



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**«Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και ρινική φορεία σε
Staphylococcus aureus: γονιδιακοί πολυμορφισμοί και
διαμεσολαβητές της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης»**

Διδακτορική Διατριβή

Μαρίνα Ν. Πλατάκη

Ιατρός

Επιβλέπων Καθηγητής

Διαμαντής Κοφτερίδης

Ηράκλειο 2020



UNIVERSITY OF CRETE
FACULTY OF MEDICINE

«Diabetes mellitus type 2 and *Staphylococcus aureus* nasal carriage: genetic polymorphisms and mediators of innate immune response»

PhD Dissertation

Marina N. Plataki, MD

Supervising Professor

Diamantis Kofteridis

Heraklion 2020



ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ ΟΡΚΟΣ



Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιεύμενος, ἐπιτελεᾶ ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενετῆσιν ἑμοίσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρῆζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάσειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρῆζωσι μαθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παρατελείης τε καὶ ἀκροήσεως καὶ τῆς λοιπῆς ὁπάσης μαθήσεως μετάδοσιν ποιήσασθαι γίνοισι τε ἑμοίσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγπεγραμμένοισι τε καὶ ὠρκειμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασι τε χρῆσθαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ ἀληθείᾳ δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρειν. Οὐ δῶσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσθαι συμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθορίον δῶσω. ἄγνως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχορήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρῆσιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ὄν ἐσίω, ἐξελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἔκτος ἔων πάσης ἀδικίης ἐκούσιης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφοροδισίων ἔργων ἐπὶ γε γυναικείων σωματων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἢ μὴ κρῆ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔσω, σιγήσομαι. ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελεᾶ ποιέοντι, καὶ μὴ συγχεόντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης ἀσθεζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίοντι δὲ καὶ ἐπιορκούντι, τάναντία τούτων.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Διαμαντής Κοφτερίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Κρήτης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Διαμαντής Κοφτερίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Σαμώνης, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Εμμανουήλ Γαλανάκης, Καθηγητής Παιδιατρικής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Διαμαντής Κοφτερίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Σαμώνης, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Εμμανουήλ Γαλανάκης, Καθηγητής Παιδιατρικής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Γουλιέλμος, Καθηγητής Γενετικής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Σοφία Αγγελάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Κρήτης

Σοφία Σχίζα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Κρήτης

Θεοδόσιος Φιλιπάτος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Κρήτης

*Αφιερώνεται στους αγαπημένους μου γονείς Νίκο και Ράνια,
στην πολυαγαπημένη μου αδερφή Μαρία,
στον υπομονετικό μου σύζυγο Χάρη
για την ανεκτίμητη ηθική υποστήριξη και βοήθεια που μου
προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.*

“Ο δὲ ἀνεξέταστος βίος οὐ βιωτὸς ἀνθρώπῳ”

Σωκράτης 469-399 π.Χ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες

Περιεχόμενα Πινάκων

Περιεχόμενα Εικόνων

Συντομογραφίες

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 1.1. Σακχαρώδης διαβήτης και φλεγμονή
- 1.2. Ιντερλευκίνη-6 ως προφλεγμονώδης κυτοκίνη
- 1.3. Ο ρόλος της βιταμίνης D στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης
- 1.4. Η καθελιδίνη, ένα ενδογενές αντιμικροβιακό πεπτίδιο
- 1.5. Ευπάθεια ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη σε λοιμώξεις
- 1.6. Ρινική φορεία σε *Staphylococcus aureus* στο σακχαρώδη διαβήτη

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 2.1. Περίληψη
- 2.2. Abstract
- 2.3. Εισαγωγή
- 2.4. Ασθενείς και Μέθοδοι
- 2.5. Στατιστική Ανάλυση
- 2.6. Αποτελέσματα
- 2.7. Συζήτηση
- 2.8. Συμπεράσματα
- 2.9. Βιβλιογραφία
- 2.10. Παράρτημα
- 2.11. Βιογραφικό σημείωμα
- 2.12. Δημοσιευμένο άρθρο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα Εξωτερικά Ιατρεία Παθολογικής και Ενδοκρινολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (Πα.Γ.Ν.Η.) και στο εργαστήριο Παθολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Πρώτον απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γενικής Παθολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Διαμαντή Κοφτερίδη για την αμέριστη στήριξη, την καθοδήγηση, την παρότρυνση και την εμπύχωση που απλόχερα μου προσέφερε όλα αυτά τα δύσκολα χρόνια των σπουδών μου. Η παρούσα διατριβή πέρα από την προσωπική μου εργασία φέρει και την δική του υπογραφή. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγητές του Πανεπιστημίου Κρήτης κ.κ. Γεώργιο Σαμώνη και Εμμανουήλ Γαλανάκη για την πολύπλευρη βοήθειά τους.

Ευχαριστώ επίσης τον κύριο Γεώργιο Γουλιέλμο, Καθηγητή Γενετικής στον οποίο οφείλω τη βαθμιαία εξοικείωση μου με τη μοριακή γενετική του ανθρώπου. όπως και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κα. Σοφία Αγγελάκη, κα. Σοφία Σχίζα, Αναπληρώτριες Καθηγήτριες της Ιατρικής Σχολής, και κ. Θεοδόση Φιλιππάτο, Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου μας. Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ στους κα. Μαρία Ζερβού, μέλος Ε.ΔΙ.Π. της Ιατρικής σχολής, κα. Βασιλική Δαράκη, Επιμελήτρια Α Ενδοκρινολογικής Κλινικής Πα.Γ.Ν.Η., κ. Ιωάννη Παπαδάκη, Διευθυντή ΕΣΥ Παθολογικής Κλινικής Πα.Γ.Ν.Η., κ. Γεώργιο Βρέντζο, Διευθυντή ΕΣΥ Παθολογικής Κλινικής Πα.Γ.Ν.Η., κα. Σοφία Μαράκη, Διευθύντρια ΕΣΥ Μικροβιολογικού Εργαστηρίου Πα.Γ.Ν.Η. για την πολύτιμη συνεργασία τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα την κυρία Μαρία Γοργομύτη για τις γνώσεις που μου προσέφερε και την ευχάριστη και δημιουργική συνεργασία μας, καθώς και του φίλους Ροδούλα Βαμβουκάκη, Αγγελική Ανδριανάκη, Ιπποκράτη Μεσσαριτάκη για την απλόχερη βοήθειά τους όποτε τους τη ζητούσα. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την ανεκτίμητη ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε και για την υπομονή που υπέδειξε στις δύσκολες στιγμές αυτού του όμορφου ταξιδιού. Σας ευχαριστώ πολύ όλους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Πολυμορφισμοί του γονιδίου της ιντερλευκίνης-6 και συσχέτισή τους με ανάπτυξη ΣΔ2 και επιπλοκών του σε διαφορετικούς πληθυσμούς.....	20
Πίνακας 2. SNPs, τύποι αλληλίων και αριθμοί αναφοράς του γονιδίου του <i>VDR</i>	26
Πίνακας 3. Μηχανισμοί διαταραχής ανοσολογικής απάντησης σε διαβητικούς ασθενείς.....	33
Πίνακας 4. Προδιαθεσικοί παράγοντες για ρινική φορεία σε <i>S. aureus</i>	37
Πίνακας 5. Κριτήρια διάγνωσης ΣΔ2.....	61
Πίνακας 6. Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους στον τελικό όγκο των 25 μl.....	62
Πίνακας 7. Συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης PCR στο θερμικό κυκλοποιητή.....	62
Πίνακας 8. Εκκινητές και συνθήκες PCR για τους SNPs του <i>VDR</i>	64
Πίνακας 9. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των 240 ΣΔ2 ασθενών με βάση το πρότυπο ρινικής φορείας.....	70
Πίνακας 10. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ατόμων στους οποίους πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs1800795 της <i>IL-6</i>	72
Πίνακας 11. Κατανομή αλληλίων και γονοτύπων του πολυμορφισμού rs1800795 της <i>IL-6</i> ανάμεσα στους ασθενείς με ΣΔ2 και τους μάρτυρες.....	73
Πίνακας 12. Συχνότητα αλληλίων και γονοτύπων του πολυμορφισμού rs1800795 -174 G/C της <i>IL-6</i> στους φορείς και μη-φορείς ΣΔ2 ασθενείς.....	74
Πίνακας 13. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των 118 ΣΔ2 ασθενών στους οποίους μετρήθηκαν 25(OH)D και LL-37 με βάση το πρότυπο ρινικής φορείας τους.....	75
Πίνακας 14. Επίπεδα ορού της LL-37 ανάλογα με τους γονοτύπους και τα αλληλία των τεσσάρων SNPs του <i>VDR</i>	82

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Ενεργοποιητές της φυσικής ανοσίας.....	15
Εικόνα 2. Μοντέλο δράσεων της IL6 που σχετίζονται με την παθογένεια του ΣΔ2.....	18
Εικόνα 3. Η επίδραση της βιταμίνης D στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	24
Εικόνα 4. Εξαρτώμενη από τη βιταμίνη D ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της καθελιδίνης μέσω του υποδοχέα TLR.....	25
Εικόνα 5. Ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες της LL-37.....	31
Εικόνα 6. Κύριοι μηχανισμοί μετάδοσης του <i>S. aureus</i> και επίδραση της ρινικής φορέας σε επακόλουθες λοιμώξεις.....	35
Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτικές ηλεκτροφορήσεις DNA μετά από πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο <i>Sfa</i> NI, ενδεικτικές των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs180095 -174G/C του γονιδίου <i>IL6</i>	63
Εικόνα 8. Επίπεδα ορού 25(OH)D ανάμεσα σε διαβητικούς ασθενείς και μάρτυρες.....	77
Εικόνα 9. Επίπεδα ορού βιταμίνης D σε διαβητικούς ασθενείς με βάση το πρότυπο ρινικής φορέας σε <i>S. aureus</i>	78
Εικόνα 10. Επίπεδα ορού βιταμίνης D σε διαβητικούς ρινικούς φορείς με βάση την ευαισθησία του <i>S. aureus</i>	78
Εικόνα 11. Το αντιμικροβιακό πεπτίδιο καθελιδίνη (LL-37) σε διαβητικούς ασθενείς με εμμένουσα, διαλείπουσα <i>S. aureus</i> ρινική φορεία και μη-φορεία.....	79
Εικόνα 12. Επίπεδα ορού της καθελιδίνης LL-37 σε διαβητικούς ρινικούς φορείς με βάση την ευαισθησία του <i>S. aureus</i>	80
Εικόνα 13. Συσχέτιση ανάμεσα στην 25-υδροξυβιταμίνη D και στην καθελιδίνη (LL-37) στους διαβητικούς μη-φορείς.....	81

Εικόνα 14. Συσχέτιση ανάμεσα στην 25-υδροξυβιταμίνη D και στην καθελιδίνη (LL-37) στους διαβητικούς ασθενείς που αποικίζονται με *S. aureus*.....81

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΣΔ: Σακχαρώδης Διαβήτης

ΣΔ2: Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2

TNF: Tumour Necrosis Factor

IL: Interleukin

TLRs: Toll-like Receptors

CRP: C-reactive protein

GWAS: Genome-wide Association Study

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

IL6R: Interleukin-6 receptor

PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

25(OH)D: 25-υδροξυβιταμίνη D

1,25(OH)₂D: 1,25-διυδροξυβιταμίνη D

VDR: Vitamin D Receptor

AMP: Antimicrobial Peptide

LL-37: Καθελσιδίνη

NFκB: Nuclear Factor kappa B

MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

hCAP18: human Cationic Antimicrobial Peptide 18

MSSA: Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*

ClfB: Clumping factor B

PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism

T2D: Type 2 Diabetes Mellitus

CLIA: Chemiluminescence Immunoassay

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Σακχαρώδης διαβήτης και φλεγμονή

Περίπου 463 εκατομμύρια ενήλικες πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) το 2019 παγκοσμίως, ενώ αναμένεται αύξηση του αριθμού των ασθενών σε 700 εκατομμύρια το 2045. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) αποτελεί τον πιο συχνό τύπο, ο επιπολασμός του οποίου έχει αυξηθεί δραματικά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες στις χώρες όλων των επιπέδων εισοδήματος (1). Η συγκεκριμένη νόσος σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα λόγω των μικρο- και μακροαγγειακών επιπλοκών και της ευπάθειας σε λοιμώξεις.

Ο ΣΔ2 είναι μια ετερογενής μεταβολική νόσος με κύριο χαρακτηριστικό την αντοχή των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη, ενώ η ανεπάρκεια ινσουλίνης είναι ελάχιστη έως μικρή. Η νόσος εμφανίζει πολυπλοκότητα που οφείλεται σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αρκετοί ερευνητές έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην παθογένεια της νόσου μελετώντας μηχανισμούς που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, κυρίως με την μη ειδική ανοσιακή απόκριση (innate immunity). Παρ' όλα αυτά μέχρι σήμερα οι μηχανισμοί που ενέχονται στην εμφάνιση της νόσου δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί.

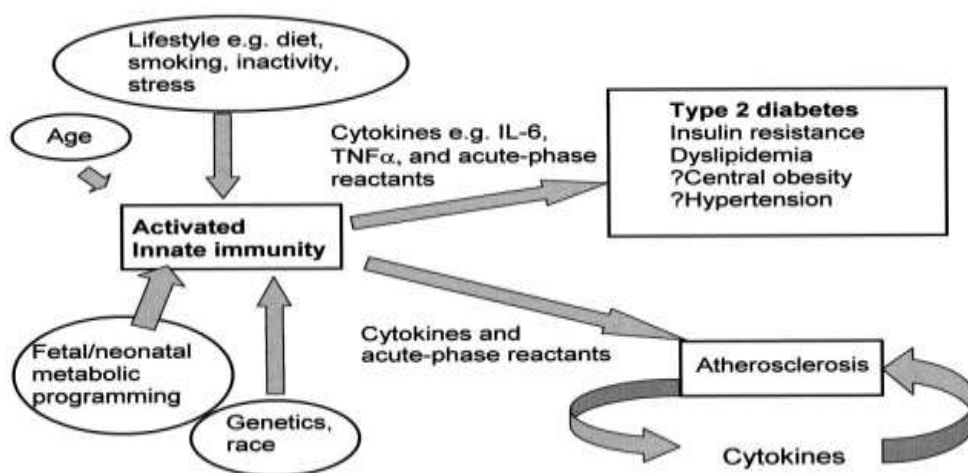
Η παχυσαρκία, που αποτελεί τον πιο συνηθισμένο προδιαθεσικό παράγοντα για ΣΔ2, χαρακτηρίζεται από χρόνια, αλλά χαμηλού βαθμού, υποκλινική φλεγμονή. Στο λευκό, ιδίως, λιπώδη ιστό εκκρίνονται κυτοκίνες και πολλές άλλες βιοδραστικές ουσίες που συμμετέχουν στα φλεγμονώδη μονοπάτια όπως ο Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α), οι ιντερλευκίνες (IL), όπως IL1 και IL6 καθώς και η λιπονεκτίνη, λεπτίνη και το αμυλοειδές του ορού. Η υποξία, η απόπτωση των λιποκυττάρων και η αυξημένη έκκριση χημειοκινών και λιποκινών οδηγούν σε διήθηση του λιπώδους ιστού από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, κυρίως μακροφάγα (2).

Τα διατροφικά λίπη ενεργοποιούν τους υποδοχείς Toll-like (Toll-like Receptors, TLRs) 2 και 4 οδηγώντας σε στρες του ενδοπλασματικού δικτύου στο λιπώδη ιστό, στο ήπαρ και στον υποθάλαμο και προκαλούν ενεργοποίηση ενδοκυττάρων κινασών σερίνης/θρεονίνης αναστέλλοντας τελικά τη σηματοδότηση της ινσουλίνης. Επιπρόσθετα, μέσω TLRs ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι του Nuclear Factor- κ B και επάγεται η μεταγραφή γονιδίων-μεσολαβητών της φλεγμονής και

απάντησης οξείας φάσης με αποτέλεσμα την παραγωγή και έκκριση κυτοκινών όπως ο TNF και ιντερλευκινών που ενισχύουν περαιτέρω την αντίσταση στην ινσουλίνη. Συμπερασματικά, το φαινόμενο της αντίστασης στην ινσουλίνη οφείλεται ενδεχομένως στην παθολογική ενεργοποίηση της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης (3).

Η απόπτωση λιποκυττάρων, ως απάντηση αυτής της μη ειδικής φλεγμονής στα λιπαρά οξέα, απελευθερώνει κρυπτικά αντιγόνα που μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια ανοχής στα αυτοαντιγόνα και ακολούθως σε ενεργοποίηση της επίκτητης αυτοανοσίας. Ωστόσο υπάρχουν ακόμα πολλά αναπάντητα ερωτήματα ως προς το ρόλο της αυτοανοσίας στην έναρξη ή εξέλιξη της φλεγμονής που σχετίζεται με την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ανάπτυξη ΣΔ2 (3).

Η υπόθεση της συμμετοχής της μη ειδικής ανοσιακής απόκρισης στην παθογένεια του ΣΔ2, όπως φαίνεται στην εικόνα 1, είχε προταθεί αρχικά το 1997 (4). Έκτοτε αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι κυκλοφορούντες δείκτες φλεγμονής, πρωτεΐνες οξείας φάσης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-Reactive Protein, CRP) και ιντερλευκίνες όπως η IL6 αποτελούν ισχυρές μεταβλητές πρόβλεψης για την ανάπτυξη ΣΔ2. Επιπρόσθετα έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση των δεικτών αυτών με άλλα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου, όπως υπέρταση, δυσλιπιδαιμία και αθηροσκλήρυνση (5).



Εικόνα 1. Ενεργοποιητές της φυσικής ανοσίας. Ορισμένοι παράγοντες όπως η διατροφή και η γενετική προδιάθεση είναι ενεργοποιητές της φυσικής ανοσίας. Η παραγωγή κυτοκινών οδηγεί σε

αντίσταση στην ινσουλίνη, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και άλλες συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου. Εικόνα από Pickup JC [5].

Η παρουσία κυτοκινών σε χαμηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της νόσου υποδηλώνει ότι η μεταβολικής αρχής φλεγμονή είναι χρόνια αλλά χαμηλού βαθμού σε αντίθεση με την κλασσική φλεγμονώδη διεργασία (6). Ενδιαφέρον παρουσιάζει κατά πόσο η επαγόμενη από κυτοκίνες φλεγμονώδης απάντηση προκαλεί το ΣΔ2 ή είναι δευτεροπαθής προερχόμενη από μία ή περισσότερες βιοχημικές και παθοφυσιολογικές διαταραχές της νόσου.

Η υπεργλυκαιμία θα μπορούσε να θεωρηθεί αίτιο της φλεγμονής στο ΣΔ2 και υπάρχουν δεδομένα υπέρ και κατά αυτής θεωρίας. Η μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε ασθενείς με ΣΔ2 συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων των δεικτών φλεγμονής. Σε δείγματα μη-διαβητικών ασθενών, τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης διέγειραν την παραγωγή IL6 σε μονοκύτταρα *in vitro*. Από την άλλη πλευρά, οι δείκτες οξείας φάσης δεν είναι υψηλοί σε διαβητικούς ασθενείς τύπου 1, στους οποίους ο βαθμός και η διάρκεια υπεργλυκαιμίας είναι ο ίδιος με ασθενείς με ΣΔ2. Επιπρόσθετα σε αρκετές προοπτικές μελέτες η πρόβλεψη ανάπτυξης ΣΔ2 βάσει υψηλών δεκτών φλεγμονής σε αρχικά μη-διαβητικά άτομα ήταν ανεξάρτητη των επιπέδων γλυκόζης αίματος. Επομένως η χρόνια υπεργλυκαιμία δεν επαρκεί για την επαγωγή φλεγμονής, εντούτοις συνεισφέρει σ' αυτήν, ενώ ο έλεγχος του γλυκαιμικού προφίλ μπορεί ενδεχομένως να τη μειώσει (5).

Πέρα από την αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, ο ΣΔ2 παρουσιάζει ισχυρή γενετική βάση, δεδομένου ότι άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Αναζητώντας γενετικούς παράγοντες που ενέχονται στην παθογένεια του ΣΔ2 έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που περιλαμβάνουν αναλύσεις σύνδεσης και προσεγγίσεις υποψηφίων γονιδίων, από τις οποίες έχουν καταγραφεί ομάδες γενετικών τόπων που σχετίζονται με τη νόσο (όπως KLF14, KCNQ1, DUSP9, FTO, HNF4A, IGF2BP2, CDKN2A/B, TCF7L2, KCNJ11 και PPAR γ). Την τελευταία δεκαετία, μελέτες γενετικής συσχέτισης σε γονιδιωματική κλίμακα (Genome-wide association studies, GWAS) με αυξανόμενα μεγέθη δείγματος έχουν ανακαλύψει 144 αλληλόμορφα σε 129 γενετικούς τόπους που οδηγούν σε ευπάθεια σε ΣΔ2 (7-8).

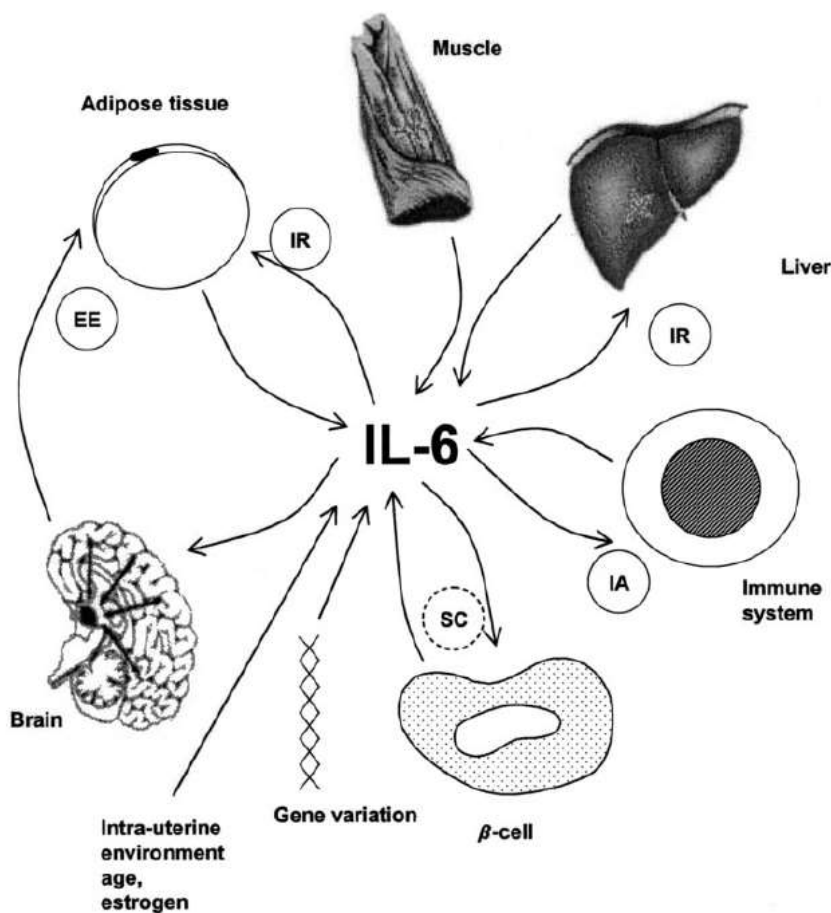
Οι γενετικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την εμφάνιση ΣΔ2 περιλαμβάνουν είτε ρυθμιστικούς μη-κωδικούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) είτε παρανοηματικές παραλλαγές που επηρεάζουν τη μετάφραση του κωδικονίου και οδηγούν σε αλλαγή του αμινοξέος σε μια πρωτεΐνη. Στην πλειοψηφία αφορούν γονίδια που συμμετέχουν στην φυσιολογική ομοιόσταση, όπως στη δράση και στην ευαισθησία της ινσουλίνης, στη λειτουργία και στον πολλαπλασιασμό των β-κυττάρων. Επιπρόσθετα έχουν βρεθεί σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων προ- και αντιφλεγμονωδών δεικτών που επηρεάζουν τα επίπεδα παραγωγής των δεικτών αυτών και ακολούθως την ένταση και το αποτέλεσμα της φλεγμονώδους απάντησης (8).

Ωστόσο, η αυξημένη συχνότητα αλληλίων, που αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων αυτών των δεικτών, δεν έχει σαφώς συσχετιστεί με την αυξημένη επίπτωση ΣΔ2. Πράγματι, διαφορετικές εθνότητες παρουσιάζουν διαφορετικές γενετικές παραλλαγές. Επιγενετικοί μηχανισμοί, όπως η μεθυλίωση του DNA, μπορούν επιπρόσθετα να εμπλακούν σε φλεγμονώδη μονοπάτια και να οδηγήσουν στην εμφάνιση ΣΔ2. Επομένως, μεγαλύτερες μελέτες θα πρέπει να διεξαχθούν σε διεθνές επίπεδο με απώτερο σκοπό την αναζήτηση θεραπειών σε γονίδια-στόχους (2).

1.2. Ιντερλευκίνη-6 ως προφλεγμονώδης κυτοκίνη

Η IL6 είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 184 αμινοξέων, η οποία συντίθεται και εκκρίνεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους όπως μονοκύτταρα, Τ κύτταρα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα, μυοκύτταρα, β-κύτταρα παγκρέατος και ενδοθηλιακά κύτταρα. Φυσιολογικά προσδένεται σε έναν ειδικό υποδοχέα (IL6R) που μπορεί να εντοπίζεται στην μεμβράνη του κυττάρου στόχου ή, έχοντας υποστεί πρωτεόλυση, να κυκλοφορεί ως διαλυτή μορφή. Μέσω της πρόσδεσης στο μεμβρανικό υποδοχέα, η IL6 ασκεί αντιφλεγμονώδεις, προστατευτικές και αναγεννητικές δράσεις ενώ το σύμπλεγμα της IL6 με το διαλυτό υποδοχέα παρουσιάζει συστηματικές προφλεγμονώδεις ιδιότητες ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Η συστηματική απάντηση της IL6 μέσω του διαλυτού μορίου του υποδοχέα της αναμένεται όταν τα επίπεδα της IL6 αυξηθούν σημαντικά ως απάντηση του οργανισμού σε προκλήσεις ομοιόστασης (9-10).

Η IL6 είναι μια κυτοκίνη με πλειοτρόπες, ανοσοτροποποιητικές και μη, δράσεις σε διάφορα όργανα-στόχους, όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Στις προφλεγμονώδεις δράσεις της περιλαμβάνεται η μετανάστευση των μακροφάγων στο λιπώδη ιστό οδηγώντας σε χρόνια φλεγμονή στους παχύσαρκους οργανισμούς. Έχει βρεθεί ότι ο αποκλεισμός του σηματοδοτικού μονοπατιού της IL6 μέσω του διαλυτού υποδοχέα της αναστέλλει πλήρως τη διήθηση των μακροφάγων στο λιπώδη ιστό, που αποτελεί τον ισχυρότερο προγνωστικό δείκτη αντίστασης στην ινσουλίνη στα παχύσαρκα άτομα (11-12).



Εικόνα 2. Μοντέλο των δράσεων της IL6 που σχετίζονται με την παθογένεια του ΣΔ2. Η έκφραση της IL6 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους καθορίζεται από γενετικές παραλλαγές, ενδομήτριο περιβάλλον, ηλικία και οιστρογόνα. Η IL6 επάγει την αντίσταση στην ινσουλίνη σε λιποκύτταρα και ηπατοκύτταρα, ενώ δρώντας συνεργιστικά με άλλες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες προκαλεί βλάβη στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Επιπρόσθετα, η IL6 ρυθμίζει την ενεργειακή δαπάνη μέσω επιδράσεων πιθανά στο κεντρικό νευρικό σύστημα. IA: ανοσολογική ενεργοποίηση, IR: αντίσταση στην

ινσουλίνη, SC: συνέργεια με προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, EE: ενεργειακή δαπάνη. Εικόνα από Kristiansen OP et al [13].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ακριβής επίδραση της IL6 στο μεταβολισμό της γλυκόζης στον άνθρωπο παραμένει άγνωστη. Ο Steensberg και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η οξεία (3ωρη) χορήγηση IL6 μέσω μηριαίας προσπέλασης σε υγιείς άνδρες δεν επέφερε αλλαγή στην παραγωγή γλυκόζης (14). Αντιθέτως, μια επιπρόσθετη μελέτη του Τσίγκου και των συνεργατών του σε 15 υγιείς άνδρες ανέδειξε ότι η χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IL6 οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων γλυκόζης αίματος χωρίς μεταβολή των επιπέδων ινσουλίνης και C-πεπτιδίου, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από πιθανή, μεσολαβούμενη από την IL6, αναστολή της διεγερόμενης από τη γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης (15).

Σε μελέτες ασθενών με ΣΔ2 έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως της IL6, στη συστηματική κυκλοφορία. Τα χρονίως αυξημένα επίπεδα της IL6 επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης που καταστέλλει τη σηματοδότηση των κυτοκινών 3, της οποίας η υπερέκφραση στα λιποκύτταρα και ηπατοκύτταρα αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (16-18). Επιπρόσθετα, διαταράσσουν τη δράση της ινσουλίνης στα λιποκύτταρα μειώνοντας την έκκριση λιπονεκτίνης, που αποτελεί ευαίσθητοποιητή της δράσης της ινσουλίνης (2). Επίσης, φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL6, μειώνουν την έκφραση των PPAR- γ στα μακροφάγα οδηγώντας σε αντίσταση στην ινσουλίνη σε ήπαρ και μυοσκελετικό σύστημα (19-20). Πέραν της συστηματικής αύξησης της IL6, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα τοπικά στα νησίδα του παγκρέατος με διακριτές επιδράσεις στην απόπτωση των α - και β -κυττάρων (10).

Τα ανωτέρω ευρήματα καθιστούν το γονίδιο της *IL6* ως εξαιρετικά ενδιαφέρον υποψήφιο γονίδιο για το ΣΔ2. Το γονίδιο της χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 7 (p15-p21). Μέχρι σήμερα, δεκάδες μελέτες έχουν εξετάσει τη συσχέτιση ανάμεσα στην ποικιλομορφία του συγκεκριμένου γονιδίου και την ανάπτυξη ΣΔ2. Ειδικότερα για τον υποκινητή του γονιδίου της *IL6* έχουν ελεγχθεί SNPs ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΣΔ2 σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες με αντικρουόμενα, όμως, αποτελέσματα, όπως φαίνεται στην πίνακα 1 (21).

Πίνακας 1. Πολυμορφισμοί του γονιδίου της ιντερλευκίνης-6 και συσχέτισή τους με ανάπτυξη ΣΔ2 και επιπλοκών του σε διαφορετικούς πληθυσμούς [21]

Gene variants (SNPs)	Diseases	Population-Ethnic groups	Association
-174 G/C	T2DM and OGTT	Brazilian	S
	T2DM and IR	American	S
	T2DM and obesity	Polish	S
	T2DM and obesity	Mexican	NS
	T2DM	Indian	S
	T2DM	Finnish	NS
	T2DM and Obesity	Tunisian	S
	T2DM	Caucasian	S
	T2DM	German	S
	DM, micro-, macrovascular complications	Australian	NS
	-do-	German	NS
	T2DM and IR	Italian	S
	T2DM	KORA Survey	S
	T2DM	Framingham Heart Study	S
	T2DM	KORA Survey	S
	T2DM	Taiwanese	S
	T2DM	Nutrition-Potsdam cohort	S
	T2DM	Finnish	S
	T2DM	Native Americans, Spanish, Caucasians	S
	T2DM and IR	Spanish	S
	T2DM and PAD	Italian	S
T2DM	KORA Survey	S	
DM and Periodontitis	Chinese	S	
T2DM and Endothelial Dysfunction	Chinese	S	
T2DM	21 studies	S	
T2DM	Boston	NS	
-597 A/G	T2DM	Canadian	S with Fasting
GWS (18 SNPs)	T2DM	Canadian	S with Fasting
PREDIAN study	DN	Spanish	S
Five tagging SNPs	T2DM and Impaired Renal Function	Singaporean	S

S: σημαντική, NS: μη σημαντική, T2DM:ΣΔ2, PAD: περιφερική αγγειοπάθεια, SNPs: μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, OGTT: από του στόματος δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, DM: ΣΔ, IR: αντίσταση στην ινσουλίνη, DN: διαβητική νεφροπάθεια

Ένας από τους κοινούς πολυμορφισμούς στον υποκινητή του γονιδίου της *IL6* (-174G>C, rs1800795) φαίνεται πως ρυθμίζει τη μεταγραφή, ως απάντηση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως

λιποπολυσακχαρίτες ή IL1. Το *IL6* -174G αλληλίο φαίνεται πως προκαλεί μεγαλύτερη δραστηριότητα του υποκινητή της *IL6* κατά 10.000 φορές, όπως και υψηλότερα επίπεδα IL6 στον ορό. Ωστόσο η ιδιότητα αυτή του αλληλίου έχει αμφισβητηθεί από διάφορες μελέτες. Ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου *IL6* -174G>C μπορεί, όπως αναφέρουν, να είναι "λειτουργικός", εντούτοις παράγοντες όπως ο απλότυπος του υποκινητή της *IL6*, η ηλικία, το φύλο, οι ορμόνες του φύλου, ο κυτταρικός τύπος καθώς και άλλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα αυτών των δυο διαφοροποιημένων υποκινητών (22-23).

Σε μια μελέτη GWAS, δεδομένα από 5601 περιπτώσεις ασθενών με ΣΔ2 και 17019 υγιείς μάρτυρες που προέκυψαν από 21 επιμέρους μελέτες συσχέτισης, έδειξαν συσχέτιση του πολυμορφισμού -174G>C με την ανάπτυξη ΣΔ2 (24). Αντιθέτως, καμία συσχέτιση δεν αποδείχθηκε μεταξύ του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και του ΣΔ2 σε μετα-ανάλυση που περιλάμβανε 5383 διαβητικούς ασθενείς και 12069 υγιή άτομα (25). Η εξήγηση σε αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα παραμένει άγνωστη.

Επιπλέον, η IL6 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση του ξενιστή σε λοιμώξεις από ιούς, βακτήρια και παράσιτα, μια ακόμα επιλοκή του ΣΔ2. Το 1987 αναγνωρίστηκε ως ο σημαντικότερος κυτοκινικός μεσολαβητής στην απόκριση οξείας φάσης στο ήπαρ. Μέσω της κλασικής οδού σηματοδότησης, επάγει την έκφραση πλειάδας πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα ηπατοκύτταρα κατά τη διάρκεια βακτηριακών λοιμώξεων και θεωρούνται προστατευτικές από κατακλυσμιαίες φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Επιπρόσθετα, η IL6 συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα της ανοσολογικής απάντησης, από τη διήθηση ουδετεροφύλων στις εστίες λοιμώξεων μέχρι τη διαμόρφωση της T κυτταρικής απάντησης (26-27).

Έχει βρεθεί ότι η IL6 υπερεκφράζεται πρώιμα σε βακτηριαμία από *Staphylococcus aureus* και αποτελεί δείκτη σοβαρότητας της νόσου δεδομένου ότι τα υψηλότερα επίπεδα αυτής στο αίμα σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση (28). Επιπρόσθετα, η θεραπεία με παράγοντες που στοχεύουν την IL6, έχει συσχετιστεί με άτυπη συμπτωματολογία από σοβαρές βακτηριακές λοιμώξεις, όπως *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* και *Streptococcus pneumoniae*. Επίσης, ελλείματα

στο σηματοδοτικό μονοπάτι της IL6, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη αποστημάτων από παθογόνα όπως *S. pneumoniae* και *S. aureus* (26,29).

1.3. Ο ρόλος της βιταμίνης D στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης

Η βιταμίνη D (καλσιφερόλη) είναι ένα λιποδιαλυτό στεροειδές, του οποίου οι κυριότερες μορφές είναι η βιταμίνη D2 (εργοκαλσιφερόλη) και η D3 (χοληκαλσιφερόλη). Η βιταμίνη D2 προέρχεται από την εργοστερόλη σε φυτά ή μύκητες μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας, ενώ η βιταμίνη D3 προέρχεται από την 7-δεϋδροχοληστερόλη στο δέρμα επίσης μετά από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τόσο η D2 όσο και η D3 δρουν ως προ-ορμόνες, οι οποίες μόλις ενεργοποιηθούν ασκούν την ίδια βιολογική δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, οι βιταμίνες D2 και D3 υφίστανται υδροξυλίωση στο ήπαρ μέσω του ενζύμου CYP27A1 και μετατρέπονται σε 25-υδροξυβιταμίνη D [25(OH)D]. Αυτή η μορφή της βιταμίνης D κυκλοφορεί στο αίμα, έχει χρόνο ημίσειας ζωής 3 εβδομάδες και, λόγω του μεγάλου χρόνου ημίσειας ζωής, χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της επάρκειας σε βιταμίνη D. Όταν αυτό απαιτείται, η 25(OH)D μετατρέπεται μέσω του ενζύμου CYP27B1 στη βιοδραστική μορφή 1,25-διυδροξυβιταμίνη D [1,25(OH)₂D]. Η μετατροπή αυτή γίνεται κυρίως στους νεφρούς, αλλά και τοπικά σε κύτταρα που εκφράζουν το ένζυμο (30-31).

