγκρεατικού μοσχεύματος και επανειλημμένες αιμοληψίες για την αναζήτηση ΑΑΤΛΚ. Παρακάτω περιγράφονται τα κύρια χαρακτηριστικά υποτροπής του ΣΔ1 στους ασθενείς αυτούς.

Ο Ασθενής 1 ήταν λευκός άνδρας ηλικίας 42 ετών με γονότυπο HLA A2/A3, B57/B60, DR4(DRB1\*0405)/DR6 που εμφάνισε ΣΔ1 σε ηλικία 7 ετών. Έλαβε ΜΝΠ από δότη με γονότυπο HLA A2/A30, B41/B60, DR4/DRX σε ηλικία 32 ετών. Η ΜΝΠ οδήγησε σε ανεξαρτησία από εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για 5 χρόνια όμως στη συνέχεια ο ασθενής έγινε πάλι ινσουλινοεξαρτώμενος. Η λειτουργία του νεφρικού μοσχεύματος και της εξωκρινούς μοίρας του παγκρεατικού μοσχεύματος δεν επηρεάστηκαν. Η επιλεκτική έκπτωση της παραγωγής ινσουλίνης χωρίς σημεία απόρριψης οδήγησε στην υποψία υποτροπής ΣΔ1. Η αναδρομική ανάλυση των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων αποκάλυψε ότι ο ασθενής είχε GAD και IA2 αυτοαντισώματα πριν τη μεταμόσχευση τα οποία παρέμειναν θετικά μετά τη μεταμόσχευση και παρά την ανοσοκαταστολή, και οι τίτλοι τους αυξήθηκαν στη διάρκεια της παρακολούθησης. Τα αυτοαντισώματα ZnT8 ήταν συνεχώς αρνητικά.

Κατά την προοπτική παρακολούθηση, περίπου 6 μήνες μετά την επανεμφάνιση υπεργλυκαιμίας λήφθηκαν βιοψίες από την κεφαλή, το σώμα και την ουρά του παγκρεατικού μοσχεύματος. Περινησιδίτιδα και σοβαρή νησιδίτιδα είχαν προσβάλλει το 50-70% των νησιδίων. Η λεμφοκυτταρική διήθηση επιβεβαιώθηκε με χρώση για ΤΛΚ (CD3, CD4, CD8) και ΒΛΚ (CD20). Το 30% των νησιδίων είχαν χάσει τη χρώση για ινσουλίνη και σχεδόν όλα εμφάνιζαν μειωμένη περιεκτικότητα σε ινσουλίνη. Το C-πεπτίδιο ήταν ακόμα ανιχνεύσιμο επιβεβαιώνοντας την υπολειμματική λειτουργία των β-κυττάρων. Δεν υπήρχαν σημεία απόρριψης στις

βιοψίες του παγκρεατικού και νεφρικού μοσχεύματος. Κατά την υποτροπή και για 4 χρόνια μετά δεν ανιχνεύτηκαν αντισώματα έναντι αντιγόνων του δότη υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι η υποτροπή του ΣΔ1 δε σχετιζόταν με απόρριψη. Κατά το χρόνο της βιοψίας, περίπου 6 μήνες μετά την υποτροπή της υπεργλυκαιμίας ανιχνεύτηκαν GAD-αυτοαντιδρώντα CD4 ΤΛΚ με γονότυπο HLA DR4(DRB1\*0405). Αυτοαντιδρώντα CD4ΤΛΚ με την ίδια ειδικότητα ανιχνεύτηκαν ξανά σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία της παρακολούθησης. Τα παραπάνω ευρήματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.



**Εικόνα 1. Κλινική πορεία, δείκτες αυτοανοσίας και ευρήματα βιοψίας στον Ασθενή 1.**

**A:** Αυτοαντισώματα προ μεταμόσχευσης και μετά. Τα GAD και IA2 αυτοαντισώματα ήταν ανιχνεύσιμα προ της μεταμόσχευσης και παρέμειναν με αυξανόμενους τίτλους μετά τη ΜΝΠ παρά την ανοσοκαταστολή. Οι οριζόντιες γραμμές αντιστοίχου χρώματος αντιπροσωπεύουν το αντίστοιχο ανώτερο επιτρεπτό όριο (αρνητικό). Για όλα τα αυτοαντισώματα αποτέλεσμα >1 θεωρείται θετικό.

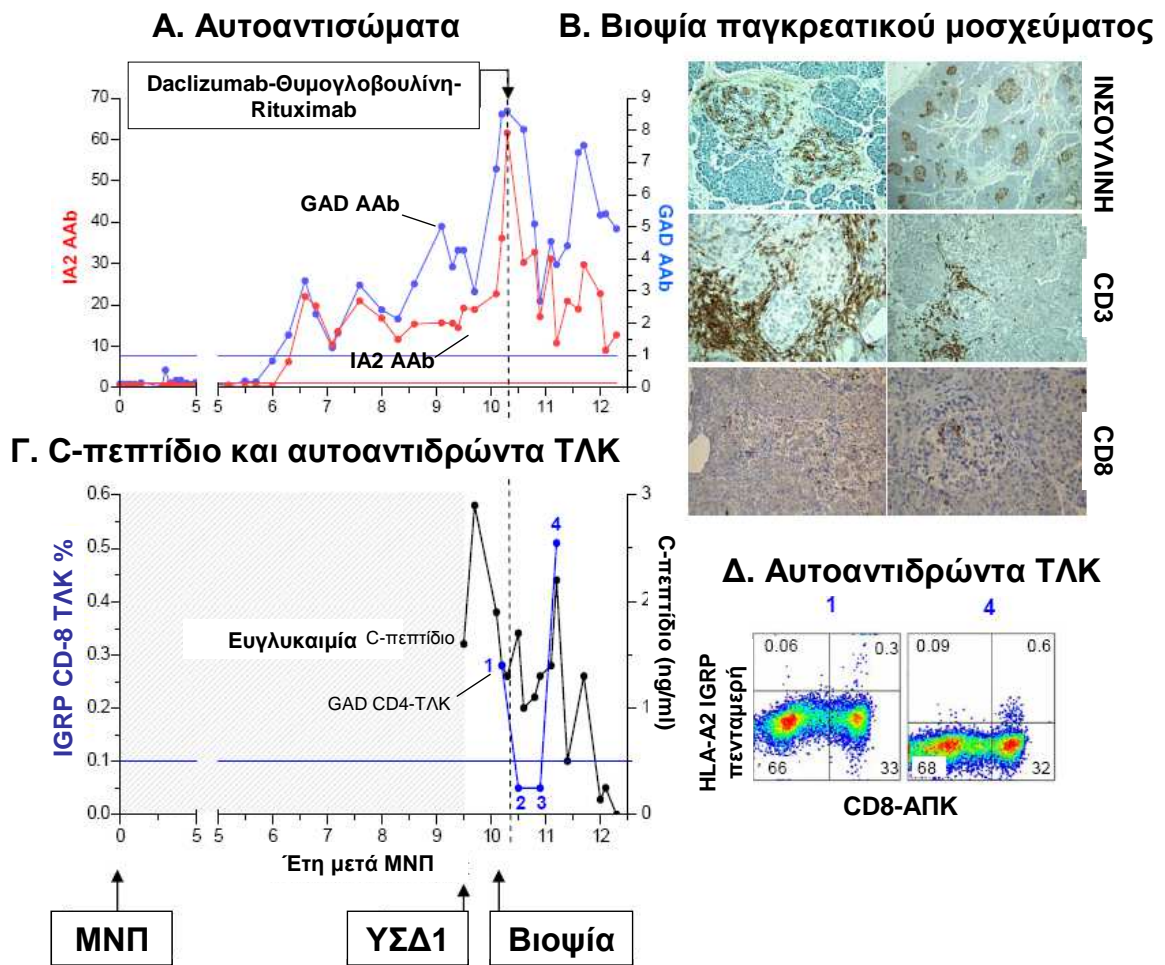
**Β:** Βιοψία παγκρεατικού μοςχεύματος με τις αντίστοιχες χρώσεις, που ελήφθη 6 μήνες μετά την υποτροπή υπεργλυκαιμίας. Περινησιδίτιδα και σοβαρή νησιδίτιδα είχαν προσβάλλει το 50-70% των νησιδίων. Η λεμφοκυτταρική διήθηση επιβεβαιώθηκε με χρώση για ΤΛΚ (CD3, CD4, CD8) και ΒΛΚ (CD20). Το 30% των νησιδίων είχαν χάσει τη χρώση για ινσουλίνη και σχεδόν όλα εμφάνιζαν μειωμένη περιεκτικότητα σε ινσουλίνη.

**Γ:** Επίπεδα C-πεπτιδίου και ποσοστό GAD αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ από τη στιγμή εμφάνισης υπεργλυκαιμίας. Το C-πεπτίδιο ήταν ανιχνεύσιμο κατά τη διάγνωση, επιβεβαιώνοντας την υπολειμματική λειτουργία β-κυττάρων . Αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ ανιχνεύτηκαν κατά το χρόνο της βιοψίας σε 2 δείγματα, περίπου 6 μήνες μετά την υποτροπή της υπεργλυκαιμίας, και ξανά σε διαδοχικά χρονικά σημεία κατά το έτος παρακολούθησης μετά την ανοσοκατασταλτική αγωγή.

Η οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει το όριο για τη μέτρηση αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ με τετραμερή (0,25%).

**Δ:** Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής που απεικονίζουν τα GAD αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ. Ο αριθμός πάνω από τα διαγράμματα τα αντιστοιχίζει με τα αντίστοιχα σημεία στο τμήμα (Γ). Η τετραμερής χρώση με πεπτίδιο μάρτυρα ήταν < 0,1% (δεν απεικονίζεται).

