

## Διερεύνηση του ρόλου των φυσικών φονέων T-κυττάρων (Natural killer T-cells – NKT) στις GRAM αρνητικές λοιμώξεις σε διαβητικούς και μη διαβητικούς ασθενείς

Π.Α. Καραγιάννη

### Περίληψη

Τα Natural Killer T-cells (NKT) συνδυάζουν T κυτταρικό υποδοχέα, έκφραση δεικτών επιφανείας φυσικών φονέων και αναγνώριση γλυκολιπιδιακών αντιγόνων, λειτουργώντας ως γέφυρα της φυσικής και κατευθύνουν την ανοσολογική απάντηση. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) θεωρείται κατάσταση ενεργοποιημένης φυσικής ανοσίας. Τα Gram αρνητικά παθογόνα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα NKT κύτταρα, συνδέονται με την ικανότητα παραγωγής αυτοανοσίας και είναι συχνά αίτια ποικιλίας λοιμώξεων σε ασθενείς με ΣΔ2.

**Μέθοδος:** Η ομάδα ΣΔ2 είχε 22 άτομα με διάγνωση ΣΔ2 από εξαμήνου τουλάχιστον, η ομάδα των μαρτύρων είχε 22 άτομα χωρίς ΣΔ2. Όλοι είχαν λοίμωξη από Gram αρνητικό μικρόβιο και εμπύρετο νόσημα τριών ημερών. Πραγματοποιήθηκε φυσική εξέταση, λήψη ζωτικών σημείων και περιφερικού αίματος την ημέρα 3 και 6 του εμπύρετου με προσδιορισμό γενικής αίματος, pH, βιοχημικού ελέγχου, ανοσοσφαιρινών, αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA)/anti-ds DNA και καλλιέργεια ούρων/αίματος/πύου. Η βαρύτητα νόσου ταξινομήθηκε με το σύστημα APACHE II. Προσδιορίσαμε τα NKT με κυτταρομετρία ροής (Becton Dickinson FACS Calibur 4 Colour) με μονοκλωνικά PE CY 5 anti-CD3, FITC anti-CD4, PE anti-NKT-Cell Receptor (BD Pharmingen). Για ενδοκυττάριας κυτταροκίνες χρησιμοποιήθηκε Alexa Fluor anti-IFN- $\gamma$ / APC anti-IL-4. Μελετήθηκαν οι παράμετροι: CD3+IL-4+NKT+, CD4+IL-4+NKT+, CD3+IFN $\gamma$ +NKT+, CD4+IFN $\gamma$ +NKT+, CD3+NKT+, CD4+NKT+, CD3+IL4+, CD4+IL-4+, CD3+IFN $\gamma$ +, CD4+IFN $\gamma$ + την 3<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα του εμπυρέτου.

**Αποτελέσματα:** Τα NKT συμμετέχουν στην πρώτη γραμμή άμυνας και στις δύο ομάδες. Ο αριθμός τους και οι ενδοκυττάρια παραγόμενες IFN $\gamma$ /IL4 μειώνονται από την ημέρα 3 στην 6 χωρίς διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Τα CD4+/CD3+ παράγουν μεικτού τύπου απάντηση (Th1/Th2) και έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στην ομάδα ΣΔ2 την 3<sup>η</sup> ημέρα, και παρόμοια αύξηση στατιστικά σημαντική εντός των ομάδων από την ημέρα 3 στην 6. Στις μετρήσεις ANA, anti-ds DNA, ανοσοσφαιρινών δεν διαπιστώνεται διαφορά μεταξύ των ομάδων.

### Εισαγωγή

Τα Natural Killer T-cells (NKT) συνδυάζουν την ειδικότητα του T κυτταρικού υποδοχέα με την έκφραση δεικτών επιφανείας

Γ' Παθολογική Κλινική  
Γ.Ν. Παπαγεωργίου  
Θεσσαλονίκη

φυσικών φονέων λειτουργώντας ως γέφυρα της φυσικής με την ειδική ανοσία<sup>1</sup>. Υπάρχουν τα τύπου I ή μη μεταβλητά – invariant NKT (NKT) κύτταρα τα οποία μας απασχολούν στη μελέτη, που εκφράζουν μη μεταβλητό T κυτταρικό υποδοχέα (TCRa) και απαντούν σε λιπιδιακά αντιγόνα που παρουσιάζονται από το CD1d (MHC I ομοιάζον μόριο), και τα τύπου II NKT κύτταρα που εκφράζουν ποικίλους T κυτταρικούς υποδοχείς και αναγνωρίζουν λιπιδιακά αντιγόνα που παρουσιάζονται από το CD1d. Τα τύπου III NKT κύτταρα δεν απαντούν σε CD1 μόρια<sup>2,3</sup>.

Τα NKT κύτταρα απαντούν πολύ γρήγορα σε ορισμένα παθογόνα έχοντας μη μεταβλητή άλυσσο του T κυτταρικού υποδοχέα (Va24/Ja18) και ικανότητα παραγωγής κυτταροκινών άμεσα και σε μεγάλες ποσότητες<sup>4</sup>.

Τα NKT αντιπροσωπεύουν ένα νέο πεδίο έρευνας λόγω της ικανότητας που έχουν να επηρεάζουν την ανοσολογική απάντηση προς την Th1 ή Th2 κατεύθυνση συμμετέχοντας σε λοιμώξεις, καρκίνους και αυτοάνοσα νοσήματα<sup>5</sup>.