Εξωνεφρική παραγωγή της βιταμίνης D πραγματοποιείται στα οστά, στα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, στους πνεύμονες, στο κόλον, στους παραθυρεοειδείς αδένες και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ειδικά τα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων μέσω των TLRs ή της ιντερφερόνης- γ οδηγεί σε παραγωγή CYP27B1 και ακολούθως σε 1,25(OH)₂D ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της 25(OH)D. Σε αντίθεση με τα νεφρικά σωληνάρια, τα μακροφάγα δεν περιορίζουν την παραγωγή σε 1,25(OH)₂D με αποτέλεσμα η συνεχής ενεργοποίησή τους να συνεπάγεται συσσώρευση βιταμίνης D (30).

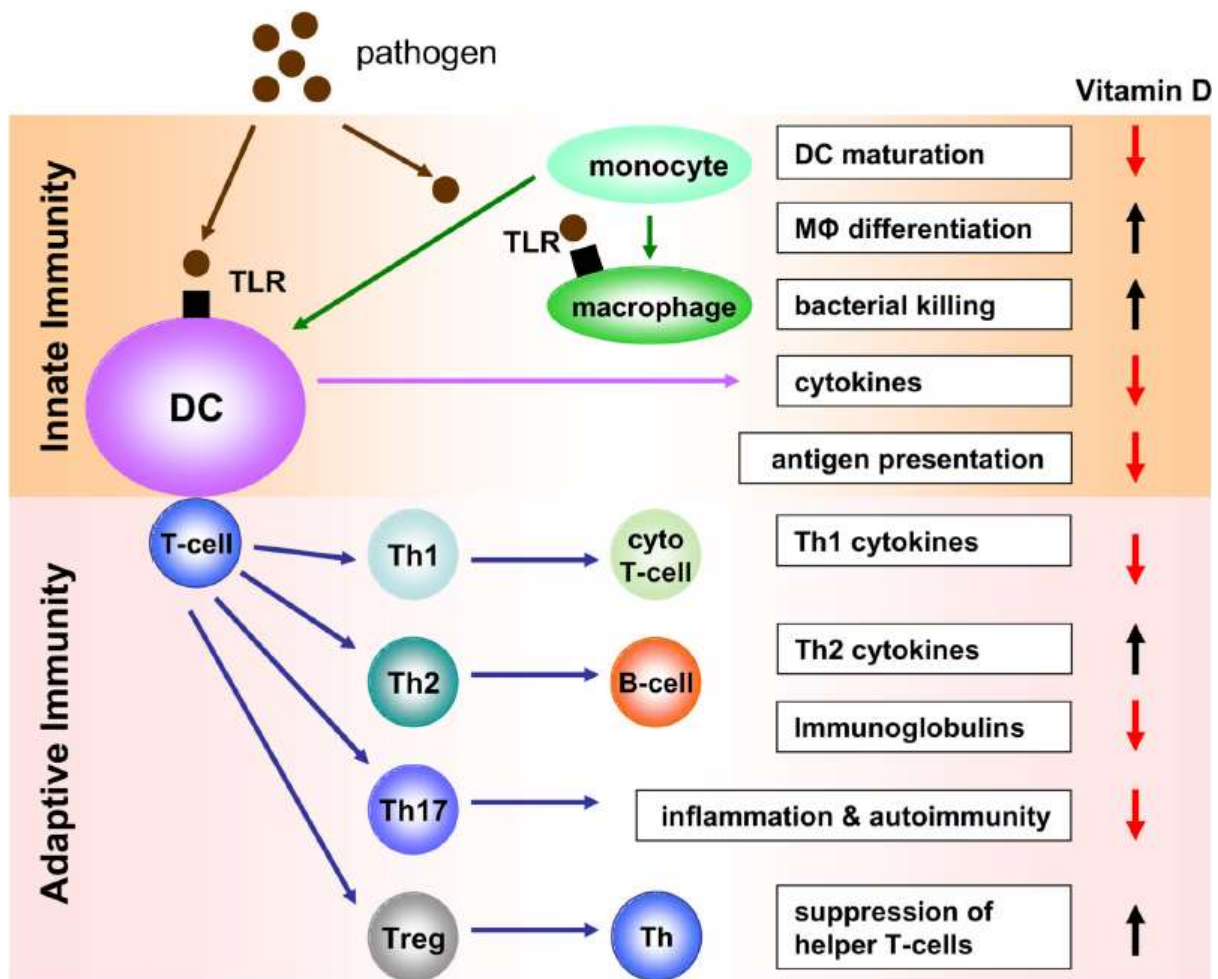
Οι γενωμικές δράσεις της 1,25(OH)₂D μεσολαβούνται από τον υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR), ένα ενδοκυττάριο μεταγραφικό παράγοντα που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών/ορμονών. Τα γονίδια στόχοι περιέχουν στους υποκινητές τους στοιχεία

απόκρισης της βιταμίνης D, όπου συνδέονται τα ετεροδιμερή των VDR και των υποδοχέων του ρετινοειδούς X και ενεργοποιείται η έκφρασή τους. Ο VDR εκφράζεται σε τουλάχιστον 30 διαφορετικούς ιστούς και ρυθμίζει την έκφραση περισσότερων από 900 γονίδια, καθιστώντας τη βιταμίνη D απαραίτητο συστατικό για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού (31).

Η σημασία της βιταμίνης D και του ενεργού μεταβολίτη της, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, στη φυσική και επίκτητη ανοσολογική απάντηση (εικόνα 3) ανεδείχθη με την ανακάλυψη της έκφρασης του VDR στη πλειονότητα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των ενεργοποιημένων CD4^+ και CD8^+ T κυττάρων, B κυττάρων, ουδετεροφίλων και αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, όπως μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα (31). Έχει βρεθεί ότι μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα εν ηρεμία εκφράζουν τον VDR ενδοκυττάρια, ενώ τα T και B κύτταρα στην ηρεμία τον εκφράζουν λίγο ή καθόλου. Αντιθέτως, η έκφραση του VDR στα T κύτταρα πενταπλασιάζεται μετά την ενεργοποίησή τους (32).

Η βιταμίνη D συμμετέχει σε αρκετές διεργασίες της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης. Αρχικά συμμετέχει στη διατήρηση φραγμού στο έντερο ρυθμίζοντας τις αποφρακτικές συνδέσεις και την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων στο έντερο. Επιπρόσθετα, τα στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D εντοπίζονται σε αρκετά γονίδια αντιμικροβιακών πεπτιδίων (antimicrobial peptides, AMPs), όπως της εψιδίνης, της καθελισιδίνης (LL-37) και της β-ντεφενσίνης-2. Είναι γνωστό, επίσης, ότι η βιταμίνη D ρυθμίζει τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας επηρεάζοντας την ωρίμανση και το μεταβολισμό των κυττάρων, την αντιγονοπαρουσίαση, την παραγωγή και απόκριση σε κυτοκίνες και χημειοκίνες (33).

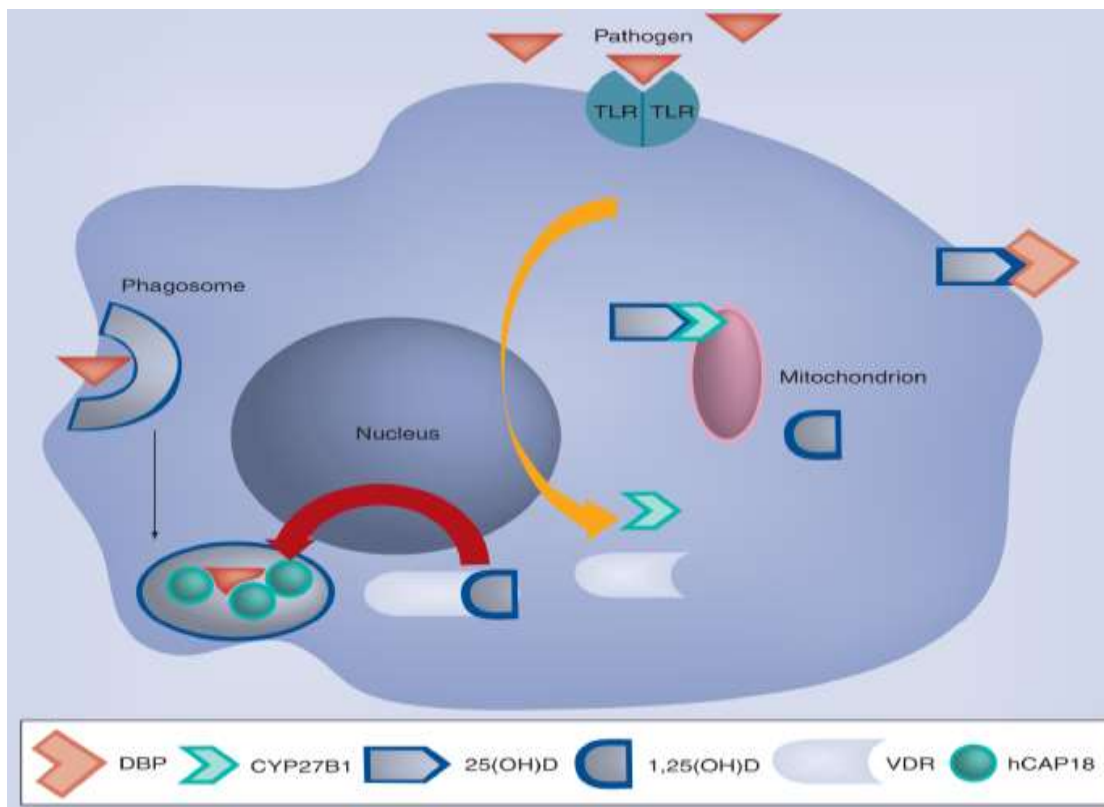
Παράλληλα, σημαντικός είναι ο ρόλος της βιταμίνης D στην επίκτητη ανοσολογική απάντηση. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ρυθμίζει το φαινότυπο των T κυττάρων καταστέλλοντας τα CD4^+ T βοηθητικά κύτταρα που εκφράζουν την IL17 και τα T βοηθητικά 1 κύτταρα, ενώ προάγει τη διαφοροποίηση των T βοηθητικών 2 κυττάρων και των ρυθμιστικών T κυττάρων. Επίσης ρυθμίζει τη δράση κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων με σημαντική επίδραση στην ενεργοποίηση των κυττάρων φυσικών φονέων (34).



Εικόνα 3. Η επίδραση της βιταμίνης D στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σχηματική αναπαράσταση των αρχικών αποκρίσεων της φυσικής και επίκτητης ανοσολογικής απάντησης σε ένα παθογόνο και η θετική ή αρνητική ρύθμιση αυτών των αποκρίσεων από τη βιταμίνη D. TLR: υποδοχέας Toll-like, DC: δενδριτικό κύτταρο, ΜΦ: μακροφάγο, T-cell: T-λεμφοκύτταρο, cyto T-cell: κυτταροτοξικό T-λεμφοκύτταρο, B-cell: B-λεμφοκύτταρο, Th: βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο, Treg: ρυθμιστικό T-λεμφοκύτταρο. Εικόνα από Hewison M et al [35].

Η βιταμίνη D φαίνεται, επομένως, πως επηρεάζει την επιρρέπεια και τη σοβαρότητα σε λοιμώδεις καταστάσεις μέσω πολλαπλών ανοσορυθμιστικών μηχανισμών. Άμεσα επιδρά, τόσο στην παραγωγή AMPs, όσο και κυτοκινών, μέσω της φυσικής και επίκτητης ανοσολογικής απάντησης, αλλά και μέσω του μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα NFκB (36). Η ανεπάρκεια σε βιταμίνη D μπορεί να οδηγήσει σε ένα προφλεγμονώδη φαινότυπο, αυξάνοντας την επίπτωση και τη σοβαρότητα των λοιμώξεων.

Ο Liu και οι συνεργάτες του, το 2006, περιέγραψαν την ενίσχυση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των ανθρωπίνων μονοκυττάρων/μακροφάγων προς το *Mycobacterium tuberculosis* από τη βιταμίνη D. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν *in vitro* ότι η σηματοδότηση του TLR2/1 σε μονοκύτταρα/μακροφάγα από ένα συνθετικό πολυπεπίδιο 19kD προερχόμενο από το *M. tuberculosis* επάγει την έκφραση του ενζύμου CYP27B1 που μετατρέπει την κυκλοφορούσα αδρανή 25(OH)D στην βιοδραστική μορφή 1,25(OH)₂D. Επιπρόσθετα αυξάνεται η έκφραση του VDR και, παρουσία υψηλών επιπέδων 1,25(OH)₂D τοπικά, επάγεται η έκφραση του γονιδίου της καθελιδίνης, όπως φαίνεται στην εικόνα 4 (37).



Εικόνα 4. Εξαρτώμενη από τη βιταμίνη D ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της καθελιδίνης μέσω του υποδοχέα TLR. Όταν ένα παθογόνο ανιχνεύεται από τον αντίστοιχο TLR, επάγεται η έκφραση των γονιδίων *CYP27B1* και *VDR*. Αυτό οδηγεί στην 1-α-υδροξυλίωση της 25(OH)D, που προσλαμβάνεται από τη συστηματική κυκλοφορία (σύμπλεγμα με τη δεσμευτική πρωτεΐνη βιταμίνης D) και ακολούθως στη σύνδεση της 1,25(OH)₂D με τον υποδοχέα VDR. Το γονίδιο της καθελιδίνης ενεργοποιείται με αποτέλεσμα να συντίθεται το AMP που στρέφεται έναντι

του παθογόνου που έχει συγχωνευτεί στο φαγόσωμα του μακροφάγου. TLR: υποδοχέας Toll-like, VDR: υποδοχέας βιταμίνης D, DBP: δεσμευτική πρωτεΐνη βιταμίνης D, hCAP18: καθελιδίνη. Εικόνα από Gombart AF [30].

Πέραν του μικροβίου *M. tuberculosis*, η βιταμίνη D είναι απαραίτητη για την ανοσολογική απόκριση απέναντι σε διάφορους μικροοργανισμούς, όπως τον ιό της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου και τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο. Σε μια ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης, ασθενείς με έλλειψη βιταμίνης D παρουσίαζαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο φορέας (OR: 2.04; 95% CI: 1.09-3.84) από *S. aureus* ανθεκτικό στη μεθισιλίνη (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) (38). Ωστόσο, η χορήγηση βιταμίνης D δε φαίνεται να έχει επίδραση στη φορεία από MRSA (39).

SNPs στο γονίδιο του VDR μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στο μεταβολισμό της βιταμίνης D και σε διαταραχές στην ανοσιακή απάντηση σε λοιμώξεις. Η παρουσία τους έχει περιγραφεί χρησιμοποιώντας διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα. Παραδείγματα αποτελούν οι *TaqI*, *BsmI*, και *ApaI* που εντοπίζονται σε μια περιοχή με άγνωστη λειτουργία ανάμεσα στα εξώνια 8 και 9 (πίνακας 2). Μια διαφορετική περίπτωση είναι εκείνη του πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικού τμήματος *FokI*. Αυτός ο πολυμορφισμός εντοπίζεται στο εξώνιο 2 και αποτελείται από αλλαγή της βάσης T σε C σε ένα κωδικόνιο έναρξης. Παρουσία του αλληλίου C χρησιμοποιείται μια εναλλακτική θέση έναρξης που οδηγεί σε διαφορετικού μεγέθους πρωτεΐνη. Τα περισσότερα πειράματα που έχουν διεξαχθεί έως σήμερα σημειώνουν ότι η μικρότερη μορφή της πρωτεΐνης (424 αμινοξέα) είναι πιο ενεργή από τη μακρύτερη (427 αμινοξέα), ανάλογα βέβαια το γονίδιο και το κύτταρο στόχο (40).

Πίνακας 2. SNPs, τύποι αλληλίων και αριθμοί αναφοράς του γονιδίου του VDR [41]

SNP	Allele type	Ref. number
ApaI	a allele: T → G transition in intron 8	rs7975232
BsmI	b allele: G → A transition	rs1544410
FokI	f allele: C → T transition at the junction of intron 1 and exon 2	rs10735810
TaqI	t allele: silent T → C transition in exon 9	rs731236

Οι παραπάνω τέσσερις πολυμορφισμοί του γονιδίου του *VDR* έχουν μελετηθεί σε σχέση με λοιμώξεις και έχει βρεθεί συσχέτιση του λειτουργικού πολυμορφισμού *FokI*, μεταξύ άλλων, με τη φυματίωση αλλά και με τη ρινική φορεία σε *S. aureus* (41-42). Ο *FokI* πολυμορφισμός μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία του *VDR* οδηγώντας σε διαφορετικό βαθμό συγγένειας με τη βιταμίνη D, που ενδεχομένως μπορεί να επηρεάσει στη συνέχεια την παραγωγή πεπτιδίων, όπως η καθελιδίνη.

Η βιταμίνη D, εκτός από τις ανοσορυθμιστικές της δράσεις, εμφανίζει επιπρόσθετα προστατευτική δράση ως προς την εμφάνιση ΣΔ2. Συγκεκριμένα, επάγει την έκκριση ινσουλίνης και προωθεί την επιβίωση των παγκρεατικών β-κυττάρων, ενώ παράλληλα ενισχύει την ευαισθησία στην ινσουλίνη διεγείροντας την έκφραση των υποδοχέων ινσουλίνης και ενεργοποιώντας τους υποδοχείς PPAR-δ. Επομένως, η απώλεια αυτών των ιδιοτήτων, επί ανεπάρκειας της βιταμίνης D, πιθανώς να εξηγεί την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και ΣΔ2 (43-45).

1.4. Η καθελιδίνη, ένα ενδογενές αντιμικροβιακό πεπτίδιο

Το σύστημα της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα κατά των παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς και στην έναρξη των φλεγμονωδών απαντήσεων. Τα AMPs αποτελούν ένα εξελικτικά διατηρημένο μηχανισμό άμυνας έναντι βακτηριακών και μυκητικών προσβολών των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ενώ υπάρχουν αρκετές τάξεις AMPs, η LL-37 αποτελεί

το μοναδικό μέλος της οικογένειας των καθελιδινών στον άνθρωπο. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας διότι, πέραν των αντιμικροβιακών του ιδιοτήτων, παρουσιάζει πολυάριθμες ανοσοτροποποιητικές δράσεις (46).

Η LL-37 είναι ένα κατιονικό πεπτίδιο 37 αμινοξέων που προκύπτει από την εξωκυττάρια αφαίρεση του C-τερματικού άκρου της πρωτεΐνης της καθελιδίνης (human Cationic Antimicrobial Peptide 18, hCAP18) 18kDa από πρωτεάσες σερίνης της οικογένειας των καλλικρεϊνών στα κερατινοκύτταρα και από την πρωτεΐνάση 3 στα ουδετερόφιλα (47-48). Η LL-37 σχηματίζει συσσωματώματα και, σε αντίθεση με άλλα AMPs, προστατεύεται από πρωτεολυτική αποδόμηση. Το θετικό φορτίο της επιτρέπει την σύνδεση με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Κατά την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη λαμβάνει διάταξη α -έλικας οδηγώντας σε ετερόπλευρο διαχωρισμό των υδρόφοβων αμινοξέων της. Αυτό επιτρέπει τη διείσδυση στη μεμβράνη, το σχηματισμό διαμεμβρανικών πόρων και τη λύση των βακτηριακών κυττάρων (49). Αντιθέτως, οι κυτταρικές μεμβράνες των θηλαστικών, που έχουν ως κύριο συστατικό τη χοληστερόλη, προστατεύονται από αυτή τη δράση της LL-37.

Η LL-37 εκφράζεται ιδιοσυστασιακά στα δευτερογενή κοκκία των ουδετεροφίλων (47). Ωστόσο παράγεται και σε πολλούς άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως τα μακροφάγα, τα κύτταρα φυσικούς φονείς, τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, του αναπνευστικού συστήματος και του εντέρου. Η ρύθμιση της έκφρασής της ελέγχεται από φλεγμονώδη μονοπάτια, το μονοπάτι της βιταμίνης D και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (46). Η υπερπαραγωγή της LL-37 απαντάται συχνότερα από την αναστολή της σύνθεσής της, αναδεικνύοντας το βοηθητικό ρόλο της LL-37 στην καταπολέμηση των διαφόρων ασθενειών (50).

Η LL-37 αρχικά έγινε γνωστή για τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες. Παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δραστηριότητας έναντι βακτηρίων, μυκήτων και ιών, με μικροβιοκτόνο δράση σε διάφορα είδη και στελέχη (51). Ωστόσο, η δράση της εξαρτάται από το μέσο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς της. Πράγματι, αρκετές μελέτες έχουν δείξει απογοητευτικές τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της LL-37 *in vitro* παρουσία άλατος, τεχνητών δακρύων ή ορού (49).

In vitro η LL-37 είναι αποτελεσματική σε Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς όπως *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* και *Neisseria gonorrhoeae* με εύρος δραστηριότητας 0.5–10 μΜ. Για τα Gram θετικά παθογόνα, αναφέρεται *in vitro* αποτελεσματικότητα μεταξύ άλλων σε *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. *Bacillus* spp. *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria monocytogenes* και *Propionibacterium acnes* με εύρος δραστηριότητας 0.5-20μΜ. Είναι, ωστόσο, δύσκολο να αξιολογηθεί η σχετική δραστηριότητα σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς προερχόμενη από διαφορετικές μελέτες, δεδομένης της χρήσης διαφορετικού μέσου και διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού (49).

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η LL-37 αναστέλλει το σχηματισμό βιομεμβράνης από διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα, αποτρέπει το σχηματισμό βιομεμβράνης από την *P. aeruginosa* με πολλαπλούς τρόπους, όπως αποτρέποντας την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων, διεγείροντας την κινητικότητα συστροφής και αναστέλλοντας την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την ανάπτυξη βιομεμβράνης. Επομένως πέραν της άμεσης βακτηριοκτόνου δράσης, η LL-37 συμμετέχει στην άμυνα του ξενιστή μέσω παρεμβολής στο σχηματισμό βιομεμβράνης (52).

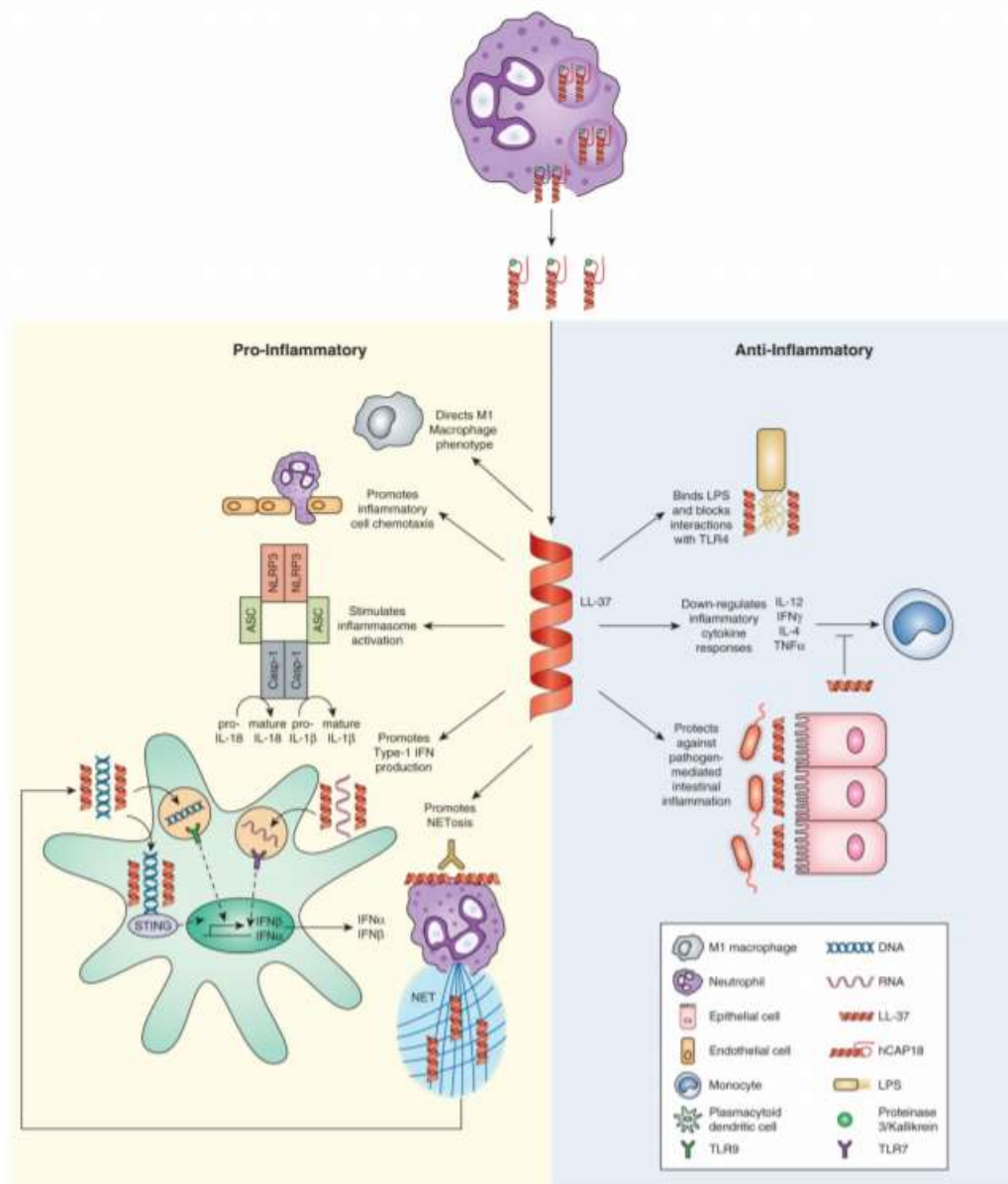
Από την άλλη πλευρά, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να υπερνικήσουν την προστατευτική δράση της LL-37. Ειδικότερα, τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος όπως τον λιποπολυσακχαρίτη και το λιποτεichoϊκό οξύ προκειμένου να μειωθεί η ηλεκτροστατική έλξη που οδηγεί το πεπτιδίο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μια άλλη στρατηγική που χρησιμοποιούν συχνά τα βακτήρια είναι η έκκριση πρωτεασών. Μέχρι τώρα έχει γίνει αναφορά ότι τα βακτήρια *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, και ο μύκητας *Candida albicans* παράγουν εξωκυττάρια πρωτεάσες που αποδομούν τόσο την LL-37 όσο και τις ντεφενσίνες (53).

Ειδικότερα για τον *S. aureus*, που αποτελεί ένα συχνό αίτιο βακτηριακών λοιμώξεων, έχει βρεθεί ότι η LL-37 έχει τη δυνατότητα να τον θανατώσει γρήγορα όταν ανευρίσκεται εξωκυττάρια. Συγκρίνοντας πειραματικά την LL-37 με τη λακτοφερρίσίνη B, τη κεφαζολίνη και τη δοξκυκλίνη, η

LL-37 αποτελούσε τον ισχυρότερο αντιμικροβιακό παράγοντα έναντι του εξωκυττάριου χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα της LL-37 να θανατώσει και την ενδοκυττάρια μορφή του. Πράγματι, σε μελέτη των Noore και συνεργατών βρέθηκε ότι η LL-37 σε συγκέντρωση 100μΜ εξάλειψε τον ενδοκυττάριο *S. aureus* εντός μόλις 2 ωρών, ενώ η κεφαζολίνη και η κλινδαμυκίνη εξάλειψαν μόνο το 2% και 23% αντίστοιχα. Ωστόσο, λόγω της ενδοκυττάριας φύσης του παθογόνου, χρειάστηκε υψηλότερη συγκέντρωση της LL-37 (100μΜ έναντι 3μΜ) στη θανάτωση του ενδοκυττάριου έναντι του εξωκυττάριου *S. aureus* (54).

Αντιθέτως, ο MRSA, συγκριτικά με τα στελέχη του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου που είναι ευαίσθητα στη μεθισιλίνη (Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) εμφανίζει αυξημένη αντίσταση στην καθελιδίνη και αυτή η αύξηση σχετίζεται τόσο με το επίπεδο αντοχής στη μεθισιλίνη όσο και με το βακτηριακό φορτίο. Πιο συγκεκριμένα, η LL-37 φέρει χαμηλό κατιονικό φορτίο, ενώ τα στελέχη του MRSA έχουν υψηλό δυναμικό ζήτα με αποτέλεσμα μικρή αλλαγή στο βακτηριακό φορτίο να είναι ικανή να αποδυναμώσει την προσκόλληση της LL-37 στην κυτταρική επιφάνεια (55). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν συνθετικά πεπτίδια προερχόμενα από την LL-37, τα οποία έχουν αποδειχτεί ικανότερα στην αντιμετώπιση του MRSA, διατηρώντας παράλληλα τις ωφέλιμες ιδιότητές της LL-37 (56).

Πέρα από την αντιμικροβιακή της δραστηριότητα, η LL-37 συμμετέχει ενεργά στη φλεγμονή εμφανίζοντας ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες, όπως φαίνεται στην εικόνα 5. Συγκεκριμένα, κατευθύνει τη δράση των διαφοροποιημένων μακροφάγων προς το φαινότυπο M1, επηρεάζοντας σημαντικά την ανάπτυξη των μακροφάγων και την παραγωγή κυτοκινών. Ενισχύει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών μεσολαβούμενη από τη σηματοδότηση της IL1β, ενώ παράλληλα ανταγωνίζεται τη δράση της ιντερφερόνης-γ, του TNF-α, των ιντερλευκινών IL4 και IL12 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους ασκώντας αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Αντιφλεγμονώδης ιδιότητα της LL-37 αποτελεί και η τροποποίηση της λειτουργίας των υποδοχέων TLR. Επιπρόσθετα παρουσιάζει χημειοτακτικές ιδιότητες είτε μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G είτε μέσω παραγωγής χημειοκινών. (46).



Εικόνα 5. Ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες της LL-37. Μετά τη διέγερση από προφλεγμονώδη σήματα, η hCAP18 απελευθερώνεται εξωκυττάρια και με τη δράση πρωτεασών προκύπτει τελικά το πεπτίδιο της LL-37. Η έκθεση στην LL-37 οδηγεί στην επιστράτευση των φλεγμονωδών κυττάρων, στην επαγωγή των μακροφάγων M1 και στη διέγερση των φλεγμονωδών αποκρίσεων, όπως η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος και η παραγωγή ιντερφερόνης τύπου 1. Παράλληλα, η LL-37, που εκφράζεται στα ουδετερόφιλα, αναγνωρίζεται από αντί-LL-37 αυτοαντισώματα και προάγει τη NETωση, μια νέα μορφή κυτταρικού θανάτου. Αντιθέτως, η LL-37 παρουσιάζει ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, όπως η εξουδετέρωση της ενεργοποίησης του TLR4 από

λιποπολυσακχαρίτες, η αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση αποκρίσεων φλεγμονωδών κυτοκινών και η αποτροπή εισβολής παθογόνων μικροοργανισμών. Εικόνα από Kahlenberg et al [46].

Στόχος των ανοσοτροποποιητικών δράσεων της LL-37 αποτελούν, μεταξύ άλλων, τα παγκρεατικά νησίδια. Η θεραπεία παγκρεατικών νησιδίων ποντικών *in vitro* με ανθρώπινη LL-37 είχε ως αποτέλεσμα την αναγέννηση β-κυττάρων και τη διέγερση έκκρισης ινσουλίνης και γλυκαγόνης, ενισχύοντας την επικοινωνία μεταξύ των νησιδίων και τη ρύθμιση της γλυκόζης. Παρουσιάζοντας εν γένει ενεργό ρόλο στη λειτουργία των νησιδίων του παγκρέατος, η LL-37 ενδεχομένως συμμετέχει στην παθογένεια του διαβήτη (57). Πράγματι, σε ασθενείς με ΣΔ2 έχουν παρατηρηθεί χαμηλά επίπεδα της LL-37, γεγονός που μπορεί επιπρόσθετα να συνεισφέρει στον υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης λοιμώξεων σε αυτήν την ομάδα ασθενών (58).

1.5. Ευπάθεια ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη σε λοιμώξεις

Ένα μείζον πρόβλημα στους διαβητικούς ασθενείς είναι η επιρρέπεια σε λοιμώξεις. Ειδικότερα, τα μη επουλωμένα έλκη αποτελούν συνήθεις πύλες εισόδου παθογόνων που προκαλούν εν τω βάθει λοιμώξεις δέρματος, μαλακών μορίων και οστών, λοιμώξεις συχνά δύσκολα θεραπεύσιμες. Αυτές οι επιπλοκές ανήκουν στις πιο συχνές αιτίες νοσηλείας που σχετίζονται με ΣΔ2. Μολονότι οι διαβητικοί ασθενείς αποικίζονται με πολυμικροβιακή χλωρίδα, ο *S. aureus* είναι το πιο συχνό παθογόνο και θεωρείται ότι συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη λοιμώξεων (59).

Πιθανοί μηχανισμοί διαταραχής ανοσολογικής απάντησης σε ασθενείς με ΣΔ2 αναφέρονται στον πίνακα 3. Εξεσημασμένη αλλαγή παρατηρείται στη λειτουργία των λευκοκυττάρων η οποία θεωρείται αποτέλεσμα της υπεργλυκαιμίας, δεδομένου ότι παύει να υφίσταται επί επαρκούς γλυκαιμικού ελέγχου. Είναι γνωστό επίσης ότι, παρουσία υψηλών τιμών γλυκόζης αίματος, τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα είναι συνεχώς ενεργοποιημένα και αντιδρούν λιγότερο σε λοιμώδη ερεθίσματα. Επιπρόσθετα τα χρονίως αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών συνεισφέρουν στην ανεπαρκή ανοσολογική απάντηση σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Τέλος, η μετανάστευση

των λευκοκυττάρων στην εστία λοίμωξης διαταράσσεται ως αποτέλεσμα της παρατεταμένης υποκλινικής φλεγμονής που οδηγεί σε πάχυνση της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών (60).

Πίνακας 3. Μηχανισμοί διαταραχής ανοσολογικής απάντησης σε ασθενείς με ΣΔ2 [60]

Humoral mechanisms	Cellular mechanisms
Decreased levels of complement C4 Increased background levels of tumour necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-8 with impaired response to stimulation	Impaired polymorphonuclear cell and neutrophil chemotaxis and phagocytosis Impaired killing by polymorphonuclear cells Decreased lymphocyte proliferative response to pathogens including <i>Staphylococcus aureus</i>

Επιπρόσθετα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει την ευπάθεια σε λοιμώξεις. Η γλουταθειόνη, που ανευρίσκεται σε αναχθείσα και οξειδωμένη μορφή, αποτελεί ρυθμιστή του στρες στα διάφορα κύτταρα του οργανισμού. Ο μειωμένος λόγος της αναχθείσας προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη, τον οποίο παρουσιάζουν ασθενείς με ΣΔ2 και φτωχό γλυκαιμικό έλεγχο, είναι ενδεικτικός οξειδωτικού στρες. Αυτό αποδίδεται σε διάφορους μηχανισμούς, όπως η μετατροπή της αυξημένης γλυκόζης σε σορβιτόλη μέσω του μονοπατιού της πολυόλης καταναλώνοντας NADPH. Το NADPH είναι συμπράγοντας που απαιτείται για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης, επομένως η κατανάλωσή του επηρεάζει την παραγωγή της αναχθείσας μορφής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της παραγωγής της IL12 και της ιντερφερόνης- γ , που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των ενδοκυττάρων βακτηριακών λοιμώξεων (61).

Μια σειρά μελετών έχει αναδείξει τον αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης σε ασθενείς με ΣΔ. Οι Shah και Hux διεξήγαγαν μια αναδρομική μελέτη κοόρτης στο Οντάριο με περισσότερους από 500.000 διαβητικούς ασθενείς, εκ των οποίων σχεδόν οι μισοί διαβητικοί ασθενείς είχαν τουλάχιστον μία νοσηλεία ή επίσκεψη σε ιατρό για λοιμώδες αίτιο κατά το έτος της μελέτης (risk ratio (RR)=1.21; 95% CI 1.20-1.22 σε σχέση με μη-διαβητικούς ασθενείς). Επιπλέον ο κίνδυνος για κάθε τύπο λοίμωξης που μελετήθηκε ήταν υψηλότερος στους διαβητικούς ασθενείς, ιδιαίτερα για οστεομυελίτιδα, μετεγχειρητικές λοιμώξεις και κυτταρίτιδα (62).