Η Ασθενής 2 ήταν λευκή γυναίκα ηλικίας 39 ετών με γονότυπο HLA A2/A24, B44/B56, DR5/DR9 που εμφάνισε ΣΔ1 σε ηλικία 8 ετών. Έλαβε ΜΝΠ από δότη με γονότυπο HLA A2/A3, B7/B14, DR7/DR9 σε ηλικία 30 ετών. Η ΜΝΠ οδήγησε σε ανεξαρτησία από εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για 9 χρόνια όμως στη συνέχεια η ασθενής έγινε πάλι ινσουλινοεξαρτώμενη. Η λειτουργία του νεφρικού μοσχεύματος και της εξωκρινούς μοίρας του παγκρεατικού μοσχεύματος δεν επηρεάστηκαν. Η επιλεκτική έκπτωση της παραγωγής ινσουλίνης χωρίς σημεία απόρριψης οδήγησε στην υποψία υποτροπής του ΣΔ1. Η αναδρομική ανάλυση των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων αποκάλυψε ότι η ασθενής εμφάνισε ορομετατροπή για GAD και IA2 αυτοαντισώματα 6 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση και παρά την ανοσοκαταστολή. Τα αυτοαντισώματα ZnT8 ήταν συνεχώς αρνητικά. Η υπεργλυκαιμία εμφανίστηκε 3,5 χρόνια μετά την ορομετατροπή. Κατά την προοπτική παρακολούθηση, περίπου 7 μήνες μετά την επανεμφάνιση υπεργλυκαιμίας, λήφθηκαν βιοψίες από το παγκρεατικό και το νεφρικό μόσχευμα. Δεν διαπιστώθηκαν σημεία απόρριψης, υπήρχε όμως σημαντική νησιδίτις και απώλεια β-κυττάρων στο παγκρεατικό μόσχευμα. Τα αυτοαντιδρώντα CD4 ΤΛΚ δεν μπορούσαν να αναζητηθούν καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα τετραμερή ομόλογα με τον τύπο HLA κλάσης II της ασθενούς. Χρησιμοποιήθηκε έτσι ένα πενταμερές HLA κλάσης I [HLA A2(A\*0201)] για την ανίχνευση IGRP-αυτοαντιδρώντων CD8-ΤΛΚ σε δείγμα περιφερικού αίματος που ελήφθη τον ίδιο χρόνο με τη βιοψία. Αυτοαντιδρώντα CD8-ΤΛΚ με την ίδια ειδικότητα ανιχνεύτηκαν ξανά σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία της παρακολούθησης.



**Εικόνα 2. Κλινική πορεία, δείκτες αυτοανοσίας και ευρήματα βιοψίας στον Ασθενή 2.**

**A:** Αυτοαντισώματα προ μεταμόσχευσης και μετά. Η ασθενής εμφάνισε ορομετατροπή 6 χρόνια μετά τη ΜΝΠ. Η υπεργλυκαιμία εμφανίστηκε 3,5 χρόνια μετά τη ΜΝΠ.

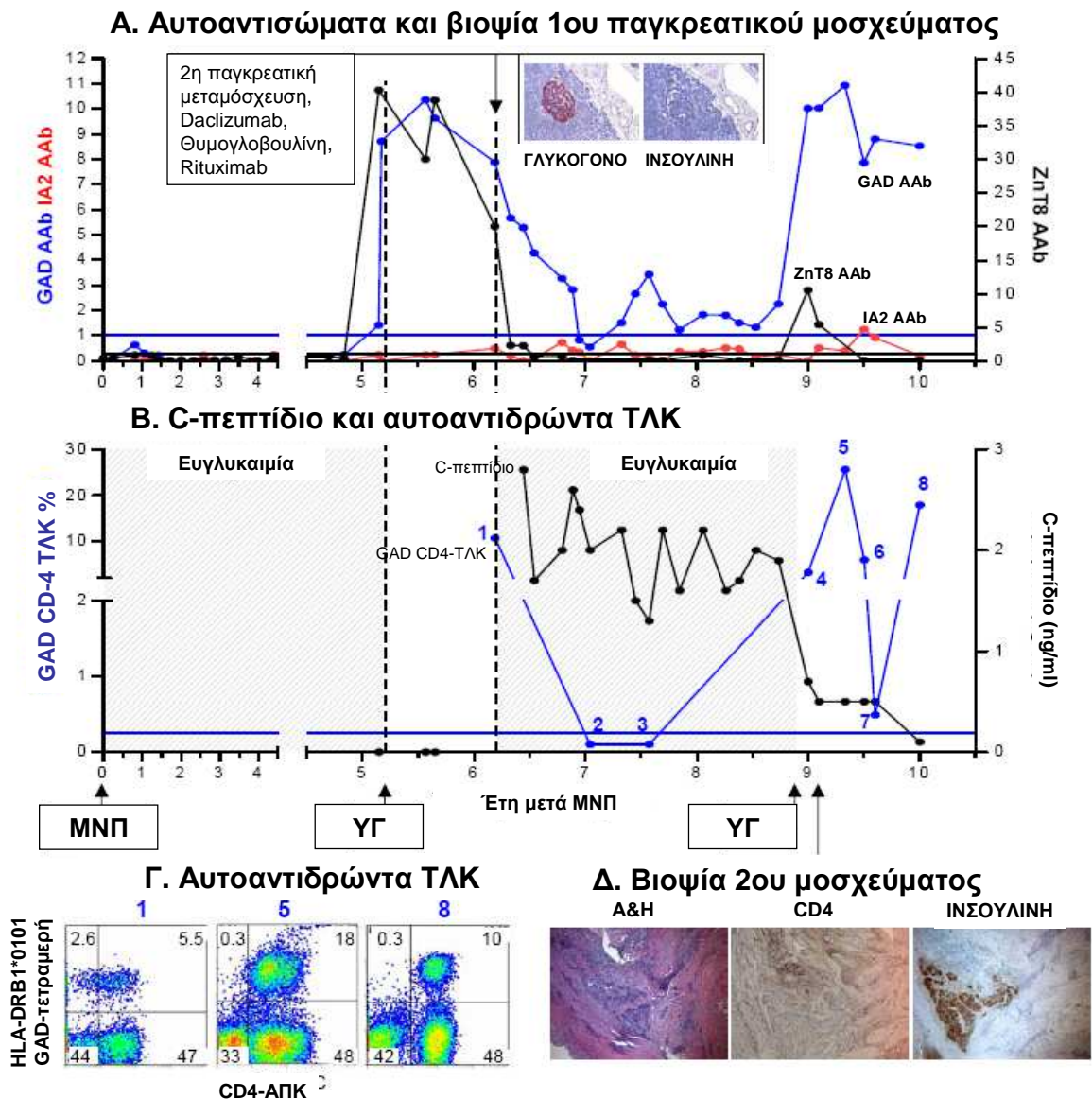
**B:** Βιοψία παγκρεατικού μοσχεύματος με τις αντίστοιχες χρώσεις, που ελήφθη 7 μήνες μετά την υποτροπή υπεργλυκαιμίας. Στοιχεία νησιδίτιδας και απώλειας β-κυττάρων.

**Γ:** Επίπεδα C-πεπτιδίου και ποσοστό IGRP αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ από τη στιγμή εμφάνισης υπεργλυκαιμίας. Το C-πεπτίδιο ήταν ανιχνεύσιμο κατά τη διάγνωση, επιβεβαιώνοντας την υπολειμματική λειτουργία β-κυττάρων . Αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ ανιχνεύτηκαν κατά το χρόνο της βιοψίας, και ένα έτος μετά την ανοσοκατασταλτική αγωγή. Η οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει το όριο για τη μέτρηση αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ με πενταμερή (0,1%).

**Δ:** Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής που απεικονίζουν τα IGRP αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ. Ο αριθμός πάνω από τα διαγράμματα τα αντιστοιχίζει με τα αντίστοιχα σημεία στο τμήμα **(Γ)**. Η τετραμερής χρώση με πεπτίδιο μάρτυρα ήταν < 0,1% (δεν απεικονίζεται).

Ο Ασθενής 3 ήταν λευκός άνδρας ηλικίας 38 ετών με γονότυπο HLA A26/A30, B38/B58, DR3/DR4(DRB1\*0402) που εμφάνισε ΣΔ1 σε ηλικία 12 ετών. Έλαβε ΜΝΠ από δότη με γονότυπο HLA A23/A33, B7/B52, DR2/DR10 σε ηλικία 27 ετών. Η ΜΝΠ οδήγησε σε ανεξαρτησία από εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για 5 χρόνια όμως στη συνέχεια ο ασθενής έγινε πάλι ινσουλινοεξαρτώμενος. Η λειτουργία του νεφρικού και της εξωκρινούς μοίρας του παγκρεατικού μωσχεύματος δεν επηρεάστηκαν. Η επιλεκτική έκπτωση της παραγωγής ινσουλίνης χωρίς σημεία απόρριψης οδήγησε στην υποψία υποτροπής ΣΔ1. αντίθεση με τους Ασθενείς 1 και 2, ο Ασθενής 3 δεν εμφάνιζε υπολειμματική παραγωγή C-πεπτιδίου νηστείας ή με γευματική δοκιμασία. Η αναδρομική ανάλυση των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων αποκάλυψε ότι ο ασθενής ήταν οροαρνητικός για νησιδιακά αυτοαντισώματα πριν τη μεταμόσχευση και μέχρι 3 μήνες πριν την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας, οπότε και εμφάνισε ορομετατροπή για GAD και ZnT8 αυτοαντισώματα. Οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων αυτών αυξήθηκαν 40 και 10 φορές αντίστοιχα πάνω από το ανώτερο φυσιολογικό. Κατά την προοπτική παρακολούθηση, λήφθηκαν βιοψίες περίπου 12 μήνες μετά την επανεμφάνιση υπεργλυκαιμίας. Διεπιστώθη σχεδόν πλήρης καταστροφή των β-κυττάρων χωρίς σημεία απόρριψης. Υπήρχε επίσης υπολειμματική νησιδίτις. Από το χρόνο της βιοψίας άρχισε και η αναζήτηση αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ και ανιχνεύτηκαν GAD-αυτοαντιδρώντα CD4-ΤΛΚ. Αυτοαντιδρώντα CD4ΤΛΚ με την ίδια ειδικότητα ανιχνεύτηκαν ξανά σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία της παρακολούθησης.





**Εικόνα 3. Κλινική πορεία, δείκτες αυτοανοσίας και ευρήματα βιοψίας στον Ασθενή 3. A:** Αυτοαντισώματα προ και μετά μεταμόσχευση. Η ασθενής εμφάνισε ορομετατροπή 5 χρόνια μετά τη ΜΝΠ για GAD και ZnT8 αυτοαντισώματα. Η υπεργλυκαιμία εμφανίστηκε 3 μήνες μετά την ορομετατροπή. Οι οριζόντιες γραμμές αντιστοίχου χρώματος αντιπροσωπεύουν το αντίστοιχο ανώτερο επιτρεπτό όριο (αρνητικό). Για όλα τα αυτοαντισώματα αποτέλεσμα >1 θεωρείται θετικό.