Η αντίδραση στο α γαλακτοσυλ-κεραμίδιο (aGalCer) είναι χαρακτηριστική για τα NKT κύτταρα<sup>6</sup>. Λόγω αυτής της ιδιότητας μπορέσαμε να μελετήσουμε τα NKT και παρατηρήθηκε ότι μετά τη διέγερση με aGalCer, τα NKT εξαφανίζονται σε λίγες ώρες. Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα αυτά αποκρίνουν την έκφραση του TCR και δεν μπορούν να ανιχνευτούν<sup>7</sup>. Σε δύο ημέρες τα NKT εκφράζουν τον TCR και αυξάνουν θεαματικά τον αριθμό τους. Σταδιακά μετά από 9 ημέρες επιστρέφουν στον κανονικό αριθμό που είχαν πριν τη διέγερση με aGalCer<sup>7,8</sup>. Τα φυσιολογικά όρια των NKT στο περιφερικό αίμα δεν έχουν προσδιοριστεί καθώς κάθε άτομο έχει διαφορετικά επίπεδα. Ο αριθμός τους δεν έχει συσχετισθεί με συγκεκριμένη ανοσολογική λειτουργία μέχρι τώρα<sup>7</sup>.

*Διακρίνονται από τα NK κύτταρα τα οποία αποτελούν μέρος της φυσικής ανοσίας και διαθέτουν αποτρεπτικούς μηχανισμούς για την καταστροφή ίδιων αντιγόνων μέσω της αναγνώρισης MHC μορίων επιφανείας από ανασταλτικούς υποδοχείς (killer inhibitory receptors – KIR)<sup>32</sup>. Σε διαβητικούς ασθενείς είναι μειωμένη η έκφραση των NKG2D και NKp46 υποδοχέων αυξάνοντας την ευαισθησία σε λοιμώξεις<sup>33</sup>.*

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) και η αντίσταση στην ινσουλίνη συσχετίζονται με ενεργο-

ποιημένη φυσική ανοσία και αυξημένους δείκτες οξειδίας φάσης<sup>9</sup>. Συγκεκριμένες λοιμώξεις είναι συχνότερες ή με βαρύτερη κλινική πορεία σε ασθενείς με ΣΔ2<sup>10</sup>, δεν υπάρχουν όμως δεδομένα για τον ρόλο ή τη συμμετοχή των NKT κυττάρων στην ανοσολογική απάντηση αυτών των ασθενών<sup>11,12</sup>.

Τα Gram αρνητικά μικρόβια είναι συχνά υπεύθυνα για λοιμώξεις σε ασθενείς με ΣΔ2. Αυτή η κατηγορία μικροβίων διαθέτει στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη το λιποπολυσακχαρίδιο (LPS) που μπορεί να ενεργοποιήσει το CD1 και τα CD1d διεγερόμενα T-κύτταρα (NKT cells) με πολλούς τρόπους<sup>13,14</sup>, και έχει βρεθεί να συσχετίζεται με παραγωγή αυτοανοσίας<sup>15</sup>.

Ένα σύστημα για τη σύγκριση, βαθμονόμηση βαρύτητας νόσου και πρόγνωση του ασθενούς είναι το Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation (APACHE II-IV). Η βαθμονόμηση είναι από 0-71<sup>16</sup>.

Έχοντας πολύ περιορισμένη βιβλιογραφία σχετικά με τα NKT σε ασθενείς με ΣΔ2, η μελέτη μας ασχολήθηκε με τη σύγκριση του αριθμού, της διακύμανσης, την ανοσολογική απάντηση των NKT κυττάρων μέσω της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτταροκινών και αυτοαντισωμάτων ασθενών με διαβήτη τύπου 2 και μαρτύρων, σε αρχική και δίμημη φάση λοίμωξης με Gram αρνητικό παθογόνο.

## Μέθοδος

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Γ' Παθολογική Κλινική του Γ.Ν. Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης. Πρωτεύον καταληκτικό σημείο ήταν η συμμετοχή στην πρώτη γραμμή άμυνας των NKT κυττάρων και η πρόωμη έκκριση κυτταροκινών από τα NKT σε σχέση με άλλα λεμφοκύτταρα (CD4+/CD3+) που παράγουν IFN $\gamma$  και IL4. Όλοι οι ασθενείς ενημερώθηκαν και συμπλήρωσαν φόρμα συγκατάθεσης. Το πρωτόκολλο της μελέτης έλαβε την έγκριση της Επιτροπής Ηθικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και είναι σύμφωνο με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

Η πρώτη ομάδα ασθενών (n=22) είχε διάγνωση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2 για τουλάχιστον 6 μήνες σύμφωνα με τα κριτήρια της American Diabetes Association (γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη  $\geq 6.5\%$  ή γλυκόζη νηστείας  $\geq 126$  mg/dl ή δύο ώρες μεταγευματική γλυκόζη  $\geq 200$  mg/dl κατά τη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης με 75 gr άνυδρης γλυκόζης διαλυμένης στο νερό ή ασθενής με κλασικά συμπτώματα υπεργλυκαιμίας ή με υπεργλυκαιμική κρίση

και τυχαία γλυκόζη πλάσματος  $\geq 200$  mg/dl)<sup>17</sup> και εμφάνισε εμπύρετο νόσημα για τρεις ημέρες. Η ομάδα των μαρτύρων (n=22) δεν είχε Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, αλλά εμφάνισε επίσης εμπύρετο νόσημα για τρεις ημέρες. Σε όλους τους ασθενείς ταυτοποιήθηκαν λοιμώξεις με Gram αρνητικά μικρόβια. Και οι δύο ομάδες περιελάμβαναν άτομα με ελληνική ιθαγένεια.