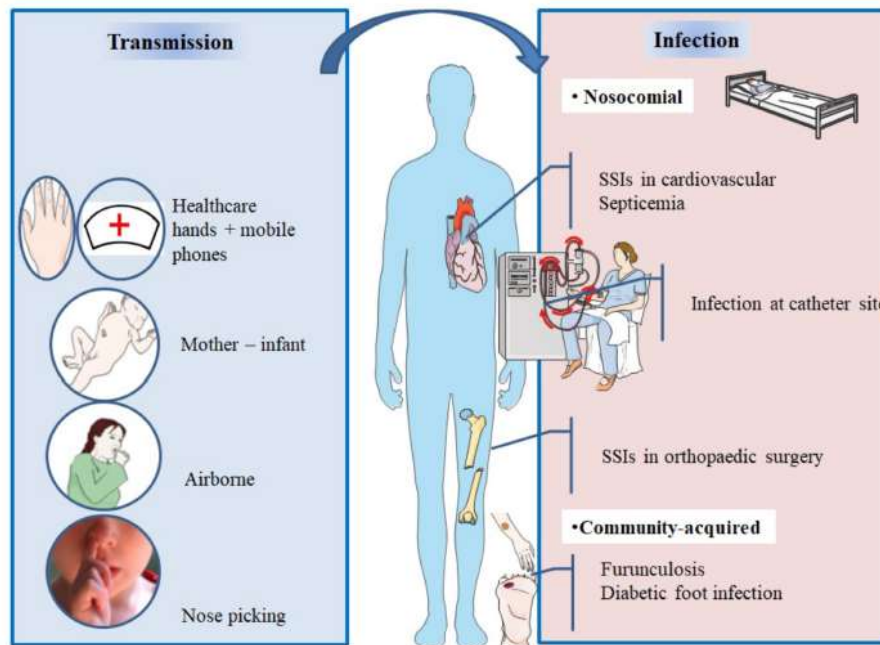
Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από την Hamilton και τους συνεργάτες της σε μια προοπτική μελέτη κοόρτης στην Αυστραλία όπου ανευρέθη διπλάσιος κίνδυνος νοσηλείας για λοίμωξη σε ασθενείς με ΣΔ2 (63). Παρομοίως, ο Benfield και οι συνεργάτες του μελέτησαν μια ομάδα διαβητικών ασθενών και υγιών μαρτύρων στη Δανία και παρατήρησαν τριπλάσιο κίνδυνο νοσηλείας για λοίμωξη στους ασθενείς με ΣΔ2 (64). Εκτός από τον υψηλό κίνδυνο για λοίμωξη, οι διαβητικοί ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο θνητότητας, όταν εμφανίσουν κάποια λοίμωξη. Ανεξάρτητα από το σχεδιασμό, τον πληθυσμό μελέτης και το είδος της λοίμωξης, η θνητότητα διπλασιάζεται σε ασθενείς με ΣΔ2 ή ακόμα τριπλασιάζεται όταν συνυπάρχει καρδιαγγειακή νόσος (60).

1.6. Ρινική φορεία σε *Staphylococcus aureus* στο σακχαρώδη διαβήτη

Ο *S. aureus* είναι ένα μείζων παθογόνο του ανθρώπου υπεύθυνο τόσο για ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις όσο και λοιμώξεις κοινότητας. Στελέχη σταφυλοκόκκου ανθεκτικά στη μεθισιλίνη έχουν αναδειχθεί και στην κοινότητα, γεγονός που τον καθιστά ακόμα πιο απειλητικό για τη δημόσια υγεία. Αποικίζει το δέρμα και τους βλεννογόνους, με τις πρόσθιες ρινικές θαλάμους να αποτελούν την πρωταρχική οικολογική δεξαμενή του. (65-66). Έχει βρεθεί ότι η ρινική φορεία στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για δοθιήνωση, λοίμωξη διαβητικού ποδιού, λοίμωξη σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση, σε ασθενείς υπό αιμοκάθαρση και σε νοσηλευόμενους σε μονάδα εντατικής θεραπείας, ιδιαίτερα σε όσους παρουσιάζουν εμμένουσα φορεία (εικόνα 6) (67).

Στον άνθρωπο, ο ρινικός αποικισμός μπορεί να ξεκινήσει από τις πρώτες ημέρες ζωής, όπως αναδείχθηκε σε μια μελέτη κοόρτης σε 100 νεογνά. Το ποσοστό φορείας σε χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο στις 8 πρώτες εβδομάδες ήταν 40-50%, πέφτοντας στο 21% στους 6 μήνες παρακολούθησης (68). Μετά την κάθετη μετάδοση, τα χέρια αποτελούν το βασικό φορέα μετάδοσης του *S. aureus* από τις επιφάνειες στη μύτη. Ειδικότερα, οι επαγγελματίες στο χώρο υγείας, που μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί ρινικοί φορείς, ενδεχομένως αποτελούν πηγή επιδημιών από MRSA.

Επιπρόσθετα, αν και λιγότερο πιθανά, η μετάδοση μπορεί να επιτευχθεί και αερογενώς (εικόνα 6) (67).



Εικόνα 6. Κύριοι μηχανισμοί μετάδοσης του *S. aureus* και επίδραση της ρινικής φορέας σε επακόλουθες λοιμώξεις. Εικόνα από Sakr et al [67].

Επιδημιολογικές μελέτες ποικίλης περιόδου από 12 εβδομάδες έως 3 έτη έχουν περιγράψει τρία πρότυπα ρινικής φορέας για το χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο ανάμεσα σε υγιείς εθελοντές που εξετάστηκαν αρκετές φορές. Συγκεκριμένα, διακρίνεται στην εμμένουσα φορεία με ποσοστά από 10 έως 30%, στη μη-φορεία με ποσοστά από 10 έως 47% και στη διαλείπουσα φορεία για τους υπόλοιπους. Ωστόσο οι μη-φορείς και τα άτομα με διαλείπουσα φορεία παρουσιάζουν παρόμοια κινητική εκρίζωσης και παρόμοιους τίτλους αντισταφυλοκοκκικών αντισωμάτων. Ο Nouwen και οι συνεργάτες του πρότειναν το συνδυασμό ποιοτικών και ποσοτικών αποτελεσμάτων δυο διαδοχικών καλλιέργειών ρινικού επιχρίσματος με διαφορά περίπου μίας εβδομάδος για τον καθορισμό του προτύπου ρινικής φορέας. Επομένως, στην περίπτωση που και οι δυο καλλιέργειες είναι θετικές πρόκειται για εμμένουσα φορεία, ενώ στη διαλείπουσα φορεία η μία μόνο από τις δύο καλλιέργειες είναι θετική (69).

Η επιτυχία του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου να αποικίσει τους ρινικούς ρώθωνες παραμένει αινιγματική. Δεδομένου, πρώτον ότι δεν εμφανίζουν όλοι εμμένουσα φορεία, και δεύτερον κάποιοι βακτηριακοί κλώνοι είναι πιο συνήθεις σε σχέση με άλλους σε ένα πληθυσμό, συμπεραίνουμε ότι τόσο ανθρώπινοι όσο και μικροβιακοί παράγοντες είναι καθοριστικοί.

Αρχικά, η ρινική φορεία σε *S. aureus* σχετίζεται αρνητικά με την παρουσία άλλων παθογόνων, συμπεριλαμβανομένου και του *Staphylococcus epidermidis*. Συγκεκριμένα κάποια παθογόνα μπορούν να εκκρίνουν αντισταφυλοκοκκικά μόρια που τροποποιούν τον ολικό πληθυσμό του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου. Για παράδειγμα, *in vitro* παραγωγή H_2O_2 από *S. pneumoniae* μπορεί να δρα ως βακτηριοκτόνο για τον *S. aureus* (70). Ομοίως, η λουγκντουνίνη, ένα βιοδραστικό μόριο που παράγεται από τον *Staphylococcus lugdunensis*, αποτρέπει το ρινικό αποικισμό από τον *S. aureus* μέσω βακτηριοκτόνου δράσης (71). Επίσης, έχει βρεθεί ότι κάποια στελέχη *S. epidermidis* παράγουν την πρωτεάση σερίνης Esp που εκριζώνει τον *S. aureus* από τους ρινικούς ρώθωνες υγιών ατόμων πιθανά αποδομώντας πρωτεΐνες επιφανείας του σταφυλόκοκκου και υποδοχείς του ξενιστή που είναι απαραίτητοι για την αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου (72-73).

Ο πρόδομος της ρινός (*vestibulum nasi*), που αποτελεί τη συχνότερη θέση εντόπισης του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου, επαλείφεται από πολύστιβο, κερατινοποιημένο, πλακώδες επιθήλιο. Η ανώτερη στιβάδα της επιδερμίδας περιλαμβάνει κερατινοκύτταρα που εκφράζουν πρωτεΐνες, όπως η λoricρίνη, η ινβολουκρίνη, η φιλαγγρίνη και η κυτοκερατίνη 10. Η Mulcahy και οι συνεργάτες της έδειξαν ότι κατά το ρινικό αποικισμό η λoricρίνη αποτελεί το σημαντικότερο στόχο σύνδεσης του παράγοντα συσσωρεύσεως B (Clumping factor B, ClfB), μιας πρωτεΐνης επιφανείας του σταφυλοκόκκου. Πράγματι, ο ρινικός αποικισμός από ClfB⁺ στελέχη του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου μειώθηκε κατά 80% σε ποντίκια που δεν παρήγαγαν λoricρίνη σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου (74). Αντίστροφα, σε μια άλλη μελέτη αναδείχθηκε ότι ClfB⁻ στελέχη του *S. aureus* αποίκισαν σε μικρότερο βαθμό τους ρινικούς ρώθωνες σε ποντίκια και αρουραίους συγκριτικά με τα στελέχη αγρίου τύπου (75). Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα ClfB⁻ στελέχη του *S. aureus* εκριζώνονται ταχύτερα σε σχέση με τα αγρίου τύπου μετά τον ενοφθαλμισμό (76).

Το εσωτερικό της ρινικής κοιλότητας, που καλύπτεται από κυλινδρικό κροσσωτό επιθήλιο, αποτελεί ένα επιπρόσθετο οικολογικό θώκο για τον *S. aureus*. Η σταφυλοκοκκική συγκολλητίνη, γνωστή ως τειχοϊκό οξύ, θεωρείται σημαντικός παράγοντας για τη διαδικασία του αποικισμού. Μεταλλαγμένα στελέχη *S. aureus*, που δεν παρήγαγαν τειχοϊκό οξύ, αδυνατούσαν να προσκολληθούν στα ρινικά κύτταρα σε σχέση με τα στελέχη μάρτυρες σε *in vivo* μελέτες (77). Η σημασία του τειχοϊκού οξέος έχει αναδειχθεί κυρίως στα αρχικά στάδια του αποικισμού από *S. aureus*.

Οι γνώσεις μας ως προς την απάντηση του ξενιστή κατά το ρινικό αποικισμό από *S. aureus* είναι περιορισμένες συγκριτικά με όσα γνωρίζουμε για την ανοσολογική απάντηση σε διεισδυτικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις. Η παρουσία του *S. aureus* στους ρινικούς ρώθωνες φαίνεται πως επάγει τόσο τη φυσική όσο και την ειδική ανοσολογική απάντηση, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις καταφέρνει να υπερνικήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Παράγοντες του ξενιστή, όπως υποκείμενα νοσήματα, που προδιαθέτουν στη ρινική φορεία αναφέρονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Προδιαθεσικοί παράγοντες για ρινική φορεία σε *S. aureus* [67]

Predisposing factors for nasal carriage

HIV-infection

Obesity

Diabetic patients undergoing dialysis
(compared to non-diabetic patients in the
same population)

Granulomatosis with polyangiitis

Rheumatoid arthritis

Skin and soft tissue infections

Recurrent furunculosis

Atopic dermatitis

Hemoglobin in nasal secretions

Histocompatibility antigen phenotype
HLA-DR3

Polymorphisms in genes encoding for
the glucocorticoid receptor, interleukin-4,
C-reactive proteins, and complement
inhibitor proteins

Hormonal contraception use

Active smokers: controversial

Hospital workers: controversial

Η ανοσολογική απάντηση στη σταφυλοκοκκική εισβολή επάγεται από τη μεσολάβηση των υποδοχέων TLR. Ειδικότερα έχει αναδειχθεί ο ρόλος του TLR2 στο ρινικό αποικισμό από *S. aureus*,

δεδομένου ότι στελέχη που αποικίζουν το ρινικό βλεννογόνο φαίνεται πως καθυστερούν την απάντηση του ξενιστή μέσω καθυστερημένης διέγερσης έκφρασης των TLR2 στα ρινικά επιθηλιακά κύτταρα (78).

Οι ρινικές εκκρίσεις στον άνθρωπο παρουσιάζουν αποτελεσματική αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Πράγματι, περιέχουν AMPs, που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα, και συνεισφέρουν στην πρώτη γραμμή άμυνας. Μετά τη διέγερση από διάφορες κυτοκίνες όπως οι IL1β και TNF-α, τα επιθηλιακά κύτταρα της ρινός παράγουν AMPs όπως οι ντεφενσίνες και η καθελιδίνη. Η παραγωγή τους μπορεί να είναι συνεχής ή επαγόμενη από φλεγμονή ή τραύμα. Τα AMPs έχουν την ιδιότητα να σκοτώνουν τα παθογόνα με άμεση δράση αλλά και έμμεσα μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων που οδηγούν στην παραγωγή χημειοκινών και στην επιστράτευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης των AMPs ενδεχομένως αποτελούν πρωταρχικούς καθοριστές των διαφόρων προτύπων ρινικής φορέας σε *S. aureus* (79-80).

Η καθελιδίνη ανήκει στα AMPs με σημαντική αντιμικροβιακή δράση στο δέρμα. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποθηκεύεται ως προ-πρωτεΐνη, γνωστή ως hCAP18, στα πεταλοειδή σωματίδια των κερατινοκυττάρων και εκκρίνεται στην ακανθωτή στιβάδα της επιδερμίδας, όπου πρωτεάσες την μετατρέπουν τοπικά στο δραστικό πεπτίδιο. Στην επιφάνεια του δέρματος, το τρυπτικό ένζυμο της κεράτινης στιβάδας μετατρέπει το προπεπτίδιο στην ενεργή LL-37. Ο συνδυασμός αυτού του ενζύμου με τη χυμοτρυπτική πρωτεάση της κεράτινης στιβάδας αποδομούν επιπρόσθετα την LL-37 σε μικρότερα πεπτίδια γνωστά ως RK-31 και KS-30 (81). Συγκριτικά με την LL-37, τα πεπτίδια RK-31 και KS-30 παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (82). Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό κατά πόσο τα επίπεδα ή/και η λειτουργία των ανωτέρω ενζύμων ή/και τα επίπεδα των δραστικών πεπτιδίων σχετίζονται με τη ρινική φορέα στον *S. aureus*.

Σημαντικός είναι και ο ρόλος της βιταμίνης D στο ρινικό αποικισμό από *S. aureus* προάγοντας τόσο τη φυσική όσο και την ειδική ανοσολογική απάντηση. Ο ενεργός μεταβολίτης 1,25(OH)₂D φαίνεται πως ενισχύει την αντιμικροβιακή δραστηριότητα ενάντια στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο *in vitro* (83). Ο υποκινητής των AMPs καθελιδίνη και β-ντεφενσίνη-2 περιέχει στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης

D με αποτέλεσμα η 1,25(OH)₂D να επάγει την παραγωγή τους σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και σε βιοψίες δέρματος (66). Πέρα από το ρόλο της στην παραγωγή AMPs, η 1,25(OH)₂D επάγει την έκφραση TLR2 και CD14 στα κερατινοκύτταρα, που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη αντίχνευση παθογόνων (83). Έχει βρεθεί, επίσης, συσχέτιση ανάμεσα στην έλλειψη βιταμίνης D και στη ρινική φορεία σε MRSA (38). Η ρινική φορεία στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο έχει συσχετιστεί πρόσφατα με τα επίπεδα βιταμίνης D, το φύλο και το κάπνισμα (84). Όλες αυτές οι μελέτες αναδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο της βιταμίνης D στο ρινικό αποικισμό από *S. aureus* που ενδεχομένως οφείλεται, μεταξύ άλλων, στην αυξημένη έκφραση καθελιδίνης στο δέρμα.

Οι ρινικές εκκρίσεις των ατόμων με εμμένουσα φορεία περιέχουν υψηλότερα επίπεδα β-ντεφενσίνης συγκριτικά με τους μη-φορείς, πιθανά ως απάντηση στην παρουσία του παθογόνου (85). Η παραγωγή AMPs, συμπεριλαμβανομένης της β-ντεφενσίνης-3, της ριβονουκλεάσης-7 και της LL-37, καθοδηγείται από κλασικές προφλεγμονώδεις, όπως η IL1β και ο TNF-α. Αυξημένα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL1β, IL6, IL8, TNF-α και ιντερφερόνη-γ έχουν παρατηρηθεί σε εθελοντές που εκρίζωσαν επιτυχώς τον *S. aureus* μετά από ενοφθαλμισμό του στους ρινικούς ρώθωνες (86). Επομένως, τα τρέχοντα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ελλείμματα της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης μπορούν να συμβάλλουν στη ρινική φορεία από *S. aureus*.

Επιπρόσθετα, γενετικοί πολυμορφισμοί σε σηματοδοτικά μόρια, παράγοντες του συμπληρώματος και άλλους ρυθμιστές μπορεί να επηρεάσουν την άμυνα του ξενιστή έναντι του *S. aureus*. Πράγματι, SNPs στο γονίδιο του *VDR* σχετίζονται με ρινική φορεία σε *S. aureus* σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 (87) και ΣΔ2 (41) αλλά όχι σε υγιή άτομα (88). Επιπλέον, πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν την προσκολλημένη στη μαννόζη λεκτίνη, τον υποδοχέα TLR2, τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, την IL4 και τον υποκινητή της β-ντεφενσίνης-1 σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ρινική φορεία σε *S. aureus*, ωστόσο τα λειτουργικά δεδομένα είναι ελλιπή (89).

Στους ασθενείς με ΣΔ και λοίμωξη διαβητικού ποδιού, ο *S. aureus* αποτελεί το συχνότερα απομονωθέν παθογόνο. Η Dunyarch-Remy και οι συνεργάτες της συνέκριναν γονοτυπικά τα στελέχη του *S. aureus* που απομονώθηκαν από ρινικούς ρώθωνες και έλκη διαβητικών ποδιών σε 276

ασθενείς. Σε 36 % των ασθενών απομονώθηκε χρυσίζων σταφυλόκοκκος και από τις δυο εστίες, εκ των οποίων 65% παρουσίαζαν το ίδιο στέλεχος (90). Είναι σαφές ότι θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες μελέτες ώστε να επιβεβαιωθεί το όφελος του προληπτικού ελέγχου και της θεραπείας της ρινικής φορέας σε αυτήν την ομάδα ασθενών.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Περίληψη

Εισαγωγή: Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης, οδηγώντας σε υψηλά ποσοστά αποικισμού από *Staphylococcus aureus*. Η ρινική φορεία σε *S. aureus*, που αποτελεί τη συχνότερη θέση αποικισμού, φαίνεται πως αυξάνει τον κίνδυνο για διεισδυτικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Γενετικοί πολυμορφισμοί γονιδίων διαμεσολαβητών της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης, όπως του γονιδίου της ιντερλευκίνης-6 (*IL6*) και του υποδοχέα της βιταμίνης D (*VDR*) έχουν συσχετιστεί με ευπάθεια στο ΣΔ2 και σε λοιμώξεις. Επιπρόσθετα, η βιταμίνη D εμφανίζει σημαντικές ανοσοτροποποιητικές δράσεις και ειδικότερα, μέσω της αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα της, επάγει την έκφραση της καθελιδίνης (LL-37), ενός ενδογενούς αντιμικροβιακού πεπτιδίου που συμμετέχει στην άμυνα του ξενιστή ενάντια στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε ο ρόλος του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) rs1800795 της *IL6* τόσο στον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2, όσο και στη ρινική φορεία με *S. aureus* σε ασθενείς με ΣΔ2. Ακολούθως εξετάστηκε η επίδραση των τεσσάρων SNPs του γονιδίου του *VDR* *FokI* (rs10735810), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) και *TaqI* (rs731236) στα επίπεδα ορού της LL-37. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η συσχέτιση των συγκεντρώσεων ορού της 25-υδροξυ βιταμίνης D [25(OH)D], που αποτελεί τον πλέον αξιόπιστο δείκτη της βιταμίνης D, και της LL-37 με τα πρότυπα ρινικής φορείας σε *S. aureus* (εμμένουσα, διαλείπουσα, μη-φορεία) στους ΣΔ2 ασθενείς. Τέλος, ερευνήθηκε εάν η ρινική φορεία σε *S. aureus* αποτελεί παράγοντα κινδύνου για διεισδυτικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις στους διαβητικούς ασθενείς.

Ασθενείς & μέθοδοι: Η ομάδα μελέτης αποτελούνταν από 240 ασθενείς με ΣΔ2 που παρακολουθούνταν στα εξωτερικά ιατρεία της Παθολογικής και της Ενδοκρινολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατά τη χρονική διάρκεια 2013 - 2014. Η ομάδα ελέγχου απαρτιζόταν από 236 μη-διαβητικούς μάρτυρες. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν Κρητικής καταγωγής. Δείγμα για καλλιέργεια ρινικού επιχρίσματος ελήφθη από όλους τους ασθενείς με ΣΔ2 με την περιστροφή του κατάλληλου στυλεού τέσσερις φορές και στους δυο ρινικούς ρόθωνες

του κάθε συμμετέχοντος. Επαναληπτικό δείγμα ελήφθη μετά από διάστημα μιας εβδομάδας έως ένα μήνα για την ταξινόμηση των ασθενών σε εμμένοντες, διαλείποντες φορείς και μη-φορείς. Επιπρόσθετα κατεγράφησαν όσοι ΣΔ2 ασθενείς ελάμβαναν συμπληρώματα βιταμίνης D καθημερινά. Από τους συμμετέχοντες ελήφθη δείγμα αίματος για γονοτύπηση και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 25(OH)D και της LL-37. Σε 144 ασθενείς με ΣΔ2 και στους 180 μη-διαβητικούς μάρτυρες έγινε γονοτύπηση του rs1800795 SNP της *IL6* μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους θραύσματος περιορισμού (PCR-RFLP). Σε 173 ΣΔ2 ασθενείς είχε προηγηθεί γονοτύπηση των *FokI* (rs10735810), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) και *TaqI* (rs731236) πολυμορφισμών του γονιδίου *VDR* μέσω PCR-RFLP. Τα επίπεδα ορού της 25(OH)D μετρήθηκαν με την ανοσολογική μέθοδο της χημειοφωταύγειας σε 118 διαβητικούς ασθενείς και σε 94 μάρτυρες, ενώ και τα επίπεδα της LL-37 εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία της ενζυμοσυζευγμένης ανοσοπροσρόφησης σε 118 διαβητικούς ασθενείς. Όλοι οι ασθενείς με ΣΔ2 παρακολούθηθηκαν για 6 έτη (2014-2020) και καταγράφηκαν επεισόδια λοιμώξεων από *S. aureus* στο χρονικό αυτό διάστημα.

Αποτελέσματα: Η ρινική φορεία με *S. aureus* βρέθηκε σε ποσοστό 25.8% των ασθενών με ΣΔ2, ενώ η εμμένουσα στο 9.6%. Ο G/C γονότυπος, καθώς και το αλληλίο C του SNP rs1800795 του γονιδίου της *IL6* βρέθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με ΣΔ2 σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0.004$, OR=1.98, 95% CI 1.24-3.18 και $p=0.011$, OR=1.59, 95% CI 1.11-2.26, αντιστοίχως). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα αλληλίου ή γονοτύπου μεταξύ φορέων και μη-φορέων ασθενών με ΣΔ2. Η ανάλυση υποομάδων ασθενών με ΣΔ2, βασισμένη στο μοτίβο φορείας (εμμένουσα ή διαλείπουσα) επίσης δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι ασθενείς με ΣΔ2 παρουσίαζαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές ορού 25(OH)D σε σχέση με τους μάρτυρες ($p<0.001$). Συγκεκριμένα, το 88.6% των διαβητικών ασθενών, ενώ μόλις το 59.6% των μη-διαβητικών μαρτύρων παρουσίαζε ανεπάρκεια (21-29ng/ml) ή έλλειψη (<20ng/ml) της βιταμίνης D. Η χορήγηση βιταμίνης D δεν επηρέασε τα ποσοστά ρινικής φορείας στους ΣΔ2 ασθενείς ($p=0.706$). Εξαιρετικά χαμηλά ήταν τα επίπεδα ορού της LL-37 που ανευρέθησαν στο σύνολο των διαβητικών ασθενών (διάμεση τιμή 0.89, εύρος 0.05-8.62 ng/ml). Η παρουσία του *BsmI* b αλληλίου του γονιδίου *VDR* συσχετίστηκε με μεγαλύτερη συγκέντρωση LL-37 ($p=0.05$), ενώ ο *BsmI* bb γονότυπος

συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα LL-37 συγκριτικά με τον Bb γονότυπο ($p=0.035$). Οι *TaqI* TT ομοζυγώτες παρουσίαζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις LL-37 σε σχέση με τους *TaqI* Tt ετεροζυγώτες ($p=0.003$), ενώ το T αλληλίο παρουσίαζε τάση υψηλότερων επιπέδων ορού LL-37, ωστόσο μη στατιστικά σημαντική ($p=0.07$). Οι διαβητικοί ασθενείς με ρινική φορεία σε *S. aureus* παρουσίαζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις LL-37 συγκριτικά με τους μη-φορείς διαβητικούς ασθενείς ($p<0.001$), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την 25(OH)D μεταξύ των δύο ομάδων. Ισχυρά θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στην 25(OH)D και την LL-37 στους μη-φορείς ($r=0.48$, $p<0.001$), η οποία ήταν ανεξάρτητη από τη χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D με βάση την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης ($p=0.002$). Κατά την βετή παρακολούθηση των διαβητικών ασθενών δε διαπιστώθηκαν επεισόδια βακτηριαμίας, ενώ ελάχιστα ήταν τα επεισόδια λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων οφειλόμενα σε *S. aureus*.

Συμπεράσματα: Τα ευρήματα της μελέτης δείχνουν ότι ο ρινικός αποικισμός από *S. aureus* είναι συχνός στους ασθενείς με ΣΔ2, που θα μπορούσε να οφείλεται σε διαταραχή της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης, όπως αναδεικνύεται από τα μειωμένα επίπεδα της 25(OH)D και του αντιμικροβιακού πεπτιδίου LL-37 στο αίμα. Η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D δε φαίνεται να επιδρά στα ποσοστά ρινικής φορείας σε *S. aureus* στους ΣΔ2 ασθενείς. Ο πολυμορφισμός rs1800795 της *IL6* σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2 αλλά όχι με αυξημένη επίπτωση ρινικής φορείας *S. aureus* σε αυτούς τους ασθενείς. Οι πολυμορφισμοί *TaqI* και *BsmI* του *VDR* φαίνεται πως επιδρούν στις συγκεντρώσεις ορού της LL-37, οι οποίες ενδεχομένως συμμετέχουν καθοριστικά στο πρότυπο ρινικής φορείας στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο στους διαβητικούς ασθενείς. Η κατάσταση ρινικής φορείας σε *S. aureus* δεν αποτέλεσε παράγοντα κινδύνου για βακτηριαμία ή άλλες διεισδυτικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις. Αυτά τα αποτελέσματα βασίζονται σε ένα σχετικά μικρό πληθυσμό και πρέπει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών.

2.2. Abstract

Objectives: *Staphylococcus aureus* nasal carriage, an important risk factor for severe infections, is common in patients with type 2 diabetes mellitus (T2D), possibly due to dysregulation of innate immunity. Genetic polymorphisms in host innate immune genes, including interleukin 6 (*IL6*) and vitamin D receptor (*VDR*) genes, have been found to be associated with susceptibility to several diseases, including type 2 diabetes (T2D) and various infections. Additionally, vitamin D and cathelicidin (LL-37), a downstream target of vitamin D - VDR complex, are both innate immune markers that play a key role in immunomodulation and may contribute to host defence mechanisms against *S. aureus*. The aim of this study was to investigate the role of rs1800795 *IL6* single nucleotide polymorphism (SNP) on the susceptibility to T2D, as well as to nasal carriage of *S. aureus* among individuals with T2D. We also examined whether LL-37 serum levels are influenced by the four most common *VDR* gene polymorphisms [*FokI* (rs10735810), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232), and *TaqI* (rs731236)] in individuals with T2D. Furthermore, we tried to determine the impact of 25-hydroxy vitamin D [25(OH)D] and LL-37 on *S. aureus* nasal carriage status in T2D patients. Finally, this study aimed to assess the contribution of *S. aureus* nasal colonization on subsequent staphylococcal infections in diabetic subjects.

Patients & methods: The study group consisted of a cohort of 240 T2D patients, followed up at the outpatient clinic of Internal Medicine and Endocrinology Department of University Hospital of Heraklion, during 2013-2014. The control group consisted of 236 healthy age- and sex-matched subjects. All individuals were of self-reported Cretan origin. From all T2D patients, nasal swab was obtained to determine *S. aureus* nasal colonization by rotating a sterile fiber-tipped swab four times in both anterior nares of each enrolled individual. A repeat swab was obtained, at a one-month interval, for the estimation of persistent carriage status. Diabetic participants were asked about the use of vitamin D supplements. Whole blood was collected from all participants enrolled in the study. One hundred and forty-four patients with T2D and one hundred and eighty healthy controls were genotyped for the *IL6* rs1800795 SNP by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length

Polymorphism (PCR-RFLP). *FokI* (rs10735810), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) and *TaqI* (rs731236) *VDR* gene polymorphisms had previously been investigated in 173 T2D patients by PCR-RFLP. Serum levels of 25(OH)D were estimated in 118 diabetic patients and 94 controls using chemiluminescence immunoassay (CLIA), while serum levels of LL-37 were evaluated in 118 diabetic patients using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All T2D patients were followed up for 6 years (2014-2020) and any cases of staphylococcal infections were recorded during this period.

Results: *S. aureus* nasal colonization was found to be at a percentage of 25.8% of T2D patients. Among them, 9.6% were defined as persistent carriers. The G/C genotype and the minor allele C of *IL6* rs1800795 SNP analyzed were more common in individuals with T2D than in healthy controls ($p=0.004$, OR=1.98, 95% CI 1.24-3.18 and $p=0.011$, OR=1.59, 95% CI 1.11-2.26, respectively). No statistically significant differences have been found between carriers and non-carriers in terms of either allele or genotype frequency. Analyses of subgroups, based on the pattern of carriage (intermittent or permanent), also did not reveal significant differences. T2D patients presented significantly lower 25(OH)D serum levels compared to controls ($p<0.001$). In particular, 88.6% of T2D patients, whereas only 59.6% of controls, in our study, presented vitamin D deficiency ($<20\text{ng/ml}$) or insufficiency (21-29ng/ml). No effect of vitamin D daily administration has been found on the rates of *S. aureus* nasal carriage in T2D patients ($p=0.706$). T2D patients presented remarkably low serum LL-37 levels (median 0.89, range 0.05-8.62 ng/ml). The presence of the *BsmI* b allele was related to higher levels of LL-37 ($p=0.05$), as well as *BsmI* bb genotype showed higher LL-37 concentrations compared to Bb genotype ($p=0.035$). *TaqI* TT homozygotes presented higher LL-37 levels compared to *TaqI* Tt heterozygotes ($p=0.003$), as well as the presence of the *TaqI* T allele was related to a trend of increased levels of LL-37, though not statistically significant ($p=0.07$). Circulating levels of LL-37 were higher in nasal carriers compared to non-carriers ($p<0.001$), whereas no difference was observed in 25(OH)D levels. A strong positive correlation was observed between 25(OH)D and LL-37 among non-carriers ($r=0.48$, $p<0.001$). This relationship was independent of vitamin D supplementation in a linear regression analysis ($p=0.002$). Finally, assessing the

development of clinical staphylococcal infections in T2D patients during the 6-year follow-up, we found no episodes of bacteremia, while very few episodes of skin and soft tissue infections, caused by *S. aureus*, were reported.

Conclusions: Our study showed that T2D patients present low serum concentrations of vitamin D and LL-37, suggesting defects in innate immunity, which could contribute to higher rates of *S. aureus* nasal colonization. No impact of vitamin D supplementation on *S. aureus* nasal colonization has been found in T2D patients. Another finding is that *IL6* rs1800795 SNP, although is associated with increased risk for T2D development, might not be associated with higher prevalence of *S. aureus* nasal carriage in patients with T2D. Our findings, also, suggest that *TaqI* and *BsmI VDR* gene polymorphisms are related to serum levels of LL-37, which could be a primary determinant for different *S. aureus* carriage states in T2D. Finally, we did not prove any significant difference in the frequency of the infections we investigated between *S. aureus* colonized and non-colonized patients. A weakness of the study is the relatively small number of samples and, therefore, our results need to be confirmed in larger studies.

2.3. Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί μια ετερογενή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Περισσότεροι από 350 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από ΣΔ, ενώ ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται ραγδαία ιδίως στις χώρες χαμηλού και μέσου εισοδήματος. Μέχρι το 2030 αναμένεται να αυξηθεί ο αριθμός των πασχόντων με ΣΔ στα 550 εκατομμύρια. Από το σύνολο των ασθενών με ΣΔ, η πλειονότητα (90%) πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2). Ο ΣΔ2 είναι μια σοβαρή μεταβολική νόσος με κύριο χαρακτηριστικό την αντοχή των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη, ενώ η ανεπάρκεια ινσουλίνης είναι σχετική. Η συνδυασμένη διαταραχή έκκρισης και δράσης της ινσουλίνης προηγείται της έναρξης της νόσου (91).

Η συγκεκριμένη νόσος εμφανίζει ιδιαίτερη πολυπλοκότητα και σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα λόγω των επιπλοκών της. Πέρα από τις μακρο- και μικροαγγειακές επιπλοκές, στις οποίες περιλαμβάνονται η στεφανιαία νόσος, τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, η περιφερική αγγειοπάθεια, η χρόνια νεφρική νόσος, η αμφιβληστροειδοπάθεια και η νευροπάθεια, ο ΣΔ χαρακτηρίζεται από ευπάθεια σε λοιμώξεις, συχνά με δυσμενέστερη πρόγνωση, που επιδεινώνει την ποιότητα ζωής των ασθενών αυτών (92).

Η αιτιοπαθογένεια της νόσου οφείλεται σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αρκετοί ερευνητές έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην παθογένεια της νόσου μελετώντας μηχανισμούς που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και ειδικότερα με τη μη ειδική ανοσολογική απάντηση. Η χρόνια, χαμηλού βαθμού, φλεγμονή, γνωστή ως μεταφλεγμονή, και η ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας φαίνεται πως εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΔ2. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν περιγράψει τη συσχέτιση ανάμεσα σε φλεγμονώδεις βιοδείκτες και στην επίπτωση τόσο του ΣΔ2 όσο και των επιπλοκών του. Επομένως, η στόχευση σε φλεγμονώδη και ανοσολογικά μονοπάτια θα μπορούσε να αποτελέσει μέρος της στρατηγικής πρόληψης, θεραπείας και διαστρωμάτωσης κινδύνου των ασθενών με ΣΔ2 (5).

Η συνεχής αντίδραση οξειάς φάσης που διαμεσολαβείται από κυτοκίνες, στο πλαίσιο της ευρύτερης ενεργοποίησης της φυσικής ανοσίας, συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου. Οι συγκεντρώσεις στο

αίμα των πλέον κοινών μεσολαβητών οξείας φάσης, όπως η CRP, το αμυλοειδές του ορού Α, η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη και η IL6, έχουν βρεθεί αυξημένες στο ΣΔ2 σε σχέση με τα επίπεδα ορού στους μη-διαβητικούς μάρτυρες. Αυτή η συσχέτιση βρέθηκε ανεξάρτητα από ηλικία, φύλο, γλυκόζη αίματος, κάπνισμα, οικογενειακό ιστορικό ΣΔ και φυσική δραστηριότητα. Τα χρονίως αυξημένα επίπεδα κυτοκινών στο ΣΔ οδηγούν σε ανοχή στη διέγερση, με αποτέλεσμα την έκκριση κυτοκινών σε μικρότερο βαθμό ως απάντηση σε παθογόνα (5-6).

Από γενετικής πλευράς, μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) έχουν παρατηρηθεί σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων προ- και αντιφλεγμονωδών δεικτών με επίδραση στα επίπεδα παραγωγής των διαμεσολαβητών αυτών. Επομένως, οι SNPs μπορούν να επηρεάσουν την ένταση και το αποτέλεσμα του φλεγμονώδους στρες. Μάλιστα, σε μια μεγάλης κλίμακας ανάλυση συσχέτισης έχει παρατηρηθεί γενετική ποικιλομορφία σε φλεγμονώδη μονοπάτια στο ΣΔ2, αναδεικνύοντας το ρόλο της γενετικής προδιάθεσης στη φλεγμονή στην ευπάθεια ΣΔ (2).