**Ένθετο:** Βιοψία του 1<sup>ου</sup> παγκρεατικού μοσχεύματος που ελήφθη κατά τη 2<sup>η</sup> παγκρεατική μεταμόσχευση με απώλεια β-κυττάρων.

**Β:** Επίπεδα C-πεπτιδίου και ποσοστό GAD αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ από το χρόνο εμφάνισης υπεργλυκαιμίας. Δεν υπήρχε υπολειμματική έκκριση C-πεπτιδίου κατά το χρόνο εμφάνισης υπεργλυκαιμίας. Η έκκριση C-πεπτιδίου αποκαταστάθηκε μετά τη 2<sup>η</sup> μεταμόσχευση αλλά εξαφανίστηκε πάλι μετά την απόρριψη του 2ου μοσχεύματος. Αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ ανιχνεύτηκαν σε δείγμα πριν τη χορήγηση ανοσοκαταστολής. Η οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει το όριο για τη μέτρηση αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ με τετραμερή (0,25%).

**Γ:** Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής που απεικονίζουν τα IGRP αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ. Ο αριθμός πάνω από τα διαγράμματα τα αντιστοιχίζει με τα αντίστοιχα σημεία στο τμήμα **(Β)**. Η τετραμερής χρώση με πεπτιδίο μάρτυρα ήταν < 0,1% (δεν απεικονίζεται).

**Δ:** Βιοψία του 2<sup>ου</sup> παγκρεατικού μοσχεύματος με σημεία απόρριψης.

**3.5 Τα αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ αναστέλλονται προσωρινά και μη ειδικά από ανοσοκατασταλτικά έναντι της Β- και Τ-κυτταρικής ανοσίας, και η επανεμφάνισή τους ακολουθείται από περαιτέρω απώλεια της έκκρισης ινσουλίνης.** Ακολουθεί περιγραφή της προσπάθειας να ανασχεθεί η αυτοάνοση διαδικασία και να διασωθούν τα υπολειμματικά β-κύτταρα στους Ασθενείς 1 και 2, ενώ ο ασθενής 3 έλαβε 2<sup>ο</sup> παγκρεατικό μόσχευμα.

Στον Ασθενή 1 η βιοψία του παγκρεατικού μοσχεύματος έδειξε νησιδίτιδα και απώλεια β-κυττάρων αλλά και υπολειμματικά β-κύτταρα και μη διηθημένα νησίδια. Η παρουσία ανιχνεύσιμου C-πεπτιδίου επιβεβαίωσε τη λειτουργία υπολειμματικών β-κυττάρων. Στην προσπάθεια να παρεμποδιστεί η αυτοάνοση και να διασωθούν τα υπολειμματικά β-κύτταρα χορηγήθηκε daclizumab (1mg/kg, 2 δόσεις με μεσοδιάστημα 2 εβδομάδων) και θυμογκλομπουλίνη (1mg/kg/μέρα για 5 μέρες). Μετά τη θεραπεία αυτή τα GAD-αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ δεν ανιχνεύονταν πλέον, ομοίως με τα ΤΛΚ αντιδρώντα σε αντιγόνο μάρτυρα, όπως θα αναμένετο έπειτα από γενικευμένη ανοσοκαταστολή.

Τα επίπεδα αυτοαντισωμάτων εμφάνισαν διακυμάνσεις αλλά διατηρήθηκαν αυξημένα κατά την παρακολούθηση. Ο ασθενής εξακολούθησε να είναι ινσουλινοεξαρτώμενος, αλλά τα επίπεδα C-πεπτιδίου αυξήθηκαν και παρέμειναν ανιχνεύσιμα για 1 έτος μετά την παραπάνω αγωγή. Στη συνέχεια, κατά τα επόμενα 2 χρόνια τα επίπεδα C-πεπτιδίου μειώθηκαν προοδευτικά, ενώ επανεμφανίστηκαν GAD-αυτοαντιδρώντα CD4-ΤΛΚ, ώστε τρία χρόνια μετά τη χορήγηση της αγωγής διάσωσης το C-πεπτίδιο δεν ήταν πλέον ανιχνεύσιμο.

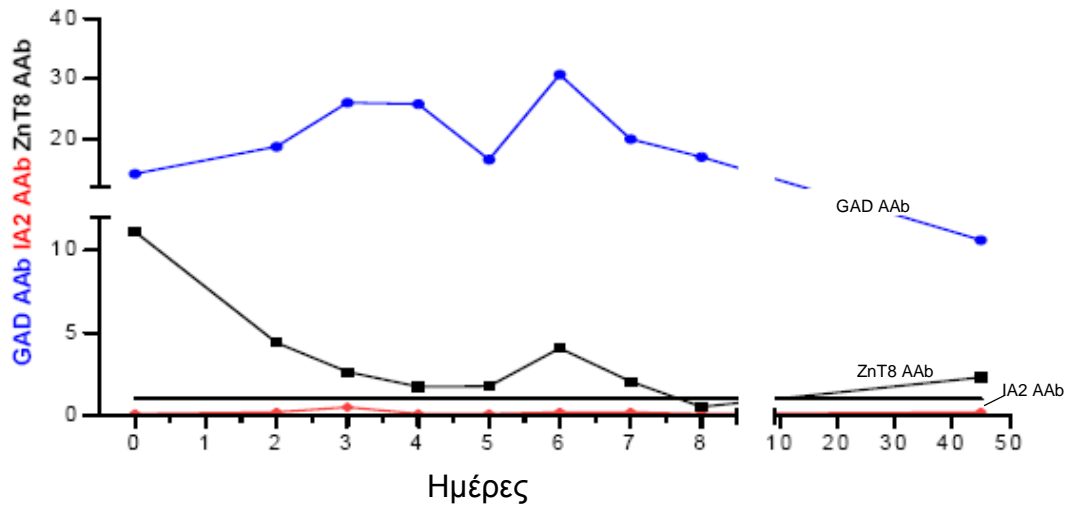
Η Ασθενής 2 είχε επίσης υπολειμματική έκκριση C-πεπτιδίου και β-κύτταρα στη βιοψία. Έλαβε daclizumab (1mg/kg, 2 δόσεις με μεσοδιάστημα 2 εβδομάδων) και θυμογκλομπουλίνη (1mg/kg/μέρα για 5 μέρες) και μια δόση rituximab (375mg/m<sup>2</sup>) μετά την πρώτη δόση θυμογκλομπουλίνης. Μετά την αγωγή διάσωσης τα IGRP-αυτοαντιδρώντα CD8-TΛΚ δεν ήταν ανιχνεύσιμα σε δυο διαφορετικές χρονικές στιγμές ενώ η ασθενής εμφάνιζε συνολικά έκπλυση ΤΛΚ. Οι αριθμοί των ΤΛΚ αποκαταστάθηκαν 6 μήνες μετά την αγωγή. Τα IGRP αυτοαντιδρώντα CD8-TΛΚ επανεμφανίστηκαν 1 χρόνο μετά την αγωγή διάσωσης. Τα επίπεδα νησιδιακών αυτοαντισωμάτων μειώθηκαν μετά την αγωγή αλλά αυξήθηκαν πάλι μετά την επανεμφάνιση IGRP αυτοαντιδρώντων CD8-TΛΚ. Τα επίπεδα C-πεπτιδίου διατηρήθηκαν μετά την αγωγή, μετά την επανεμφάνιση όμως IGRP αυτοαντιδρώντων CD8-TΛΚ και τη συνακόλουθη αύξηση των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων μειώθηκαν σταδιακά. Η ασθενής παρέμεινε ινσουλινοεξαρτώμενη καθόλη τη διάρκεια.

Ο Ασθενής 3 δεν είχε υπολειμματική έκκριση ινσουλίνης. Έλαβε λοιπόν δεύτερο παγκρεατικό μόσχευμα από δότη με γονότυπο HLA A1/A29, B8/B44, DR2/DR3. Κατά τη 2<sup>η</sup> μεταμόσχευση έγινε βιοψία του πρώτου παγκρεατικού μοσχεύματος που έδειξε εκτεταμένη απώλεια β-κυττάρων χωρίς σημεία απόρριψης. Η ανοσοκαταστολή που χορηγήθηκε για τη 2<sup>η</sup> μεταμόσχευση περιλάμβανε daclizumab (1mg/kg, 2 δόσεις με μεσοδιάστημα 2 εβδομάδων) και θυμογκλομπουλίνη (1mg/kg/μέρα για 5 μέρες), μια δόση rituximab (375mg/m<sup>2</sup>) και

πλασμαφαίρεση, μια συνεδρία προ της μεταμόσχευσης και τρεις συνεδρίες ανά δεύτερη μέρα μετά. Συνεχίστηκε η χορήγηση των tacrolimus, mycophenolate mofetil και των γλυκοκορτικοειδών σε δόσεις συντήρησης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3Α, τα νησιδιακά αυτοαντισώματα μειώνονταν πριν την επαναμεταμόσχευση και συνέχισαν να μειώνονται μετά από αυτή. Το διάγραμμα 10 δείχνει διαδοχικές μετρήσεις αυτοαντισωμάτων που έγιναν στη διάρκεια μιας περιόδου 8 ημερών ενός σχήματος πλασμαφαίρεσης που έγινε κατά τη 2<sup>η</sup> παγκρεατική μεταμόσχευση. Η πλασμαφαίρεση δεν επηρέασε τα επίπεδα των GAD αυτοαντισωμάτων αλλά τα αντισώματα ZnT8 μειώθηκαν.