Φυσική εξέταση και μέτρηση ζωτικών σημείων πραγματοποιήθηκαν και έγινε λήψη περιφερικού αίματος την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα του εμπύρετου με προσδιορισμό γενικής αίματος, pH, βιοχημικού ελέγχου (γλυκόζη, SGOT, SGPT, γGT, ALP, ουρία, κρεατινίνη, K, Na, λευκώματα, λευκοματίνη, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, HDL, LDL, ουρικό οξύ), γενική σύζων / καλλιέργεια, καλλιέργειες αίματος με δεσμευτικό, καλλιέργειες πύου, ποσοτικό προσδιορισμό ανοσοσφαιρινών και προσδιορισμό αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) και αντιδίκλωνου DNA (αντί dsDNA).

Η βαρύτητα της λοίμωξης ταξινομήθηκε σύμφωνα με το σύστημα APACHE II.

Κριτήρια αποκλεισμού ήταν: διάρκεια πυρετού πάνω από 3 ημέρες, Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1, κακοήθειες, χρόνια νεφρική νόσος, κολλαγονικά νοσήματα, ψυχιατρική νόσος, ηπατική νόσος, φάρμακα όπως τα στεροειδή, ανοσοτροποποιητικά (κυκλοσπορίνη, tacrolimus).

Χρησιμοποιήσαμε κυτταρομετρία ροής [Becton Dickinson (BD) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur 4 Colour] για τον προσδιορισμό των NKT με μονοκλωνικά αντισώματα Phycoerythrin (PE)-Cyanin (CY) 5 anti Human CD3, Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti Human CD4, PE anti human invariant NKT T-Cell Receptor (BD Pharmingen, New Jersey, USA). Για τον ενδοκυττάριο προσδιορισμό κυτταροκινών χρησιμοποιήθηκε Alexa Fluor anti Human IFN- $\gamma$  και APC anti-human IL-4 (BD Pharmingen)<sup>18</sup>. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν CD3+IL-4+NKT+, CD4+IL-4+NKT+, CD3+IFN $\gamma$ +NKT+, CD4+IFN $\gamma$ +NKT+, CD3+NKT+, CD4+NKT+, CD3+IL4+, CD4+IL-4+, CD3+IFN $\gamma$ +, CD4+IFN $\gamma$ + κατά την 3<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα του εμπύρετου.

### Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος (mean)  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (standard error of the mean, SEM) για τις συνεχείς μεταβλη-

τές, και ως συχνότητες για τις κατηγορικές μεταβλητές. Λόγω του μεγέθους του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση μη παραμετρικές δοκιμασίες. Για τη σύγκριση των συνεχών μεταβλητών, χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney test στις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων (between groups) και το Wilcoxon signed ranks test στις συγκρίσεις εντός των ομάδων (within groups). Για τη σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών, χρησιμοποιήθηκε το Chi-Square test ή το Fisher exact test. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το SPSS 21.0 για Macintosh (SPSS Inc., Chicago, IL). Η σημαντικότητα ορίστηκε ως  $p < 0.05$  (two-tailed).

### Αποτελέσματα

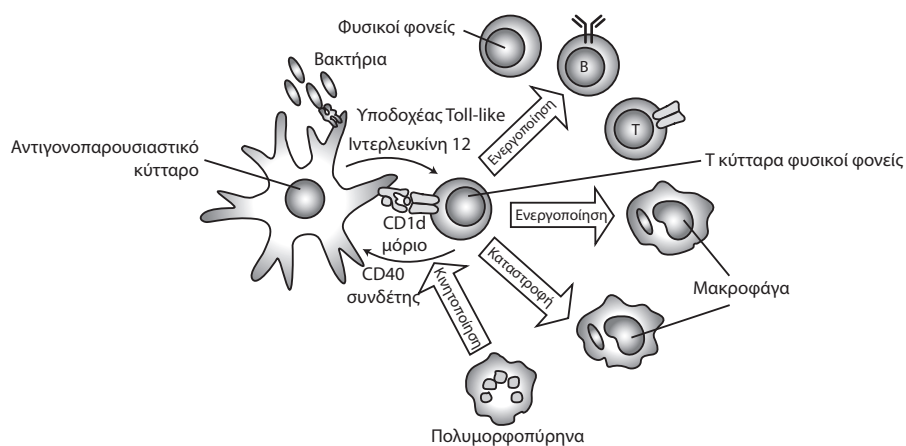
Η ομάδα ΣΔ2 αποτελούνταν από 13 άνδρες και 9 γυναίκες ηλικίας  $74.0 \pm 1.2$  έτη με BMI  $30.3 \pm 0.5$  kg/m<sup>2</sup>. Η ομάδα μαρτύρων αποτελούνταν από 11 άνδρες και 11 γυναίκες ( $p=0.54$ ) ηλικίας  $75.0 \pm 2.0$  έτη ( $p=0.906$ ) με BMI  $28.2 \pm 0.7$  kg/m<sup>2</sup> ( $p=0.041$ ). Όλοι οι ασθενείς έπασχαν από λοίμωξη με Gram αρνητικό μικρόβιο, η οποία χαρακτηρίστηκε κατά πλειοψηφία ως ήπιας-μέτριας βαρύτητας (APACHE II score  $< 19$ ) ( $p=1.00$ ). Από τα είδη των λοιμώξεων: 84.1% λοιμώξεις ουροποιητικού, 9.1% λοιμώξεις σε έλκη κάτω άκρων, 4.5% βακτηριαμιά από πνευμονία, 2.3% χολοκυστίτιδα. Και στις δύο ομάδες η πλειοψηφία ήταν λοιμώξεις ουροποιητικού ( $p=0.071$ ) που σε ποσοστό 61.4% οφείλονταν σε E. coli. Στο σύνολο των ασθενών 22.7% παρουσίασε θετικές αιμοκαλλιέργειες με 27.3% στην ομάδα των μαρτύρων και 18.2% στην ομάδα των ασθενών με ΣΔ2 ( $p=0.473$ ). Από τα συνοδά νοσήματα στην ομάδα ΣΔ2, η στεφανιαία νόσος παρατηρείται σε ποσοστό