Η διαταραχή της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης μπορεί να εξηγήσει την ευπάθεια των ΣΔ ασθενών στις λοιμώξεις. Έχει περιγραφεί διαταραχή τόσο στη χημειοταξία όσο και στη φαγοκυττάρωση των μονοκυττάρων διαβητικών ασθενών. Δεδομένου ότι το πλάσμα υγιών μαρτύρων δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στη φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων των διαβητικών, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η διαταραχή αυτή οφείλεται σε εσωτερικά ελλείμματα των μονοκυττάρων. Αυτή η δυσλειτουργία των μονοκυττάρων/ μακροφάγων, σε συνδυασμό με τη μειωμένη έκκριση κυτοκινών ως απάντηση σε παθογόνα, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή ανοσολογική απάντηση (6).

Περιορισμένος αριθμός μελετών έχει αναδείξει την αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων σε ασθενείς με ΣΔ. Η πρώτη ήταν των Shah και Hux, οι οποίοι διεξήγαγαν μια αναδρομική μελέτη κοόρτης στον Καναδά σε δυο ανεξάρτητες χρονικές περιόδους με περισσότερους από 500.000 διαβητικούς ασθενείς, εκ των οποίων σχεδόν οι μισοί ασθενείς είχαν τουλάχιστον μία νοσηλεία ή επίσκεψη σε ιατρό για λοιμώδες αίτιο. Από τη μελέτη βρέθηκε ότι οι διαβητικοί ασθενείς παρουσίαζαν υψηλότερο κίνδυνο λοίμωξης σε σχέση με μη-διαβητικούς ασθενείς, ιδίως για βακτηριακές λοιμώξεις, όπως οστεομυελίτιδα, πυελονεφρίτιδα, κυστίτιδα, πνευμονία, κυτταρίτιδα, σήψη ή περιτονίτιδα (62).

Πέρα από το γεγονός ότι ο ΣΔ αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για βακτηριακές λοιμώξεις, θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν επιπρόσθετα στοιχεία που συνδέουν το ΣΔ με τις λοιμώξεις. Αρχικά οι διαβητικοί ασθενείς είναι περισσότερο επιρρεπείς σε σπάνιες λοιμώξεις, όπως η εμφυσηματική χολοκυστίτιδα, η εμφυσηματική πυελονεφρίτιδα, η κακοήθη εξωτερική ωτίτιδα και η ρινοεγκεφαλική μωκορμύκωση. Επιπρόσθετα, στους διαβητικούς ασθενείς οι λοιμώξεις διαδράμουν με βαρύτερη κλινική εικόνα, ενώ σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών. Τέλος, συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί εμφανίζονται συχνότερα στους ασθενείς με ΣΔ, όπως τα *Staphylococcus aureus* και *Mycobacterium tuberculosis* (93).

Ο *S. aureus* αποτελεί σημαντικό αίτιο τόσο ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων όσο και λοιμώξεων κοινότητας. Ειδικότερα στις λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων που σχετίζονται με ΣΔ, ο *S. aureus* αποτελεί μείζον παθογόνο. Επιπλέον, ο ΣΔ αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για βακτηριαμμία από *S. aureus*. Η αυξημένη επίπτωση σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων στους ΣΔ ασθενείς μπορεί να εξηγηθεί, εν μέρει, από τη δυσλειτουργία των ουδετερόφιλων πολυμορφοκυττάρων, που συμμετέχουν ενεργά στη θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών μέσω απελευθέρωσης βακτηριοκτόνων αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) και προφλεγμονωδών κυτοκινών (94-95).

Οι σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις αποτελούν ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας καθώς παρουσιάζουν μεγάλη νοσηρότητα και θνητότητα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν καταγραφεί υψηλά ποσοστά *S. aureus* ανθεκτικού στη μεθισιλίνη (MRSA), ο οποίος ενδημεί τόσο στην κοινότητα όσο και στο νοσοκομειακό περιβάλλον και μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις με εξαιρετικά υψηλά ποσοστά θανάτων λόγω των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών. Επομένως, έχει καταστεί επιτακτική η ανάγκη εφαρμογής μέτρων πρόληψης για τον περιορισμό εξάπλωσης του συγκεκριμένου παθογόνου (96).

Ο *S. aureus* αποικίζει συχνά το δέρμα και τους βλεννογόνους στον άνθρωπο με τις πρόσθιες ρινικές θαλάμες να αποτελούν τη πρωταρχική οικολογική δεξαμενή. Η ρινική φορεία έχει συσχετιστεί με την πρόοδο σε κλινική νόσο με βάση τρία αποδεικτικά στοιχεία. Αρχικά, τα ποσοστά λοιμώξεων είναι υψηλότερα στους φορείς σε σχέση με τους μη-φορείς. Δεύτερον, μελέτες έχουν δείξει ότι σε ασθενείς που είναι αποικισμένοι με *S. aureus*, τα στελέχη που προκαλούν λοίμωξη είναι όμοια με εκείνα που

τους αποικίζουν. Τρίτον, η προσωρινή εκρίζωση του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου, με την εφαρμογή μπουπροσίνης τοπικά, ελάττωσε τα ποσοστά σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (97).

Σε υγιή άτομα, το 10-35% παρουσιάζει εμμένουσα ρινική φορεία, το 20-75% διαλείπουσα φορεία και το 5-70% είναι μη-φορείς. Οι εμμένοντες φορείς έχουν υψηλότερο βακτηριακό φορτίο και, κατ' επέκταση, μεγαλύτερο κίνδυνο λοίμωξης. Η επίπτωση ρινικής φορείας σε *S. aureus* αυξάνει σε ορισμένες καταστάσεις όπως μετεγχειρητικά και σε ασθενείς υπό συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση. Επίσης, οι διαβητικοί ασθενείς, ιδίως όσοι λαμβάνουν ινσουλινοθεραπεία, εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά ρινικής φορείας σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Ειδικότερα, σε σειρά μελετών, έχει βρεθεί ότι ο ΣΔ αποτελεί παράγοντα κινδύνου για φορεία από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο ανθεκτικό στη μεθισιλίνη (MRSA) (67,98).

Ο Wertheim και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο αποικισμός της ρινός από *S. aureus* αύξησε τον κίνδυνο ενδοσοκομειακής βακτηριαιμίας από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο. Ωστόσο, οι μη-φορείς παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με τους φορείς. Δεδομένου ότι τα περισσότερα στελέχη *S. aureus*, που προκαλούν στους φορείς ενδοσοκομειακή βακτηριαιμία, είναι ενδογενούς προελεύσεως, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι οι φορείς είναι ανοσολογικά προσαρμοσμένοι στα δικά τους στελέχη *S. aureus*. Επομένως είτε οι φορείς παρουσιάζουν επαρκέστερη ανοσολογική απάντηση σε σχέση με τους μη-φορείς, είτε τα εξωγενή στελέχη, που προκαλούν λοίμωξη στους μη-φορείς, είναι περισσότερο λοιμογόνα από τα ενδογενή (99). Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκε εάν η ρινική φορεία σε *S. aureus* αποτελεί παράγοντα κινδύνου για διεισδυτικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις στους διαβητικούς ασθενείς.

Μέχρι σήμερα, η επιτυχία του *S. aureus* να αποικίζει τον άνθρωπο παραμένει αινιγματική. Συγκεκριμένα είναι πολυπαραγοντική και οφείλεται σε ποικίλους καθοριστές από πλευράς παθογόνου και ξενιστή. Από πλευράς ξενιστή, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μηχανισμοί που σχετίζονται με τη μη ειδική ανοσολογική απάντηση, συμπεριλαμβανομένων κυτοκινών, αντιμικροβιακών μορίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από το χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο.

Στους υποδοχείς που συμμετέχουν στην αναγνώριση του *S. aureus* ανήκουν οι TLR2 και NOD2, που ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μονοπάτια και οδηγούν σε αλλαγή έκφρασης γονιδίων. Η σηματοδότηση μέσω αυτών των υποδοχέων οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και στην παραγωγή AMPs και κυτοκινών, όπως της IL1β, η οποία στην συνέχεια επάγει την παραγωγή IL6, που ενισχύει τη, μεσολαβούμενη από τα ουδετερόφιλα, θανάτωση του *S. aureus* στο δέρμα (66).

Η IL6 είναι μια κυτοκίνη με σημαντικές αντι- και προφλεγμονώδεις ιδιότητες, η οποία συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση συγκεκριμένων ανοσολογικών απαντήσεων. Σε καταστάσεις φλεγμονής ή λοίμωξης, η IL6 εκκρίνεται από ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα και η συγκέντρωσή της στο αίμα πολλαπλασιάζεται ραγδαία. Τόσο η ενεργοποίηση του μονοπατιού NFκB όσο και η IL1 αποτελούν ισχυρά ερεθίσματα παραγωγής της IL6, η οποία συνιστά τον κυριότερο διαμεσολαβητή απάντησης οξείας φάσης στο ήπαρ. Επομένως, η IL6 οδηγεί στη σύνθεση πλειάδας πρωτεϊνών, όπως η CRP, το αμυλοειδές του ορού Α, η απτοσφαιρίνη και η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη, που εκκρίνονται από τα ηπατοκύτταρα κατά τη διάρκεια βακτηριακών λοιμώξεων και προστατεύουν τον οργανισμό από κατακλυσμιαίες φλεγμονώδεις αντιδράσεις (9).

Μόρια επιφανείας του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου, όπως η πεπτιδογλυκάνη και το λιποτειχοϊκό οξύ είναι πιθανοί διεγέρτες παραγωγής κυτοκινών, όπως ο TNF-α, οι ιντερλευκίνες IL1β, IL6 και η ιντερφερόνη-γ, ως απάντηση στη λοίμωξη. Σε ασθενείς με σηψαιμία από *S. aureus* έχουν βρεθεί στην οξεία φάση αυξημένες συγκεντρώσεις της IL6 στον ορό ακολουθούμενες από ταχεία μείωση (100). Η επαγωγή διαφορετικών αποκρίσεων κυτοκινών από τον *S. aureus* μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά κλινικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα επίπεδα της IL6 στον ορό ασθενών με επιπλεγμένη βακτηριαιμία από *S. aureus* σε σχέση με εκείνους που εμφάνιζαν ανεπίπλεκτη βακτηριαιμία. Επιπρόσθετα, η IL6 έχει αναδειχθεί ως πρώιμος δείκτης βαρύτητας δεδομένου ότι υψηλά κυκλοφορούντα επίπεδα στα αρχικά στάδια της λοίμωξης σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση (28).

Σημαντικός είναι ο ρόλος των φλεγμονωδών διαμεσολαβητών και στη διαδικασία αποικισμού από *S. aureus*. Το λιποτειχοϊκό οξύ και η πρωτεΐνη Α του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου επάγουν την

έκφραση, μεταξύ άλλων, της IL6 αναδεικνύοντας το ρόλο της στην άμυνα του ξενιστή κατά τη διαδικασία του αποικισμού. Ο Cole και οι συνεργάτες του έδειξαν σε *in vivo* πειράματα εθελοντών, στους οποίους πραγματοποιήθηκε ρινικός ενοφθαλμισμός χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου, ότι η επιτυχία του ρινικού αποικισμού εξαρτιόταν από την αρχική φλεγμονώδη απάντηση του ξενιστή. Πράγματι, εκρίζωση του παθογόνου επιτεύχθη στους εθελοντές, οι οποίοι παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα μεσολαβητών φλεγμονής, όπως οι ιντερλευκίνες IL1β, IL6, ο TNF-α και η ιντερφερόνη-γ (86).

Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της IL6, στις οποίες εντάσσεται και η απάντηση οξείας φάσης, ασκούνται μέσω μεμβρανικού υποδοχέα, η ενεργοποίηση του οποίου επάγει τις προστατευτικές ιδιότητες της IL6 ως προς την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων. Αντιθέτως, μέσω του διαλυτού υποδοχέα της, η IL6 συμμετέχει σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη και η ανάπτυξη ΣΔ. Συμπερασματικά, η στόχευση στην IL6 για την αντιμετώπιση διαφόρων νοσημάτων θα πρέπει να γίνεται προς το ανάλογο μονοπάτι, καθώς ο ολικός αποκλεισμός την μπορεί να μην έχει επιθυμητά αποτελέσματα (9).

Μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών, γενετικών, *in vivo* και *in vitro* μελετών στον άνθρωπο έχουν προσπαθήσει να αποσαφηνίσουν το ρόλο της IL6 στην ανάπτυξη ΣΔ2. Η IL6 είναι ρυθμιστής του μεταβολισμού της γλυκόζης στα υγιή άτομα, ενώ σε περίπτωση παχυσαρκίας ενισχύει την υπάρχουσα φλεγμονή. Θεωρώντας δεδομένη την εμπλοκή της φλεγμονής στην αιτιοπαθογένεια του ΣΔ, η IL6, ως μεσολαβητής της φλεγμονής, πιστεύεται ότι εμπλέκεται σε παθοφυσιολογικές διεργασίες επεμβαίνοντας στη σηματοδότηση της ινσουλίνης και διαταράσσοντας τη λειτουργία των β-κυττάρων. Σε πειραματικά μοντέλα μεταβολισμού της γλυκόζης, η *in vivo* έγχυση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης IL6 επάγει τη γλυκονεογένεση, την υπεργλυκαιμία και, αντιρροπιακά, την υπερινσουλιναιμία. Όμοιες μεταβολικές απαντήσεις έχουν παρατηρηθεί στον άνθρωπο μετά από χορήγηση υποδορίως ανασυνδυασμένης IL6 (15).

Αυξημένα επίπεδα IL6 έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΣΔ2 καθώς και σε άτομα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2 (6,101). Επιπρόσθετα, η IL6 φαίνεται πως σχετίζεται με θνητότητα σχετιζόμενη με ΣΔ καθώς και με επιπλοκές του ΣΔ, όπως καρδιαγγειακά συμβάματα και νευροπάθεια (102-103). Λόγω μελετών με αντικρουόμενα αποτελέσματα, διενεργήθηκε μετα-ανάλυση δεκαέξι προοπτικών

μελετών, από το Liu και τους συνεργάτες του, όπου βρέθηκε ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης ΣΔ2 ήταν 1.32 (95% CI 1.14–1.51) για κάθε 1 log mg/L προσ αύξηση στα επίπεδα της IL6 (104).

Γενετικές αναλύσεις στοχεύουν στην ταυτοποίηση γονιδίων που συμμετέχουν στην παθογένεια του ΣΔ2 και στην αποσαφήνιση μονοπατιών που εμπλέκονται στην προδιάθεση και πρόοδο της νόσου. Πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *IL6* μεταβάλλουν τα επίπεδα μεταγραφής και έκφρασης του γονιδίου και επομένως επηρεάζουν την ευπάθεια σε πληθώρα ασθενειών, όπως στο ΣΔ2, στη διαβητική νεφροπάθεια και καρδιαγγειακή νόσο (105-106). Ο πολυμορφισμός rs1800795 στην 5' ανοδική περιοχή της *IL6* και συγκεκριμένα στη θέση -174 (G→C) φαίνεται πως επηρεάζει τη μεταγραφή του γονιδίου μέσω αρνητικής ρυθμιστικής επίδρασης στη δραστηριότητα του υποκινητή (107).

Σε γενετικές μελέτες ατόμων με αντίσταση στην ινσουλίνη έχει βρεθεί υψηλού βαθμού συσχέτιση ανάμεσα στην ευαισθησία στην ινσουλίνη και σε ένα αλληλίο του *IL6* -174G/C πολυμορφισμού που σχετίζεται με υψηλότερη έκφραση IL6. Το G αλληλίο φαίνεται πως προκαλεί μεγαλύτερη ενεργότητα του υποκινητή της *IL6* και έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα ορού της IL6. Ομοίως, ομοζυγώτες για το “G” αλληλίο παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα IL6, αυξημένη ινσουλίνη και γλυκόζη αίματος σε σχέση με τους C/C ομοζυγώτες (108). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της κατανομής του αλληλίου του πολυμορφισμού *IL6* -174G/C στην ευπάθεια στο ΣΔ2 στον ομοιογενή γενετικά πληθυσμό της Κρήτης.

Πέρα από την ευπάθεια στο ΣΔ2, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός rs1800795 έχει συσχετιστεί ευρέως με τη σήψη και με τη θνητότητα σχετιζόμενη με σήψη. Το αλληλίο “C” πιστεύεται πως διακόπτει τη σύνδεση του επαγόμενου από τη νορεπινεφρίνη μεταγραφικού παράγοντα στον υποκινητή του γονιδίου της *IL6*, μειώνοντας ακολούθως την έκφραση του γονιδίου. Σε μετα-ανάλυση του Chauhan και των συνεργατών του το 2008 δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό -174G/C και στον κίνδυνο σήψης σε νεογνά εξαιρετικά χαμηλού βάρους γέννησης (109). Επίσης, μετα-ανάλυση του 2013 δεν επιβεβαίωσε συσχέτιση σε οποιαδήποτε ηλικία ή εθνότητα (110). Σε πρόσφατη μελέτη σε νεογνά στη Σαουδική Αραβία, το αλληλίο “G” συσχετίστηκε με πρόωμης έναρξης σήψη (111). Αντιθέτως, σε νεότερες μελέτες το αλληλίο “C” συσχετίστηκε με κίνδυνο

σήψης από πνευμονία (112-113). Ως προς τη θνητότητα οφειλόμενη σε σήψη, επίσης τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα (114-115).

Σε ανοσολογικό επίπεδο, πολυμορφισμοί σε γονίδια φλεγμονώδους απάντησης του ξενιστή έχουν συσχετιστεί με ρινική φορεία σε *S. aureus*. Πιο συγκεκριμένα, διαφορετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της λεκτίνης συνδεόμενης με μαννόζη, του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, της CRP, της β-ντεφενσίνης 1, του TLR9 και της IL4 έχουν βρεθεί σε φορείς και μη-φορείς του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου (67). Επιπλέον, παραλλαγές του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) έχουν συσχετιστεί με το ρινικό αποικισμό από *S. aureus*, τόσο στους ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 (87), όσο και τύπου 2 (41). Στη μελέτη μας εξετάστηκε, για πρώτη φορά, εάν ο πολυμορφισμός rs1800795 -174G/C της *IL6* σχετίζεται με το ρινικό αποικισμό από *S. aureus* σε ασθενείς με ΣΔ2.

Μελετώντας τη μη ειδική ανοσολογική απάντηση, αναδεικνύεται ολοένα και περισσότερο ο σημαντικός ρόλος της βιταμίνης D. Ο ενεργός μεταβολίτης της, 1,25(OH)₂D, συντίθεται έπειτα από διαδοχικές υδροξυλιώσεις και ασκεί τις δράσεις της μέσω αλληλεπίδρασης με τον ενδοκυττάριο υποδοχέα VDR, ο οποίος εκφράζεται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Το σύμπλεγμα 1,25(OH)₂D - VDR σχηματίζει ετεροδιμερές με τον υποδοχέα του ρετινοειδούς X που προσδέεται στη συνέχεια στα στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D, τα οποία εντοπίζονται σε ρυθμιστικές περιοχές διαφόρων ανοσολογικών γονιδίων (116-117).

Ο ρόλος της βιταμίνης D στην παθοφυσιολογία του ΣΔ2 είναι αμφιλεγόμενος στην επιστημονική κοινότητα. Ωστόσο, η σύνδεση ανάμεσα στην ανεπάρκεια της βιταμίνης D και στο ΣΔ2 έχει ενισχυθεί μετά την ανεύρεση του VDR στα β-κύτταρα. Πράγματι, στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D έχουν βρεθεί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της ινσουλίνης, επομένως το σύμπλεγμα βιταμίνης D – VDR ενισχύει τη μεταγραφή του γονιδίου και αυξάνει τη σύνθεση ινσουλίνης. Επιπρόσθετα, η βιταμίνη D παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες επιδρώντας είτε απευθείας σε γονίδια φλεγμονωδών κυτοκινών είτε έμμεσα σε μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση κυτοκινών (43-44). Σε πρόσφατη τυχαίοποιημένη μελέτη βρέθηκε ότι η συγχορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D και ασβεστίου βελτίωσε τη συστηματική φλεγμονή μειώνοντας τα επίπεδα IL6 και TNF-α σε διαβητικούς ασθενείς με ανεπάρκεια βιταμίνης D (118). Επίσης, η

παρουσία γενετικών πολυμορφισμών πιθανά στο γονίδιο του *VDR* έχει συσχετιστεί με αντίσταση στην ινσουλίνη και ανάπτυξη ΣΔ2, με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα (44).

Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω βιταμίνης D - *VDR* οδηγεί στην παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs), συμπεριλαμβανομένης της καθελιδίνης και της β-ντεφενσίνης. Η καθελιδίνη είναι ένα μικρό κατιονικό πεπτίδιο με ισχυρές αντιμικροβιακές και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες. Το γονίδιο της καθελιδίνης στον άνθρωπο κωδικοποιεί το πεπτίδιο της LL-37, στο N-τερματικό άκρο του οποίου, βρίσκονται δυο αμινοξέα λευκίνης και έχει μήκος συνολικά 37 αμινοξέων. Η LL-37 εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα και ιστούς, όπως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ιδιοσυστασιακά και σε επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος κατόπιν ερεθίσματος (119).

Στις ανοσοτροποποιητικές δράσεις του συγκεκριμένου πεπτιδίου εντάσσεται η αγγειογένεση τοπικά, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων, η απελευθέρωση κυτοκινών και η χημειοταξία. Μέσω αυτών των ιδιοτήτων, η LL-37 οργανώνει τη φλεγμονώδη απάντηση. Ειδικότερα, επάγει την έκφραση IL8 από μακροφάγα, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα, ενώ παράλληλα ενισχύει την παραγωγή του διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης-1 και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα (120). Επιπλέον, σε πειράματα αρουραίων, έχει αναδειχθεί ο ρόλος της LL-37 στη λειτουργία και στην αναγέννηση των νησιδίων του παγκρέατος συμμετέχοντας στην ομοιοστάση της γλυκόζης (57).

Η καθελιδίνη εκφράζεται ιδιοσυστασιακά σε χαμηλά επίπεδα στα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, ενώ απελευθερώνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις από κοκκιοκύτταρα και μονοπύρνα φαγοκύτταρα, ως απάντηση σε λοιμώδη ερεθίσματα. Η μέση συγκέντρωση της LL-37 στον ορό υγιών ατόμων βρέθηκε 1.18 μg/mL, ενώ η συγκέντρωσή της τοπικά μετά την αποκοκκίωση των ουδετεροφίλων μπορεί να είναι σημαντικά μεγαλύτερη (121).

Σε συνθήκες λοίμωξης, η αλληλεπίδρασή της καθελιδίνης με τις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες των παθογόνων μικροοργανισμών ουδετεροποιεί το μεμβρανικό φορτίο, αλλάζει τη δευτεροταγή και τεταρτοταγή δομή του πεπτιδίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό διαμεμβρανικών πόρων (119). Επίσης, η καθελιδίνη έχει την ιδιότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων και δρα

συνεργιστικά με άλλα μόρια άμυνας του ξενιστή, όπως τη λυσοζύμη και τη λακτοφερρίνη. Το φάσμα των παθογόνων μικροοργανισμών, που είναι ευαίσθητοι στην καθελιδίνη, είναι ευρύ και περιλαμβάνει Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια, μύκητες, ιούς και παράσιτα (122).

Ο Jeng και οι συνεργάτες του ανέδειξαν θετική σχέση ανάμεσα στα επίπεδα βιταμίνης D και καθελιδίνης σε βαρέως σηπτικούς ασθενείς (123). Ασθενείς με έλλειψη βιταμίνης D (<20ng/ml) ενδεχομένως αδυνατούν να παράγουν πλήρως καθελιδίνη με αποτέλεσμα την ευπάθεια σε λοιμώξεις. Η βιταμίνη D συμμετέχει ενεργά στην αντιμικροβιακή άμυνα του δέρματος μέσω επαγωγής της έκφρασης, πέραν της καθελιδίνης, και της β-ντεφενσίνης 2. Επιπρόσθετα, η βιταμίνη D συμβάλλει στην ακεραιότητα του επιδερμικού φραγμού και συμμετέχει στον περιορισμό της προφλεγμονώδους απάντησης και στη θανάτωση του *S. aureus* μέσω του οξειδωτικού στρες των μονοκυττάρων (124).

Πράγματι, κερατινοκύτταρα στα οποία έχει χορηγηθεί 1,25(OH)₂D παρουσίαζαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη θανάτωση του *S. aureus* σε σχέση με εκείνα που δεν προηγήθηκε χορήγηση βιταμίνης D (125). Επίσης, η Thomason και οι συνεργάτες της έδειξαν μια ανεξάρτητη συσχέτιση ανάμεσα στην έλλειψη βιταμίνης D και στη λοίμωξη από MRSA (126). Δεδομένου ότι η έλλειψη της βιταμίνης D αποδυναμώνει την άμυνα ενάντια στον *S. aureus* και λαμβάνοντας υπόψη ότι ο ΣΔ αποτελεί παράγοντα κινδύνου για έλλειψη στη βιταμίνη D, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η επάρκεια βιταμίνης D αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή ρινικής φορέας στον *S. aureus* στους διαβητικούς ασθενείς.

Στην προσπάθεια αποσαφήνισης της σχέσης ανάμεσα στη βιταμίνη D και στη ρινική φορέα από *S. aureus* έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες παρατήρησης, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Έχει παρατηρηθεί αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ορού της βιταμίνης D και του ρινικού αποικισμού, τόσο σε MRSA όσο και σε MSSA, ενώ σε άλλη μελέτη δεν έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσά τους (38,84,98). Επιπρόσθετα, η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D δεν έχει βρεθεί να μειώνει τα ποσοστά ρινικής φορέας σε MSSA ή MRSA (39,127).

Επί προσβολής του *S. aureus* στο δέρμα, τα κερατινοκύτταρα και άλλα κύτταρα της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης, όπως μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, μαστοκύτταρα και κύτταρα

φυσικούς φονείς επάγουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, που οδηγούν στην παραγωγή AMPs (β-ντεφενσινών και καθελισιδίνης) με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (128). Οι ρινικές εκκρίσεις στον άνθρωπο έχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή. Περιλαμβάνουν μια ποικιλία AMPs, όπως η λυσοζύμη, η λακτοφερρίνη, οι ντεφενσίνες και η καθελισιδίνη που δρουν συνεργιστικά για την επιτυχή εκρίζωση του παθογόνου. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι οι β-ντεφενσίνες, η καθελισιδίνη και η λυσοζύμη εμφανίζουν συνεργιστική αντισταφυλοκοκκική δραστηριότητα σε ασθενείς με κυστική ίνωση, όταν χορηγούνται μέσω ρινικής εισπνοής (129).

Η LL-37 έχει αποδειχθεί ισχυρότερη και γρηγορότερη στην εξουδετέρωση του εξοκυττάρου *S. aureus*, συγκριτικά με τη λακτοφερρίνη, τη δοξυκυκλίνη και τη κεφαζολίνη. Στην περίπτωση, ωστόσο, του ενδοκυττάρου χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου απαιτείται αρκετά υψηλότερη συγκέντρωση (100 μ M έναντι 3 μ M) για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι αντιβακτηριακές ιδιότητες της LL-37 εξασθενούν παρουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνών στον ορό, όπως των απολιποπρωτεϊνών (54).

Η Ouhara και οι συνεργάτες της έδειξαν ότι τα κλινικά στελέχη MRSA παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση στην LL-37, συγκριτικά με τα απομονωθέντα στελέχη με ευαισθησία στη μεθισιλίνη (MSSA), γεγονός που αποδίδεται στο επίπεδο αντίστασης στη μεθισιλίνη και κυρίως στο περισσότερο θετικό βακτηριακό φορτίο επιφανείας του MRSA. Επιπρόσθετα, τα στελέχη MRSA εμφανίζουν υψηλότερη αντίσταση στο κατιονικό αντιμικροβιακό πεπτίδιο της LL-37 συγκριτικά με άλλα κατιονικά πεπτίδια, όπως της β-ντεφενσίνης 3 λόγω χαμηλότερου φορτίου του πεπτιδίου της LL-37 που δυσχεραίνει την αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη του παθογόνου (55).

Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα επίπεδα της βιταμίνης D και της LL-37 στον ορό ασθενών με ΣΔ2 και η ύπαρξη συσχέτισης με το πρότυπο ρινικής φορέας στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (μη-φορεία, εμμένουσα ή διαλείπουσα φορεία).

Γνωρίζοντας ότι οι δράσεις της βιταμίνης D σε πυρηνικό επίπεδο εξαρτώνται από τον υποδοχέα της VDR, είναι απαραίτητη η μελέτη των SNPs στο γονίδιο του VDR, που ενδεχομένως οδηγούν σε τροποποίηση της δομής της παραγόμενης πρωτεΐνης και επηρεάζουν το μεταβολισμό της βιταμίνης D

και την έκφραση της LL-37. Οι πολυμορφισμοί *FokI* (rs10735810), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) και *TaqI* (rs731236) είναι οι πλέον κοινοί πολυμορφισμοί στις μελέτες γενετικής συσχέτισης. Οι *TaqI*, *BsmI*, και *ApaI* εντοπίζονται σε μια περιοχή με άγνωστη λειτουργία ανάμεσα στα εξώνια 8 και 9, ενώ ο πολυμορφισμός *FokI* εντοπίζεται στο εξώνιο 2 και αποτελείται από αλλαγή της βάσης T σε C σε ένα κωδικόνιο έναρξης. Παρουσία του αλληλίου C χρησιμοποιείται μια εναλλακτική θέση έναρξης που οδηγεί σε διαφορετικού μεγέθους πρωτεΐνη (40).

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του *VDR* ενδεχομένως επηρεάζουν την πιθανότητα λοίμωξης ή αποικισμού από ενδοκυττάριους μικροοργανισμούς (συμπεριλαμβανομένου του *S. aureus*) δεδομένου ότι οι μεταβολίτες της βιταμίνης D διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των μακροφάγων. Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα, που συμμετέχουν ενεργά στη μη ειδική ανοσιακή απάντηση του *S. aureus*, εκφράζουν λειτουργικό *VDR* σε επίπεδα όμοια με εκείνα των μακροφάγων (130).

Αρκετές μελέτες παρατήρησης έχουν ερευνήσει τη συσχέτιση ανάμεσα στη ρινική φορεία σε *S. aureus* και σε πολυμορφισμούς του γονιδίου του *VDR*. Σε μελέτη των Claassen και συνεργατών στο γενικό πληθυσμό δεν επιβεβαιώθηκε συσχέτιση ανάμεσα τους (88). Αντιθέτως, σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα σε δύο πιθανά μη-λειτουργικούς πολυμορφισμούς του *VDR* (*ApaI* και *TaqI*) και στην επίπτωση ρινικής φορείας στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (87). Ο Messaritakis και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι σε ασθενείς με ΣΔ2 υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο λειτουργικό πολυμορφισμό *FokI* και στη ρινική φορεία σε *S. aureus* (41). Επομένως, σε καταστάσεις με διαταραχή στην ανοσία όπως ο ΣΔ, οι γενετικοί πολυμορφισμοί του *VDR* φαίνεται πως εμπλέκονται στον αποικισμό από *S. aureus*.

Ο λειτουργικός πολυμορφισμός *FokI*, και συγκεκριμένα ο γονότυπος FF, έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα καθελιδίνης στον ορό ασθενών με φυματίωση, ανεξάρτητα από τη σοβαρότητα της νόσου (42). Προς το παρόν, άγνωστη παραμένει η συσχέτιση των τεσσάρων αυτών πολυμορφισμών του *VDR* με την έκφραση της καθελιδίνης σε διαβητικούς ασθενείς και ρινική φορεία στον *S. aureus*. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε ο ρόλος των πολυμορφισμών του *VDR*

(AraI, TaqI, BsmI και FokI) στα επίπεδα ορού της 25(OH)D και της καθελισιδίνης σε ασθενείς με ΣΔ2 και ρινικό αποικισμό στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο.

2.4. Ασθενείς και Μέθοδοι

Πληθυσμός μελέτης

Η ομάδα μελέτης αποτελούνταν από 240 ασθενείς με ΣΔ2 που παρακολουθούνταν στα εξωτερικά ιατρεία της Παθολογικής και της Ενδοκρινολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατά τη χρονική διάρκεια 2013 - 2014. Η διάγνωση του ΣΔ2 τίθετο με βάση τα καθιερωμένα κριτήρια της Αμερικανικής Διαβητολογικής Εταιρείας, όπως φαίνονται στον πίνακα 5 (131). Η ομάδα ελέγχου απαρτιζόταν από 236 μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας και φύλου, οι οποίοι παρακολουθούνταν στα εξωτερικά ιατρεία της Παθολογικής κλινικής και δεν είχαν ιστορικό ΣΔ2, ούτε έλαβαν ποτέ στο παρελθόν αντιδιαβητική αγωγή. Η έγγραφη συγκατάθεση κάθε ατόμου ήταν απαραίτητη προϋπόθεση για τη συμμετοχή του στη μελέτη. Μια φόρμα καταγραφής συμπληρωνόταν για κάθε ασθενή, όπου καταγραφόταν η ηλικία, το φύλο, η διάρκεια του ΣΔ2, η θεραπεία που ελάμβαναν, η παρουσία επιπλοκών, οι συννοσηρότητες, το κάπνισμα, εργαστηριακά ευρήματα όπως το λιπιδαιμικό προφίλ και η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, και η χρήση ή μη συμπληρωμάτων βιταμίνης D. Περισσότερο λεπτομερείς πληροφορίες λαμβάνονταν από ιατρικά αρχεία, εάν αυτό κρινόταν απαραίτητο. Κριτήρια αποκλεισμού της μελέτης ήταν η παρουσία ΣΔτ1 ή άλλων ενδοκρινολογικών νοσημάτων, η χρήση φαρμάκων που οδηγούν δευτερογενώς σε ΣΔ2, η παρουσία λοίμωξης, η χρήση χρόνιας ανοσοκατασταλτικής αγωγής, η πρόσφατη λήψη αντιμικροβιακών φαρμάκων καθώς και η πρόσφατη νοσηλεία σε νοσοκομείο. Το πρωτόκολλο της μελέτης, σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι του 1964, είχε λάβει την έγκριση από την αντίστοιχη επιστημονική επιτροπή ηθικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν Κρητικής καταγωγής και δεν είχαν συγγενική σχέση μεταξύ τους. Η Κρήτη είναι το νοτιότερο σημείο της Ευρώπης (εντοπίζεται 25°E και 35°N), με περίπου 650,000 κατοίκους.

Πίνακας 5. Κριτήρια διάγνωσης ΣΔ2 [131]

-
1. A1C $\geq 6.5\%$. The test should be performed in a laboratory using a method that is NGSP certified and standardized to the DCCT assay.*
OR
 2. FPG ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l). Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 h.*
OR
 3. 2-h plasma glucose ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) during an OGTT. The test should be performed as described by the World Health Organization, using a glucose load containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water.*
OR
 4. In a patient with classic symptoms of hyperglycemia or hyperglycemic crisis, a random plasma glucose ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l).
-

*In the absence of unequivocal hyperglycemia, criteria 1–3 should be confirmed by repeat testing.

Εξαγωγή και ανάλυση DNA

Από όλους τους διαβητικούς συμμετέχοντες και τους 180 μάρτυρες έγινε συλλογή ολικού αίματος σε σωληνάρια που περιείχαν EDTA, και απομόνωση του γενωμικού DNA από περιφερικά λευκά αιμοσφαίρια χρησιμοποιώντας το INVITROGENE Kit (PureLink® Genomic DNA Mini Kit). Το εξαχθέν DNA αποθηκεύτηκε στους -20 °C έως την ανάλυση.

Σε 144 ασθενείς με ΣΔ2 και στους 180 μη-διαβητικούς μάρτυρες έγινε ανάλυση του πολυμορφισμού rs1800795 G>C της *IL6*. Η ενίσχυση του DNA έγινε με καθιερωμένες τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), τις οποίες ακολούθησε στη συνέχεια η τεχνική πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP).

Αναλυτικότερα, το cDNA της ανθρώπινης αλληλουχίας του γονιδίου *IL6* (GenBank accession number NG_011640) χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό εκκινητών για την ενίσχυση με PCR. Ο ανοδικός 5'-TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTG T-3' και ο καθοδικός εκκινητής 5'-CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG-3' σχεδιάστηκαν για να οριοθετήσουν το τμήμα του υποκινητή του γονιδίου *IL6* που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό υπό μελέτη (εντοπισμένο στο χρωμόσωμα 7). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο διαλύματος 25μL, περιλαμβάνοντας 2mM MgCl₂, 0.75mM κάθε dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2.25 μM κάθε εκκινητή και 2.5 units Taq πολυμεράση (Invitrogen, Carlsbad, CA). Στον πίνακα 6 φαίνονται αναλυτικά οι όγκοι του κάθε

αντιδραστήριου που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της PCR καθώς και η τελική τους συγκέντρωση. Οι συνθήκες της αντίδρασης στον θερμικό κυκλοποιητή δίνονται στον πίνακα 7. Τα παράγωγα της PCR, τα οποία είχαν μέγεθος 198 ζεύγη βάσεων, οπτικοποιήθηκαν σε 2,5% πήκτωμα αγαρόζης, χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο.