Μετά την ανοσοκαταστολή που χορηγήθηκε για τη 2<sup>η</sup> μεταμόσχευση τα GAD αυτοαντιδρώντα CD4-TLK ήταν μη ανιχνεύσιμα. Το 2<sup>ο</sup> παγκρεατικό μόσχευμα αποκατέστησε την έκκριση ινσουλίνης και ο ασθενής επέστρεψε στην ευγλυκαιμία. Δεκαπέντε μήνες μετά τη 2<sup>η</sup> μεταμόσχευση εμφάνισε ένα επεισόδιο απόρριψης που επιβεβαιώθηκε με διαδερμική βιοψία και αντιμετωπίστηκε με γλυκοκορτικοειδή. Περίπου 1,5 χρόνο αργότερα ο ασθενής εμφάνισε υπεργλυκαιμία. Κατά τη βιοψία το 2<sup>ο</sup> παγκρεατικό μόσχευμα ήταν ένα ινώδες υπόλειμμα με στοιχεία οξείας και χρόνιας απόρριψης. Το εύρημα ήταν συμβατό και με την εύρεση αντισωμάτων έναντι των συγκεκριμένων HLA αντιγόνων του 2<sup>ου</sup> δότη. Μαζί με την απόρριψη παρατηρήθηκε και ενεργοποίηση των δεικτών αυτοανοσίας καθώς υπήρξε οξεία άνοδος των GAD και λιγότερο των ZnT8 αυτοαντισωμάτων. Τα GAD αυτοαντιδρώντα CD4-TLK επανεμφανίστηκαν και συνέχισαν να ανιχνεύονται σε πολλαπλά δείγματα αίματος. Επιπλέον, πανομοιότυπα αυτοαντιδρώντα TLK εντοπίστηκαν σε περιπαγκρεατικούς λεμφαδένες από το πρώτο παγκρεατικό μόσχευμα που ελήφθησαν κατά τη βιοψία

του 2<sup>ου</sup> παγκρεατικού μοσχεύματος. Ο ασθενής απώλεσε την έκκριση C-πεπτιδίου 3 χρόνια μετά τη 2<sup>η</sup> μεταμόσχευση και είναι πάλι ινσουλινοεξαρτώμενος.



**Διάγραμμα 10.** Διαδοχικές μετρήσεις αυτοαντισωμάτων που έγιναν στη διάρκεια 8 ημερών, στα πλαίσια ενός σχήματος πλασμαφαίρεσης που έγινε κατά τη 2<sup>η</sup> παγκρεατική μεταμόσχευση του Ασθενή 3.

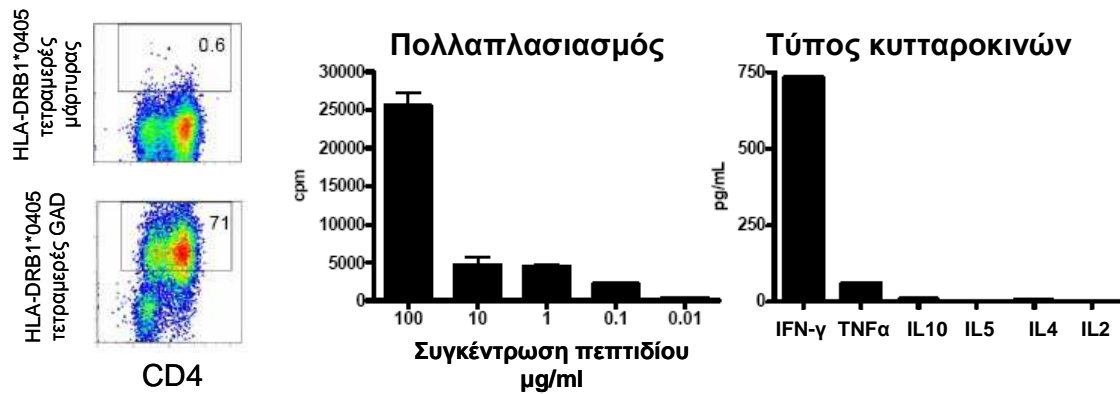
### 3.6 In vitro λειτουργική αξιολόγηση των αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ.

Διερευνήθηκε η λειτουργία κλώνων ΤΛΚ προερχομένων από αυτοαντιδρώντα CD4-ΤΛΚ που απομονώθηκαν από τους ασθενείς 1 και 3 σε διαφορετικά χρονικά σημεία της παρακολούθησης.

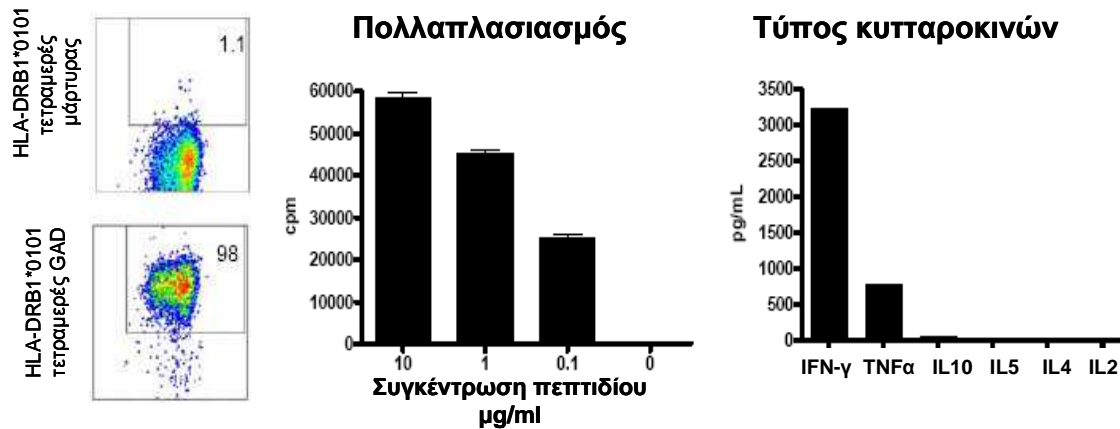
Ένας αντιπροσωπευτικός κλώνος του Ασθενή 1 φαίνεται στην Εικόνα 4 και του Ασθενή 3 στην Εικόνα 5. Ο κλώνος του ασθενή 1 προέρχεται από το δείγμα αίματος πλησιέστερο χρονικά στην εμφάνιση υπεργλυκαιμίας. Είχε ισχυρή χρώση με

τετραμερή GAD αλλά όχι με τα τετραμερή που έφεραν αντιγόνο-μάρτυρα. Αριστερά φαίνεται η συχνότητα CD(+) τετραμερές-GAD(+) κυττάρων. Στο κέντρο η ανταπόκριση του κλώνου με πολλαπλασιασμό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτιδίου GAD 555-567. Ο πολλαπλασιασμός υπολογίζεται με τις κρούσεις ανά λεπτό (cpm) από ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης τις τελευταίες 12 από 72 ώρες κυτταρικής καλλιέργειας. Οι κυτταροκίνες μετρήθηκαν σε υπερκείμενα που συλλέχτηκαν στις 48 ώρες (Cytometric Bead Array, BD Biosciences, San Jose, CA).

Ο κλώνος ΤΛΚ από τον ασθενή 3, προερχόταν από δείγμα αίματος που ελήφθη ένα χρόνο μετά την επανεμφάνιση υπεργλυκαιμίας, πριν τη δεύτερη μεταμόσχευση. Ο κλώνος είχε ισχυρή χρώση με τετραμερή GAD αλλά όχι με τα τετραμερή που έφεραν αντιγόνο-μάρτυρα. Αριστερά φαίνεται η συχνότητα CD(+) τετραμερές-GAD(+) κυττάρων. Στο κέντρο η ανταπόκριση του κλώνου με πολλαπλασιασμό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτιδίου GAD 555-567. Ο πολλαπλασιασμός υπολογίζεται με τις κρούσεις ανά λεπτό (cpm) από ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης τις τελευταίες 12 από 72 ώρες κυτταρικής καλλιέργειας. Οι κυτταροκίνες μετρήθηκαν σε υπερκείμενα που συλλέχτηκαν στις 48 ώρες. Ο κλώνος παράγαγε υψηλά επίπεδα IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  σε απάντηση στο πεπτίδιο GAD. Ο κλώνος αυτός εμφάνιζε επίσης χαρακτηριστικά Th1 κυττάρων (88).



**Εικόνα 4.** Χαρακτηριστικά κλώνου ΤΛΚ του Ασθενή 1. Ο κλώνος αυτός έδειξε συμπεριφορά Τ-βοηθητικών (Th1) λεμφοκυτάρων καθώς η κύρια κυτταροκίνη που παράγαγε ήταν ιντερφερόνη-γ (IFN-γ).



**Εικόνα 5.** Χαρακτηριστικά κλώνου ΤΛΚ του Ασθενή 3.



**3.7 Αναζήτηση νησιδιακών αυτοαντιγόνων σε δότες ΜΝΠ και συσχέτιση με την επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος.** Τέσσερις από τους 135 δότες με διαθέσιμα δείγματα ορού ήταν θετικοί για νησιδιακά αυτοαντισώματα: 3 δότες είχαν αντί-GAD και ένας αντισώματα ινσουλίνης (IAA). Κανένας δότης δεν είχε IA2 ή περισσότερα από ένα αυτοαντισώματα. Στους παρακάτω Πίνακες 2 και 3 παρουσιάζεται η ηλικιακή κατανομή και οι τύποι HLA-DR των δοτών. Επίσης παρουσιάζονται για τους δότες με ανιχνεύσιμα αυτοαντισώματα το είδος αυτών, η ηλικία, ο HLA-τύπος δοτών με νησιδιακά αυτοαντισώματα και των αντιστοιχών ληπτών καθώς και κλινική εξέλιξη των ληπτών αυτών. Δύο δότες με αντί-GAD ήταν ομόζυγοι για τα αλληλία HLA-DR3 ή DR4 που συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ1. Ο εναπομένον δότης με αντί-GAD έφερε το αλληλίο HLA-DR2 που θεωρείται προστατευτικό. Ο δότης με αντισώματα IAA έφερε HLA αλληλία που θεωρούνται ουδέτερα.