Πίνακας 1. Βασικές μετρήσεις.

Παράμετρος	Ομάδα μαρτύρων	Ομάδα ΣΔ2	P value
Ηλικία (έτη)	$75.0 \pm 2.0$	$74.0 \pm 1.2$	0.906
BMI	$28.2 \pm 0.7$	$30.3 \pm 0.5$	<b>0.041</b>
SGOT (U/L)	$28.5 \pm 2.9$	$24.0 \pm 0.9$	0.621
SGPT (U/L)	$26.6 \pm 4.1$	$23.3 \pm 1.6$	0.673
Ολ. χολερυθρίνη (mg/dl)	$0.6 \pm 0.5$	$0.6 \pm 0.5$	0.540
Ολ. χοληστερόλη (mg/dl)	$180.6 \pm 8.5$	$183.2 \pm 10.4$	0.787
HDL (mg/dl)	$48.7 \pm 1.8$	$44.4 \pm 3.0$	0.121
LDL (mg/dl)	$110.4 \pm 7.7$	$112.6 \pm 9.6$	0.850
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	$108.0 \pm 6.8$	$147.4 \pm 13.0$	<b>0.022</b>
Ολ. πρωτεΐνη (g/dl)	$6.6 \pm 0.1$	$6.4 \pm 0.1$	0.074
INR	$1.1 \pm 0.0$	$1.1 \pm 0.0$	0.698

Πίνακας 2. Αιματολογικές-Βιοχημικές μετρήσεις.

Παράμετρος	Ημέρα	Ομάδα μαρτύρων	Ομάδα ΣΔ2	P value (μεταξύ των ομάδων)
<b>Hct (%)</b>	3	37.2 ± 1.3	38.3 ± 0.7	0.778
	6	33.8 ± 0.9	34.2 ± 0.7	0.742
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.004</b>	<b>&lt;0.001</b>	
<b>Λευκά αιμοσφαίρια (κκχ)</b>	3	13190.9 ± 1139.7	14289.0 ± 1144.1	0.324
	6	8297.8 ± 484.0	8798.6 ± 677.0	0.953
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	
<b>Ουδετερόφιλα</b>	3	10967.21 ± 930.5	11403.5 ± 1130.8	0.725
	6	5969.1 ± 401.4	6027.5 ± 690.0	0.511
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	
<b>Λεμφοκύτταρα</b>	3	1188.7 ± 145.4	1694.6 ± 122.7	<b>0.010</b>
	6	1354.2 ± 134.3	1761.1 ± 117.2	<b>0.007</b>
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		0.223	0.548	
<b>Αιμοπετάλια (*10<sup>3</sup> κκχ)</b>	3	216.4 ± 12.6	211.0 ± 25.6	0.116
	6	209.0 ± 13.6	199.0 ± 16.5	0.690
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		0.123	0.592	
<b>ΤΚΕ (mm/h)</b>	3	46.4 ± 5.7	58.4 ± 6.4	0.162
	6	57.3 ± 5.3	58.5 ± 5.1	0.991
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.003</b>	0.770	
<b>CRP (mg/dl)</b>	3	17.4 ± 3.1	19.0 ± 3.4	0.673
	6	13.2 ± 1.0	11.0 ± 1.5	0.149
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		0,338	<b>0,007</b>	
<b>Σάκχαρο (mg/dl)</b>	3	124.3 ± 4.6	<b>193.7 ± 17.2</b>	<0.001
	6	99.3 ± 2.3	<b>128.0 ± 4.0</b>	<0.001
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<0.001	<b>&lt;0.001</b>	
<b>Ουρία (mg/dl)</b>	3	53.4 ± 6.3	<b>49.1 ± 3.5</b>	0.778
	6	33.5 ± 3.1	<b>35.0 ± 2.5</b>	0.496
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<0.001	<b>&lt;0.001</b>	
<b>Κρεατινίνη (mg/dl)</b>	3	1.6 ± 0.2	<b>1.4 ± 1.0</b>	0.681
	6	1.0 ± 0.0	<b>1.1 ± 0.0</b>	0.452
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<0.001	<b>&lt;0.001</b>	
<b>Ουρικό οξύ (mg/dl)</b>	3	6.8 ± 0.4	<b>6.6 ± 0.3</b>	0.963
	6	6.2 ± 0.4	<b>6.3 ± 0.3</b>	0.725
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<0.001	<b>&lt;0.001</b>	