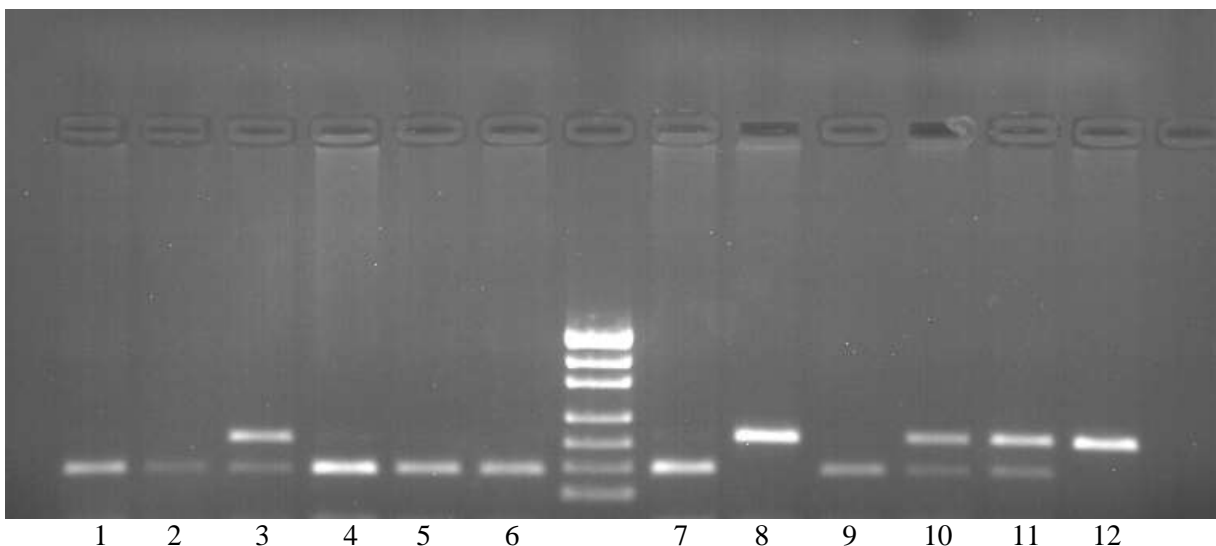
Πίνακας 6. Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους στον τελικό όγκο των 25 μL

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Primer F (37.5 μM)	1.5	2.25 μM
Primer R (37.5 μM)	1.5	2.25 μM
dNTPs (12.5 mM)	1.5	0.75mM κάθε dNTP
MgCL ₂ (50 mM)	1	2 mM
10x PCR Buffer with MgCl ₂	2.5	1x
Taq Polymerase (5 units/ μL)	0.5	2.5 units/25 μL
DNA (25 ng/ μL)	4	100ng/25 μL
H ₂ O	12.5	
Τελικός όγκος	25	

Πίνακας 7. Συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης PCR στο θερμικό κυκλοποιητή

Διαδικασία	T (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	5 min	1
Αποδιάταξη	94	1 min	35
Σύνδεση εκκινητών	55	90 sec	
Επιμήκυνση	72	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72	10 min	1

Ακολούθησε η γονοτύπηση με ανάλυση περιορισμού των PCR προϊόντων χρησιμοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο *Sfa*NI (New England BioLabs, Beverly, MA). Εν περιλήψει, 7 μ L κάθε δείγματος PCR αναμείχθηκαν με 1 μ L του περιοριστικού ενζύμου, 2 μ L 10x ρυθμιστικού διαλύματος και 10 μ L H₂O. Μετά από επώαση στους 37°C για 2 ώρες, τα θραύσματα περιορισμού διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 2.5% πήκτωμα αγαρόζης, χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο και οπτικοποιήθηκαν με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στη συσκευή 312-nm ultraviolet transilluminator. Το ενισχυμένο DNA από το αλληλίο G περιλαμβάνει τη θέση πέψης του περιοριστικού ενζύμου με αποτέλεσμα τη δημιουργία δυο θραυσμάτων των 140 και 58 ζευγών βάσεων. Αντιθέτως, η παρουσία του C αλληλίου συνεπάγεται απουσία της θέσης περιορισμού του *Sfa*NI. Επομένως, οι γονότυποι GG, GC, και CC είναι ομοζυγώτες για την παρουσία της θέσης περιορισμού (140/58 bp), ετεροζυγώτες για την παρουσία και απουσία της θέσης (198/140/58 bp) και ομοζυγώτες για την απουσία της θέσης (198 bp), αντίστοιχα. Οι γονότυποι σημειώθηκαν τυφλά και επαναλήφθηκε η ανάλυση όλων των διαφορούμενων δειγμάτων. Επιπρόσθετα, 60% των δειγμάτων αναλύθηκε δύο φορές, ώστε να βεβαιωθεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων μετά την ολοκλήρωση της αρχικής γονοτύπησης.



Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτικές ηλεκτροφορήσεις DNA μετά από πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο *Sfa*NI, ενδεικτικές των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs180095 -174G/C

του γονιδίου *IL6*. 1-2, 4-7, 9: ομόζυγοι για το G αλληλίο, 8,12: ομόζυγοι για το C αλληλίο και 3, 10-11: ετερόζυγοι.

Επιπρόσθετα, σε 173 από τους ΣΔ2 ασθενείς είχε προηγηθεί στο εργαστήριό μας γονοτύπηση του γονιδίου *VDR* και ειδικότερα των πολυμορφισμών *FokI* (rs10735810), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) και *TaqI* (rs731236) μέσω των τεχνικών PCR-RFLP. Η διαδικασία της γονοτύπησης περιγράφεται λεπτομερώς στη μελέτη του Messaritakis και των συνεργατών (41). Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση των τεμαχίων που φιλοξενούν τους πολυμορφισμούς του υποδοχέα της βιταμίνης D καθώς και οι συνθήκες PCR.

Πίνακας 8. Εκκινητές και συνθήκες PCR για τους SNPs του *VDR*

SNP	PCR primers	PCR conditions
<i>ApaI</i>	Forward (5' -3') CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA	Αποδιάταξη στους 94ο C για 5 min, ακολουθούμενη από την προσθήκη της πολυμεράσης, μετά τα δείγματα εκτέθηκαν σε 30 κύκλους αποδιάταξης (στους 94ο C για 60 sec), σύνδεσης εκκινητών (στους 60° C για 60 sec), και επιμήκυνσης αλύσου (στους 72°C για 1 min), ακολουθούμενης από ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72° C για 7 min
	Reverse (3' -5') GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC	
<i>BsmI</i>	Forward (5' -3') CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA	Αρχική θέρμανση στους 94° C για 4 min, ακολουθούμενη από την προσθήκη της πολυμεράσης, και μετά 35 κύκλους αποδιάταξης (στους 94° C για 20 sec), σύνδεσης εκκινητών (στους 60° C για 30 sec) και επιμήκυνσης αλύσου (στους 72° C για 30 sec), ακολουθούμενης από ένα τελικό βήμα
	Reverse (3' -5') AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG	

		επιμήκυνσης στους 72° C για 7 min
<i>FokI</i>	Forward (5' -3') AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT	Αρχική θέρμανση στους 94° C για 5 min, ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποδιάταξης (στοις 94° C για 20 sec), σύνδεσης εκκινητών (στοις 60° C για 30 sec) και επιμήκυνσης αλύσου (στοις 72° C για 30 sec), ακολουθούμενης από ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72° C για 7 min
	Reverse (3' -5') ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC	
<i>TaqI</i>	Forward (5' -3') CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA	Αποδιάταξη στους 94° C για 5 min, ακολουθούμενη από την προσθήκη της πολυμεράσης, μετά τα δείγματα εκτέθηκαν σε 35 κύκλους αποδιάταξης (στοις 94° C για 30 sec), σύνδεσης εκκινητών (στοις 70° C για 30 sec), και επιμήκυνσης αλύσου (στοις 72° C για 1 min), ακολουθούμενης από ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72° C για 7 min
	Reverse (3' -5') GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC	

Ακολούθησε πέψη των προϊόντων της PCR με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI*, *BsmI*, *FokI* και *TaqI* (Promega Corp., Madison, WI, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Περιληπτικά, 7μL κάθε PCR προϊόντος αναμείχθηκαν με 0.5 μL κάθε περιοριστικού ενζύμου, 2.5 μL 10x ρυθμιστικού διαλύματος, 0.5 μL βόειας αλβουμίνης ορού και 14.5 μL H₂O. Μετά από επώαση στους 37°C για 2 ώρες, τα περιοριστικά θραύσματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 2.5% πήκτωμα αγαρόζης, χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο, και οπτικοποιήθηκαν με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στη συσκευή 312-nm ultraviolet transilluminator. Το αλλήλιο με το μικρό γράμμα αναπαριστά την παρουσία της θέσεως περιορισμού (*f*: *FokI*, *b*: *BsmI*, *a*: *ApaI*, *t*:*TaqI*), και το αλλήλιο με το κεφαλαίο γράμμα αναπαριστά την απουσία της θέσεως περιορισμού (*F*, *B*, *A*, ή *T*, αντίστοιχα).

Καλλιέργεια ρινικού επιχρίσματος για ανίχνευση S. aureus

Ρινικά δείγματα ελήφθησαν από όλους τους διαβητικούς ασθενείς περιστρέφοντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό τέσσερις φορές και στους δύο πρόσθιους ρώθωνες του κάθε συμμετέχοντος στη μελέτη διαβητικού ατόμου. Τα μάκτρα αμέσως τοποθετούνταν σε μέσο μεταφοράς Amies (BioMerieux, Marcy L'Etoile, France) και άμεσα μεταφέρονταν στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Οι στυλεοί παρέμεναν στους 4°C για μία ώρα πριν ενοφθαλμιστούν σε άγαρ μαννιτόλης και Columbia άγαρ με 5% αίμα προβάτου για την ανίχνευση στελεχών *S. aureus*. Οι καλλιεργητικοί δίσκοι επωάζονταν στους 36°C για 48 ώρες. Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος ταυτοποιούνταν με βάση τη μορφολογία των αποικιών, τη χρώση κατά Gram, τη δοκιμασία καταλάσης, τη δοκιμασία κοαγκουλάσης και το σύστημα API 20 Staph system (Biomerieux). Τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν ταξινομήθηκαν με βάση το φαινότυπο σε ευαίσθητα στη μεθισιλίνη (MSSA) ή ανθεκτικά (MRSA) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με δίσκο cefoxitin 30μg σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (132).

Ένα δεύτερο ρινικό δείγμα για καλλιέργεια ελήφθη μετά από διάστημα μιας εβδομάδας έως ένα μήνα. Οι συμμετέχοντες ταξινομούσαν ως εμμένοντες φορείς εάν και οι δύο καλλιέργειες ήταν θετικές, ως μη-φορείς εάν και οι δύο καλλιέργειες ήταν αρνητικές, και ως διαλείποντες φορείς σε περιπτώσεις όπου η μία καλλιέργεια ήταν θετική και η άλλη ήταν αρνητική (69,85,88,97). Οι ασθενείς με ένα μόνο διαθέσιμο ρινικό δείγμα αποκλείονταν από την περαιτέρω ανάλυση της κατάστασης ρινικής φορέας.

Ποσοτικός προσδιορισμός 25(OH)D και LL-37 στο αίμα

Από 118 διαβητικούς ασθενείς της μελέτης έγινε συλλογή αίματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 25(OH)D και της LL-37, ενώ επιπρόσθετα σε 94 μη-διαβητικούς μάρτυρες έγινε μέτρηση των επιπέδων της 25(OH)D.

Για τη μέτρηση της 25(OH)D ελήφθησαν 2ml ολικού αίματος κατά τη διάρκεια καλοκαιρινών μηνών. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο βιοχημικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου

Ηρακλείου, όπου ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της 25(OH)D με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, σε συνδυασμό με τη στερεά φάση παραμαγνητικών σωματιδίων. Για αυτό το σκοπό απαραίτητη ήταν η χρήση του αυτόματου ανοσολογικού αναλυτή Unicel DxI 800 Immunoassay System (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Η 25(OH)D αποτελεί τον πλέον αξιόπιστο δείκτη εκτίμησης της επάρκειας του οργανισμού σε βιταμίνη D. Συγκεκριμένα, η έλλειψη της βιταμίνης D ορίζεται ως η κατάσταση κατά την οποία τα επίπεδα ορού της 25(OH)D είναι μικρότερα από 20 ng/ml, η ανεπάρκεια όταν τα επίπεδα της 25(OH)D είναι μεταξύ 21–29 ng/ml και η επάρκεια της βιταμίνης D όταν τα επίπεδα της 25(OH)D είναι μεταξύ 30-100 ng/ml, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ενδοκρινολογικής εταιρείας (133).

Για τη μέτρηση της LL-37 χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια που περιείχαν EDTA. Τα δείγματα αίματος παρέμειναν σε πάγο και εντός 20 λεπτών ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C στα 1500g. Απομονώθηκε το υπερκείμενο πλάσμα και ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για να αποφευχθεί η επιμόλυνση με λευκά αιμοσφαίρια. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -70 °C έως την ανάλυση. Οι αξιολογήσεις πραγματοποιήθηκαν μετά την ολοκλήρωση της συλλογής των δειγμάτων.

Τα επίπεδα ορού της LL-37 προσδιορίστηκαν με τη δοκιμασία της ενζυμοσυσζευγμένης ανοσοπροσρόφησης με τη χρήση ενός εμπορικός διαθέσιμου κιτ και συγκεκριμένα του Human LL-37 ELISA Kit (HK321; Hycult Biotechnology, Uden, Netherlands), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το κιτ περιλάμβανε τα παρακάτω υλικά και αντιδραστήρια: 2 πλάκες 96 οπών επιστρωμένες με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης LL-37, διάλυμα έκπλυσης/αραίωσης, βιοτινυλιωμένο αντί-LL-37 αντίσωμα, στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση, πρότυπο διάλυμα, διάλυμα χρωμοφόρου υποστρώματος που περιέχει τετρα-μέθυλο-βενζιδίνη (TMB) και διάλυμα τερματισμού (οξαλικό οξύ).

Τα κατεψυγμένα δείγματα παρασκευάστηκαν για ανάλυση σε θερμοκρασία δωματίου και αναλύθηκαν μέσα σε 3½ ώρες. Η αραίωση στην οποία έγινε η επεξεργασία των δειγμάτων των ασθενών ήταν 1:2. Ακολούθως έγινε η αραίωση του πρότυπου διαλύματος. Για το σκοπό αυτό

χρειάστηκαν 8 σωλήνες. Στο σωλήνα 1 προστέθηκαν 750μL διαλύματος έκπλυσης/αραιώσης ώστε η τελική συγκέντρωση της LL-37 να είναι 100ng/ml και στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις στους σωλήνες 2-8, στους οποίους προστέθηκαν 250 μL του διαλύματος έκπλυσης/αραιώσης. Από το σωλήνα 1 αφαιρέθηκαν 125 μL και προστέθηκαν στο σωλήνα 2, από το σωλήνα 2 αφαιρέθηκαν 125 μL και προστέθηκαν στο σωλήνα 3 και ούτω καθεξής. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε ο σωλήνας 8 ο οποίος περιείχε μόνο τα 250 μL διαλύματος έκπλυσης/αραιώσης Έτσι, προέκυψαν 8 σωλήνες με τις συγκεντρώσεις 100 ng/ml, 33 ng/ml, 11 ng/ml, 3.7 ng/ml, 1.2 ng/ml, 0.4 ng/ml, 0.1 ng/ml και 0 ng/ml.

Στη συνέχεια 100 μL από τα πρότυπα διαλύματα, τα δείγματα και το τυφλό δείγμα τοποθετήθηκαν στο δισκίο και επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, η ποσότητα της LL-37, που υπήρχε σε κάθε δείγμα, δεσμεύτηκε και ακινητοποιήθηκε στις οπές. Ακολούθησαν τέσσερις πλύσεις του δίσκου. Μετά, προστέθηκαν 100 μL βιοτινυλιωμένου αντι-LL-37 αντισώματος και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα. Ακολούθησαν πάλι τέσσερις πλύσεις. Μετά την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου βιοτινυλιωμένου αντισώματος προστέθηκαν 100 μL στρεπταβιδίνης η οποία είναι συνδεδεμένη με υπεροξειδάση. Μετά την επώαση για 1 ώρα, ακολούθησαν τέσσερις πλύσεις των οπών. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 μL από το διάλυμα με το υπόστρωμα TMB (τετραμεθυλβενζιδίνη) και το δισκίο επώαστηκε για 30 λεπτά. Η δεσμευμένη στο αντίσωμα υπεροξειδάση κατέλυσε την οξείδωση του TMB από το H₂O₂ οδηγώντας στην παραγωγή υδατοδιαλυτού μπλε προϊόντος. Μετά την προσθήκη 100μL του διαλύματος τερματισμού, το μπλε προϊόν μετατράπηκε σε κίτρινο υδατοδιαλυτό προϊόν. Η ένταση του παραγόμενου χρώματος (κίτρινο) ήταν ανάλογη της ποσότητας της LL-37. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της LL-37 έγινε με μέτρηση εντός τριάντα λεπτών της οπτικής απορρόφησης στα 450nm σε ειδικό φωτόμετρο και, στη συνέχεια, με τη χρήση μιας βαθμονομημένης καμπύλης.

Η απόδοση και τα χαρακτηριστικά ανιχνεύσεως ήταν τα εξής: όριο ανίχνευσης ίσο με 0.1 ng/ml και συντελεστές διακύμανσης (intra-/inter-assay) 5.3% και 6.1%, αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν.

Εκτίμηση ευπάθειας σε κλινικές λοιμώξεις

Όλοι οι ασθενείς με ΣΔ2 παρακολούθηθηκαν για 6 έτη (2014-2020) και καταγράφηκαν όλα τα επιβεβαιωμένα επεισόδια λοιμώξεων από *S. aureus* στο χρονικό αυτό διάστημα. Συγκεκριμένα, έγινε αναζήτηση των συγκεκριμένων ασθενών στο πληροφοριακό σύστημα AMED για την ανεύρεση νοσηλειών λόγω λοιμώξεων. Στη συνέχεια ακολούθησε αναζήτηση όλων των καλλιεργειών τους από τα μικροβιολογικά εργαστήρια των δυο τριτοβάθμιων νοσοκομείων του νομού Ηρακλείου, του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και του Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και κατεγράφησαν εκείνες στις οποίες απομονώθηκε *S. aureus*.

2.5. Στατιστική Ανάλυση

Η κατανομή γονοτύπων και συχνοτήτων αλληλίων για τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του Chi-square test. Η ισορροπία Hardy-Weinberg ελέγχθηκε συγκρίνοντας τις αναμενόμενες και παρατηρούμενες γονοτυπικές συχνότητες με Chi-square test. Το 2-tailed Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξουμε εάν οι κατανομές των κατηγοριοποιημένων μεταβλητών μεταξύ των ομάδων ήταν σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε σε πίνακες συνάφειας, συμπεριλαμβάνοντας υπολογισμούς του λόγου πιθανοτήτων (odds ratio, OR) και του ανώτερου και κατώτερου ορίου του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (95% CI). Τα ποσοτικά δεδομένα εκφράστηκαν είτε ως μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) είτε, στην περίπτωση που δεν παρουσίαζαν κανονική κατανομή, ως διάμεσος τιμή (ελάχιστη-μέγιστη τιμή). Το 2-tailed Student's t-test χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξουμε τη στατιστική σημασία των διαφορών μεταξύ των συνεχών κανονικών μεταβλητών. Για τις ποσοτικές μεταβλητές με μη κανονική κατανομή η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των στατιστικών δοκιμασιών Mann – Whitney ή Kruskal – Wallis test. Η συσχέτιση των μεταβλητών προσδιορίστηκε με τη στατιστική δοκιμασία Spearman correlation coefficient. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε η τιμή $p < 0.05$ σε όλες τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου IBM SPSS Statistics, έκδοση 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.6. Αποτελέσματα

Στη παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν 240 ασθενείς με ΣΔ2 [85 (35.4%) άνδρες], με διάμεση ηλικία τα 68 (44-95) έτη και διάμεση διάρκεια ΣΔ2 από τη διάγνωση τα 10.5 (1-40) έτη. Στην αρχική καλλιέργεια του ρινικού επιχρίσματος, 57/240 (23.8%) ασθενείς με ΣΔ2 βρέθηκαν αποικισμένοι με *S. aureus*. Λαμβάνοντας υπόψιν το αποτέλεσμα και της δεύτερης καλλιέργειας ρινικού επιχρίσματος παρατηρήσαμε ότι 23 (9.6%) άτομα εντάχθηκαν στους εμμένοντες φορείς, 39 (16.2%) στους διαλείποντες φορείς και 178 (74.2%) στους μη-φορείς. Τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά τους περιγράφονται στον πίνακα 9. Σε μια υποανάλυση των ρινικών φορέων, με βάση την ευαισθησία του *S. aureus*, 9 (14.5%) άτομα βρέθηκαν αποικισμένοι με MRSA και 50 (80.7%) με MSSA. Τρεις φορείς (4.8%) εμφάνισαν μεικτό αποικισμό με απομόνωση εναλλάξ MRSA και MSSA στις καλλιέργειες ρινικού επιχρίσματος.

Πίνακας 9. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των 240 ΣΔ2 ασθενών με βάση το πρότυπο ρινικής φορείας

Characteristics	Persistent carriers (N=23)	Intermittent carriers (N=39)	Non-carriers (N=178)	P-value
Age (years)	66 (44-80)	67 (47-79)	70 (46-95)	0.045
Sex				
Male	4 (17.4%)	10 (25.6%)	71 (39.9%)	0.040
Diabetes duration (years)	10 (1-35)	8 (1-40)	8 (1-40)	0.700
Diabetes treatment				

Non-insulin treated	18 (78.3%)	35 (89.7%)	134 (75.3%)	0.154
Insulin treated	5 (21.7%)	4 (10.3%)	44 (24.7%)	
Complications of diabetes				
Cardiovascular disease	7 (30.4%)	8 (20.5%)	50 (28%)	0.723
Peripheral vascular disease	4 (17.4%)	3 (7.7%)	35 (19.7%)	0.275
Nephropathy	2 (8.7%)	4 (10.2%)	22 (12.3%)	0.861
Retinopathy	2 (8.7%)	3 (7.7%)	24 (13.5%)	0.548
Neuropathy	2 (8.7%)	1 (2.6%)	16 (9%)	0.256
Concomitant underlying diseases				
Hypertension	16 (69.6%)	32 (82%)	135 (75.8%)	0.576
Current smoking	2 (8.7%)	3 (7.7%)	9 (5%)	0.729
Total Cholesterol	172 (113-256)	190 (118-294)	182 (90-299)	0.265
*HDL	48 (35-80)	48 (27-78)	49 (15-87)	0.983
**LDL	89 (44-177)	103 (66-197)	105 (45-216)	0.752
Triglycerides	116 (55-275)	159 (56-585)	137 (40-440)	0.050
***HbA1c	6.9 (5.8-11)	7 (5.3-13.4)	7.1 (4.7-13.7)	0.409

HDL: High-density lipoprotein, **LDL: Low-density lipoprotein, *HbA1c: Glycatedhaemoglobin*

Επίπεδο σημαντικότητας: $p < 0.05$. Οι τιμές σημαντικότητας (p-values) υπολογίστηκαν με το chi-square test ή το t-test. Οι ποσοτικές μεταβλητές αναγράφονται ως διάμεσος τιμή (ελάχιστη τιμή-μέγιστη τιμή).

Από το σύνολο των ασθενών με ΣΔ2, στους εκατό σαράντα τέσσερις ασθενείς (53 άνδρες και 91 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 68.3 έτη) και από το σύνολο των μη-διαβητικών, στους εκατό ογδόντα

υγιείς μάρτυρες (82 άνδρες και 98 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 74.9 έτη), πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs1800795 της *IL-6*. Τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ατόμων στους οποίους πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs1800795 της *IL-6*

Characteristics	T2D patients (N=144)	Controls (N=180)	P-value
Age (years)	68.3 (\pm 9.9)	74.9 (\pm 11.7)	<0.0001
Sex			
Male	53 (36.8%)	82 (45.6%)	0.1124
Disease duration (years)	10.8 (\pm 8.4)	*NA	
Treatment		NA	
Diet and exercise	14 (9.7%)		
Insulin	13 (9%)		
Oral drugs	99 (68.8%)		
Insulin + oral drugs	18 (12.5%)		
Complications of diabetes		NA	
Cardiovascular disease	42 (29.2%)		
Peripheral vascular disease	20 (13.9%)		
Retinopathy	19 (13.2%)		
Nephropathy	14 (9.7%)		
Neuropathy	12 (8.3%)		
Concomitant underlying diseases			
Hypertension	106 (73.6%)	116 (64.4%)	0.0775
Hyperlipidemia	82 (56.9%)	51 (28.3%)	<0.0001

Obesity	1 (0.7%)	0 (0%)	NA
Current smoking	10 (6.9%)	7 (3.9%)	0.2203
**HbA1c	7.8 (\pm 1.9)	NA	

* NA: Not available, ** HbA1c: Glycatedhaemoglobin

Επίπεδο σημαντικότητας: $p < 0.05$. Οι τιμές σημαντικότητας (p-values) υπολογίστηκαν με το chi-square test ή το t-test.

Η ετεροζυγωτία (G/C) παρατηρήθηκε συχνότερα σε ασθενείς με ΣΔ2 σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (OR 1.98, 95% CI: 1.24-3.18, $p=0.004$). Επίσης, το αλληλίο C βρέθηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στους διαβητικούς ασθενείς (OR 1.59, 95% CI: 1.11-2.26, $p=0.011$). Ωστόσο, η συχνότητα του ομόζυγου (C/C) γονοτύπου δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς με ΣΔ2 και υγιείς μάρτυρες (OR 1.67, 95%CI: 0.71-3.94, $p=0.26$). Η κατανομή των αλληλίων και γονοτύπων του πολυμορφισμού rs1800795 της *IL-6* ανάμεσα στους διαβητικούς ασθενείς και τους μάρτυρες παρουσιάζεται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11. Κατανομή αλληλίων και γονοτύπων του πολυμορφισμού rs1800795 της *IL-6* ανάμεσα στους ασθενείς με ΣΔ2 και τους μάρτυρες

GENOTYPES	T2D N=144	Controls N=180	p-value	OR (95% CI)
rs1800795				
G/G	68 (47.22%)	114 (63.33%)		
G/C	64 (44.44%)	54 (30.00%)	0.004	1.98 (1.24-3.18)
C/C	12 (8.34%)	12 (6.67%)	0.26	1.67 (0.71-3.94)
ALLELES	N=288	N=360		
G	200 (69.44%)	282 (78.33%)		
C	88 (30.56%)	78 (21.67%)	0.011	1.59 (1.11-2.26)

Επίπεδο σημαντικότητας: $p < 0.05$. Το χ^2 test ή το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των διαφορών στη συχνότητα γονοτύπων και αλληλίων.

Στους συμμετέχοντες, στους οποίους πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs1800795 -174 G/C της *IL-6*, βρέθηκε ρινική φορεία με *S. aureus* σε ποσοστό 31%, ενώ εμμένουσα ήταν η φορεία στο 12% των διαβητικών ασθενών. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα αλληλίου ή γονοτύπου μεταξύ φορέων και μη-φορέων ΣΔ2 ασθενών, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 12. Η ανάλυση υποομάδων ΣΔ2 ασθενών, βασισμένη στο μοτίβο φορείας (εμμένουσα ή διαλείπουσα), επίσης δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 12. Συχνότητα αλληλίων και γονοτύπων του πολυμορφισμού rs1800795 -174 G/C της *IL-6* στους φορείς και μη-φορείς ΣΔ2 ασθενείς.

GENOTYPES	T2D patients - non-carriers	T2D patients - carriers	p-value	OR (95% CI)
rs1800795	N=100	N=44		
G/G	45 (45%)	114 (63.33%)		
G/C	46 (46 %)	54 (30%)	0.57	1.3(0.62-2.74)
C/C	9 (9 %)	12 (6.67%)	0.74	1.53(0.37-6.21)
ALLELES	N=200	N=360		
G	136 (68 %)	64 (72.7%)		
C	64 (32%)	24 (27.3%)	0.48	0.79(0.45-1.38)

Επίπεδο σημαντικότητας: $p < 0.05$. Το χ^2 test ή το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των διαφορών στη συχνότητα γονοτύπων και αλληλίων.

Από τους συμμετέχοντες στη μελέτη, σε εκατό δεκαοκτώ ασθενείς με ΣΔ2 [32 (27.1%) άνδρες], με διάμεση ηλικία τα 67 (44-83) έτη, και διάμεση διάρκεια ΣΔ2 τα 8 (1-40) έτη, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της 25(OH)D και της LL-37. Τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των 118 ΣΔ2 ασθενών στους οποίους μετρήθηκαν 25(OH)D και LL-37 με βάση το πρότυπο ρινικής φορέας τους

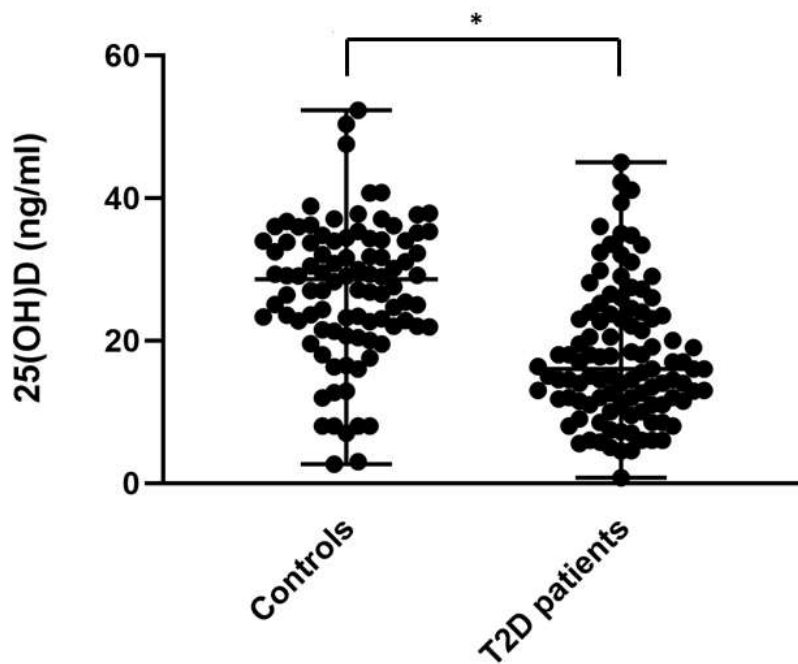
Characteristics	Persistent carriers (N=19)	Intermittent carriers (N=23)	Non-carriers (N=76)	P-value
Age (years)	68 (44-80)	67 (47-78)	67 (47-83)	0.260
Sex				
Male	4 (21.1%)	4 (17.4%)	24 (31.6%)	0.330
Diabetes duration (years)	10 (3-35)	7.5 (1-33)	8 (1-40)	0.401
Diabetes treatment				
Non-insulin treated	15 (78.9%)	21 (91.3%)	60 (78.9%)	0.394
Insulin treated	4 (21.1%)	2 (8.7%)	16 (21.1%)	
Complications of diabetes				
Cardiovascular disease	6 (31.6%)	6 (26.1%)	15 (19.7%)	0.503
Peripheral vascular disease	4 (21.1%)	2 (8.7%)	12 (15.8%)	0.528
Nephropathy	2 (10.5%)	3 (13%)	9 (11.8%)	0.969
Retinopathy	2 (10.5%)	1 (4.4%)	8 (10.5%)	0.658
Neuropathy	2 (10.5%)	0 (0%)	6 (7.9%)	0.326
Concomitant underlying diseases				
Hypertension	13 (68.4%)	18 (78.3%)	62 (81.6%)	0.454
Current smoking	2 (10.5%)	2 (8.7%)	4 (5.3%)	0.660
Total Cholesterol	169 (113-256)	183 (118-271)	182 (90-277)	0.499
*HDL	48 (35-80)	49 (27-78)	48 (15-84)	0.938
**LDL	86 (44-177)	101 (66-181)	106 (57-178)	0.574

Triglycerides	116 (55-275)	160 (56-283)	137 (41-440)	0.149
***HbA1c	6.9 (6-11)	6.9 (5-9)	7.1 (6-12)	0.379
Vitamin D supplementation	4 (21%)	3 (13%)	14 (18.4%)	0.706

*HDL: High-density lipoprotein, **LDL: Low-density lipoprotein, ***HbA1c: Glycatedhaemoglobin

Επίπεδο σημαντικότητας: $p < 0.05$. Οι τιμές σημαντικότητας (p-values) υπολογίστηκαν με το chi-square test ή το t-test. Οι ποσοτικές μεταβλητές αναγράφονται ως διάμεσος τιμή (ελάχιστη τιμή-μέγιστη τιμή).

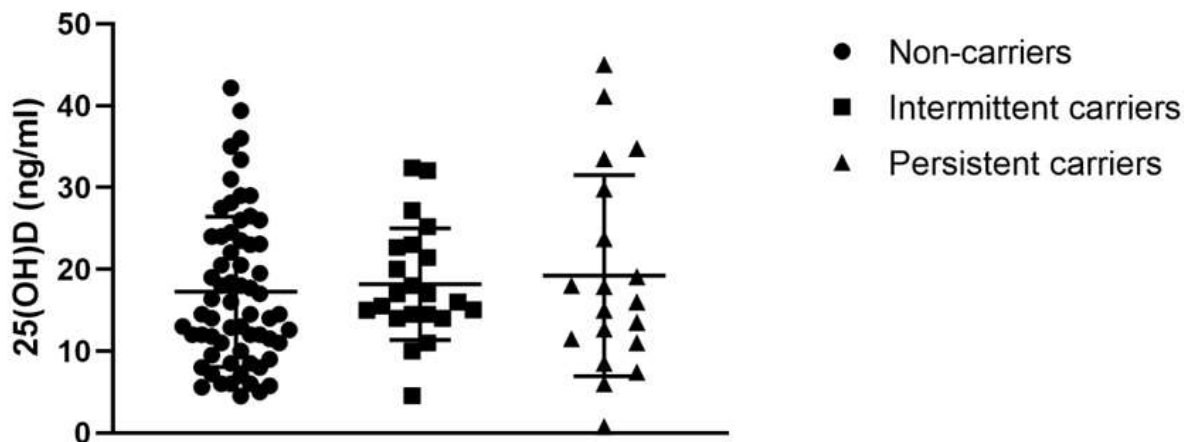
Σε ενενήντα τέσσερις μη-διαβητικούς μάρτυρες [39 (41.4%) άνδρες] με διάμεση ηλικία τα 67 (41-93) έτη έγινε, επίσης, μέτρηση των επιπέδων ορού της 25(OH)D. Ανάμεσα στους μάρτυρες, 20 (21.3%) παρουσίασαν έλλειψη βιταμίνης D, ενώ ανεπάρκεια βιταμίνης D παρατηρήθηκε σε 36 (38.3%) μάρτυρες. Ανάμεσα στους ασθενείς με ΣΔ2, 69 (65.7%) παρουσίασαν έλλειψη βιταμίνης D, ενώ ανεπάρκεια βιταμίνης D παρατηρήθηκε σε 24 (22.9%) διαβητικούς ασθενείς. Υψηλότερα επίπεδα ορού βιταμίνης D βρέθηκαν στους μη-διαβητικούς σε σχέση με τους διαβητικούς ασθενείς, όπως φαίνεται στην εικόνα 8 (28.6ng/ml vs 16.0ng/ml; $p < 0.001$).