Η κλινική παρακολούθηση των αντιστοιχών ληπτών είχε μέση διάρκεια  $5,1 \pm 2,1$ (SD) έτη. Όλοι οι λήπτες που έλαβαν μόσχευμα από δότη οροθετικό για νησιδιακά αυτοαντισώματα ήταν ινσουλινοανεξάρτητοι μετά τη ΜΝΠ. Οι τρεις από τους τέσσερις λήπτες είχαν επαρκώς λειτουργούντα παγκρεατικά μοσχεύματα 3-5,8 έτη μετά τη ΜΝΠ. Ο λήπτης του μοσχεύματος από το δότη #1 είχε μια βιοψία του παγκρεατικού μοσχεύματος 3,2 έτη μετά τη μεταμόσχευση χωρίς σημεία απώλειας β-κυττάρων, νησιδίτιδος, ή άλλων παθολογικών ευρημάτων. Ο λήπτης αυτός είχε υψηλούς τίτλους αντί-GAD πριν τη μεταμόσχευση που παρέμειναν ουσιαστικά αμετάβλητοι κατά την παρακολούθηση μετά τη ΜΝΠ. Ο λήπτης του παγκρέατος από

το δότη #4 με IAA εμφάνισε χρόνια απόρριψη αφότου ο ίδιος διέκοψε την ανοσοκατασταλτική αγωγή 3,3 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση. Ο ασθενής έγινε ξανά ινσουλινοεξαρτώμενος παρότι διατήρησε υπολειμματική έκκριση C-πεπτιδίου μέχρι και 2,2 χρόνια μετά την έναρξη της χρόνιας απόρριψης. Η επίπτωση της έκπτωσης της λειτουργίας του παγκρεατικού μοσχεύματος δε διέφερε μεταξύ ληπτών μοσχευμάτων από δότες με θετικά ή αρνητικά νησιδιακά αυτοαντισώματα (1 στους 4 έναντι 12 στους 131,  $p=0.33$ ).

**Πίνακας 2. Ηλικιακή κατανομή και HLA-DR τύποι δοτών ΜΝΠ**

Ηλικία	n	μη-DR3,4	DR3	DR4	DR3/4
<10	= 6	1	3	2	0
10-19	= 41	23	10	7	1
20-29	= 35 (+1*)	21	6	7	1
30-39	= 38	22	4	12	0
40-49	= 11	6	2	2	1
≥50	= 3	1	1	1	0
Σύνολο	= 135	74 (55.2%)	26 (19.4%)	31 (23.1%)	3(2.2%)

Ο HLA τύπος δεν ήταν διαθέσιμος για έναν δότη.

\* αφορά το δότη για τον οποίο ο HLA τύπος δεν ήταν διαθέσιμος.

**Πίνακας 3. Παρουσία αυτοαντισωμάτων, ηλικία, HLA-τύπος δοτών με νησιδικά αυτοαντισώματα αντιστοιχών ληπτών καθώς και κλινική εξέλιξη των ληπτών**

	Δότες			Λήπτες					
	AAb	Ηλικία	HLA	Κλινική κατάσταση	Ηλικία (έτη)	HLA	GAD AAb	IA2 AAb	Παρακολούθηση (έτη)
#1	GAD	41	DR4/4	ΕΓ	48	DR3/4	+	+	4.4
#2	GAD	22	DR1/2	ΕΓ	38	DR3/4	-	-	3
#3	GAD	5	DR3/3	ΕΓ	39	DR3/7	+	+	5.8
#4	IAA	19	DR6/7	ΠΑ	19	DR1	+	-	6.8

ΕΓ: Ευγλυκαιμία

ΠΑ: Παγκρεατική απόρριψη.

AAb: Αυτοαντισώματα.

#### 4. Συζήτηση

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η υποτροπή του ΣΔ1 μπορεί να εμφανιστεί σε λήπτες ΜΝΠ που λαμβάνουν ανοσοκαταστολή, χωρίς σημεία απόρριψης. Με τη μελέτη αυτή καταδείχθηκαν τα κύρια χαρακτηριστικά υποτροπής του ΣΔ1:

- 1) Υπεργλυκαιμία χωρίς λειτουργική διαταραχή της εξωκρινούς μοίρας του παγκρεατικού μοσχεύματος ή του νεφρικού μοσχεύματος, με επιλεκτική απώλεια της έκκρισης ινσουλίνης.
- 2) Βιοψία με ευρήματα νησιδίτιδας και/ή απώλειας β-κυττάρων.
- 3) Παραμονή ή επανεμφάνιση νησιδιακών αυτοαντισωμάτων που προηγείται της υποτροπής του ΣΔ1.
- 4) Παρουσία στην περιφερική κυκλοφορία αυτοαντιδρώντων CD4 ή CD8 ΤΛΚ κατά τη χρονική περίοδο εμφάνισης υποτροπής του ΣΔ1 και μετά από αυτή.

Η εμφάνιση υποτροπής του ΣΔ1 σε ασθενείς με ιστορικό ΣΔ1 που υποβάλλονται σε ΜΝΠ θεωρήθηκε αρχικά σπάνιο συμβάν καθώς η ανοσοκαταστολή που λαμβάνουν οι ασθενείς αυτοί αναμένετο να προλαμβάνει και την επανενεργοποίηση της αυτοάνοσης διαδικασίας καταστροφής των β-κυττάρων (71-74). Μεταγενέστερες παθολογοανατομικές μελέτες παγκρεατικών μοσχευμάτων έδειξαν πιθανή υποτροπή της αυτοάνοσης με νησιδίτιδα και επιλεκτική απώλεια των β-κυττάρων (89). Στις πρώτες αυτές αναφορές περιλαμβάνονταν και περιπτώσεις μεταμόσχευσης μεταξύ αδελφών με πανομοιότυπο τύπο HLA που δεν είχαν λάβει πλήρη ανοσοκαταστολή (72) και έτσι οι ερευνητές αυτοί είχαν

διατυπώσει την άποψη ότι η ανοσοκαταστολή που προλαμβάνει την απόρριψη, προλαμβάνει επίσης και την υποτροπή του ΣΔ1. Μια μεταγενέστερη αναφορά περιέγραψε 2 ασθενείς με ευρήματα συμβατά με υποτροπή του ΣΔ1 ανάμεσα σε 20 λήπτες που εμφάνισαν υπεργλυκαιμία μετά τη μεταμόσχευση. Στον ένα από τους 2 ασθενείς διαπιστώθηκαν αυξημένοι τίτλοι GAD και ICA αυτοαντισωμάτων κατά τη διάγνωση της υπεργλυκαιμίας, χωρίς να υπάρχουν άλλες μετρήσεις μετά τη μεταμόσχευση (78).

Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει τη μεγαλύτερη σειρά ασθενών με ιστορικό ΣΔ1 που υποβλήθηκαν σε ΜΝΠ, με καταγραφή νησιδιακών αυτοαντισωμάτων σε βάθος χρόνου και αναδεικνύει την υποτροπή του ΣΔ1 ως σημαντικού αίτιου επανεμφάνισης υπεργλυκαιμίας. Το 35% των ασθενών ΜΝΠ που εμφάνισαν υπεργλυκαιμία είχαν χαρακτηριστικά υποτροπής ΣΔ1. Επρόκειτο δηλαδή για το δεύτερο συχνότερο αίτιο υπεργλυκαιμίας μετά την απόρριψη (45%). Επιπλέον παρέχει τη μεγαλύτερη βάση δεδομένων παρακολούθησης νησιδιακών αυτοαντισωμάτων σε βάθος χρόνου μετά τη ΜΝΠ και καταδεικνύει ότι η ορομετατροπή συσχετίζεται τόσο με την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας συνολικά, όσο και την υποτροπή του ΣΔ1 στους ασθενείς αυτούς. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν 44 ορομετατροπείς (17%). Το δεδομένο αυτό υποστηρίζει την ανάγκη παρακολούθησης των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ΜΝΠ, κάτι που μέχρι σήμερα δεν έχει καθιερωθεί ως συνήθης πρακτική. Αυτή η παρακολούθηση ίσως επιτρέψει τον πρώιμο εντοπισμό του κινδύνου υποτροπής του ΣΔ1 και την παρέμβαση σε πρωιμότερο στάδιο.

Σε μια προηγούμενη εργασία μελετήθηκαν 50 ασθενείς με ΜΝΠ με μετρήσεις GAD και ICA κάθε 1-2 χρόνια και μέση παρακολούθηση 4 χρόνια. Καθότι τα αυτοαντισώματα των ασθενών αυτών δεν παρακολουθούνταν συχνά, η διάκριση μεταξύ επίμονης οροθετικότητας και ορομετατροπής δεν ήταν δυνατή. Το 22% των ασθενών είχαν θετικά αυτοαντισώματα μετά τη ΜΝΠ. Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στο μεταβολικό έλεγχο μεταξύ οροθετικών και οροαρνητικών ασθενών (75). Σε μια άλλη μελέτη ΜΝΠ ασθενών εξετάστηκαν τα επίπεδα GAD και IA2 κατά τη ΜΝΠ και κατά την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας ή στον ίδιο περίπου χρόνο μετά τη ΜΝΠ σε ασθενείς χωρίς ΥΓ. Οι ασθενείς με ΥΓ είχαν υψηλότερα επίπεδα αυτοαντισωμάτων (78). Παρόμοια ευρήματα έχουν περιγραφεί και σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νησιδίων (90). Σε μια άλλη μελέτη αναφέρεται ότι οι 5 από τους 75 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ΜΝΠ, εμφάνισαν σημαντική αύξηση των επιπέδων αυτοαντισωμάτων, και οι 4 από τους 5 αυτούς χρειάστηκε να επιστρέψουν στην εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης (91).

Στις παραπάνω αναφορές δεν υπάρχουν στοιχεία από βιοψίες ή αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ που να περιγράφουν διεξοδικότερα την κλινική υποτροπή ΣΔ1. Στους ασθενείς 1 και 2 που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη, η εμφάνιση αυτοαντισωμάτων προηγείτο της υπεργλυκαιμίας για σημαντικό χρονικό διάστημα (πάνω από 3 χρόνια), κάτι που υποδεικνύει ότι η κλινική πορεία της υποτροπής της αυτοανοσίας είναι βραδύτερη σε ασθενείς που λαμβάνουν ανοσοκαταστολή από αυτή που παρατηρείται σε μεταμοσχεύσεις από ζώντες συγγενείς δότες με ταυτόσημα αντιγόνα HLA στις οποίες δε χορηγείται ανοσοκαταστολή (71-73). Παρόμοια βραδύτερη πορεία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς έχει περιγραφεί στη

βιβλιογραφία (73,78). Στον ασθενή 3 ωστόσο η ορομετατροπή ήταν πιο αιφνίδια και ακολουθήθηκε από εμφάνιση υπεργλυκαιμίας εντός μηνών. Συνολικά, σε όλους τους ορομετατροπείς με υποτροπή ΣΔ1, η ορομετατροπή προηγείτο κατά  $15\pm 7,2$  μήνες.

Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι ο συχνός έλεγχος των επιπέδων αυτοαντισωμάτων κατέστησε δυνατές τις παρατηρήσεις αυτές. Συνολικά στους περιγραφέντες ασθενείς οι αυξομειώσεις των τίτλων των νησιδιακών αυτοαντισωμάτων ανταποκρίνονταν στην κλινική πορεία. Η συχνότητα εμφάνισης υποτροπής του ΣΔ1 είναι παρόμοια με εκείνη προηγούμενων αναφορών στις οποίες η παρουσία αυτοαντισωμάτων συσχετιζόταν με έκπτωση της λειτουργίας του παγκρεατικού μοσχεύματος (91). Με βελτιστοποίηση της παρακολούθησης, η υποτροπή του ΣΔ1 μπορεί να αποδειχθεί συχνότερη απ'ό,τι θεωρείτο, αν ληφθούν υπόψιν η πρόοδος που παρατηρείται στην αποφυγή χρόνιας απόρριψης και η βελτιωμένη επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος που επιτυγχάνονται στους ασθενείς αυτούς τα τελευταία χρόνια.

Ο ρόλος των αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ στην παθογένεση του ΣΔ1 φαίνεται από την επίδραση της ανοσοκατασταλτικής αγωγής στην καθυστέρηση εμφάνισης της νόσου σε προδιαβητικούς ασθενείς (92) και τη μετάδοση του ΣΔ1 σε λήπτη μυελού των οστών από δότη με ΣΔ1 (93). Επιπλέον, ΤΛΚ από ποντίκια NOD μεταδίδουν τη νόσο σε υγιή ποντίκια και αμφότερα CD4 και CD8 ΤΛΚ απαιτούνται γι'αυτό (94). Τα IGRP αντιδρώντα CD8 ΤΛΚ, όπως επίσης και τα GAD αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ αντιδρούν με το ίδιο επιτόπιο που έχει περιγραφεί σε ασθενείς με πρωτοεμφανιζόμενο ΣΔ1 και προδιαβητικούς ασθενείς (95,96). Η ύπαρξη αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ έχει συσχετιστεί με την υποτροπή της αυτοάνοσης

καταστροφής των β-κυττάρων σε ασθενείς με ιστορικό ΣΔ1 που λαμβάνουν μεταμόσχευση νησιδιακών κυττάρων (41). Αυτοαντιδρώντα ΤΛΚ ανιχνεύονται επίσης σε ασθενείς με ΣΔ1 και προδιαβητικούς ασθενείς, συχνά προηγούνται μήνες ή και χρόνια της εμφάνισης του ΣΔ1 και μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως και τα αυτοαντισώματα ως προγνωστικοί δείκτες (97,98).

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε η παρουσία αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ σε ασθενείς με υποτροπή του ΣΔ1. Δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία άλλη αναφορά σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΜΝΠ και εμφανίζουν υποτροπή του ΣΔ1, η οποία να συνδυάζει δεδομένα από την ταυτόχρονη παρακολούθηση αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ, νησιδιακών αυτοαντιγόνων και ευρήματα από βιοψίες παγκρεατικών μοσχευμάτων. Η παρακολούθηση των αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς μπορεί να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες ΥΣΔ1 αλλά και στόχο ανοσοτροποποιητικής παρέμβασης στο μέλλον. Η απόπειρα αντιμετώπισης της ΥΣΔ1 στους ασθενείς 1 και 2 με επιπλέον ανοσοκατασταλτικά έγινε δοκιμάζοντας διαδοχικά περισσότερο εξειδικευμένες θεραπείες που στόχευαν τα Τ-λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα και αυτοαντισώματα (θυμογλοβουλίνη, daclizumab, rituximab και πλασμαφαίρεση). Η αγωγή προκάλεσε γενικευμένη ελάττωση των ΤΛΚ, περιλαμβανομένων των αυτοαντιδρώντων. Η επανεμφάνιση των αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ ένα χρόνο αργότερα συνοδεύτηκε από προοδευτική μείωση του C-πεπτιδίου και παράλληλη αύξηση των τίτλων των αυτοαντισωμάτων.

Παρότι ο αριθμός των ασθενών είναι περιορισμένος, τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα κλινικών μελετών ασθενών με πρωτοεμφανιζόμενο ΣΔ1 στους οποίους η χορήγηση ανοσοκαταστολής έχει ως αποτέλεσμα την



παροδική διατήρηση της έκκρισης του C-πεπτιδίου που ακολουθείται από προοδευτική πτώση (53). Επίσης οι παρατηρήσεις αυτές παρέχουν δεδομένα για την συμπεριφορά των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων και των αυτοαντιδρώντων ΤΛΚ σε σχέση με τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής όπως η θυμογλοβουλίνη και το rituximab, ανοσοκασταλικά που χρησιμοποιούνται σε κλινικές μελέτες νεοεμφανιζόμενου ΣΔ1 που βρίσκονται σε εξέλιξη (54). Οι παρατηρήσεις στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΜΝΠ υποδηλώνουν ότι η μη ειδική ανοσοκαταστολή ίσως δεν επιφέρει τη μακροχρόνια αναστολή της αυτοάνοσης καταστροφής των νησιδίων. Μελλοντικό στόχο ίσως αποτελέσει η επανεγκατάσταση ανοσολογικής ανοχής μετά την αρχική γενικευμένη καταστολή.

Όσον αφορά τη συσχέτιση του γονοτύπου HLA DR3/4 με την ορομετατροπή και την επανεμφάνιση υπεργλυκαιμίας, το εύρημα αυτό δείχνει ότι η ομάδα αυτή ληπτών ενδείκνυται να παρακολουθείται περισσότερο εντατικά ή να λαμβάνει εντατικότερη ανοσοκαταστολή. Το εύρημα αυτό ίσως εξηγεί μερικώς και την παρατήρηση προηγούμενων μελετών ότι η ταύτιση περισσότερων HLA αντιγόνων μεταξύ δότη και λήπτη δεν αυξάνει την επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος (63,66). Η παρατήρηση αυτή είχε αρχικά αποδοθεί στην απώλεια χρόνου που απαιτείται για τον έλεγχο της συμβατότητας που μείωνε τη βιωσιμότητα του μοσχεύματος, ίσως όμως η επίτευξη υψηλότερου βαθμού συμβατότητας να προδιαθέτει το μόσχευμα σε αυτοάνοση αναγνώριση και καταστροφή από το ανοσολογικό σύστημα του λήπτη. Στην παρούσα μελέτη υπήρχε χαμηλός ή μέτριος βαθμός συμβατότητας για τους περισσότερους λήπτες.

Αν και η ένταξη των ασθενών στη μεταμοσχευτική λίστα προϋποθέτει αυτοί να πάσχουν από ΣΔ1, για τους ασθενείς που ήταν οροαρνητικοί για νησιδιακά αυτοαντισώματα αμέσως πριν τη ΜΝΠ, δεν υπήρχε προηγούμενη τεκμηρίωση της διάγνωσης του αυτοάνοσου ΣΔ1, δεν υπήρχαν δηλαδή διαθέσιμες μετρήσεις νησιδιακών αυτοαντισωμάτων κατά το χρόνο της αρχικής διάγνωσης. Αυτό σημαίνει ότι ένα μικρό ποσοστό ασθενών με ΜΝΠ ενδέχεται να μην έπασχαν από αυτοάνοσο ΣΔ1, γεγονός πάντως που σημαίνει ότι η στατιστική σημαντικότητα των ευρημάτων της παρούσας μελέτης ίσως ήταν μεγαλύτερη αν μπορούσαν να εξαιρεθούν οι ασθενείς αυτοί.

Ένας άλλος περιορισμός της παρούσας μελέτης ήταν το γεγονός ότι με την πρόοδο της φαρμακολογίας την τελευταία 15ετία, η ανοσοκατασταλτική αγωγή που λάμβαναν οι ασθενείς αυτοί δεν ήταν η ίδια τόσο ανάμεσα σε διαφορετικούς ασθενείς όσο και για τον ίδιο ασθενή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Το κατά πόσο οι διαφορές ή οι αλλαγές αυτές επηρέασαν την εκδήλωση υποτροπής του ΣΔ1 δεν κατέστη δυνατό να μελετηθεί, ενώ ένας ακόμα αστάθμητος παράγοντας ήταν η συμμόρφωση στην αγωγή. Σε κάθε περίπτωση πάντως τα ανοσοκατασταλτικά που χορηγήθηκαν ήταν τα ευρέως αποδεκτά και χορηγούμενα για την αντίστοιχη χρονική περίοδο.

Τέλος, σε κάποιους ασθενείς με παγκρεατική απόρριψη ή ΣΔ2 η επανενεργοποίηση της αυτοανοσίας ίσως να συνέβαλλε στην ταχύτερη έκπτωση της ενδοκρινούς λειτουργίας του μοσχεύματος. Η ταυτόχρονη ύπαρξη περισσότερων από μιας αιτιών εμφάνισης υπεργλυκαιμίας στους ασθενείς αυτούς δεν ήταν δυνατό να ελεγχθεί. Επιπλέον, η χορήγηση ανοσοκαταστολής πιθανόν να μεταβάλλει την

κλινική πορεία της υποτροπής του ΣΔ1 και κάποιοι ασθενείς με υπεργλυκαιμία που ταξινομήθηκαν ως ασθενείς με ΣΔ2 να εμφάνισαν υπεργλυκαιμία λόγω ήπιας αυτοάνοσης βλάβης των νησιδίων. Η αδυναμία ελέγχου των ΑΑΤΛΚ σε όλους τους ασθενείς ΜΝΠ, δεν επιτρέπει την τεκμηρίωση της χρησιμότητας των ΑΑΤΛΚ για την πρόβλεψη της υποτροπής του ΣΔ1.