**Εικόνα 1.** Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Αpcs) ενεργοποιούνται από τους toll like υποδοχείς και εκκρίνουν IL-12 (προφλεγμονώδεις κυτοκίνες). Η IL12 ενισχύει την ασθενή απάντηση μέσω TCR στα αυτολόγα λιπιδιακά αντιγόνα που παρουσιάζονται από το CD1d επάνω στα APCs και οδηγεί στην παραγωγή και έκκριση κυτοκινών από τα NKT. Αυτός ο μηχανισμός ενεργοποίησης μπορεί να εξηγήσει πώς τα NKT με τον υποδοχέα περιορισμένης ειδικότητας μπορούν να διεγερθούν γρήγορα σε διάφορες μικροβιακές λοιμώξεις. Η πρώτη έκκριση κυτοκινών από τα NKT κατά τη διάρκεια της λοίμωξης οδηγεί σε ενεργοποίηση των μακροφάγων, NK, T και B κυττάρων. Οι χημικίνες που εκκρίνονται συνεισφέρουν στην προσέλκυση άλλων ανοσολογικών κυττάρων όπως πολυμορφοσύρινα. Τα ενεργοποιημένα NKT μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να καταστρέψουν τα μακροφάγα άμεσα. Η έκκριση IFN-γ και η διέγερση CD40L οδηγούν στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων.

Πίνακας 3. Κυτταρομετρία ροής.

Παράμετρος (%)	Ημέρα	Ομάδα μαρτύρων	Ομάδα ΣΔ2	P value (μεταξύ των ομάδων)
CD4+IL4+	3	56.4 ± 8.7	82.1 ± 4.9	<b>0.008</b>
	6	56.8 ± 9.2	85.5 ± 4.6	0.159
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.033</b>	<b>0.010</b>	
CD4+IL4+NKT+	3	4.6 ± 1.0	3.3 ± 0.6	0.906
	6	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.548
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	
CD4+IFNγ+	3	50.0 ± 8.4	79.0 ± 5.6	<b>0.027</b>
	6	58.2 ± 8.8	81.5 ± 5.9	0.059
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.007</b>	<b>0.031</b>	
CD4+IFNγ+NKT+	3	4.8 ± 1.3	2.9 ± 0.5	0.842
	6	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.300
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.032</b>	<b>&lt;0.001</b>	
CD4+NKT+	3	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.925
	6	0.5 ± 1.5	0.4 ± 0.1	0.436
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.025</b>	0.061	
CD3+IL4+	3	54.4 ± 8.6	79.9 ± 4.8	<b>0.028</b>
	6	56.4 ± 9.1	84.8 ± 4.7	0.121
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		0.082	<b>0.003</b>	
CD3+IL4+NKT+	3	6.6 ± 1.7	4.2 ± 0.9	0.698
	6	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.906
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.002</b>	<b>0.005</b>	
CD3+IFNγ+	3	48.5 ± 8.2	76.5 ± 5.5	<b>0.032</b>
	6	61.2 ± 8.5	80.8 ± 1.7	0.156
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.002</b>	<b>0.017</b>	
CD3+IFNγ+NKT+	3	6.0 ± 1.7	3.2 ± 0.5	0.573
	6	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.878
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.019</b>	<b>&lt;0.001</b>	
CD3+NKT+	3	2.4 ± 0.5	2.8 ± 0.7	0.725
	6	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.075
<i>p-value (εντός των ομάδων)</i>		<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	

36.4% με στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.004$ ), ενώ η υπέρταση είναι στο σύνολο των ασθενών η συχνότερη πάθηση με ποσοστό 43.2% ( $p=0.761$ ). Η διάρκεια νόσου στην ομάδα ΣΔ2 ήταν μικρότερη από 10 έτη σε ποσοστό 60%, με αποτέλεσμα λίγοι ασθενείς να έχουν μακροχρόνιες επιπλοκές από την πάθηση. Η μέση τιμή γλυκοζυλιωμένης στην ομάδα ΣΔ2 ήταν  $7.43 \pm 0.2\%$ .

### Συζήτηση

Στις βασικές μετρήσεις, η ομάδα ΣΔ2 παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στον δείκτη μάζας σώματος και στα τριγλυκερίδια από την ομάδα των μαρτύρων, τα οποία είναι τυπικά χαρακτηριστικά για τον ΣΔ2, καθώς συνδυάζονται με το φαινόμενο της αντίστασης στην ινσουλίνη<sup>19,20</sup>.

Στις αιματολογικές-βιοχημικές εξετάσεις παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμε-

σα στις δύο ομάδες με υπεροχή του απόλυτου αριθμού λεμφοκυττάρων στην ομάδα ΣΔ2 την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της λοίμωξης. *Συσχετίζεται η μεταβολή του κλάσματος πολυμορφοπυρήνων/λεμφοκυττάρων με βακτηριαιμία και δυσμενέστερη έκβαση, όταν παρατηρείται υπεροχή των πολυμορφοπυρήνων*<sup>21</sup>. Επίσης ο αριθμός λεμφοκυττάρων συσχετίζεται ισχυρότερα με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, την αντίσταση στην ινσουλίνη και υψηλότερο BMI από τις υπόλοιπες ομάδες λευκών αιμοσφαιρίων<sup>22-24</sup>.