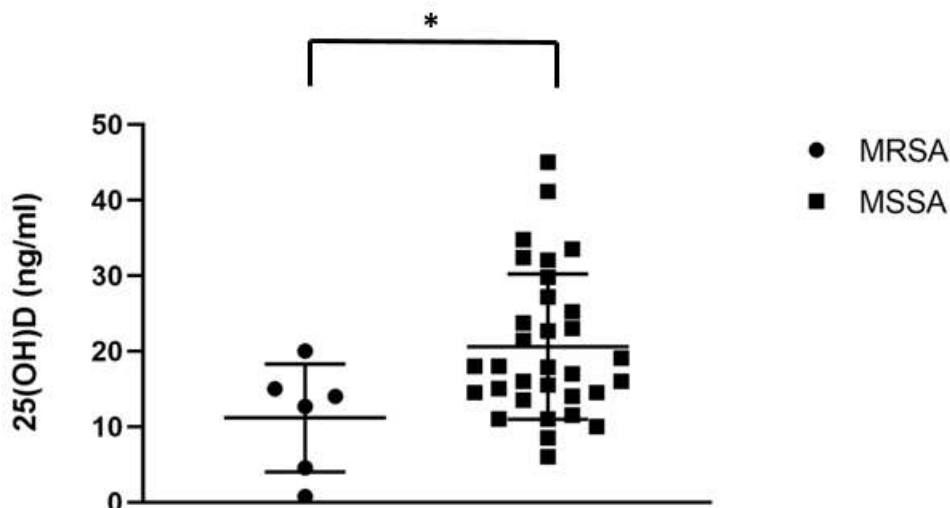
Εικόνα 8. Επίπεδα ορού βιταμίνης D σε διαβητικούς ασθενείς και μη-διαβητικούς μάρτυρες. Τα επίπεδα ορού της 25-υδροξυβιταμίνης D στους μάρτυρες ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους ΣΔ2 ασθενείς. Το Mann–Whitney test χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. * $p < 0.001$.

Στην ομάδα των 118 ΣΔ2 ασθενών, στους οποίους έγινε μέτρηση των συγκεντρώσεων ορού της 25(OH)D και της LL-37, 42/118 ασθενείς (35.6%) βρέθηκαν αποικισμένοι με *S. aureus*. Στην αποικισμένη ομάδα, 19 (16.1%) ορίστηκαν ως εμμένοντες φορείς και 23 (19.5%) ως διαλείποντες. Σε μια υποανάλυση των ρινικών φορέων, με βάση την ευαισθησία του *S. aureus*, 6 (14.3%) άτομα βρέθηκαν αποικισμένοι με MRSA και 33 (78.6%) με MSSA. Τρεις φορείς (7.1%) εμφάνισαν μεικτό αποικισμό με απομόνωση εναλλάξ MRSA και MSSA στις καλλιέργειες ρινικού επιχρίσματος.

Στους φορείς, 17 (40.5%) εμφάνισαν έλλειψη βιταμίνης D και 8 (19%) ανεπάρκεια βιταμίνης D. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις ορού της 25(OH)D ανάμεσα σε φορείς (εμμένοντες ή διαλείποντες) και μη-φορείς ΣΔ2 ασθενείς (εικόνα 9). Εντούτοις, οι MSSA ρινικοί φορείς εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα της 25(OH)D συγκριτικά με τους MRSA φορείς, όπως φαίνεται στην εικόνα 10 ($p=0.029$).



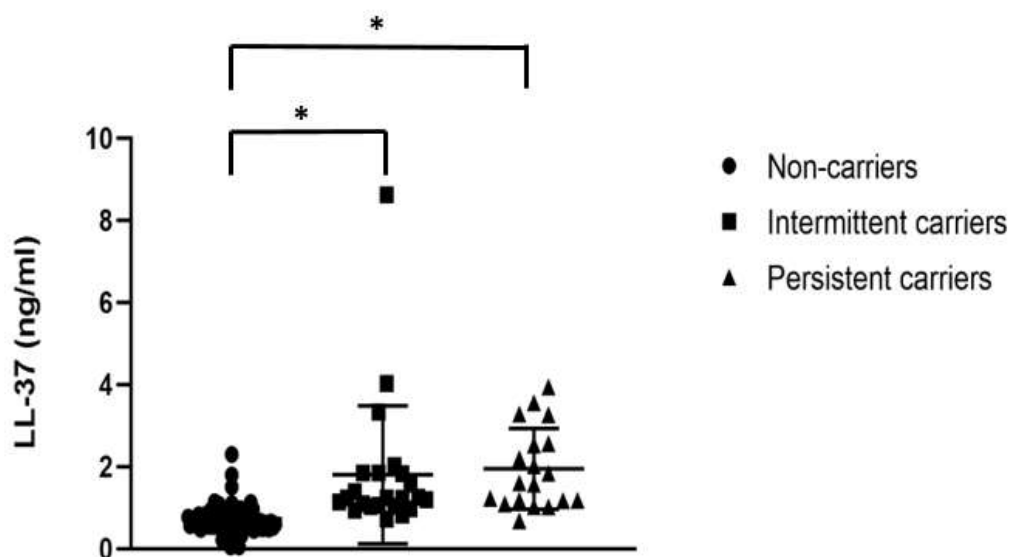
Εικόνα 9. Επίπεδα ορού βιταμίνης D σε διαβητικούς ασθενείς με βάση το πρότυπο ρινικής φορέας σε *S. aureus*. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις ορού της 25-υδροξυβιταμίνης D ανάμεσα σε ρινικούς φορείς και μη-φορείς ($p=0.661$). Το Kruskal-Wallis test χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση.



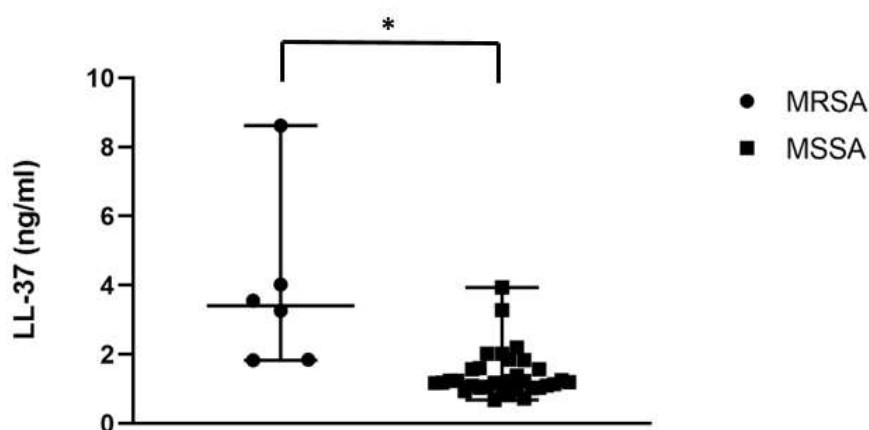
Εικόνα 10. Επίπεδα ορού βιταμίνης D σε διαβητικούς ρινικούς φορείς με βάση την ευαισθησία του *S. aureus*. Τα επίπεδα ορού της 25-υδροξυβιταμίνης D στους διαβητικούς ασθενείς που ήταν

αποικισμένοι με MSSA ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση τα επίπεδα όσων ήταν φορείς με MRSA. Το Mann–Whitney test χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. * $p=0.029$.

Στους 118 ΣΔ2 ασθενείς βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα ορού της LL-37 (διάμεση τιμή 0.89, εύρος 0.05-8.62 ng/ml). Ωστόσο, οι ρινικοί φορείς με *S. aureus* παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ορού LL-37 συγκριτικά με τους μη-φορείς (1.25ng/ml έναντι 0.72ng/ml; $p<0.001$), όπως φαίνεται στην εικόνα 11. Επιπρόσθετα, οι MRSA ρινικοί φορείς εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα της LL-37 συγκριτικά με τους MSSA φορείς, όπως φαίνεται στην εικόνα 12 ($p<0.001$).



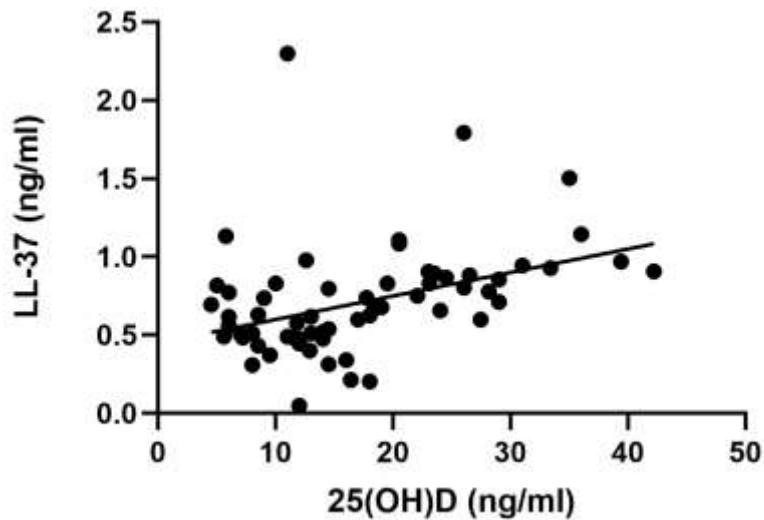
Εικόνα 11. Το αντιμικροβιακό πεπτίδιο καθελιδίνη (LL-37) σε διαβητικούς ασθενείς με εμμένουσα, διαλείπουσα *S. aureus* ρινική φορεία και μη-φορεία. Τα επίπεδα ορού της LL-37 ήταν σημαντικά υψηλότερα στις 2 ομάδες φορέων (εμμένοντες και διαλείποντες) συγκριτικά με τους μη-φορείς. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της LL-37 ανάμεσα σε εμμένοντες και διαλείποντες φορείς. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Kruskal–Wallis test. * $p<0.001$.



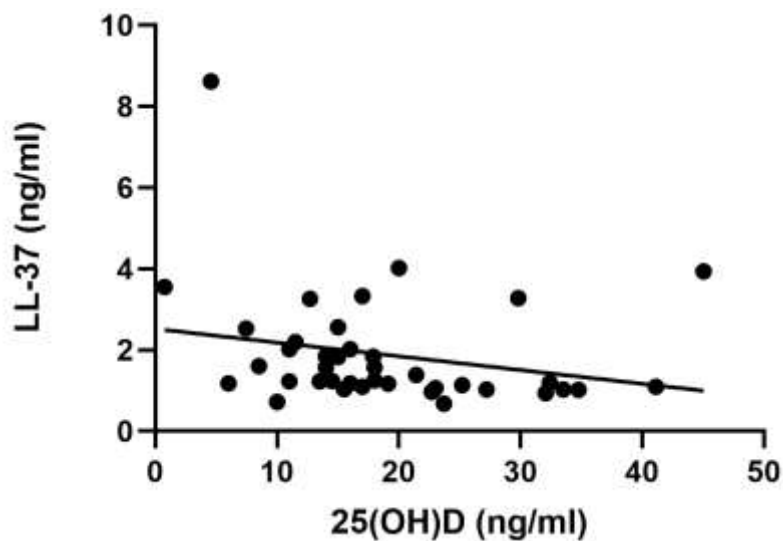
Εικόνα 12. Επίπεδα ορού της καθελιδίνης LL-37 σε διαβητικούς ρινικούς φορείς με βάση την ευαισθησία του *S. aureus*. Τα επίπεδα ορού της LL-37 στους διαβητικούς ασθενείς που ήταν αποικισμένοι με MRSA ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση τα επίπεδα όσων ήταν φορείς με MSSA. Το Mann–Whitney test χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. * $p < 0.001$.

Εικοσιένα (17.8%) στους 118 ΣΔ2 ασθενείς δήλωσαν ότι ελάμβαναν καθημερινά συμπληρώματα βιταμίνης D (η ημερήσια πρόσληψη υπερέβαινε τις 800IU). Στη παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D δε συσχετίστηκε με χαμηλότερη επίπτωση ρινικής φορέας σε *S. aureus*, είτε εμμένουσα είτε διαλείπουσα ($p=0.706$).

Για τη συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις ορού της 25(OH)D και της LL-37 στους ΣΔ2 ασθενείς χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση Spearman. Ισχυρή θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ αυτών των δύο ανοσολογικών δεικτών στους μη-φορείς (Coefficient=0.48, $p < 0.001$). Η σχέση αυτή παρέμεινε ανεξάρτητη της χορήγησης συμπληρωμάτων βιταμίνης D με βάση την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης ($p=0.002$). Αντιθέτως, μια μετρίως αρνητική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στην 25(OH)D και την LL-37 στους ρινικούς φορείς (Coefficient=-0.392, $p=0.011$) Οι συσχετίσεις αυτές απεικονίζονται στις εικόνες 13 και 14, αντιστοίχως.



Εικόνα 13. Συσχέτιση ανάμεσα στην 25-υδροξυβιταμίνη D και στην καθελσιδίνη (LL-37) στους διαβητικούς μη-φορείς. Στους μη-φορείς βρέθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού της βιταμίνης D και της LL-37 (Coefficient=0.48, $p<0.001$).



Εικόνα 14. Συσχέτιση ανάμεσα στην 25-υδροξυβιταμίνη D και στην καθελσιδίνη (LL-37) στους διαβητικούς ασθενείς που αποικίζονται με *S. aureus*. Σε αυτούς τους ασθενείς βρέθηκε μια μετρίως αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού της βιταμίνης D και της LL-37 (Coefficient=-0.392, $p=0.011$).

Σε εκατό εβδομήντα τρεις ΣΔ2 ασθενείς της μελέτης είχε προηγηθεί γονοτύπωση των τεσσάρων SNPs του γονιδίου του *VDR* (*ApaI*, *TaqI*, *BsmI* και *FokI*). Η κατανομή των γονοτύπων στους ασθενείς που μελετήθηκαν ήταν σύμφωνη με το Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$). Σε αυτούς τους ασθενείς έγινε σύγκριση των επιπέδων ορού της 25(OH)D και της LL-37 ανάλογα με τους γονότυπους και τα αλληλία των τεσσάρων SNPs του *VDR*.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 14, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση ορού της LL-37 ανάμεσα στις συχνότητες γονοτύπων και αλληλίων των *FokI* και *ApaI* *VDR* πολυμορφισμών. Η παρουσία του *BsmI* b αλληλίου του γονιδίου *VDR* συσχετίστηκε με μεγαλύτερη συγκέντρωση LL-37 στον ορό ($p=0.05$). Συγκρίνοντας τους γονοτύπους του *BsmI* βρέθηκε ότι ο *BsmI* bb γονότυπος συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα ορού της LL-37 συγκριτικά με τον Bb γονότυπο ($p=0.035$). Το *TaqI* T αλληλίο συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα ορού της LL-37, με οριακή αλλά μη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.07$). Οι *TaqI* TT ομοζυγώτες παρουσίαζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις ορού της LL-37 σε σχέση με τους *TaqI* Tt ετεροζυγώτες ($p=0.003$). Συγκρίνοντας την 25(OH)D, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα ορού ανάμεσα στις συχνότητες γονοτύπων και αλληλίων των *FokI*, *ApaI* και *TaqI* *VDR* πολυμορφισμών. Εντούτοις, η παρουσία του *BsmI* b αλληλίου συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα ορού της 25(OH)D συγκριτικά με το B αλληλίο (διάμεση τιμή 16ng/ml έναντι 13.5ng/ml, $p=0.05$). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις ορού της 25(OH)D ανάμεσα στους γονότυπους του *BsmI* SNP του *VDR*.

Πίνακας 14. Επίπεδα ορού της LL-37 ανάλογα με τους γονοτύπους και τα αλληλία των τεσσάρων SNPs του *VDR*

VDR gene SNPs	LL-37 (ng/ml)	p-value	VDR gene SNPs	LL-37 (ng/ml)	p-value
<i>TaqI</i> Genotype		0.015	<i>ApaI</i> Genotype		0.758
tt (n=26)	0.96 (0.34-3.55)		aa (n=36)	0.92 (0.2-2.57)	
Tt (n=84)	0.77 (0.05-8.62)		Aa (n=77)	0.87 (0.45-8.62)	

TT (n=61)	1.03 (0.31-4.02)	AA (n=58)	0.83 (0.05-3.28)
Allele		Allele	
	0.070		0.623
T (n=206)	0.88 (0.05-8.62)	A (n=193)	0.84 (0.05-8.62)
t (n=136)	0.82 (0.05-8.62)	a (n=149)	0.9 (0.2-8.62)
BsmI		FokI	
Genotype		Genotype	
	0.086		0.492
bb (n=50)	0.96 (0.31-8.62)	ff (n=39)	0.97 (0.31-3.28)
Bb (n=90)	0.8 (0.05-3.55)	Ff (n=80)	0.88 (0.05-4.02)
BB (n=31)	0.75 (0.2-3.26)	FF (n=73)	0.77 (0.2-8.62)
Allele		Allele	
	0.054		0.215
B (n=152)	0.77 (0.05-3.55)	F (n=226)	0.83 (0.05-8.62)
b (n=190)	0.91 (0.05-8.62)	f (n=158)	0.92 (0.05-4.02)

Επίπεδο σημαντικότητας: $p < 0.05$. Μη παραμετρικά στατιστικά τεστ χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση διαφορών ανάμεσα στις ομάδες.

Από την καταγραφή των λοιμώξεων από *S. aureus* κατά την δετή παρακολούθηση όλων των 240 ΣΔ2 ασθενών, αναζητήθηκε η διαφορά επίπτωσης όλων αυτών των λοιμώξεων στους διαβητικούς ασθενείς οι οποίοι βρέθηκαν αποικισμένοι από το χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο σε σχέση με την αντίστοιχη επίπτωση στους ασθενείς στους οποίους δεν τεκμηριώθηκε ρινικός αποικισμός από *S. aureus*. Κανένας από τους διαβητικούς συμμετέχοντες (φορέας ή μη) δεν εμφάνισε βακτηριαμία από *S. aureus*. Τέσσερις ΣΔ2 ασθενείς εμφάνισαν κυτταρίτιδα από *S. aureus*, εκ των οποίων τρεις μη-φορείς και ένας διαλείπον φορέας (MSSA απομονωθέν από την καλλιέργεια ρινικού επιχρίσματος και από την καλλιέργεια πύου). Ένας μη-φορέας εμφάνισε ωτίτιδα με απομόνωση *S. aureus* σε καλλιέργεια ωτικού υγρού και ακόμη μη-φορέας παρουσίασε κερατίτιδα με απομόνωση *S. aureus* σε καλλιέργεια κερατοειδούς. Επίσης ένας διαλείπον φορέας αποικισμένος από MSSA εκδήλωσε λοίμωξη ουροποιητικού συστήματος με καλλιέργεια ούρων θετική για MSSA. Επομένως ανευρέθη πολύ χαμηλή επίπτωση σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων στους διαβητικούς ασθενείς, χωρίς διαφορά μεταξύ των αποικισμένων και των μη αποικισμένων διαβητικών ασθενών.

2.7. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει, για πρώτη φορά, ότι ο πολυμορφισμός rs1800795 G/C του γονιδίου της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL6 συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔ2 στο γενετικά ομοιογενή πληθυσμό της νήσου Κρήτης. Ο ΣΔ2 αποτελεί ένα σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας και η χρόνια, χαμηλού βαθμού φλεγμονή, γνωστή τα τελευταία χρόνια ως μεταφλεγμονή, θεωρείται ένας από τους υποκείμενους ρυθμιστές της παθογένειας της νόσου. Πλήθος προφλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένης της IL6, έχουν βρεθεί έως τώρα να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση και να αυξάνουν το κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2 (2,4). Πράγματι, τα επίπεδα πλάσματος της IL6 έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένα σε ΣΔ2 ασθενείς και σε άτομα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2 συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες (6,101), αναδεικνύοντας το ρόλο της συγκεκριμένης κυτοκίνης στην παθοφυσιολογία του ΣΔ2. Συνεπώς, η γενετική ποικιλομορφία του γονιδίου της *IL6* ενδεχομένως κατέχει ουσιώδη ρόλο στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου νοσήματος.

Όπως είναι γνωστό σε προηγούμενες μελέτες, το αλληλίο "G" του πολυμορφισμού rs1800795 - 174G/C σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή IL6 και, επομένως, τα υγιή άτομα με GC ή GG γονότυπο έχουν συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα IL6 (107). Εντούτοις, η συσσωρευμένη γνώση ως προς την ακριβή λειτουργία των "G" και "C" αλληλίων όσον αφορά στην παθογένεια του ΣΔ2 παραμένει ελλιπής και αυτή η σχέση θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Μέχρι σήμερα, η γενετική συσχέτιση της IL6 με το ΣΔ2 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, δεδομένης της ύπαρξης αρκετών μελετών με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Πράγματι, μολονότι ο SNP της *IL6* βρέθηκε να συσχετίζεται με το ΣΔ2 στις περισσότερες μελέτες σε ανθρώπους, σε μια από τις μεγαλύτερες από αυτές, που διεξήχθη στη Δανία, δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό και στο ΣΔ2 (134). Ομοίως, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή γονοτύπων και αλληλίων ανάμεσα σε ΣΔ2 ασθενείς και υγιείς μάρτυρες σε μια μετα-ανάλυση μεγάλης κλίμακας (25) και σε μια μικρότερη μελέτη που διεξήχθη στην Ελλάδα από την Tsiανου *et al* (135). Από την άλλη πλευρά, το αλληλίο "C" του *IL6* -174G/C SNP έχει αναφερθεί να

συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔ2 στους Ινδιάνους της Βορείου Αμερικής της φυλής Pima και στους Ισπανούς Καυκάσιους (136), καθώς και σε πληθυσμό της Γερμανίας (137). Επιπρόσθετα, μια μετα-ανάλυση με 20.000 συμμετέχοντες αποκάλυψε ότι το “C” αλληλίο του -174G/C SNP συσχετίστηκε με ήπια μείωση στον κίνδυνο για εμφάνιση ΣΔ (odds ratio 0.91 συγκριτικά με όσους εμφάνισαν το GG γονότυπο) (24). Αντιθέτως, μια άλλη μελέτη σε νορμογλυκαιμικά υγιή άτομα στη Φιλανδία έδειξε χαμηλότερα ποσοστά πρόσληψης γλυκόζης από τους ιστούς σε εκείνα τα άτομα που ήταν ομόζυγα για το “C” αλληλίο συγκριτικά με τους φορείς του “G” αλληλίου (138). Ομοίως, το “C” αλληλίο βρέθηκε να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη ΣΔ2 στον Κρητικό πληθυσμό στην παρούσα μελέτη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το “C” αλληλίο ανευρίσκεται σπανιότερα σε Αφροαμερικανούς και Ασιαμερικανούς συγκριτικά με τους Καυκάσιους (139). Όσον αφορά στον υπό έρευνα πολυμορφισμό, φαίνεται ότι, η κατανομή αλληλίων και γονοτύπων στους μάρτυρες στον πληθυσμό της Κρήτης είναι παρόμοια με την ανευρεθείσα σε Καυκάσιους πληθυσμούς της Γερμανίας και της Ιταλίας (140-141).

Στη βιβλιογραφία περιγράφονται πολλά παραδείγματα, όπου γενετικές αναλύσεις σε διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών με σύμπλοκα νοσήματα καταλήγουν σε αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, γεγονός που οφείλεται είτε σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και μεταξύ γενετικών παραγόντων και περιβάλλοντος είτε στη διαφορετική εθνική/φυλετική τους προέλευση και στη συνολική γενετική τους σύσταση. Προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε πληθυσμό της Κρήτης έχουν αναδείξει μερικές περιπτώσεις, με τέτοια αντικρουόμενα αποτελέσματα, που αφορούν στη γενετική συσχέτιση με νόσους ή στην επίδραση συγκεκριμένων αλληλίων (142). Από GWAS μελέτες μέχρι σήμερα, δεν έχει αποδειχτεί συσχέτιση ανάμεσα στην IL6 και στο ΣΔ2 (25,143). Εντούτοις, και άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε Κρητικό πληθυσμό στο παρελθόν, έχουν αναδείξει γενετική συσχέτιση ανάμεσα σε γονιδιακούς πολυμορφισμούς και διάφορα νοσήματα, μολονότι προηγηθείσες μεγάλες GWAS μελέτες δεν ανίχνευσαν τέτοια συσχέτιση (144).

Το βασικό πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης είναι η προσοχή στην επιλογή γενετικά και εθνικά ομοιογενών ασθενών με ΣΔ2 και υγιών μαρτύρων από έναν γεωγραφικά καλά καθορισμένο

πληθυσμό, αυτόν της Κρήτης. Αδυναμία της μελέτης αποτελεί η σχετικά μικρή ομάδα μελέτης που έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη στατιστική ισχύ, καθώς επίσης και η απουσία επιβεβαιωτικής επαναληπτικής κούρτης. Προκειμένου να αυξηθεί το μέγεθος της ομάδας μελέτης, θα έπρεπε να συμπεριληφθούν άτομα εκτός Κρήτης, το οποίο προφανώς θα οδηγούσε σε απώλεια του γενετικού πλεονεκτήματος αυτής της μελέτης, δηλαδή της διερεύνησης μίας ομοιογενούς ομάδας ασθενών και ομάδας ελέγχου λόγω προσθήκης γενετικού υλικού από γειτονικές χώρες (Βαλκάνια, Ασία, Δυτική Ευρώπη).

Στη παρούσα μελέτη επικεντρωθήκαμε τόσο στον αρχικό αποικισμό, όσο και στην εμμένουσα φορεία σε *S. aureus*, καθώς οι εμμένοντες φορείς έχουν υψηλότερο φορτίο χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου, και υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης σταφυλοκοκκικής λοίμωξης. Τα αυξημένα ποσοστά ρινικού αποικισμού και εμμένουσας φορείας σε *S. aureus* στον πληθυσμό της μελέτης (35.6% και 16.1%, αντίστοιχα) είναι σύμφωνα με τα ποσοστά που αναφέρθηκαν σε άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία (96-97). Συνολικά, 6 ΣΔ2 ασθενείς (14.3%) βρέθηκαν αποικισμένοι με MRSA, αντιπροσωπεύοντας ένα υψηλότερο ποσοστό αποικισμού σε ΣΔ2 ασθενείς, συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες (96). Μια μετα-ανάλυση της Stacey και των συνεργατών της έδειξε, επίσης, αυξημένο επιπολασμό του αποικισμού από MRSA σε διαβητικούς ασθενείς (145). Από την άλλη πλευρά, αποτελέσματα από τη μελέτη Fremantle Diabetes Study έδειξε ότι η φορεία σε MRSA δεν ήταν συνήθης σε διαβητικούς ασθενείς (98). Ωστόσο, το υψηλό ποσοστό αποικισμού σε MRSA, στον πληθυσμό μελέτης μας, συμβαδίζει με τον υψηλό επιπολασμό του αποικισμού σε MRSA στο γενικό πληθυσμό στην Ελλάδα (146).

Η ικανότητα του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου να αποικίζει τον ανθρώπινο ξενιστή και ακολούθως να προκαλεί λοίμωξη εξαρτάται τόσο από τις μολυσματικές ιδιότητες του εισβάλλοντος στελέχους, όσο και από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Δεν είναι πολλά γνωστά σχετικά με τις εγγενείς ιδιότητες των στελεχών του *S. aureus*, οι οποίες διευκολύνουν τον αποικισμό και την μακροχρόνια φορεία (85,97). Αντιθέτως, αναδυόμενα στοιχεία υποδεικνύουν γενετικούς παράγοντες του ξενιστή οι οποίοι επηρεάζουν τον αποικισμό και τη φορεία σε *S. aureus* (69,85,97).

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs1800795 της *IL6* και της φορείας με *S. aureus* σε ασθενείς με ΣΔ2 στον Κρητικό πληθυσμό. Προφλεγμονώδεις

κυτοκίνες, όπως η IL6, διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην ανοσιακή απάντηση του ξενιστή σε λοιμώξεις, μια σημαντική επιπλοκή του ΣΔ2 (26). Ειδικότερα, η IL6 φαίνεται πως επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων TLRs, δηλαδή των υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων για gram-θετικά παθογόνα, όπως ο *S. aureus* (147). Επομένως, γενετικοί πολυμορφισμοί σε σηματοδοτικά μόρια και άλλους ρυθμιστές της φλεγμονώδους απάντησης μπορεί να επηρεάσουν την άμυνα του ξενιστή έναντι του *S. aureus*.

Πράγματι, πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν τη λεκτίνη συνδεδεμένη με μαννόζη, τους υποδοχείς TLR2 και TLR9, τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, τη CRP, την IL4 και τον υποκινητή της β-ντεφενσίνης-1 έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για ρινική φορεία σε *S. aureus*, ωστόσο τα λειτουργικά δεδομένα είναι ελλιπή (67,89). Επιπρόσθετα, SNPs στο γονίδιο του VDR σχετίζονται με ρινική φορεία σε *S. aureus* σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 (87) και ΣΔ2 (41) όχι, όμως, σε υγιή άτομα (88). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα για τον πολυμορφισμό -174G/C του γονιδίου της IL6 και την επίδρασή του στον αποικισμό από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο σε διαβητικούς ασθενείς. Η απουσία συσχέτισης, στην παρούσα μελέτη, βασίζεται πιθανά στο σχετικά μικρό δείγμα ασθενών και, επομένως, μεγαλύτερες ομάδες πληθυσμού θα πρέπει να εξεταστούν μεταγενέστερα για την επιβεβαίωση των άνωθεν ευρημάτων.

Στη μελέτη μας βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα ορού της 25(OH)D και της LL-37 στους ΣΔ2 ασθενείς, υποδεικνύοντας ένα πιθανό έλλειμμα στην μη ειδική ανοσολογική απάντηση αυτών των ασθενών. Διαφοροποιημένη έκφραση στην LL-37 φαίνεται πως επάγεται ανάλογα με το πρότυπο ρινικής φορείας σε *S. aureus* στους ΣΔ2 ασθενείς. Η χορήγηση δε, συμπληρωμάτων βιταμίνης D καθημερινά δε φαίνεται να επηρεάζει τα ποσοστά ρινικού αποικισμού στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο σε αυτήν την ομάδα ασθενών.

Ο ρόλος της βιταμίνης D, πέρα από την ομοίωσή της του ασβεστίου και του φωσφόρου, στην ανοσολογική απάντηση έχει αναδειχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Οι ενεργοί μεταβολίτες της, παρουσιάζουν ποικίλες ανοσοτροποποιητικές δράσεις. Συγκεκριμένα, ρυθμίζουν τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας επηρεάζοντας την ωρίμανση και το μεταβολισμό των κυττάρων, την αντιγονοπαρουσίαση, την παραγωγή και απόκριση σε κυτοκίνες και χημειοκίνες (33). Επιπρόσθετα, η

βιταμίνη D ασκεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις μέσω καταστολής της έκφρασης εξαρτώμενων από τον NFκB προφλεγμονωδών κυτοκινών· παράλληλα ρυθμίζει θετικά την παραγωγή του αντιμικροβιακού πεπτιδίου LL-37 μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα VDR (148). Στην παρούσα μελέτη ενενήντα τρεις (88.6%) ΣΔ2 ασθενείς, ενώ μόλις πενήντα έξι (59.6%) μη-διαβητικοί μάρτυρες, παρουσίαζαν είτε έλλειψη είτε ανεπάρκεια βιταμίνης D. Πράγματι, αρκετές μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα βιταμίνης D και τον επιπολασμό ΣΔ2 (149). Επομένως, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η μεταφλεγμονή που επάγεται από το ΣΔ2 μπορεί να οδηγήσει σε αρνητική ρύθμιση των αντιφλεγμονωδών και ανοσοτροποποιητικών δράσεων της βιταμίνης D ή αντίστροφα.

Εντούτοις, η μελέτη μας δεν κατάφερε να αναδείξει συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις ορού της 25(OH)D και του προτύπου ρινικής φορέας σε *S. aureus* στους διαβητικούς ασθενείς· ωστόσο, αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η συντριπτική πλειοψηφία των διαβητικών ασθενών, που συμμετείχαν στη μελέτη, παρουσίαζαν έλλειψη ή ανεπάρκεια βιταμίνης D. Αυτό το εύρημα μπορεί να υποστηριχθεί από τη μελέτη παρατήρησης Fremantle Diabetes Study Phase II σε 660 διαβητικούς ασθενείς, κατά την οποία δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στη βιταμίνη D και στη ρινική φορεία από MRSA ή MSSA (98).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σύγκριση των συγκεντρώσεων της βιταμίνης D ανάμεσα στους MRSA και MSSA ρινικούς φορείς ανέδειξε σημαντικά μειωμένα επίπεδα 25(OH)D στην ομάδα των φορέων σε MRSA σε σχέση με τους MSSA φορείς. Από δεδομένα της μελέτης National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2004 με 14.639 συμμετέχοντες, ο Matheson και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι τα άτομα με έλλειψη βιταμίνης D παρουσίαζαν αυξημένο κίνδυνο ρινικής φορέας σε MRSA, συγκριτικά με όσους είχαν επαρκή επίπεδα, μετά από διόρθωση για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες, ενώ δε βρήκαν συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της βιταμίνης D και στη ρινικό αποικισμό από MSSA (38). Αντιθέτως, σε μελέτη παρατήρησης με 2780 Νορβηγούς συμμετέχοντες, ο Olsen και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι στους μη καπνιστές άνδρες υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού της βιταμίνης D και στην ρινικό αποικισμό από MSSA, ενώ δε βρέθηκε συσχέτιση σε καπνιστές άνδρες και στις γυναίκες συνολικά. Στη

συγκεκριμένη μελέτη δε συμπεριελήφθησαν φορείς MRSA (84). Εάν τα επίπεδα ορού της βιταμίνης D είναι, πράγματι, δείκτης αντίδρασης οξείας φάσης, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα χαμηλά επίπεδα ορού της βιταμίνης D ίσως είναι το αποτέλεσμα της ρινικής φορέας σε MRSA παρά ένας παράγοντας κινδύνου.

Η LL-37, η οποία παράγεται κυρίως μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από τη βιταμίνη D, είναι ένας πολυλειτουργικός τροποποιητής της έκκρισης κυτοκινών και της ειδικής ανοσολογικής απάντησης και εκφράζεται σε κερατινοκύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (128).

Η μέση συγκέντρωση της καθελιδίνης LL-37 στον άνθρωπο είναι 1.18 µg/mL στον ορό υγιών ατόμων (150). Στην παρούσα μελέτη, οι συγκεντρώσεις της LL-37 στον ορό βρέθηκαν χαμηλότερες σε ΣΔ2 ασθενείς, αναδεικνύοντας μια πιθανή διαταραχή στην παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων στο πλαίσιο του σακχαρώδη διαβήτη. Είναι γεγονός, άλλωστε, από μελέτη των Gonzalez-Curiel και συνεργατών ότι οι ΣΔ2 ασθενείς παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του γονιδίου της LL-37 (58). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα έκφρασης της LL-37 που έχουν βρεθεί σε βιοψίες ελκών διαβητικών ποδιών συγκριτικά με το υγιές δέρμα (151).

Εξ' όσων γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που εξετάζει τη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού της LL-37 και τη ρινική φορεία σε *S. aureus* ανάμεσα σε ΣΔ2 ασθενείς. In vitro η LL-37 παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη ικανότητα θανάτωσης του *S. aureus* (54). Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα ορού της LL-37 βρέθηκαν υψηλότερα σε όσους ήταν αποικισμένοι με *S. aureus* συγκριτικά με τους μη-φορείς ΣΔ2 ασθενείς. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της LL-37, όπως και των β-ντεφενσινών, παρατηρήθηκαν, επίσης, στις ρινικές εκκρίσεις ανάμεσα σε υγιείς *S. aureus* φορείς συγκριτικά με μη-φορείς (85,152). Βάσει των ανωτέρω ευρημάτων, τα αυξημένα επίπεδα της LL-37 δεν πριμοδοτούν απαραίτητα τον ξενιστή με μια αποτελεσματική αντισταφυλοκοκκική απάντηση. Θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η έκφραση της LL-37 επάγεται από τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο, ωστόσο η συγκέντρωση που επιτυγχάνεται, στο πλαίσιο του σακχαρώδη διαβήτη, φαίνεται να είναι πολύ χαμηλή για να καταφέρει να επιτελέσει την αντιμικροβιακή της δραστηριότητα. Φαίνεται ότι τα υψηλότερα επίπεδα ορού της LL-37 δεν σχετίζονται απαραίτητα με αυξημένα επίπεδα στα επιθηλιακά κύτταρα. Αντιθέτως, μπορεί να είναι ενδεικτικά μιας ενεργοποιημένης κατάστασης των

ουδετεροφίλων σε ΣΔ2 ασθενείς, που είναι επιρρεπή στη NETωση. Είναι σημαντικό ότι η LL-37 είναι ένα μείζων μόριο τελεστής που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ουδετεροφιλικής NETωσης. Εν κατακλείδι, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ορού της LL-37 πιθανά αντανακλούν τη μεταφλεγμονή παρά τη μη ειδική επιθηλιακή ανοσία.

Βάσει του προτύπου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά, τα επίπεδα της LL-37 βρέθηκαν να είναι υψηλότερα στους ΣΔ2 ασθενείς που ήταν αποικισμένοι με MRSA συγκριτικά με τους MSSA ρινικούς φορείς, ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό είναι μάλλον αμφιλεγόμενο λόγω του μικρού αριθμού των περιστατικών. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα στελέχη MRSA, πράγματι, παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση στα ενδογενή αντιμικροβιακά πεπτιδία, όπως η LL-37, και, επομένως, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι απαιτείται σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση καθελιδίνης για την εξάλειψη του MRSA σε σχέση με τον MSSA (55,153).

Ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα στη μελέτη μας είναι ότι, μολονότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα της 25(OH)D και της LL-37 συσχετίζονται θετικά στους μη-φορείς, η σχέση τους βρέθηκε να αντιστρέφεται στους ασθενείς με ρινική φορεία στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο. Αυτά τα ευρήματα ενδεχομένως προτείνουν ότι η παραγωγή της LL-37 κατά τη διάρκεια του αποικισμού από *S. aureus* ρυθμίζεται από μονοπάτια εξαρτώμενα, αλλά και μη-, από τη βιταμίνη D, ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος και την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή. Μια μελέτη του Bhan και των συνεργατών έδειξε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην 25(OH)D και στην LL-37 σε υγιή άτομα, μόνο σε συγκεντρώσεις της 25(OH)D μικρότερες ή ίσες με 32 ng/ml (154). Μια άλλη μελέτη του Adams και των συνεργατών δεν κατάφερε να δείξει συσχέτιση ανάμεσα στα κυκλοφορούντα επίπεδα της 25(OH)D και της καθελιδίνης σε ένα γηραιότερο πληθυσμό (155). Είναι πιθανό ότι επιπρόσθετοι παράγοντες δρουν συγχυτικά στη σχέση ανάμεσα στη βιταμίνη D και στην καθελιδίνη, όπως η νεφρική ανεπάρκεια. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί καλύτερα η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην βιταμίνη D και στις αποκρίσεις της LL-37 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, θα πρέπει να εκτιμηθούν οι τοπικές ή ενδοκυττάριας συγκεντρώσεις της καθελιδίνης.

Η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D με στόχο την αποκατάσταση των διαταραχών στη λειτουργία της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας τα

τελευταία χρόνια. Αρκετές μελέτες έχουν επιχειρήσει να εξετάσουν το ρόλο της συμπληρωματικής χορήγησης βιταμίνης D στην κατάσταση ρινικής φορέας σε *S. aureus*. Στη μελέτη μας, δε βρέθηκε καμία επίδραση της καθημερινής λήψης συμπληρωμάτων βιταμίνης D στα ποσοστά ρινικής φορέας σε *S. aureus* στους ΣΔ2 ασθενείς. Ομοίως, στην πρώτη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη από το Slow και τους συνεργάτες του σε 304 υγιείς ενήλικες ανεδείχθη ότι η μηνιαία χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D δε μείωσε σημαντικά τον επιπολασμό της εμμένουσας ρινικής φορέας σε MSSA. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν ελέγχθηκε κατά πόσο η βιταμίνη D μείωσε το φορτίο του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου στους ρινικούς ρώθωνες (127). Επιπρόσθετα, μια δεύτερη τυχαιοποιημένη μελέτη του 2018 από την Björkhem-Bergman και τους συνεργάτες της σε 62 συμμετέχοντες έδειξε ότι η καθημερινή χορήγηση βιταμίνης D δε μείωσε τα ποσοστά εμμένουσας ρινικής φορέας από MRSA (39).

Ο πιο σημαντικός περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι το σχετικά μικρό μέγεθος δείγματος που μειώνει την ισχύ της μελέτης. Περισσότερες έρευνες σε μεγαλύτερες ομάδες πληθυσμού είναι απαραίτητες για να επιβεβαιωθούν τα τρέχοντα ευρήματα. Η μέτρηση της LL-37 στα επιθηλιακά κύτταρα της ρινός στους διαβητικούς ασθενείς θα μπορούσε να αποτελεί μια ενδιαφέρουσα μελλοντική επέκταση της παρούσας εργασίας μας. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι πολλαπλά αντιμικροβιακά πεπτιδία δρουν συνεργιστικά για να εκριζώσουν αποτελεσματικά το χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο, θα πρέπει να εκτιμηθούν οι συγκεντρώσεις και των λοιπών πεπτιδίων σε μελλοντικές μελέτες για την πλήρη κατανόηση της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή στο ΣΔ2.

Έχει προηγουμένως εξεταστεί η συσχέτιση της ρινικής φορέας στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο με τους τέσσερις περισσότερο κοινούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου του VDR (*BsmI*, *ApaI*, *TaqI* και *FokI*) στους ΣΔ2 ασθενείς (41). Το αλλήλιο f του πολυμορφισμού *FokI* δημιουργεί ένα εναλλακτικό ATG κωδικόνιο, το οποίο οδηγεί σε μία πρωτεΐνη VDR μακρύτερη κατά τρία αμινοξέα. Η βραχύτερη F-VDR πρωτεΐνη (424 αμινοξέα) έχει δειχθεί ότι είναι περισσότερο ενεργός από την πιο επιμηκυμένη μορφή (427 αμινοξέα), σε μεταγραφικό επίπεδο. Επιπλέον, καθώς το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να είναι ειδικό για το γονίδιο και τον κυτταρικό τύπο, ορισμένα γονίδια και κυτταρικοί τύποι θα είναι περισσότερο ευαίσθητοι από άλλους (40). Ο *TaqI* είναι ένας σιωπηλός

SNP στο εξώνιο 9, ενώ ο *ApaI* και ο *BsmI* εντοπίζονται στο ιντρόνιο μεταξύ των εξωνίων 8-9, και δε φαίνεται να επηρεάζουν τη δομή της πρωτεΐνης VDR (40). Ο Messaritakis και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι σε ασθενείς με ΣΔ2 υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο λειτουργικό πολυμορφισμό *FokI* και στη ρινική φορεία σε *S. aureus* (41).

Στη βιβλιογραφία έχει προταθεί η επίδραση των SNPs του γονιδίου VDR στη βιοδιαθεσιμότητα και στην επάρκεια σε 25(OH)D και σε LL-37 (42). Επομένως, στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τη συσχέτιση αυτών των ειδικών SNPs στο γονίδιο του VDR με τη βιταμίνη D και το επαγόμενο από τη βιταμίνη D μόριο της καθελιδίνης στους διαβητικούς ασθενείς. Η παρουσία του *BsmI* b αλληλίου συσχετίστηκε με μεγαλύτερη συγκέντρωση 25(OH)D και LL-37 στον ορό, συγκριτικά με το B αλληλίο. Επιπρόσθετα, ο *BsmI* bb γονότυπος συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα ορού της LL-37 συγκριτικά με τον Bb γονότυπο χωρίς, ωστόσο, να παρατηρηθεί μεταξύ τους διαφορά στις συγκεντρώσεις ορού της 25(OH)D. Από την άλλη πλευρά, το *TaqI* T αλληλίο συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα ορού της LL-37, με οριακή μη σημαντική διαφορά, ενώ οι *TaqI* TT ομοζυγώτες παρουσίαζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις ορού της LL-37 σε σχέση με τους *TaqI* Tt ετεροζυγώτες. Ο *TaqI* πολυμορφισμός δε συσχετίστηκε με διαφορές στις συγκεντρώσεις ορού της βιταμίνης D. Τέλος, συγκρίνοντας τα επίπεδα ορού των 25(OH)D και LL-37, δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στις συχνότητες γονοτύπων και αλληλίων των *FokI* και *ApaI* VDR πολυμορφισμών.

Εφόσον οι *BsmI* και *TaqI* πολυμορφισμοί στερούνται γνωστών λειτουργικών επιδράσεων, αυτοί καθαυτοί οι πολυμορφισμοί μπορεί να μην είναι ο επηρεάζων τη νόσο γενετικός τόπος, αλλά μάλλον να αντανακλούν μια ανισορροπία σύνδεσης, και να δρουν ως μέσο επισήμανσης για λειτουργικές παραλλαγές οι οποίες επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της βιταμίνης D και του αντιμικροβιακού πεπτιδίου της καθελιδίνης. Ειδικότερα, ο *BsmI* συνδέεται ισχυρά με μία 3-πολύ(A) μικροδορυφορική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία στην 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή, η οποία φαίνεται να επηρεάζει τη σταθερότητα του VDR mRNA (156). Σε αυτό το πλαίσιο, τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να οφείλονται στο γεγονός ότι οι SNPs του γονιδίου του VDR, που βρέθηκαν να σχετίζονται με τα επίπεδα της βιταμίνης D και της LL-37, συνδέονται στενά και συν-κληρονομούνται με αλληλία ενός άλλου, αγνώστου, αλλά αληθώς λειτουργικού, γενετικού τόπου.

Σε μια προηγούμενη μελέτη, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις ορού της 25(OH)D και στις γονιδιακές παραλλαγές του VDR σε ενήλικο πληθυσμό στον Καναδά (157). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανεύρεση, ωστόσο, συσχέτισης των υψηλότερων επιπέδων καθελσιδίνης με τον *FokI* FF γονότυπο σε πληθυσμό της Βόρειας Ινδίας (42). Οι παρατηρούμενες διαφορές στα αποτελέσματα θα μπορούσαν να οφείλονται στην ετερογένεια των υπό μελέτη κοορτών και στις γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα στις διάφορες εθνικές ομάδες.

Τελευταίο, αλλά εξίσου αξιοσημείωτο εύρημα της μελέτης μας ήταν η μη ανάδειξη της ρινικής φορέας σε *S. aureus* ως παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη κλινικών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων ανάμεσα σε ασθενείς με ΣΔ2. Οι διαφορές στον αριθμό των λοιμώξεων από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο ήταν μη σημαντικές μεταξύ αποικισμένων και μη-αποικισμένων διαβητικών ασθενών. Η συσχέτιση ανάμεσα στη ρινική φορεία και στην εκδήλωση σταφυλοκοκκικής νόσου αναφέρθηκε πρώτη φορά από το Danbolt το 1931, που μελέτησε τη δοθιήνωση, και επιβεβαιώθηκε έκτοτε από πληθώρα μελετών. Ειδικότερα, η ρινική φορεία σε *S. aureus* βρέθηκε να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για νοσοκομειακές λοιμώξεις σε αρκετές ειδικές πληθυσμιακές ομάδες, όπως σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε μονάδα εντατικής παρακολούθησης ή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση (158). Ωστόσο, σε μελέτη της Miller σε υγιή πληθυσμό το 2009, δεν ανευρέθη συσχέτιση μεταξύ ρινικού αποικισμού από *S. aureus* και σοβαρών δερματικών λοιμώξεων (159). Ειδικότερα, όσον αφορά στην εκδήλωση βακτηριαιμίας, κανείς από τους διαβητικούς συμμετέχοντες ασθενείς στη μελέτη μας, δεν παρουσίασε βακτηριαιμία κατά την δετή παρακολούθηση. Αντιθέτως, σε μελέτη του Wertheim ο αποικισμός της ρινός από *S. aureus* βρέθηκε να αυξάνει τον κίνδυνο ενδονοσοκομειακής βακτηριαιμίας από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (99). Επίσης, σε μελέτη του Rujol βρέθηκε ότι ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης βακτηριαιμίας σε ασθενείς με ρινική φορεία που νοσηλεύονται στη μονάδα εντατικής θεραπείας ήταν 12.4 (160). Η ύπαρξη αντικρουόμενων ευρημάτων υπογραμμίζει την ανάγκη διερεύνησης εναλλακτικών θέσεων, περιβαλλοντικών ή σωματικών, οι οποίες μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας στην καλύτερη κατανόηση της δυναμικής της μετάδοσης του *S. aureus* και στην ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών πρόληψης.

2.8. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η μελέτη μας, μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων, κατάφερε να αναδείξει μια συσχέτιση ανάμεσα στο rs1800795 SNP του γονιδίου της IL6 και το ΣΔ2 σε έναν ομοιογενή γενετικά Μεσογειακό πληθυσμό. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα πρέπει να αποτελέσουν τη βάση για μελλοντικές συγκριτικές μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς προκειμένου να αποσαφηνιστεί η γενετική αρχιτεκτονική του ΣΔ2 και οι επιδράσεις συγκεκριμένων αλληλίων.

Η αύξηση των γνώσεων για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ΣΔ2 είναι κρίσιμη για τον επιτυχή καθορισμό μέτρων πρόληψης και ελέγχου. Η στόχευση φλεγμονωδών μονοπατιών θα μπορούσε να αποτελεί μέρος των στρατηγικών πρόληψης και ελέγχου του ΣΔ2 και των επιπλοκών αυτού. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να κατανοήσουμε πλήρως πως μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως η IL6, εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΔ2 και να ανακαλύψουμε θεραπευτικές προοπτικές ελέγχοντας τα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής και μειώνοντας τη φλεγμονή.

Η έλλειψη κατανόησης των κυτταρικών και μοριακών διαδικασιών οι οποίες επηρεάζονται από τους πολυμορφισμούς, καθιστά την ερμηνεία των μελετών παρατήρησης εξαιρετικά δύσκολη. Απαιτείται περαιτέρω εργασία ώστε να εξερευνηθούν οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι δυνητικά ενισχύουν ή αναστέλλουν αυτόν το ρόλο των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στον ΣΔ2, όπως είναι η συνεισφορά σχετιζόμενων γενετικών τόπων ή έκθεσης σε άλλους περιβαλλοντικούς ρυθμιστές.

Η μεγαλύτερη πρόκληση για τις επερχόμενες μελέτες θα είναι να ενσωματώσουν σε ενιαίο σύνολο την περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ περιβάλλοντος, φλεγμονής και ανοσοποιητικού συστήματος. Από τα μέχρι τώρα δεδομένα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μεταφλεγμονή με τα χρονίως διεγερμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο ΣΔ2 οδηγεί σε ανοχή στα διάφορα ερεθίσματα και σε ανεπαρκή απάντηση μετά από διέγερση. Ωστόσο, επιπρόσθετες διαταραχές των ανοσοποιητικών κυττάρων, όπως η μειωμένη ικανότητα των πολυμορφοπύρηνων ουδετεροφίλων στη θανάτωση παθογόνων, μπορούν να εξηγήσουν την αυξημένη επίπτωση αποικισμού και λοιμώξεων από *S. aureus* στους ασθενείς με ΣΔ2.

Στη μελέτη μας βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα ορού της 25(OH)D και της LL-37 στο ΣΔ2, αναδεικνύοντας ένα πιθανό έλλειμμα στη μη ειδική ανοσολογική απάντηση των διαβητικών ασθενών. Η ρινική φορεία στο χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο συσχετίστηκε με υψηλότερα κυκλοφορούντα επίπεδα της καθελιδίνης, αντανακλώντας πιθανότατα τη μεταφλεγμονή, παρά την επιθηλιακή ανοσιακή απόκριση, στο ΣΔ2. Η ανίχνευση των επιπέδων της 25(OH)D και της LL-37 σε τοπικό επιθηλιακό επίπεδο θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής έρευνας για την αποσαφήνιση της μη ειδικής επιθηλιακής ανοσολογικής απάντησης σε αυτούς τους ασθενείς.

Επιπρόσθετα, η καθημερινή λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης D δε φάνηκε να επιδρά στα ποσοστά ρινικής φορείας σε *S. aureus* στους ΣΔ2 ασθενείς. Κατανοώντας τους μηχανισμούς μέσω των οποίων ο άξονας βιταμίνης D-καθελιδίνης συμμετέχει στη ρύθμιση της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης, στο πλαίσιο του ΣΔ2, είναι καίριας σημασίας για την ανακάλυψη ισχυρών, κατευθυνόμενων προς το ξενιστή, θεραπευτικών μέσων για την πρόληψη του αποικισμού και την αντιμετώπιση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων.

Η γενετική ποικιλότητα στο γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D ενδεχομένως επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της βιταμίνης D και του αντιμικροβικού πεπτιδίου της καθελιδίνης. Τα ευρήματά μας, ωστόσο, βασίζονται σε έναν σχετικά μικρό πληθυσμό και περισσότερο ενδελεχείς μελέτες είναι βέβαιο ότι απαιτούνται για τη διερεύνηση του ανοσορυθμιστικού ρόλου του υποδοχέα της βιταμίνης D.

Τέλος, στη μελέτη μας η ρινική φορεία στον *S. aureus* δε φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για διεισδυτικές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις στους ασθενείς με ΣΔ2. Επομένως, η στρατηγική πρόληψης των συστηματικών λοιμώξεων μέσω εκρίζωσης του χρυσίζοντα σταφυλοκόκκου από τη ρινική κοιλότητα δεν υποστηρίζεται από τα τρέχοντα ευρήματα. Επιτακτική καθίσταται η ανάγκη διερεύνησης εναλλακτικών θέσεων, οι οποίες μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας στη διείσδυση και μετάδοση του *S. aureus*, προκειμένου να αναπτυχθούν αποτελεσματικότερες μέθοδοι πρόληψης.

2.9. Βιβλιογραφία

1. Global Report on Diabetes 2016. Paris: World Health Organization; 2016. Retrieved from <https://www.who.int/health-topics/diabetes>.
2. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. *Curr Diab Rep*. 2013;13(3):435-444.
3. Velloso LA, Eizirik DL, Cnop M. Type 2 diabetes mellitus--an autoimmune disease?. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(12):750-755.
4. 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;40(11):1286-1292.
5. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):813-823.
6. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;26(3-4):259-265.
7. Xue A, Wu Y, Zhu Z, et al. Genome-wide association analyses identify 143 risk variants and putative regulatory mechanisms for type 2 diabetes. *Nat Commun*. 2018;9(1):2941.
8. Witka BZ, Oktaviani DJ, Marcellino M, Barliana MI, Abdulah R. Type 2 Diabetes-Associated Genetic Polymorphisms as Potential Disease Predictors. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;12:2689-2706.
9. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):475-487.
10. Akbari M, Hassan-Zadeh V. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. *Inflammopharmacology*. 2018;26(3):685-698.
11. Kraakman MJ, Kammoun HL, Allen TL, et al. Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance [published correction appears in *Cell Metab*. 2016 Mar 8;23(3):563]. *Cell Metab*. 2015;21(3):403-416.

12. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(3):E506-E515.
13. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?. *Diabetes.* 2005;54 Suppl 2:S114-S124.
14. Steensberg A, Fischer CP, Sacchetti M, et al. Acute interleukin-6 administration does not impair muscle glucose uptake or whole-body glucose disposal in healthy humans. *J Physiol.* 2003;548(Pt 2):631-638.
15. Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4167-4170.
16. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(2):372-379.
17. Kim JH, Kim JE, Liu HY, Cao W, Chen J. Regulation of interleukin-6-induced hepatic insulin resistance by mammalian target of rapamycin through the STAT3-SOCS3 pathway. *J Biol Chem.* 2008;283(2):708-715.
18. Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017;27(3):229-236.
19. Zhou T, Hu Z, Yang S, Sun L, Yu Z, Wang G. Role of Adaptive and Innate Immunity in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res.* 2018;2018:7457269.
20. Tanaka T, Itoh H, Doi K, et al. Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia.* 1999;42(6):702-710.
21. Banerjee M, Saxena M. Genetic polymorphisms of cytokine genes in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2014;5(4):493-504.
22. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18138-18144.

23. Nadeem A, Naveed AK, Hussain MM, et al. Variations in association of Interleukin 6 - G174C single nucleotide polymorphism with type 2 diabetes mellitus—a review. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2013;33:186–191.
24. Huth C, Heid IM, Vollmert C, et al. IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes*. 2006;55(10):2915-2921.
25. Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet*. 2006;15(11):1914-1920.
26. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(7):399-409.
27. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(20):7251-7255.
28. McNicholas S, Talento AF, O'Gorman J, et al. Cytokine responses to Staphylococcus aureus bloodstream infection differ between patient cohorts that have different clinical courses of infection. *BMC Infect Dis*. 2014;14:580.
29. Vogel TP, Milner JD, Cooper MA. The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. *J Clin Immunol*. 2015;35(7):615-623.
30. Gombart AF. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol*. 2009;4(9):1151-1165.
31. Bizzaro G, Antico A, Fortunato A, Bizzaro N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit?. *Isr Med Assoc J*. 2017;19(7):438-443.
32. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178(1):145-153.

33. Harrison SR, Li D, Jeffery LE, Raza K, Hewison M. Vitamin D, Autoimmune Disease and Rheumatoid Arthritis. *Calcif Tissue Int.* 2020;106(1):58-75.
34. Colotta F, Jansson B, Bonelli F. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *J Autoimmun.* 2017;85:78-97.
35. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(2):365-379.
36. Gunville CF, Mourani PM, Ginde AA. The role of vitamin D in prevention and treatment of infection. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2013;12(4):239-245.
37. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311(5768):1770-1773.
38. Matheson EM, Mainous AG 3rd, Hueston WJ, Diaz VA, Everett CJ. Vitamin D and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Scand J Infect Dis.* 2010;42(6-7):455-460.
39. Björkhem-Bergman L, Missailidis C, Karlsson-Valik J, et al. Vitamin D supplementation to persistent carriers of MRSA—a randomized and placebo-controlled clinical trial. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(9):1735-1744.
40. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006;371(1-2):1-12.
41. Messaritakis I, Samonis G, Dimopoulou D, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage might be associated with vitamin D receptor polymorphisms in type 2 diabetes. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):920-925.
42. Panda S, Tiwari A, Luthra K, Sharma SK, Singh A. Association of Fok1 VDR polymorphism with Vitamin D and its associated molecules in pulmonary tuberculosis patients and their household contacts. *Sci Rep.* 2019;9(1):15251.
43. Harinarayan CV. Vitamin D and diabetes mellitus. *Hormones (Athens).* 2014;13(2):163-181.
44. Issa CM. Vitamin D and Type 2 Diabetes Mellitus. *Adv Exp Med Biol.* 2017;996:193-205.

45. Khan H, Kunutsor S, Franco OH, Chowdhury R. Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc.* 2013;72(1):89-97.
46. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *J Immunol.* 2013;191(10):4895-4901.
47. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* 1995;63(4):1291-1297.
48. Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood.* 2001;97(12):3951-3959.
49. Xhindoli D, Pacor S, Benincasa M, Scocchi M, Gennaro R, Tossi A. The human cathelicidin LL-37--A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(3):546-566.
50. Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758(9):1408-1425.
51. Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood.* 1997;90(7):2796-2803.
52. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun.* 2008;76(9):4176-4182.
53. Belas R, Manos J, Suvanasuthi R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 2004;72(9):5159-5167.
54. Noore J, Noore A, Li B. Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra- and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(3):1283-1290.
55. Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, et al. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(6):1266-1269.

56. Haisma EM, de Breij A, Chan H, et al. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4411-4419.
57. Pound LD, Patrick C, Eberhard CE, et al. Cathelicidin Antimicrobial Peptide: A Novel Regulator of Islet Function, Islet Regeneration, and Selected Gut Bacteria. *Diabetes.* 2015;64(12):4135-4147.
58. Gonzalez-Curiel I, Castañeda-Delgado J, Lopez-Lopez N, et al. Differential expression of antimicrobial peptides in active and latent tuberculosis and its relationship with diabetes mellitus. *Hum Immunol.* 2011;72(8):656-662.
59. Lipsky BA, Richard JL, Lavigne JP. Diabetic foot ulcer microbiome: one small step for molecular microbiology . . . One giant leap for understanding diabetic foot ulcers?. *Diabetes.* 2013;62(3):679-681.
60. Dryden M, Baguneid M, Eckmann C, et al. Pathophysiology and burden of infection in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease: focus on skin and soft-tissue infections. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21 Suppl 2:S27-S32.
61. Gan YH. Host susceptibility factors to bacterial infections in type 2 diabetes. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003794.
62. Shah BR, Hux JE. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26(2):510-513.
63. Hamilton EJ, Martin N, Makepeace A, Sillars BA, Davis WA, Davis TM. Incidence and predictors of hospitalization for bacterial infection in community-based patients with type 2 diabetes: the fremantle diabetes study. *PLoS One.* 2013;8(3):e60502.
64. Benfield T, Jensen JS, Nordestgaard BG. Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. *Diabetologia.* 2007;50(3):549-554.
65. Ruimy R, Angebault C, Djossou F, et al. Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal *Staphylococcus aureus* carriage in humans?. *J Infect Dis.* 2010;202(6):924-934.

66. Johannessen M, Sollid JE, Hanssen AM. Host- and microbe determinants that may influence the success of *S. aureus* colonization. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:56.
67. Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol.* 2018;9:2419.
68. Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, et al. Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5718-5725.
69. Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MF, et al. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a "culture rule". *Clin Infect Dis.* 2004;39(6):806-811.
70. Regev-Yochay G, Trzcinski K, Thompson CM, Malley R, Lipsitch M. Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: In vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2006;188(13):4996-5001.
71. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, et al. Corrigendum: Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature.* 2016;539(7628):314.
72. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature.* 2010;465(7296):346-349.
73. Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol.* 2013;195(8):1645-1655.
74. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, et al. Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003092.
75. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiario J, et al. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infect Immun.* 2006;74(4):2145-2153.
76. Wertheim HF, Walsh E, Choudhury R, et al. Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Med.* 2008;5(1):e17.

77. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, et al. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med*. 2004;10(3):243-245.
78. Quinn GA, Cole AM. Suppression of innate immunity by a nasal carriage strain of *Staphylococcus aureus* increases its colonization on nasal epithelium. *Immunology*. 2007;122(1):80-89.
79. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010;1(5):440-464.
80. Burgey C, Kern WV, Römer W, Rieg S. Differential induction of innate defense antimicrobial peptides in primary nasal epithelial cells upon stimulation with inflammatory cytokines, Th17 cytokines or bacterial conditioned medium from *Staphylococcus aureus* isolates. *Microb Pathog*. 2016;90:69-77.
81. Yamasaki K, Gallo RL. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol*. 2008;18(1):11-21.
82. Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, Dorschner RA, Gallo RL. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol*. 2004;172(5):3070-3077.
83. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 2007;117(3):803-811.
84. Olsen K, Falch BM, Danielsen K, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with serum 25-hydroxyvitamin D levels, gender and smoking status. The Tromsø Staph and Skin Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(4):465-473.
85. Cole AM, Tahk S, Oren A, et al. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(6):1064-1069.
86. Cole AL, Muthukrishnan G, Chong C, et al. Host innate inflammatory factors and staphylococcal protein A influence the duration of human *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Mucosal Immunol*. 2016;9(6):1537-1548.

87. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Maraki S, Papavasiliou E, Galanakis E. Staphylococcus aureus nasal carriage might be associated with vitamin D receptor polymorphisms in type 1 diabetes. *Int J Infect Dis.* 2009;13(6):e437-e443.
88. Claassen M, Nouwen J, Fang Y, et al. Staphylococcus aureus nasal carriage is not associated with known polymorphism in the Vitamin D receptor gene. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;43(2):173-176.
89. Mulcahy ME, McLoughlin RM. Host-Bacterial Crosstalk Determines Staphylococcus aureus Nasal Colonization. *Trends Microbiol.* 2016;24(11):872-886.
90. Dunyach-Remy C, Courtais-Coulon C, DeMattei C, et al. Link between nasal carriage of Staphylococcus aureus and infected diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab.* 2017;43(2):167-171.
91. Global burden of diabetes. International Diabetes federation. Diabetic atlas fifth edition 2011, Brussels. Available at <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
92. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia.* 2019;62(1):3-16.
93. Knapp S. Diabetes and infection: is there a link?--A mini-review. *Gerontology.* 2013;59(2):99-104.
94. Smit J, Sogaard M, Schønheyder HC, Nielsen H, Frøslev T, Thomsen RW. Diabetes and risk of community-acquired Staphylococcus aureus bacteremia: a population-based case-control study. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(5):631-639.
95. Yano H, Kinoshita M, Fujino K, et al. Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice and thereby improves surgical site Staphylococcus aureus infection. *Infect Immun.* 2012;80(12):4409-4416.
96. Den Heijer CD, van Bijnen EM, Paget WJ, et al. Prevalence and resistance of commensal Staphylococcus aureus, including methicillin-resistant S aureus, in nine European countries: a cross-sectional study [published correction appears in *Lancet Infect Dis.* 2013 Dec;13(12):1011. Flemming, Douglas [corrected to Fleming, Douglas]]. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(5):409-415.

97. Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?. *Trends Microbiol.* 2001;9(12):605-610.
98. Hart J, Hamilton EJ, Makepeace A, et al. Prevalence, risk factors and sequelae of *Staphylococcus aureus* carriage in diabetes: the Fremantle Diabetes Study Phase II. *J Diabetes Complications.* 2015;29(8):1092-1097.
99. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet.* 2004;364(9435):703-705.
100. Söderquist B, Sundqvist KG, Vikerfors T. Kinetics of serum levels of interleukin-6 in *Staphylococcus aureus* septicemia. *Scand J Infect Dis.* 1992;24(5):607-612.
101. 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;286(3):327-334.
102. Ofstad AP, Gullestad L, Orvik E, et al. Interleukin-6 and activin A are independently associated with cardiovascular events and mortality in type 2 diabetes: the prospective Asker and Bærum Cardiovascular Diabetes (ABCD) cohort study. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:126.
103. Schamarek I, Herder C, Nowotny B, et al. Adiponectin, markers of subclinical inflammation and nerve conduction in individuals with recently diagnosed type 1 and type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(4):433-443.
104. Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q, Hua M. Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine.* 2016;86:100-109.
105. Karadeniz M, Erdogan M, Berdeli A, Yilmaz C. Association of interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphism with increased risk of type 2 diabetes mellitus patients with diabetic nephropathy in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014;18(1):62-65.
106. Buraczynska M, Zukowski P, Drop B, Baranowicz-Gaszczyk I, Ksiazek A. Effect of G(-174)C polymorphism in interleukin-6 gene on cardiovascular disease in type 2 diabetes patients. *Cytokine.* 2016;79:7-11.

107. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1369-1376.
108. Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, et al. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes*. 2000;49(3):517-520.
109. Chauhan M, McGuire W. Interleukin-6 (-174C) polymorphism and the risk of sepsis in very low birth weight infants: meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93(6):F427-9.
110. Gao JW, Zhang AQ, Pan W, et al. Association between IL-6-174G/C polymorphism and the risk of sepsis and mortality: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015;10(3):e0118843.
111. Allam G, Alsulaimani AA, Alzaharani AK, Nasr A. Neonatal infections in Saudi Arabia: association with cytokine gene polymorphisms. *Cent Eur J Immunol* 2015;40(1):68-77.
112. Mao ZR, Zhang SL, Feng B. Association of IL-10 (-819T/C, -592A/C and -1082A/G) and IL-6-174G/C gene polymorphism and the risk of pneumonia-induced sepsis. *Biomarkers* 2017;22(2):106-12.
113. Feng B, Mao ZR, Pang K, Zhang SL, Li L. Association of tumor necrosis factor alpha -308G/a and interleukin-6 -174G/C gene polymorphism with pneumonia-induced sepsis. *J Crit Care* 2015;30(5):920-3.
114. Lorente L, Martin MM, Perez-Cejas A, et al. Association between Interleukin-6 Promoter Polymorphism (-174 G/C), Serum Interleukin-6 Levels and Mortality in Severe Septic Patients. *Int J Mol Sci* 2016;17(11).pii: E1861.
115. Jimenez-Sousa MA, Medrano LM, Liu P, et al. IL-6 rs1800795 polymorphism is associated with septic shock-related death in patients who underwent major surgery: a preliminary retrospective study. *Ann Intensive Care* 2017;7(1):22.
116. Caprio M, Infante M, Calanchini M, Mammi C, Fabbri A. Vitamin D: not just the bone. Evidence for beneficial pleiotropic extraskeletal effects. *Eat Weight Disord*. 2017;22(1):27-41.

117. Chung C, Silwal P, Kim I, Modlin RL, Jo EK. Vitamin D-Cathelicidin Axis: at the Crossroads between Protective Immunity and Pathological Inflammation during Infection. *Immune Netw.* 2020;20(2):e12.
118. Tabesh M, Azadbakht L, Faghihimani E, Tabesh M, Esmailzadeh A. Calcium-vitamin D Cosupplementation influences circulating inflammatory biomarkers and Adipocytokines in vitamin D-insufficient diabetics: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(12):E2485–E2493.
119. Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep* 2012;39(12):10957-10970.
120. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol* 2012;280(1):22-35.
121. Van Harten RM, van Woudenberg E, van Dijk A, Haagsman HP. Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials. *Vaccines (Basel)* 2018;6(3):63.
122. Bals R, Wilson JM. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(4):711-720.
123. Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med* 2009;7:28.
124. Schwalfenberg GK. A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:96–108.
125. Bikle DD. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17(4):348-352.
126. Thomason J, Rentsch C, Stenehjem EA, Hidron AI, Rimland D. Association between vitamin D deficiency and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Infection.* 2015;43(6):715-722.
127. Slow S, Priest PC, Chambers ST, et al. Effect of vitamin D3 supplementation on *Staphylococcus aureus* nasal carriage: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy adults. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(5):453-458.

128. Ryu S, Song PI, Seo CH, Cheong H, Park Y. Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8753-8772.
129. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci*. 2005;40(2):123-132.
130. Takahashi K, Nakayama Y, Horiuchi H, et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2002;24(3):335-347.
131. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33:S62-S69.
132. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2018.
133. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911–1930.
134. Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, et al. Variations of the interleukin-6 promoter associates with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia*. 2005;48:251–260.
135. Tsiavou A, Hatzigelaki E, Chaidaroglou A, Manginas A, Koniavitou K, Degiannis D, Raptis SA. TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6, gene polymorphisms in latent autoimmune diabetes of adults (LADA) and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Immunol*. 2004;24(6):591-9.
136. Vozarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, et al. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet*. 2003;112:409–413.
137. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, et al. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:5053–5058.

138. Kubaszek A, Pihlajama`ki J, Punnonen K, et al. The C- 174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity. *Diabetes*. 2003;52:558–561.
139. Kurzawski M, Pawlik A, Czerny B, et al. Frequencies of the common promoter polymorphisms in cytokine genes in a Polish population. *Int J Immunogenet*. 2005;32:285–291.
140. Nieters A, Brems S, Becker N. Cross-sectional study of cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of German population. *Hum Genet*. 2001;108:241–248.
141. Poli F, Nocco A, Berra S, et al. Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. *Eur J Immunogenet*. 2002;29:237–240.
142. Eliopoulos E, Zervou MI, Andreou A, et al. Association of the PTPN22 R620 W polymorphism with increased risk for SLE in the genetic homogeneous population of Crete. *Lupus*. 2011;10:501–506.
143. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007;316:1331–1336.
144. Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, et al. STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece. *Hum Immunol*. 2009;70:738–741.
145. Stacey HJ, Clements CS, Welburn SC, Jones JD. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among diabetic patients: a meta-analysis. *Acta Diabetol*. 2019;56(8):907-921.
146. Tsiodras S, Daikos GL, Lee A, Plachouras D, Antoniadou A, Ploiarchopoulou F et al. Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation in a large metropolitan area in Greece: An epidemiological study using two case definitions. *J Glob Antimicrob Re*. 2014;2(1):27-33.
147. Caiello I, Minnone G, Holzinger D, Vogl T, Prencipe G, Manzo A, et al. IL-6 Amplifies TLR Mediated Cytokine and Chemokine Production: Implications for the Pathogenesis of Rheumatic Inflammatory Diseases. *PLoS ONE*. 2014;9(10): e107886.

148. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients* 2015;7(10):8251-8260.
149. Dhas Y, Banerjee J, Damle G, Mishra N. Association of vitamin D deficiency with insulin resistance in middle-aged type 2 diabetics. *Clin Chim Acta* 2019;492:95-101.
150. Sørensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods* 1997;206:53–59.
151. Rivas-Santiago B, Trujillo V, Montoya A, Gonzalez-Curiel I, Castaneda-Delgado J, Cardenas A et al. Expression of antimicrobial peptides in diabetic foot ulcer. *J Dermatol Sci* 2012;65(1):19-26.
152. Thienhaus ML, Wohlers J, Podschun R, Hedderich J, Ambrosch P, Laudien M. Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *Staphylococcus aureus* colonization in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology* 2011;49(5):554-561.
153. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(9):2206-2214.
154. Bhan I, Camargo CA Jr, Wenger J, Ricciardi C, Ye J, Borregaard N et al. Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(5):1302-4.e1.
155. Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, Gombart AF et al. Vitamin D-Directed Rheostatic Regulation of Monocyte Antibacterial Responses. *J Immunol* 2009;182(7):4289-4295.
156. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004;338(2):143-56.
157. Larcombe L, Mookherjee N, Slater J, Slivinski C, Dantouze J, Singer M et al. Vitamin D, serum 25(OH)D, LL-37 and polymorphisms in a Canadian First Nation population with endemic tuberculosis. *Int J Circumpolar Health* 2015;74:28952.

158. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005;5(12):751-62.
159. Miller M, Cook HA, Furuya EY, Bhat M, Lee MH, Vavagiakis P, Visintainer P, Vasquez G, Larson E, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* in the community: colonization versus infection. *PLoS One* 2009;4(8):e6708.
160. Pujol M, Pena C, Pallares R, et al. Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am J Med* 1996;100:509–16.