Αναφορικά με την αναζήτηση νησιδιακών αυτοαντιγόνων σε δότες ΜΝΠ και τη συσχέτισή τους με την επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος, υπάρχει ενδιαφέρον για την εφαρμογή γενικευμένου ελέγχου - screening - για την ανεύρεση νησιδιακών αυτοαντισωμάτων στον ορό δοτών παγκρεατικών μοσχευμάτων, προκειμένου να ανιχνεύονται δότες σε προδιαβητικό στάδιο των οποίων τα παγκρεατικά μοσχεύματα δεν είναι κατάλληλα για μεταμόσχευση αλλά μπορούν να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για τη διερεύνηση του αυτοάνοσου μηχανισμού του ΣΔ1 στον άνθρωπο. Το Ίδρυμα Έρευνας Νεανικού Διαβήτη (Juvenile Research Foundation – JDRF) υποστηρίζει την εφαρμογή ευρείας κλίμακας ελέγχου screening για τον εντοπισμό δοτών θετικών έναντι νησιδιακών αυτοαντισωμάτων των οποίων τα μοσχεύματα θα διοχετευθούν στην έρευνα (98). Πρόσφατη μελέτη δοτών παγκρεατικών μοσχευμάτων ηλικίας 25-60 ετών έδειξε ότι η παρουσία ενός νησιδιακού αυτοαντισώματος δεν συσχετίζεται συνήθως με την παρουσία νησιδίτιδος και απώλειας β-κυττάρων (100). Η ανάλυση έγινε σε τεμάχια βιοψίας όγκου  $\sim 0,5\text{cm}^3$  παγκρεατικών μοσχευμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση νησιδιακών κυττάρων. Νησιδίτις βρέθηκε σε δύο μόνο δότες που ήταν οροθετικοί για 3 νησιδιακά αυτοαντισώματα και όχι σε 59 δότες που ήταν θετικοί για 1 ή 2 αυτοαντισώματα.

Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν τέσσερις δότες θετικοί σε ένα μόνο νησιδιακό αυτοαντίσωμα, συχνότητα ανάλογη με αυτή που έχει περιγραφεί σε δότες οργάνων και στο γενικό πληθυσμό (101,102). Τα στοιχεία που παρουσιάζονται εδώ περιλαμβάνουν άτομα μικρότερης ηλικίας από προηγούμενες μελέτες: το 55% των δοτών είχαν ηλικία < 25 ετών, ηλικιακή ομάδα με μεγαλύτερη επίπτωση ΣΔ1. Σε αυτή την ηλικιακή ομάδα πράγματι ανευρέθησαν 3 από τους 4 δότες που ήταν θετικοί σε νησιδιακά αυτοαντισώματα. Η παρούσα ανάλυση είναι μοναδική καθώς παρέχει πληροφορίες για την επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος από δότες οροθετικούς για ένα νησιδιακό αυτοαντίσωμα. Όλοι οι λήπτες έγιναν ινσουλινοανεξάρτητοι μετά τη μεταμόσχευση. Σε έναν ασθενή που ήταν ευγλυκαιμικός, η βιοψία που έγινε 3 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση δεν έδειξε σημεία νησιδιακής βλάβης. Στο λήπτη του μοσχεύματος από δότη με αντισώματα ΙΑΑ εμφανίστηκε έκπτωση της λειτουργίας του παγκρεατικού μοσχεύματος λόγω μη συμμόρφωσης στα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και χρόνιας απόρριψης.

Τα παρόντα στοιχεία είναι σε συμφωνία με παθολογοανατομικά δεδομένα προηγούμενων μελετών που δείχνουν ότι η παρουσία ενός νησιδιακού αυτοαντισώματος στο δότη δε σχετίζεται με σημαντική αυτοάνοση καταστροφή β-κυττάρων (100). Τα δεδομένα παρακολούθησης της λειτουργίας του παγκρεατικού μοσχεύματος από δότες με θετικά νησιδιακά αυτοαντισώματα είναι μοναδικά στη βιβλιογραφία. Είναι επίσης σε συμφωνία με στοιχεία του γενικού πληθυσμού που δείχνουν ότι η παρουσία ενός μόνο αυτοαντισώματος συσχετίζεται με χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ1.

Ως προς την κλινική σημασία των ευρημάτων αυτών για την παγκρεατική μεταμόσχευση, τα παρόντα στοιχεία δείχνουν ότι η παρουσία ενός νησιδιακού αυτοαντισώματος στο δότη δε φαίνεται να επηρεάζει την επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος και αυτό το εύρημα ίσως συμβάλλει στον καθορισμό της στρατηγικής του ελέγχου screening των δοτών. Η περιορισμένη διαθεσιμότητα ανθρωπίνου παγκρέατος με εξελισσόμενη αυτοάνοση καταστροφή παραμένει μείζον εμπόδιο στην προσπάθεια διερεύνησης του ΣΔ1 στον άνθρωπο.

### III. Περίληψη

Η υποτροπή Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1) μετά ταυτόχρονη μεταμόσχευση νεφρών-παγκρέατος (ΜΝΠ) σε ασθενείς που λαμβάνουν ανοσοκαταστολή θεωρείται τόσο σπάνια ώστε δείκτες νησιδιακής αυτοανοσίας δεν παρακολουθούνται στην κλινική πράξη και η υποτροπή του ΣΔ1 μετά ΜΝΠ δεν έχει περιγραφεί επαρκώς. Η παρούσα μελέτη περιγράφει την παρακολούθηση δεικτών αυτοανοσίας (αυτοαντισωμάτων και αυτοαντιδρώντων Τ-λεμφοκυττάρων) και τα κύρια χαρακτηριστικά υποτροπής του ΣΔ1 σε ασθενείς ΜΝΠ.

Οκτώ από τους 14 (57%) ασθενείς με υπεργλυκαιμία και ευρήματα συμβατά με υποτροπή του ΣΔ1 εμφάνισαν ορομετατροπή για νησιδιακά αυτοαντισώματα. Το ποσοστό ορομετατροπής ήταν σημαντικά μεγαλύτερο συγκριτικά με ασθενείς που παρέμειναν ευγλυκαιμικοί (14% έναντι 57%,  $p=0,0002$ ,  $OR=5,6$ ). Η ορομετατροπή και η υποτροπή του ΣΔ1 ήταν συχνότερη μεταξύ ασθενών με γονότυπο HLA-DR3/4 συγκριτικά με ασθενείς χωρίς το γονότυπο αυτό (47% έναντι 22%,  $p=0,01$  και 11% έναντι 3,6%,  $p=0,02$  αντίστοιχα). Η οροθετικότητα για ένα νησιδιακό αυτοαντίσωμα του δότη δεν φαίνεται να επηρεάζει την επιβίωση του παγκρεατικού μοσχεύματος.

Η χορήγηση ανοσοκατασταλτικών έναντι της Β- και Τ-ανοσίας σε ασθενείς ΜΝΠ με υποτροπή του ΣΔ1, οδήγησε σε γενικευμένη ανοσοκαταστολή και διατήρηση του C-πεπτιδίου για περισσότερο από ένα χρόνο. Εν συνεχεία όμως η επανεμφάνιση αυτοαντιδρώντων Τ-λεμφοκυττάρων συνοδεύτηκε από εξαφάνιση του C-πεπτιδίου στα επόμενα 2 χρόνια. Η παρακολούθηση των δεικτών αυτοανοσίας μπορεί να ανιχνεύσει νωρίς τους ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής του ΣΔ1, γεγονός

που ίσως επιτρέψει την τροποποίηση της ανοκατασταλτικής αγωγής ώστε να προληφθεί η υποτροπή αυτή.

## IV. Summary

Type 1 diabetes (T1D) recurrence (T1DR) following simultaneous pancreas-kidney transplantation (SPK) in recipients under immunosuppression is considered so rare that islet autoimmunity is not routinely assessed and T1DR remains incompletely characterized. The present study describes the cardinal features of T1DR with clinical, laboratory and transplant biopsy data. Immunological assessment included extensive testing for autoantibodies and autoantigen-specific T cells.

Eight of 14 patients (57%) who developed hyperglycemia with T1DR characteristics were converters for islet autoantibodies. The seroconversion frequency was significantly higher than for euglycemic patients (14% vs. 57%,  $p=0,0002$ ,  $OR=5,6$ ). The frequency of seroconversion and T1DR was significantly higher among HLA-DR3/4 patients compared to non-DR3/4 patients (47% vs. 22%,  $p=0,01$  and 11% vs. 3,6%,  $p=0,02$  respectively). Single islet autoantibody positivity in SPK donors did not appear to affect transplant outcome.

Treatment with T cell and B cell directed therapy to attenuate autoimmunity non-specifically depleted T cells and was associated with C-peptide secretion for over one year. The reappearance of autoreactive T cells was followed by progressive C-peptide loss over the next two years. Follow-up of islet autoimmunity markers in SPK patients may allow early detection and treatment of patients at risk of T1DR.



## **Βιβλιογραφία.**

1. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986;314:1360-1368.
2. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2009. *Diabetes Care* 2009;32:S13-S61.
3. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. *Pediatr Clin North Am* 2005;52:1553-1578.
4. Gale EA. Latent autoimmune diabetes in adults: a guide for the perplexed. *Diabetologia* 2005; 48:2195-2199.
5. Gungor N, Hannon T, Libman I, et al. Type 2 diabetes mellitus in youth: the complete picture to date. *Pediatr Clin North Am* 2005;52:1579-1609.
6. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:200-213.
7. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2009;32:S62-S67.
8. Burdick JS, Tompson ML. Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental Anomalies of the Pancreas. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt L, editors. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease : pathophysiology, diagnosis, management*. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p.1174-1181.

9. Buse JB, Polonsky KS, Larsen PR. Type 2 Diabetes Mellitus. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, editors. Williams Textbook of Endocrinology. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p.554-556.
10. Inzucchi SE, Sherwin RS. Type 1 Diabetes Mellitus. In: Goldman L, Ausiello D, editors. Cecil Medicine. 23<sup>rd</sup> ed. Saunders Elsevier; 2007. p.443-448.
11. Tarasov A, Dusonchet J, Ashcroft F. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel: a pas de deux. Diabetes 2004;53:S113 S122.
12. Thorens B. GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection. Mol Membr Biol 2001;18:265-273.
13. Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, et al. Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. J Clin Invest 1993;92:2092-2098.
14. González-Sánchez JL, Serrano-Ríos M. Molecular basis of insulin action. Drug News Perspect 2007;20:527-531.
15. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 2001;414:799-806.
16. Slink M. Childhood diabetes: a global perspective. Horm Res 2002;57:1-5.
17. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, et al. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes Care 2000;23:1516-1526.
18. cdc.gov [Webpage, Internet]. Atlanta: National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion; 2008: [www.cdc.gov/diabetes/projects/cda2.htm](http://www.cdc.gov/diabetes/projects/cda2.htm)

19. Writing Group for the SEARCH for Diabetes in Youth Study Group, Dabelea D, Bell RA, et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *JAMA* 2007;297:2716-2724.
20. Plotnick LP, Klingensmith GJ, Silverstein JH. Diabetes mellitus. In: Kappy MS, Allen DB, Geffner ME, editors. *Principles and Practice of Pediatric Endocrinology*. Springfield, Illinois: Thomas C; 2005. p. 635.
21. Hogan P, Dall T, Nikolov P. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care* 2003;26:917-932.
22. Tillil H, Kobberling J. Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 1987;36:93-99.
23. Pugliese A. Genetics of type 1A diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004;33:1-16.
24. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* 2008;40:1399-1401.
25. Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:69-89.
26. Elliott RB, Martin JM. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 1984;26:297-299.
27. Karjalainen J, Martin JM, Knip M, et al. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1992;327:302-307.
28. Wright AL. The rise of breastfeeding in the United States. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:1-12.

29. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 2003;290:1713-1720
30. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, et al. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 2003;290:1721-1728.
31. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, et al. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth cohort study. *Lancet* 2001;358:1500-1503.
32. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347:911-920.
33. Champsaur HF, Bottazzo GF, Bertrams J, et al. Virologic, immunologic, and genetic factors in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr* 1982;100:15-20.
34. Menser MA, Forrest JM, Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* 1978;1:57-60.
35. Dahlquist GG, Ivarsson S, Lindberg B, et al. Maternal enteroviral infection during pregnancy as a risk factor for childhood IDDM: a population-based case-control study. *Diabetes* 1995;44:408-413.
36. Viskari HR, Koskela P, Lonnrot M, et al. Can enterovirus infections explain the increasing incidence of type 1 diabetes? *Diabetes Care* 2000;23:414-416.
37. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996;85:291-297.
38. Chatila TA. Regulatory T cells: key players in tolerance and autoimmunity.

- Endocrinol Metab Clin North Am 2009;38:265-272.
39. van der Vliet HJ, Nieuwenhuis EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. Clin Dev Immunol 2007;89017:1-5.
40. Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. Ann N Y Acad Sci 2001;928:200-211.
41. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. Diabetologia 2003;46:305-321.
42. Tree T, Peakman M. Autoreactive T cells in human type 1 diabetes. Endocrinol Metab Clin N Am 2004;33:113-133.
43. Schmidt KD, Valeri C, Leslie RDG. Autoantibodies in Type 1 diabetes. Clin Chim Acta 2005;354:35-40.
44. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. Nature 2005;435:220-223.
45. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, et al. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. J Clin Invest 1995;95:628-634.
46. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:17040-17045.
47. Reijonen H, Novak EJ, Kochik S, et al. Detection of GAD65-specific T-cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type 1 diabetic patients and at-risk subjects. Diabetes 2002;51:1375-1382.

48. Panina-Bordignon P, Lang R, van Endert PM, et al. Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 1995;181:1923-1927.
49. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-986.
50. Grey M, Whittemore R, Tamborlane W. Depression in type 1 diabetes in children: natural history and correlates. *J Psychosom Res.* 2002;53:907-911.
51. Julius MC, Schatz DA, Silverstein JH. The prevention of type I diabetes mellitus. *Pediatr Ann* 1999;28:585-588.
52. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, et al. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:123-127.
53. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005;352:2598-2608.
54. diabetes.niddk.nih.gov [Webpage, Internet]. Bethesda, Maryland: National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC); 2008: <http://diabetes.niddk.nih.gov/statistics/index.htm>
55. Hu CY, Rodriguez-Pinto D, Du W, et al. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3857-3867.

56. Liu C, Noorchashm H, Sutter JA, et al. B lymphocyte-directed immunotherapy promotes long-term islet allograft survival in nonhuman primates. *Nat Med* 2007;13:1295-1298.
57. Gale EA, Bingley PJ, Emmett CL, et al. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet* 2004;363:925-931.
58. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care* 2005;28:1068-1076.
59. Ludvigsson J, Faresjo M, Hjorth M, et al. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2008;359:1909-1920.
60. Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2009;301:1573-1579.
61. Fiorina P, Secchi A. Pancreatic Islet Cell Transplant for Treatment of Diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2007;36:999-1013.
62. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006;355:1318-1330.
63. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant* 2005;19:433-455.

64. Tyden G, Bolinder J, Solders G, et al. Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. *Transplantation* 1999;67:645-648.
65. Lipshutz G, Wilkinson A. Pancreas-Kidney and Pancreas Transplantation for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2007;36:1015-1038.
66. Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, et al. Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg* 2001;233:463-501.
67. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002;73:1373-1381.
68. Pietra BA. Transplantation immunology 2003: simplified approach. *Pediatr Clin N Am* 2003;50:1233-1259.
69. Malaise J, Berney T, Morel P, et al. EUROSPK Study Group. Effect of HLA matching in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:2846-2857.
70. Burke GW, Ciancio G, Sollinger HW. Advances in pancreas transplantation. *Transplantation* 2004;77:S62-S67.
71. Sutherland DE, Sibley RK, Xu XZ, et al. Twin-to-twin pancreas transplantation: reversal and reenactment of the pathogenesis of type I diabetes. *Trans Assoc Am Physicians* 1984;97:80-87.



72. Sibley RK, Sutherland DE, Goetz F, et al. Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab Invest* 1985;53:132-144.
73. Santamaria P, Nakhleh RE, Sutherland DE, et al. Characterization of T lymphocytes infiltrating human pancreas allograft affected by isletitis and recurrent diabetes. *Diabetes* 1992;41:53-61.
74. Bosi E, Bottazzo GF, Secchi A, et al. Islet cell autoimmunity in type I diabetic patients after HLA-mismatched pancreas transplantation. *Diabetes* 1989; 38:S82-S84.
75. Esmatjes E, Rodriguez-Villar C, Ricart MJ, et al. Recurrence of immunological markers for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in immunosuppressed patients after pancreas transplantation. *Transplantation* 1998;66:128-131.
76. Petruzzo P, Andreelli F, McGregor B, et al. Evidence of recurrent type I diabetes following HLA-mismatched pancreas transplantation. *Diabetes Metab* 2000;26:215-218.
77. Thivolet C, Abou-Amara S, Martin X, et al. Serological markers of recurrent beta cell destruction in diabetic patients undergoing pancreatic transplantation. *Transplantation* 2000;69:99-103.
78. Tyden G, Reinholt FP, Sundkvist G, et al. Recurrence of autoimmune diabetes mellitus in recipients of cadaveric pancreatic grafts. *N Engl J Med* 1996;335:860-863.

79. Rijkeljkhuizen JM, Girman CJ, Mari A, et al. Classical and model-based estimates of beta-cell function during a mixed meal vs. an OGTT in a population-based cohort. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;83:280-288.
80. Baidal DA, Faradji RN, Messinger S, et al. Early metabolic markers of islet allograft dysfunction. *Transplantation* 2009;87:689-697.
81. Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW. Diabetes antibody standardization program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes* 2003;52:1128-1136.
82. Törn C, Mueller PW, Schlosser M, et al. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 2008;51:846-852.
83. Mishra MN, Mani N, Narula AS, et al. HLA Typing – A Comparison of Serology and DNA Techniques. *Int J Hum Genet* 2004;4:151-153.
84. Invitrogen.com [Webpage, Internet]. Carlsbad, CA: Invitrogen Corporation; 2009: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Clinical-and-Diagnostic-Applications/Transplant-Diagnostics/TD-Misc/Serology.html>
85. Malaise J, Secchi A, Caldara R, et al. Metabolic assessment after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:2851-2852.
86. Reijonen H, Mallone R, Heninger AK, et al. GAD65-specific CD4+ T-cells with high antigen avidity are prevalent in peripheral blood of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53:1987-1994.
87. Maus MV, Riley JL, Kwok WW, et al. HLA tetramer-based artificial antigen-presenting cells for stimulation of CD4(+) T cells. *Clin Immunol* 2003;106:16-22.

88. Street NE, Schumacher JH, Fong TA, et al. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 1990;144:1629-1639.
89. Sibley RK, and Sutherland DE. Pancreas transplantation. An immunohistologic and histopathologic examination of 100 grafts. *Am J Pathol* 1987;128:151-170.
90. Jaeger C, Hering BJ, Hatzigelaki E, et al. Glutamic acid decarboxylase antibodies are more frequent than islet cell antibodies in islet transplanted IDDM patients and persist or occur despite immunosuppression. *J Mol Med* 1999;77:45-48.
91. Braghi S, Bonifacio E, Secchi A, et al. Modulation of humoral islet autoimmunity by pancreas allotransplantation influences allograft outcome in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2000;49:218-224.
92. Bougneres PF, Carel JC, Castano L, et al. Factors associated with early remission of type I diabetes in children treated with cyclosporine. *N Engl J Med* 1988;318:663-670.
93. Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, et al. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 1993;341:1243-1244.
94. Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 1986;35:855-860.
95. Standifer NE, Ouyang Q, Panagiotopoulos C, et al. Identification of Novel HLA-A\*0201-restricted epitopes in recent-onset type 1 diabetic subjects and antibody-positive relatives. *Diabetes* 2006;55:3061-3067.

96. Ouyang Q, Standifer NE, Qin H, et al. Recognition of HLA class I-restricted beta-cell epitopes in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006;55:3068-3074.
97. Monti P, Scirpoli M, Rigamonti A, et al. Evidence for in vivo primed and expanded autoreactive T cells as a specific feature of patients with type 1 diabetes. *J Immunol* 2007;179:5785-5792.
98. Monti P, Scirpoli M, Maffi P, et al. Islet transplantation in patients with autoimmune diabetes induces homeostatic cytokines that expand autoreactive memory T cells. *J Clin Invest* 2008;118:1806-1814.
99. Diamantopoulos S, Allende G, Ferreira JM, et al. Retrospective assessment of islet cell autoantibodies in pancreas organ donors. *Diabetes Care* 2008;31:1741-1742.
100. In't Veld P, Lievens D, De Grijse J, et al. Screening for insulinitis in adult autoantibody-positive organ donors. *Diabetes* 2007;56:2400-2404.
101. Gianani R, Putnam A, Still T, et al. Initial results of screening of nondiabetic organ donors for expression of islet autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1855-1861.
102. Knip M, Karjalainen J, Akerblom HK. Islet cell antibodies are less predictive of IDDM among unaffected children in the general population than in sibs of children with diabetes. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes Care* 1998;21:1670-1673.