Η ταχύτητα καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ) αιμοσφαιρίων παρουσίασε μεταβολή από την 3<sup>η</sup> στην 6<sup>η</sup> ημέρα εντός της ομάδας των μαρτύρων με στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p=0.003$ ), ενώ στην ομάδα ΣΔ2 οι τιμές της 3<sup>ης</sup> ημέρας ήταν υψηλότερες χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες. *Η ΤΚΕ είναι μη ειδικός δείκτης φλεγμονής, και*

επιηρεάζεται από άλλους παράγοντες εκτός της λοίμωξης. Η μεταβολή της ΤΚΕ μπορεί να είναι ψευδώς θετική, ενώ η βραδεία ανταπόκριση στην οξεία φάση μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα νωρίς στην πρόιμη φάση της λοίμωξης. Η επιστροφή σε φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να γίνει σε εβδομάδες ή μήνες. Αυξημένη ΤΚΕ συσχετίζεται με νεφρική ανεπάρκεια, παχυσαρκία, ΣΔ2<sup>25</sup>.

Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά εντός της ομάδας ΣΔ2 από την 3<sup>η</sup> στην 6<sup>η</sup> ημέρα λοίμωξης με υψηλότερη αρχική τιμή και χαμηλότερη στη δεύτερη μέτρηση ( $p=0,007$ ) χωρίς να παρουσιάσει διαφορά ανάμεσα στις ομάδες κατά τη σύγκριση ίδιων ημερών μέτρησης. Σε μελέτη γενικού πληθυσμού βρέθηκαν υψηλότερες τιμές CRP σε άτομα με ΣΔ2 από την ομάδα μαρτύρων [3.67 (SD 3.71) έναντι 1.85 (3.83) αντίστοιχα·  $p<0.0001$ ]<sup>26</sup>.

Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη είναι πιο ευαίσθητος δείκτης από την ΤΚΕ, μπορεί να μεταβάλλεται η τιμή της πιο σύντομα, έχει χρόνο διπλασιασμού και ημίσειας ζωής περίπου έξι ώρες και φτάνει στο μέγιστο σε δύο ημέρες, ενώ η τιμή της πέφτει άμεσα με την αποδρομή της λοίμωξης. Η σύγκριση CRP και ΤΚΕ έδειξε καλύτερη συσχέτιση της CRP με τη λοίμωξη<sup>27</sup>. Η CRP επίσης συσχετίζεται με την παρουσία ΣΔ2 και αθηρωμάτωσης<sup>25,28,29</sup>.

Σάκχαρο, Ουδετερόφιλα, Ουρία, Κρεατινίνη και Ουρικό οξύ έχουν την ίδια μεταβολή ( $p<0.001$ ) μέσα τις δύο ομάδες και καμία διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες κατά την 3<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα της λοίμωξης και συμβαδίζουν με την καλή πορεία νόσου των ασθενών.

Η απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις μεταβλητές της μελέτης ανάμεσα στην ομάδα ΣΔ2 και στους μάρτυρες αναδεικνύει ότι ο ρόλος των NKT κυττάρων είναι ο ίδιος και στις δύο ομάδες κατά τη διάρκεια των Gram αρνητικών λοιμώξεων και ότι δεν υπάρχει διαφορά στην αριθμητική διακύμανση αυτού του κυτταρικού πληθυσμού. Με τις μέχρι τώρα βιβλιογραφικές αναφορές δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την IFN $\gamma$ /IL4 (Th1/Th2) έκκριση κατά τη διάρκεια Gram αρνητικών λοιμώξεων σε ασθενείς με ΣΔ2.

Εντός και των δύο ομάδων παρατηρούμε μείωση την 6<sup>η</sup> ημέρα σε όλες τις παραμέτρους των NKT (IL4+/IFN $\gamma$ +) (CD4+IL4+NKT+, CD3+IL4+NKT+, CD4+IFN $\gamma$ +NKT+, CD3+IFN $\gamma$ +NKT+, CD3+NKT+) ενώ αύξηση παρατηρείται στα μη

NKT (CD3+IL4+ /CD4+IL4+/CD3+IFN $\gamma$ /CD4+IFN $\gamma$ ) σε σχέση με την 3<sup>η</sup> ημέρα.

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται την 3<sup>η</sup> ημέρα στην ομάδα ΣΔ2 όπου υπερέχει η παραγωγή κυτταροκινών από τα μη NKT κύτταρα (CD4+IL4+/CD4+IFN $\gamma$ +/CD3+IL4+/CD3+IFN $\gamma$ +). Σε όλες αυτές τις παραμέτρους υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά εντός των ομάδων από την 3<sup>η</sup> στην 6<sup>η</sup> ημέρα εκτός από την CD3+IL4+ στους μάρτυρες που υποδηλώνει λιγότερη αύξηση στην IL4 την 6<sup>η</sup> ημέρα.

Το σύνδρομο αντισταθμιστικής αντιφλεγμονώδους απάντησης (compensatory anti-inflammatory response syndrome – CARS) θα μπορούσε να εξηγήσει την επικράτηση στην παραγωγή IL4 κατά την όπιμη φάση της λοίμωξης σε ασθενείς με ΣΔ2 και την επικράτηση της παραγωγής IFN $\gamma$  στους μάρτυρες.