2.10. Παράρτημα

ΦΟΡΜΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Όνοματεπώνυμο Πατρώνυμο

Διεύθυνση Τηλέφωνο

Ηλικία Φύλο

Αριθμός αρχείου Νοσοκομείου ΑΜΚΑ

ΑΤΟΜΙΚΟ ΑΝΑΜΝΗΣΤΙΚΟ

- Αρτηριακή Υπέρταση
- Δυσλιπιδαιμία
- Παχυσαρκία
- Χρόνια λήψη κορτικοστεροειδών -ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων
- Χρόνια λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης D
- Χρόνια Νεφρική Νόσος
- Κίρρωση – άλλη ηπατική νόσος
- Αλκοολισμός
- Κάπνισμα
- Υποθυρεοειδισμός
- Χρόνια αναπνευστική πνευμοπάθεια
- Άλλο

Χρόνια Φαρμακευτική αγωγή

1.
2.
3.
4.

ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

- Καρδιαγγειακή νόσος
- Περιφερική αγγειοπάθεια
- Νεφρική νόσος
- Αμφιβληστροειδοπάθεια
- Νευροπάθεια

ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

.....

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

Δίαιτα και άσκηση

Ινσουλινοθεραπεία

Per os φαρμακευτική αγωγή

1.

2.

3.

ΠΡΟΣΦΑΤΗ ΛΗΨΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ (ΕΝΤΟΣ ΤΡΙΜΗΝΟΥ)

Ναι

Όχι

ΠΡΟΣΦΑΤΗ ΝΟΣΗΛΕΙΑ ΣΕ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ (ΕΝΤΟΣ ΤΡΙΜΗΝΟΥ)

Ναι

Όχι

ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΥΣΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Ναι

Όχι

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΡΙΝΙΚΟΥ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΟΣ

1. Ημερομηνία.....

Αποτέλεσμα..... MRSA MSSA

2. Ημερομηνία.....

Αποτέλεσμα..... MRSA MSSA

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

HbA1c		Βιταμίνη 25(OH)D	
Ολική χοληστερόλη		CPK	
LDL		Λευκά αιμοσφαίρια	
HDL		Αιματοκρίτης	
Τριγλυκερίδια		Αιμοσφαιρίνη	
Γλυκόζη		Αιμοπετάλια	
Κρεατινίνη		CRP	
Θυρία		ΤΚΕ	

2.11. Βιογραφικό σημείωμα

Προσωπικά στοιχεία

Όνομα: **Μαρίνα**

Επώνυμο: **Πλατάκη**

Ημερομηνία Γέννησης: 17 Μαΐου 1989

Διεύθυνση κατοικίας: Γαργαδόρου 59, Αγ. Νικόλαος Κρήτης, Ελλάδα

Κινητό τηλέφωνο: +30 6974059704

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμη

E-mail: marinaplatak@gmail.com

Εκπαίδευση-Εργασία

2007: απολυτήριο από το Ενιαίο Γενικό Λύκειο Αγ. Νικολάου, Κρήτη

2007-2013: φοιτήτρια Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα (βαθμός 8.94/10)

03/2013-06/2013: Karolinska Institutet, Στοκχόλμη, Σουηδία: Πρόγραμμα Erasmus

10/2013-04/2015: επιστημονική συνεργάτης στην Παθολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Ελλάδα

04/2015-07/2017: ειδικευόμενη Παθολογίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη, Ελλάδα

07/2017-σήμερα: ειδικευόμενη Καρδιολογίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη, Ελλάδα

5/2/2014-σήμερα: υποψήφια Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Κρήτης

03/2015: ALS provider course

Ξένες γλώσσες

2003: Κρατικό Πιστοποιητικό Γλωσσομάθειας Επιπέδου B2 Ιταλικής Γλώσσας και ‘Certificazione di Italiano come Lingua Straniera (Livello DUE-B2)’ Ιταλικής Γλώσσας (Centro CILS)

2004: Κρατικό Πιστοποιητικό Γλωσσομάθειας Επιπέδου B2 Γερμανικής Γλώσσας και ‘Zentrale Mittelstufenprüfung (ZMP)’ Γερμανικής Γλώσσας (Ινστιτούτο Goethe)

2006: Πιστοποιητικό Αριστης Γνώσης Αγγλικής Γλώσσας (Πανεπιστήμιο του Michigan) και επάρκεια διδασκαλίας

Βραβεία/Υποτροφίες

2009: υποτροφία και βραβείο αριστείας από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών

2011: υποτροφία από το Κοινωφελές Ίδρυμα ‘Μελισσεΐδιο Πνευματικό Κέντρο’

2013: υποτροφία της εταιρείας Glaxo Smith Kline για Μεταπτυχιακές Σπουδές (1η απόφοιτη Ιατρικής Σχολής)

2018: 2^ο βραβείο προφορικής ανακοίνωσης στο 4^ο πανελλήνιο συνέδριο συνεχιζόμενης εκπαίδευσης στην Εσωτερική Παθολογία με διεθνή συμμετοχή

Παρουσιάσεις σε συνέδρια

1. 10-13/05/2014: 24th ECCMID, ‘Toll-like receptor 9 polymorphism in Cretan patients with Leishmania infantum infection’
2. 05-09/09/2014: 54th ICAAC, ‘Clinical Features and Outcome of Infections Due to Pandrug-Resistant Gram-Negative Bacteria’
3. 05-09/09/2014: 54th ICAAC, ‘Colistin- Tigecycline Antimicrobial Combination for the Treatment of Ventilator Associated Pneumonia: A Retrospective Cohort Study’
4. 06-08/03/2015: 15^ο πανελλήνιο συνέδριο Λοιμώξεων ‘Συγκριτική μελέτη της γνώσης της υγιεινής των χεριών σε προπτυχιακούς φοιτητές Ιατρικής και σπουδαστές Νοσηλευτικής’
5. 25-28/04/2015: 25th ECCMID, ‘In vitro activity of tigecycline against 14,074 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates’
6. 09-12/10/2015: 7th Trends in Medical Mycology, ‘Candida lusitaniae fungemia: report of three cases’

7. 04-06/03/2016: 16^ο πανελλήνιο συνέδριο Λοιμώξεων, ‘Εμβολιαστική κάλυψη ασθενών με νεοπλασία’
8. 04-06/03/2016: 16^ο πανελλήνιο συνέδριο Λοιμώξεων, ‘Χορήγηση παρεντερικής αντιμικροβιακής αγωγής στα εξωτερικά ιατρεία’
9. 09-12/04/2016: 26th ECCMID, ‘Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: a threat in patients with neoplasia’
10. 03-05/03/2017: 17^ο πανελλήνιο συνέδριο Λοιμώξεων, ‘Λοιμώξεις από *Klebsiella pneumoniae* σε ασθενείς με νεοπλασία’
11. 03-05/03/2017: 17^ο πανελλήνιο συνέδριο Λοιμώξεων, ‘Συνδυασμός κλοξακιλλίνης-δαπτομυκίνης: Αποτελεσματική θεραπεία ενδοκαρδίτιδας από *Staphylococcus lugdunensis*’
12. 03-05/03/2017: 17^ο πανελλήνιο συνέδριο Λοιμώξεων, ‘Ο πολυμορφισμός της ιντερλευκίνης-6 -174G/C (rs1800795) σχετίζεται με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, αλλά όχι με ρινική φορεία *Staphylococcus aureus*’
13. 21-25/02/2018: 4^ο πανελλήνιο συνέδριο στην Εσωτερική Παθολογία με διεθνή συμμετοχή, ‘Ο πολυμορφισμός της ιντερλευκίνης-6 -174G/C (rs1800795) σχετίζεται με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, αλλά όχι με ρινική φορεία *Staphylococcus aureus*’
14. 18-20/10/2018: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέριο, ‘Τα επίπεδα μακρών μη κωδικών μορίων RNA σε υπερτασικούς ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια με διατηρημένο κλάσμα εξώθησης και η σχέση τους με τη λειτουργική ικανότητα’
15. 18-20/10/2018: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέριο, ‘Επιδείνωση της συνολικής μέγιστης επιμήκους παραμόρφωσης της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ενδαγγειακή επιδιόρθωση ανευρύσματος κοιλιακής αορτής’
16. 18-20/10/2018: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέριο, ‘Η συσχέτιση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης του microRNA- 208b με τη μείωση της μέγιστης σφαιρικής επιμήκους παραμόρφωσης της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με οξεία μυοκαρδίτιδα’
17. 18-20/10/2018: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Η πρόιμη ανίχνευση δυσλειτουργίας της δεξιάς κοιλίας σε πρωτοδιαγνωστούμενους ασθενείς με ιδιοπαθή αρτηριακή υπέρταση μέσω της εκτίμησης της σφαιρικής επιμήκους συστολικής παραμόρφωσης: Η επίδραση της υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας’
18. 18-20/10/2018: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘MicroRNA-21 ως προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία με σακουπιτρίλη/βαλσαρτάνη στην καρδιακή ανεπάρκεια με μειωμένο κλάσμα εξώθησης’
19. 05-08/12/2018: 22nd Annual Congress of the EACVI, ‘Deterioration of left ventricular global longitudinal peak strain in patients undergoing endovascular repair P302 of abdominal aortic aneurysms’

20. 05-08/12/2018: 22nd Annual Congress of the EACVI, ‘Association of microRNA-21 gene expression levels with the deterioration of left ventricular global longitudinal peak P955 strain in patients with essential hypertension’
21. 13-16/04/2019: 29th ECCMID, ‘Treatment pattern and outcome in patients with infection due to pandrug-resistant bacteria’
22. 02-04/05/2019: 4th International Congress on Cardiovascular Imaging in Clinical Practice, ‘Acute dyspnea in a young patient’
23. 19-22/06/2019: 26th International Congress on Thrombosis ‘Characterization of multiple platelet activation pathways in patients undergoing percutaneous coronary intervention: The effect of stent length’
24. 31/08-04/09/2019: ESC Congress 2019, ‘MicroRNA-208b gene expression levels as a biomarkers of left ventricular dysfunction in patients with acute myocarditis’
25. 17-19/10/2019: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Ο αυξημένος μέσος όγκος αιμοπεταλίων ως προγνωστικός βιοδείκτης στην ιδιοπαθή υπέρταση’
26. 17-19/10/2019: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου για το microRNA-133a στον λιπώδη ιστό σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο: η επίδραση του δείκτη μάζα σώματος’
27. 17-19/10/2019: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου microRNA-208b ως βιοδείκτης δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με οξεία μυοκαρδίτιδα’
28. 17-19/10/2019: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Αυξημένα επίπεδα μικρών μη-κωδικοποιούμενων μορίων RNA σε υπερτασικούς ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και διατηρημένο κλάσμα εξώθησης’
29. 22-24/10/2020: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Η αυξημένη γονιδιακή έκφραση του microRNA-133a στο λιπώδη ιστό των μη διαβητικών ασθενών με στεφανιαία νόσο’
30. 22-24/10/2020: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Gerbode defect complicating a TAVI procedure: Successful management with valve-in-valve implantation’
31. 22-24/10/2020: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Late functional recovery of subtotally occluded radial artery graft after progression of native coronary stenosis’
32. 22-24/10/2020: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Η επιμήκης συστολική παραμόρφωση της δεξιάς κοιλίας ως προγνωστικός παράγοντας στην νεοεμφανιζόμενη καρδιακή ανεπάρκεια με διατηρημένο κλάσμα εξώθησεως στους υπερτασικούς ασθενείς’
33. 22-24/10/2020: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Συσχέτιση της πρόσληψης νατρίου και καλίου με το φορτίο κοιλιακών αρρυθμιών στην καρδιακή ανεπάρκεια με διατηρημένο κλάσμα εξώθησης’
34. 22-24/10/2020: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, ‘Η επιδείνωση της μέγιστης συνολικής επιμήκους παραμόρφωσης της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε

ενδοαγγειακή επιδιόρθωση ανευρυσμάτων της κοιλιακής αορτής: Η επίδραση στην αρτηριακή σκληρία'

35. 22-24/10/2020: πανελλήνιο καρδιολογικό συνέδριο, 'Πρόπτωση μιτροειδικής κομμισούρας, μία υποδιαγνωσμένη κατάσταση. Μελέτη περιστατικών με τρισδιάστατη δισοφάγειο μελέτη'

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

1. Gionis, M.N., Kaimasidis, G., Tavlas, E., Kontopodis, N., **Plataki, M.**, Kafetzakis, A., & Ioannou, C.V. (2013). Medical management of acute type a aortic dissection in association with early open repair of acute limb ischemia may prevent aortic surgery. *The American journal of case reports*. 14:52–7.
2. Kofteridis, D.P., Giourgouli, G., **Plataki, M.N.**, Andrianaki, A.M., Maraki, S., Papadakis, J.A., Zacharioudaki, M.E. and Samonis, G. (2016). Community-Acquired Pneumonia in Elderly Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of the American Geriatric Society*. 64:649-651.
3. **Plataki, M.N.**, Zervou, M.I., Samonis, G., Daraki, V., Goulielmos, G.N., Kofteridis, D.P. (2018). Association of the Interleukin-6 rs1800795 Polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus in the Population of the Island of Crete, Greece. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 22(7):448-452.
4. Koutserimpas, C., Samonis, G., **Plataki, M.N.**, Bikis, C., Kontakis, G., Kofteridis, D.P. (2018). Multidrug-resistant Gram-negative osteomyelitis: a 10-year study. *Il Giornale di Chirurgia*. 34(5):284-290.
5. Marketou, M.E., Maragkoudakis, S., Anastasiou, I., Nakou, H., **Plataki, M.**, Vardas, P.E., Perthenakis, F.I. (2019). Salt-induced effects on microvascular function: A critical factor in hypertension mediated organ damage. *The Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)*. 21(6):749-757.
6. Marketou, M., Kontaraki, J., Papadakis, J., Kochiadakis, G., Vrentzos, G., Maragkoudakis, S., Fragkiadakis, K., Katsouli, E., **Plataki, M.**, Patrianakos, A., Chlouverakis, G., Papanikolaou, K., Vardas, P., Parthenakis, F. (2019). Platelet microRNAs in hypertensive patients with and without cardiovascular disease. *Journal of Human Hypertension*. 33:149–156.
7. Kofteridis, D.P., Andrianaki, A.M., Maraki, S., Mathioudaki, A., **Plataki, M.**, Alexopoulou, C., Ioannou, P., Samonis, G., Valachis, A. (2020). Treatment pattern, prognostic factors, and outcome in patients with infection due to pan-drug-resistant gram-negative bacteria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 39(5):965-970.

8. **Plataki MN**, Vamvoukaki R, Samonis G, Bikis C, Gorgomiti M, Papadakis JA, Maraki S, Kofteridis DP. (2020). Vitamin D and cathelicidin (LL-37) status in patients with type 2 diabetes and Staphylococcus aureus nasal carriage. *The Review of Diabetic Studies*. X-X (Under review)

Δημοσιεύσεις σε ελληνόγλωσσα επιστημονικά περιοδικά

1. **Πλατάκη, Μ.Ν.**, Σαμώνης, Γ., Γουλιέλμος, Γ.Ν., Ζερβού, Μ.Ι., Μπικής, Χ.Σ., Παπαδάκης, Ι.Α., Ανδριανάκη, Α.Μ., Μαράκη, Σ., Κοφτερίδης, Δ.Π. (2018). Συσχέτιση του πολυμορφισμού της ιντερλευκίνης-6 rs1800795 με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 αλλά όχι με ρινική φορεία Staphylococcus aureus στον Κρητικό πληθυσμό. *Ελληνική Ιατρική Επιθεώρηση*. 119: 178-184.

2.12. Δημοσιευμένο άρθρο

Association of the Interleukin-6 rs1800795 Polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus in the Population of the Island of Crete, Greece

Marina N. Plataki,^{1,*} Maria I. Zervou,^{2,*} George Samonis,^{1,2} Vasiliki Daraki,³
George N. Goulielmos,^{2,*} and Diamantis P. Kofteridis^{1,*}

Background: Interleukin 6 (IL-6), a proinflammatory cytokine, is elevated in patients with type 2 diabetes (T2D), and is considered an independent predictor of T2D. *IL-6* single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with higher levels of IL-6. This study investigated the role of an *IL-6* gene polymorphism and its possible association to T2D in the genetically homogeneous Greek population of the island of Crete.

Materials and Methods: A total of 144 patients with T2D and 180 controls, all Cretans, selected from the Diabetes Clinic and the Department of Internal Medicine at the University Hospital of Heraklion, Crete, Greece, were genotyped for the *IL-6* -174G>C (rs1800795) SNP by the restriction fragment length polymorphism method.

Results: The G/C genotype and the minor allele C of the *IL-6* rs1800795 SNP were more common in individuals with T2D than controls ($p=0.004$, odds ratio [OR] = 1.98, 95% confidence interval [CI]: 1.24–3.18 and $p=0.011$, OR = 1.59, 95% CI: 1.11–2.26, respectively).

Conclusion: An association of the rs1800795 SNP of the *IL-6* gene with T2D has been detected for the first time in Cretans. The present results, in combination with those presented previously from different ethnic/racial populations, highlight the necessity of comparative studies among different ethnic/racial populations to detect genetic characteristics and associations with T2D.

Keywords: interleukin-6, type-2 diabetes, gene polymorphism, genetic association

Introduction

DIABETES MELLITUS (DM) is a heterogeneous group of metabolic disorders characterized by increased plasma glucose levels. Type 2 diabetes (T2D) is the predominant type of the disease, affecting more than 371 million individuals worldwide (Stumvoll *et al.*, 2005; Ogurtsova *et al.*, 2017). Its prevalence is increasing in industrialized countries throughout the world (Golden *et al.*, 2009). T2D is associated with significant morbidity and mortality due to microvascular and macrovascular disease, and to infectious complications (Geerlings and Hoepelman, 1999; Zimmet *et al.*, 2001; Peleg *et al.*, 2007).

In T2D genetic and environmental factors jointly determine susceptibility. However, mechanisms leading to T2D development have not been fully elucidated so far. Accumulated evidence suggests an association of T2D with a subclinical systemic inflammation, which may be attributed

to a deregulation of the innate immune system (Pickup and Crook, 1998). Individuals progressing to T2D, years before the disease onset, are characterized by low-grade inflammation. Mediators of inflammation, such as tumor necrosis factor α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-18, have been proposed to be involved in the pathogenesis of both forms of DM (Geerlings and Hoepelman, 1999).

IL-6 is a multifunctional cytokine with pro- and anti-inflammatory properties (Chun *et al.*, 2007; Cigni *et al.*, 2014). A big number of epidemiological, genetic, and human *in vivo* and *in vitro* studies have attempted to clarify the putative role of IL-6 in the T2D development. Since inflammation has been proposed to be involved in T2D pathogenesis, activity of IL-6 is believed to be among the events causing the disease. So far, research has demonstrated increased levels of IL-6 in T2D subjects and that insulin may stimulate fat cells to generate IL-6 (Krogh-Madsen *et al.*, 2003). Moreover, researchers began

¹Department of Internal Medicine, University Hospital of Heraklion and Laboratory of Internal Medicine-Host Defense Unit, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.

²Section of Molecular Pathology and Human Genetics, Laboratory of Internal Medicine, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.

³Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, University Hospital of Crete, Heraklion, Crete, Greece.

*These authors contributed equally to this work.

gaining insight how IL-6 is involved in various T2D related conditions such as inflammation, cardiovascular complications, and nerve degeneration (Schamarek *et al.*, 2016; Shirai *et al.*, 2016). A two- to threefold elevation of circulating IL-6 has been observed in T2D (Pradhan *et al.*, 2001), but it still remains unclear whether these levels represent a causative factor of the disease. The results of observational studies remain conflicting; demonstrating either increased (Marques-Vidal *et al.*, 2013) or decreased levels of IL-6 in T2D patients, compared to normal controls (Al-Shukaili *et al.*, 2013).

The *IL-6* gene has been mapped to the p21 location of the short arm of chromosome 7 (Bowcock *et al.*, 1988). The human IL-6 protein contains 212 amino acids with a signal peptide of 27 amino acids and two potential NH₂-linked glycosylation sites with molecular weight ranging from 21 to 28 kDa (Kamimura *et al.*, 2003). Thus far, genetic analysis based on the *IL-6* gene has conferred the identification of new polymorphisms implicated in T2D development. In this framework, several polymorphisms in and close to *IL-6* gene have been found to be associated with T2D risk, such as the common polymorphism rs1800795 (Terry *et al.*, 2000). The *IL-6* -174G/C polymorphism locates in a negative regulatory domain in the *IL-6* promoter (Fishman *et al.*, 1998). Various analyses in cohorts of Native American and Spanish of Caucasian origin (Vozarova *et al.*, 2003), in an Indian (Mukhopadhyaya *et al.*, 2010), a Pakistani (Nadeem *et al.*, 2017), and in a German population (Illig *et al.*, 2004) have shown rs1800795 single nucleotide polymorphism (SNP) to be associated with T2D. Moreover, a meta-analysis of 20,000 participants confirmed this genetical association between rs1800795 SNP and T2D (Huth *et al.*, 2006). Of interest, the same SNP was found to be associated also with T1D (Jahromi *et al.*, 2000).

The *IL-6* -174G/C rs1800795 has been suggested to functionally affect *IL-6* promoter activity (Fishman *et al.*, 1998). Genetic studies in individuals with insulin resistance have shown a high degree of correlation between insulin sensitivity and a particular allele of the rs1800795 associated with higher expression of IL-6. Thus, homozygotes for the “G” allele have increased levels of IL-6, increased circulating insulin, and higher blood glucose than individuals possessing a C/C genotype (Fernandez-Real *et al.*, 2000; Spranger *et al.*, 2003). Moreover, recent studies demonstrated a genetical association between rs1800795 SNP and diabetic nephropathy or cardiovascular disease in T2D patients (Karadeniz *et al.*, 2014; Buraczynska *et al.*, 2016).

The aim of this study was to investigate the influence of allele distribution of *IL-6* -174G/C polymorphism and its association to T2D in the homogeneous population of the island of Crete, Greece.

Materials and Methods

Study population

The study population included 144 Cretan Greek individuals with T2D, taken care of at the Diabetes Outpatient Clinic and the Department of Internal Medicine of the University Hospital of Heraklion, Crete, Greece, and 180 nondiabetic controls. T2D was defined according to established criteria (American Diabetes Association, 2010). Medical records were reviewed for detailed medical history of each patient. Individuals with type 1 diabetes, and other metabolic or endocrinological diseases were excluded from the study, in

addition to individuals taking drugs facilitating secondary DM. The control group included 180 individuals taken care of at the Internal Medicine Outpatient Clinic. All controls had fasting plasma glucose concentration of <6.05 mM (110 mg/dL), no history of DM, and had never received antidiabetic medication. All individuals of the study were unrelated native Cretan Greeks.

The study protocol, complying with the 1964 Helsinki Declaration, was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion and a written informed consent was obtained from each participant.

Analysis of *IL-6* rs1800795 polymorphism

Genomic DNA was isolated from leucocytes by using the commercial kit of INVITROGENE (PureLink[®] Genomic DNA Mini Kit), according to the manufacturer's instructions. Analysis of rs1800795 SNP of *IL-6* was performed by using a restriction fragment length polymorphisms method, as described before (Karadeniz *et al.*, 2014). The amplification was carried out by using the Taq polymerase provided by INVITROGENE. Briefly, the upstream 5'-TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTG T-3' and the downstream 5'-CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG-3' primers, based on the human *IL-6* gene sequence (accession number NG_011640) were used to generate a region of the promoter of *IL-6* gene harboring the polymorphic site under study. A hot start was used with initial heating at 94°C for 5 min and then 35 cycles of denaturing (at 94°C for 1 min), annealing (at 55°C for 1 min and 30 s), and chain extension (at 72°C for 1 min), followed with a final extension step at 72°C for 10 min. Polymerase chain reaction (PCR) products were analyzed through electrophoresis on 2.5% agarose gel and ethidium bromide fluorescence in reference to a molecular weight marker. The genotyping of the samples was performed by digesting the 198-bp PCR product with *Sfa*NI restriction enzyme (New England BioLabs, Beverly, MA), which digests the DNA that is amplified from the allele G, thus generating two fragments of 140 and 58-bp. The presence of allele “C” results in the absence of the *Sfa*NI restriction site. Genotypes were scored blindly and analysis of all ambiguous samples was repeated. About 60% of samples were amplified twice to check the accuracy of the results upon the completion of the initial genotyping process.

Statistical analysis

The χ^2 test or Fisher's exact test were used to examine differences of genotype and allele frequencies between patients and controls, where there was a call rate >98%. A two tailed *p* value less than 0.05 was defined as statistically significant. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated based on 2×2 contingency tables, if appropriate. The *IL-6* gene variants under investigation were evaluated for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) by comparing observed and expected genotype frequencies by means of χ^2 test or Fisher's exact test (by using the program named “Calculate”; Copyright TRG, SR, INMD, 2008).

Results

A total of 144 T2D patients (53 male, 91 female, mean age 68.3±9.9) and 180 control individuals (82 male, 98 female, mean age 74.9±11.7) were enrolled. Their demographic,

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS AND LABORATORY FINDINGS OF PATIENTS WITH T2D AND CONTROL INDIVIDUALS

Characteristics	T2D patients (N=144)	Controls (N=180)	p
Age (years)	68.3±9.9	74.9±11.7	<0.0001
Sex			
Male	53 (36.8%)	82 (45.6%)	0.1124
Disease duration (years)	10.8±8.4	NA	
Treatment		NA	
Diet and exercise	14 (9.7%)		
Insulin	13 (9%)		
Oral drugs	99 (68.8%)		
Insulin+oral drugs	18 (12.5%)		
Complications of diabetes		NA	
Cardiovascular disease	42 (29.2%)		
Peripheral vascular disease	20 (13.9%)		
Retinopathy	19 (13.2%)		
Nephropathy	14 (9.7%)		
Neuropathy	12 (8.3%)		
Concomitant underlying diseases			
Hypertension	106 (73.6%)	116 (64.4%)	0.0775
Hyperlipidemia	82 (56.9%)	51 (28.3%)	<0.0001
Obesity	1 (0.7%)	0 (0%)	NA
Current smoking	10 (6.9%)	7 (3.9%)	0.2203
HbA1c	7.8±1.9	NA	

Significance level: $p < 0.05$. p -values were calculated by the chi-square test or the t -test.

HbA1c, glycatedhemoglobin; NA, not available; T2D, type 2 diabetes mellitus.

clinical, and laboratory characteristics are presented in Table 1. All individuals were evaluated for the *IL-6* gene polymorphism presence. Heterozygotes (G/C) were observed more frequently in T2D patients than in nondiabetic controls (OR = 1.98, 95% CI: 1.24–3.18; $p = 0.004$). Moreover, the minor allele C of *IL-6* SNP under investigation was found to be more frequent in T2D patients (OR = 1.59, 95% CI: 1.11–2.26; $p = 0.011$). The frequency of the homozygous C/C genotype did not show any statistically significant difference between diabetics and controls (OR = 1.67, 95% CI: 0.71–3.94; $p = 0.26$). The distribution of *IL-6* rs1800795 SNP genotypes and alleles among T2D patients and controls is presented in Table 2. Verification of the results has been made by testing for the second time 60% of the diabetics' and controls' samples and the replicated genotyping data were reproducible at a rate

TABLE 2. GENOTYPE AND ALLELE FREQUENCY OF THE *IL-6* -174G/C POLYMORPHISM AMONG CASES AND CONTROLS

Genotypes	T2D N=144	Controls N=180	p	OR (95% CI)
rs1800795				
G/G	68 (47.22%)	114 (63.33%)		
G/C	64 (44.44%)	54 (30.00%)	0.004	1.98 (1.24–3.18)
C/C	12 (8.34%)	12 (6.67%)	0.26	1.67 (0.71–3.94)
Alleles	N=288	N=360		
G	200 (69.44%)	282 (78.33%)		
C	88 (30.56%)	78 (21.67%)	0.011	1.59 (1.11–2.26)

Significance level: $p < 0.05$; The χ^2 test or Fisher's exact test was used to examine differences of genotype and allele frequencies.

CI, confidence interval; IL-6, interleukin 6; OR, odds ratio.

of 100%. The distribution of genotypes in the T2D and the control groups was found to be under HWE ($p > 0.01$).

Discussion

This study confirms, for first time, that the rs1800795 SNP of *IL-6* gene is associated with increased risk for T2D in the genetically homogeneous population of the island of Crete. The genetic association of *IL-6* and T2D is not fully understood, given that several studies have reported contradictory results. Hence, although the *IL-6* SNP has been found to be associated with T2D in most human studies, in a large one, performed in Denmark, no association between this SNP and T2D was found (Hamid *et al.*, 2005). Similarly, no significant differences have been detected in the distribution of genotypes and alleles between T2D patients and control individuals in a large-scale meta-analysis (Qi *et al.*, 2006). Allele "C" of the *IL-6* -174G/C SNP has been reported to be associated with a decreased risk of T2D in U.S. Pima Indians and Caucasians Spanish (Vozarova *et al.*, 2003), and in Germans (Illig *et al.*, 2004). Furthermore, a meta-analysis of 20,000 participants revealed that the "C" allele was associated with a slight reduction in diabetes risk (OR = 0.91 compared to GG subjects) (Huth *et al.*, 2006). In contrast, a different study in normoglycemic individuals found lower rates of whole-body glucose uptake in homozygous for the C allele cases (Kubaszek *et al.*, 2003). Likewise, allele "C" has been found to be associated with increased risk for T2D in Cretans of the present study. The frequency of "C" allele appears to be rarer in African Americans and Asian Americans when compared with Caucasians (Kurzawski *et al.*, 2005). The allelic and genotypic data of controls from Greece are similar to those observed in German and Italian (Caucasian) populations (Nieters *et al.*, 2001; Poli *et al.*, 2002).

Many proinflammatory cytokines, including IL-6, have been shown, so far, to play a central role in the inflammatory reaction and to increase the T2D risk (Hu *et al.*, 2004). IL-6 plasma levels have been found to be significantly increased in T2D patients compared with normal individuals (Pradhan *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2006), emphasizing the role of this cytokine in the pathophysiology of T2D and its complications (Pickup and Crook, 1998; Buraczynska *et al.*, 2016). As a consequence, genetic polymorphisms of the *IL-6* gene may play a substantial role in the development of the disease. Previous studies have shown that allele "G" of rs1800795 SNP correlates with higher IL-6 production and IL-6 levels were found to be higher in normal GC or GG individuals (Fishman *et al.*, 1998). However, the existing information keeps definitely obscure the real function of "G" and "C" alleles regarding T2D and this issue needs to be clarified further.

There are many examples in the literature, suggesting that relevant analyses in different populations of patients with complex diseases result in controversial data, due to either gene–environment/gene–gene interactions or their different ethnic/racial origin and their overall genetic makeup. Previous studies evaluating Cretans have demonstrated such opposing results, regarding the genetic association with diseases or the effect of particular alleles (Eliopoulos *et al.*, 2011; Dimopoulou *et al.*, 2013; Myrthianou *et al.*, 2017). From Genome-Wide Association Studies (GWAS) conducted so far, *IL-6* was not identified to be associated with T2D (Qi *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2007). Notably, several studies focusing on

Cretans have shown association of some gene polymorphisms with various diseases, although previous large GWAS had not detected such association (Bertsias *et al.*, 2009; Zervou *et al.*, 2009; Vazgiourakis *et al.*, 2011).

An advantage of this study was the careful selection of genetically and ethnically homogeneous patients and controls from a geographically well-defined area such as the island of Crete. A weakness of the study is the relatively small number of samples leading to a relatively low statistical power, and the lack of a replication cohort. However, inclusion of additional individuals from mainland Greece or immigrants that could reduce the homogeneity of the sample has been avoided.

In conclusion, an association of rs1800795 SNP with increased risk for T2D was detected in Cretans. The results of the study should be viewed as a basis for further comparative studies in different populations, in an attempt to define the genetic origins of T2D and the effects of specific risk alleles on the disease's pathogenesis.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, *et al.* (2013) Analysis of inflammatory mediators in type 2 diabetes patients. *Int J Endocrinol* 2013:976810.
- American Diabetes Association (2010) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33:S62–S69.
- Bertsias GK, Nakou M, Choulaki C, *et al.* (2009) Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 60:207–218.
- Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM, *et al.* (1988) The human “interferon beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6” gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics* 3:8–16.
- Buraczynska M, Zukowski P, Drop B, *et al.* (2016) Effect of G(-174)C polymorphism in interleukin-6 gene on cardiovascular disease in type 2 diabetes patients. *Cytokine* 79:7–11.
- Chun HY, Chung JW, Kim HA, *et al.* (2007) Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 27:461–466.
- Cigni A, Pileri PV, Faedda R, *et al.* (2014) Interleukin 1, interleukin 6, interleukin 10, and tumor necrosis factor α in active and quiescent systemic lupus erythematosus. *J Investig Med* 62:825–829.
- Dimopoulou DG, Zervou MI, Trachana M, *et al.* (2013). Investigation of juvenile idiopathic arthritis susceptibility loci: results from a Greek population. *Hum Immunol* 74:1194–1810.
- Eliopoulos E, Zervou MI, Andreou A, *et al.* (2011) Association of the PTPN22 R620 W polymorphism with increased risk for SLE in the genetic homogeneous population of Crete. *Lupus* 10:501–506.
- Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, *et al.* (2000) Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes* 49:517–520.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, *et al.* (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369–1376.
- Geerlings SE, Hoepelman AIM. (1999) Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol* 26:259–265.
- Golden SH, Robinson KA, Saldanha I, *et al.* (2009) Clinical review: prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1853–1878.
- Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, *et al.* (2005) Variations of the interleukin-6 promoter associates with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia* 48:251–260.
- Hu FB, Meigs JB, Li TY, *et al.* (2004) Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes* 53:693–700.
- Huth C, Heid IM, Vollmert C, *et al.* (2006) IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes* 55:2915–2921.
- Illig T, Bongardt F, Schopfer A, *et al.* (2004) Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5053–5058.
- Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG (2000) A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *J Interferon Cytokine Res* 20:885–888.
- Kamimura D, Ishihara K, Hirano T (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149:1–38.
- Karadeniz M, Erdogan M, Berdeli A, *et al.* (2014) Association of interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphism with increased risk of type 2 diabetes mellitus patients with diabetic nephropathy in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers* 18:62.
- Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Keller P, *et al.* (2003) Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor- α gene expression in human subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E234–E238.
- Kubaszek A, Pihlajamäki J, Punnonen K, *et al.* (2003) The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity. *Diabetes* 52:558–561.
- Kurzawski M, Pawlik A, Czerny B, *et al.* (2005) Frequencies of the common promoter polymorphisms in cytokine genes in a Polish population. *Int J Immunogenet* 32:285–291.
- Marques-Vidal P, Bastardot F, von Kaanel R, *et al.* (2013) Association between circulating cytokine levels, diabetes and insulin resistance in a population-based sample. *Clin Endocrinol* 78:232–241.
- Mukhopadhyaya PN, Acharya A, Chavan Y, *et al.* (2010) Metagenomic study of single-nucleotide polymorphism within candidate genes associated with type 2 diabetes in an Indian population. *Genet Mol Res* 9:2060–2068.
- Myrthianou E, Zervou MI, Budu-Aggrey A, *et al.* (2017) Investigation of the genetic overlap between Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis in a Greek population. *Scandinavian J Rheumatol* 46:180–186.
- Nadeem A, Mumtaz S, Naveed AK, *et al.* (2017) Association of IL-6 C-174G (rs 1800795) single nucleotide polymorphism with type 2 diabetes mellitus in Pakistani population. *J Pak Med Assoc* 67:428–433.
- Nieters A, Brems S, Becker N. (2001) Cross-sectional study of cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of German population. *Hum Genet* 108:241–248.
- Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y *et al.* (2017) IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract* 128:40–50.

- Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, *et al.* (2007) Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 23:3–13.
- Pickup JC, Crook MA (1998) Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41:1241–1248.
- Poli F, Nocco A, Berra S, *et al.* (2002) Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. *Eur J Immunogenet* 29:237–240.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, *et al.* (2001) C-Reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327–334.
- Qi L, van Dam RM, Meigs JB, *et al.* (2006) Genetic variation in *IL6* gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case—control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet* 15:1914–1920.
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, *et al.* (2007) Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316:1331–1336.
- Schamarek I, Herder C, Nowotny B, *et al.* (2016) Adiponectin, markers of subclinical inflammation and nerve conduction in individuals with recently diagnosed type 1 and type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 174:433–443.
- Shirai T, Nazarewicz RR, Wallis BB, *et al.* (2016) The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. *J Exp Med* 213:337–354.
- Spranger J, Kroke A, Möhlig M, *et al.* (2003) Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812–817.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333–1346.
- Terry CF, Loukaci V, Green FR (2000) Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 275:18138–18144.
- Vaziourakis VM, Zervou MI, Choulaki C, *et al.* (2011) A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 70:2184.
- Vozarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, *et al.* (2003) The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 112:409–413.
- Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, *et al.* (2009) STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece. *Hum Immunol* 70:738–741.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782–787.

Address correspondence to:
Diamantis P. Kofteridis, MD
Department of Internal Medicine
University Hospital of Heraklion and Laboratory
of Internal Medicine-Host Defense Unit
School of Medicine
University of Crete, Heraklion
P.O. Box 1352
Heraklion 71110
Crete
Greece

E-mail: kofterid@med.uoc.gr