Στην οξεία φάση της λοίμωξης τα μακροφάγα διεγερόμενα από το λιποπολυσακχαρίδιο (LPS) παράγουν κυτταροκίνες όπως TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$  και IL-12 (Th1). Η οξεία φάση ακολουθείται από μια αντίδραση που χαρακτηρίζεται από παραγωγή Th2 κυτταροκινών (IL-4, IL-10) από τα λεμφοκύτταρα σε μια προσπάθεια να μειώσουν την ένταση της φλεγμονής. Εάν η δεύτερη αυτή φάση παραταθεί, μπορεί να προκύψουν φαινόμενα ανοσοκαταστολής<sup>30</sup>. Το αποτέλεσμα μιας τέτοιας αντίδρασης μπορεί να είναι δευτερογενείς λοιμώξεις<sup>31</sup>.

Τα NKT κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν είτε με αναγνώριση του μικροβιακού λιπιδιακού αντιγόνου που παρουσιάζεται από το CD1d ή από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή μέσω παραγωγής λιπιδιακών μορίων από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μικρόβια. Ο τύπος της διέγερσης μπορεί να ευθύνεται για το διαφορετικό μοντέλο παραγωγής κυτταροκινών<sup>4</sup>. Η βαρύτητα της λοίμωξης, το είδος του LPS κάθε παθογόνου και η ποσότητα αυτού θεωρούνται παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τις ανοσολογικές μετρήσεις.

Θα μπορούσε η διέγερση των NKT με αγωνιστές να χρησιμοποιηθεί προστατευτικά από την ανάπτυξη διαβήτη όπως έγινε πειραματικά σε μη παχύσαρκους διαβητικούς επιμύς<sup>34</sup>.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι νεότερες μελέτες που αναδεικνύουν ότι τα NKT που βρίσκονται στο έντερο όταν εκτεθούν σε γλυκολιπιδιακό αντιγόνο μπορούν να μετατραπούν σε Foxp3+ κύτταρα (NK-Tregs) και να συνεργαστούν με τα Tregs (T ρυθμιστι-

κά λεμφοκύτταρα) ασκώντας ανοσοκατασταλτική δράση η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί θεραπευτικά<sup>35</sup>.

Περιορισμός της μελέτης είναι η πραγματοποίηση των μετρήσεων των NKT σε περιφερικό αίμα καθώς η διερεύνηση σε ιστούς να μπορεί να δώσει περισσότερα συμπεράσματα για την φλεγμονή *in situ*, ωστόσο αυτό το είδος μελέτης απαιτεί και διαφορετικές διαδικασίες. Επίσης, βαρύτερες λοιμώξεις θα μπορούσαν να επηρεάσουν με διαφορετικό τρόπο τα αποτελέσματα.

## Συμπέρασμα

Ο αριθμός των NKT και οι ενδοκυττάρια παραγόμενες κυτταροκίνες δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα ΣΔ2 και στους μάρτυρες κατά τη διάρκεια των Gram αρνητικών λοιμώξεων.

## Ευχαριστίες:

Ευχαριστώ θερμά την Ελληνική Εταιρεία Μελέτης και Εκπαίδευσης για τον Σακχαρώδη Διαβήτη (πρώην Δ.Ε.Β.Ε.) για την ευγενική υποστήριξη και χορήγηση υποτροφίας για την πραγματοποίηση της μελέτης.

## Abstract

**Karagianni PD. Investigating the role of Natural Killer T-cells in Gram negative infections of patients with type 2 diabetes mellitus and controls. *Hellenic Diabetol Chron* 2016; 4: 252-259.**

Natural Killer T-cells (NKT) combine T cell receptor specificity with natural killer cell surface markers and recognize glycolipid antigens, bridging innate with adaptive immunity. NKT cells produce cytokines during the early stages of an infection and are able to direct immune response. Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is associated with activated innate immunity but there is limited data concerning the role of NKT cells. Gram negative pathogens have the ability to activate NKT cells, promote autoimmune reactivity and are responsible for a variety of infections in patients with type 2 diabetes.

*Method:* T2DM group consisted of 22 patients with T2DM diagnosis for at least six months, the control group consisted of 22 patients who had not T2DM. All patients were infected from Gram negative bacteria and febrile illness for three days. Physical examination, vital signs were performed and peripheral blood was drawn on days three and six of febrile illness for complete blood count, pH, biochemistry, immunoglobulins,

antinuclear antibodies, anti-ds DNA and blood/urine/pus cultures. APACHE II system was used to stratify disease severity. Flow cytometry (Becton Dickinson FACS Calibur 4 Colour) was utilized for NKT identification with monoclonal PE CY 5 anti-CD3, FITC anti-CD4, PE anti-NKT TC Receptor (BD Pharmingen). For intracellular staining we utilized Alexa-Fluor anti-IFN- $\gamma$  and APC anti-IL-4. Measured parameters were: CD3+IL-4+NKT+, CD4+IL-4+NKT+, CD3+IFN $\gamma$ +NKT+, CD4+IFN $\gamma$ +NKT+, CD3+NKT+, CD4+NKT+, CD3+IL4+, CD4+IL-4+, CD3+IFN $\gamma$ +, CD4+IFN $\gamma$ + on day 3 and 6 of febrile illness.

*Results:* NKT cells participate in the early immune response to Gram negative infections in both groups of patients. NKT cell number and intracellularly produced IFN $\gamma$ /IL4 are decreasing from day 3 to day 6 in same way in both groups. Following NKT stimulation a mixed type of response (Th1/Th2) is being elicited from CD4+/CD3+ lymphocytes with significant difference in T2DM group on day 3 and significant increase between groups from day 3 to day 6. There is no significant difference between groups concerning immunoglobulins and production of antinuclear antibodies or anti-ds DNA.

## Βιβλιογραφία

1. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 535-62.
2. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007 Jun; 19(3): 354-64.
3. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004 Mar; 4(3): 231-7.
4. Cohen NR, Garg S, Brenner MB. Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv Immunol* 2009; 102: 1-94.
5. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2008 Jun; 20(3): 58-68.
6. Anderson BL, Teyton L, Bendelac A, Savage PB. Stimulation of natural killer T cells by glycolipids. *Molecules* 2013; 18(12): 15662-88.
7. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 877-900.
8. Zajonc DM, Elsliger MA, Teyton L, Wilson IA. Crystal structure of CD1a in complex with a sulfatide self antigen at a resolution of 2.15 Å. *Nat Immunol* 2003 Aug; 4(8): 808-15.
9. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997 Nov; 40(11): 1286-92.
10. Benfield T, Jensen JS, Nordestgaard BG. Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. *Diabetologia* 2007 Mar; 50(3): 549-54.

11. Hartman ME, O'Connor JC, Godbout JP, Minor KD, Maz-zocco VR, Freund GG. Insulin receptor substrate-2-de-pendent interleukin-4 signaling in macrophages is im-paired in two models of type 2 diabetes mellitus. *J Biol Chem* 2004 Jul 2; 279(27): 28045-50.
12. Lynch L, Nowak M, Varghese B, et al. Adipose tissue in-variant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 2012 Sep 21; 37(3): 574-87.
13. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, et al. Natural killer T cells recog-nize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 2006 Sep; 7(9): 978-86.
14. Nagarajan NA, Kronenberg M. Invariant NKT cells ampli-fy the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2007 Mar 1; 178(5): 2706-13.
15. Gotschlich EC, Fraser BA, Nishimura O, Robbins JB, Liu TY. Lipid on capsular polysaccharides of gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 1981 Sep 10; 256(17): 8915-21.
16. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008 Jan; 36(1): 296-327.
17. Standards of medical care in diabetes – 2014. *Diabetes Care* Jan; 37 Suppl 1: S14-80.
18. Metelitsa LS. Flow cytometry for natural killer T cells: multi-parameter methods for multifunctional cells. *Clin Immunol* 2004 Mar; 110(3): 267-76.
19. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* 2009 Mar; 5(3): e1000324.
20. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006 Dec 14; 444(7121): 840-6.
21. Yang M, Li L, Su N, Lin J, Wang J. Dynamic monitoring of the neutrophil/lymphocyte ratio could predict the progn-osis of patients with bloodstream infection. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2015 Jun; 27(6): 471-6.
22. Lorenzo C, Hanley AJ, Haffner SM. Differential white cell count and incident type 2 diabetes: the Insulin Resist-ance Atherosclerosis Study. *Diabetologia* 2014 Jan; 57(1): 83-92.
23. Lee CT, Harris SB, Retnakaran R, et al. White blood cell subtypes, insulin resistance and beta-cell dysfunction in high-risk individuals – the PROMISE cohort. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014 Oct; 81(4): 536-41.
24. Pinkerton PH, McLellan BA, Quantz MC, Robinson JB. Acute lymphocytosis after trauma – early recognition of the high-risk patient? *J Trauma* 1989 Jun; 29(6): 749-51.
25. Li Q, Li L, Li Y. Enhanced RBC Aggregation in Type 2 Diabetes Patients. *J Clin Lab Anal* 2015 Aug 17.
26. Nabipour I, Vahdat K, Jafari SM, et al. Elevated high sen-sitivity C-reactive protein is associated with type 2 dia-betes mellitus: the Persian Gulf Healthy Heart Study. *Endocr J* 2008 Aug; 55(4): 717-22.
27. Jekarl DW, Kim JY, Lee S, et al. Diagnosis and evaluation of severity of sepsis via the use of biomarkers and pro-files of 13 cytokines: a multiplex analysis. *Clin Chem Lab Med* 2015 Mar; 53(4): 575-81.
28. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001 Jul 18; 286(3): 327-34.
29. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive pro-tein, the metabolic syndrome, and risk of incident car-diovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 ini-tially healthy American women. *Circulation* 2003 Jan 28; 107(3): 391-7.
30. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and adverse out-comes from critical illness. *Pediatr Clin North Am* 2008 Jun; 55(3): 647-68, xi.
31. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003 Jan 9; 348(2): 138-50.
32. Kokaraki G, Daniilidis M. Killer cell immunoglobulin like receptors and natural killer cells: clinical perspectives. *Elliniki Iatriki* 2007; 1(73): 7-16
33. Berrou J, Fougeray S, Venot M, et al. *PLoS One* 2013 April 25; 8(4): e62418.
34. Tard C, Rouxel O, Lehuen A. Regulatory role of natural killer T cells in diabetes. *Biomed J* 2015 Dec; 38(6): 484-95.
35. Monteiro MI, Almeida CF, Caridade M, et al. Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. *J Immunol* 2010 Aug 15; 185(4): 2157-63.

**Λέξεις-κλειδιά:**

Τύπου 2 Σακχαρώδης Διαβήτης  
Gram αρνητικές λοιμώξεις  
T-κύτταρα φυσικοί φονείς

**Key-words:**

Type 2 Diabetes Mellitus  
Gram negative infections  
Natural killer T-cells