Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά 31, 4: 224-231, 2018

Πρωτότυπη Εργασία

Ο ρόλος του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1: πρώτη καταγραφή σε παιδιά και εφήβους ελληνικής καταγωγής

Σ. Γκίζα[1]
Α. Γούλας[2]
Ε. Γκμπάντι[2]
Σ. Ευφραιμίδου[3]
Ε. Παπαδοπούλου-Αλατάκη[1]
Μ. Εμποριάδου[1]
Α. Γαλλή-Τσινοπούλου[1]

[1] Δ΄ Παιδιατρική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ, ΓΝ Θεσσαλονίκης Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη
[2] Α΄ Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη
[3] Αιματολογικό Εργαστήριο, ΓΝ Θεσσαλονίκης Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη

Περίληψη

Εισαγωγή-Σκοπός: Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔ1) αποτελεί αυτοάνοσο πολυπαραγοντικό νόσημα. Το PTPN22 (Protein Tyrosine Phosphatase Non receptor type 22) γονίδιο κωδικοποιεί τη λεμφοειδική φωσφατάση Lyp, αναστολέα της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων. Ο PTPN22 C1858T πολυμορφισμός συσχετίστηκε με τον ΣΔ1 σε πληθυσμούς της λευκής φυλής. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση για πρώτη φορά της συσχέτισης του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τον ΣΔ1 σε ελληνικό πληθυσμό.

Ασθενείς και Μέθοδοι: Μελετήσαμε 130 παιδιά και εφήβους με ΣΔ1 και 135 υγιή άτομα ελληνικής καταγωγής. Ο πολυμορφισμός προσδιορίστηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση μήκους θραύσματος από ένζυμα περιορισμού.

Αποτελέσματα: Οι C1858T και T1858T γονότυποι καθώς και το 1858T αλληλόμορφο εντοπίστηκαν συχνότερα στους ασθενείς (10,8% και 5,8%, αντίστοιχα) έναντι των υγιών ατόμων (5,9% και 3,0%, αντίστοιχα) αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το φύλο, την ηλικία διάγνωσης, τη σοβαρότητα αρχικής εκδήλωσης, το ατομικό ιστορικό θυρεοειδίτιδας Hashimoto ή το οικογενειακό ιστορικό ΣΔ1.

Συμπεράσματα: Η αυξημένη συχνότητα του 1858T αλληλόμορφου στους ασθενείς συγκριτικά με μη πάσχοντες συμφωνεί με τα αποτελέσματα παρόμοιων μελετών σε άλλους πληθυσμούς. Η αδυναμία ανίχνευσης στατιστικά σημαντικής διαφοράς οφείλεται ενδεχομένως στη μικρή συχνότητα του ελάσσονος αλληλόμορφου στον ελληνικό πληθυσμό, γεγονός που αυξάνει τις απαιτήσεις για μεγαλύτερο δείγμα.

Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔ1) χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των ινσουλινοπαραγωγών β-κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος από τα CD8+ κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα με τη συμβολή των CD4+ βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων, η οποία οδηγεί σε μόνιμη διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης. Θεωρείται πολυπαραγοντική νόσος, καθώς απαιτείται η αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για την πυροδότηση της αυτοανοσίας[1]. Αν και η ακριβής παθογένεια του ΣΔ1 δεν έχει διαλευκανθεί, έχουν αναγνωριστεί αρκετές γονιδιακές θέσεις οι οποίες εμπλέκονται στην εκδήλωση της νόσου. Μεταξύ αυτών πρωτεύοντα ρόλο διαδραματίζουν τα γονίδια των αντι-

γόνων των ανθρώπινων λευκών αιμοσφαιρίων (Human Leukocyte Antigen, HLA) τάξης ΙΙ, της ινσουλίνης (Insulin, INS), του αντιγόνου-4 του κυτταροτοξικού Τ λεμφοκυττάρου (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4, CTLA-4) και του μη υποδοχέα της πρωτεϊνικής τυροσινικής φωσφατάσης 22 (Protein Tyrosine Phosphatase Non receptor type 22, PTPN22)[2].

Το PTPN22 γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1p13.3-p13.1 και κωδικοποιεί τη λεμφοειδική τυροσινική φωσφατάση (lymphoid-specific phosphatase, Lyp), σημαντικό αναστολέα της ενεργοποίησης και του πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων. Η αρνητική ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης της Lyp με την C-τελική Src τυροσινική κινάση (C-terminal Src tyrosine kinase, Csk), η οποία καταστέλλει τη σηματοδότηση του υποδοχέα των Τ λεμφοκυττάρων (T cell receptor, TCR)[3]. Ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP) στη θέση 1858 (rs2476601) της κωδικοποιητικής ακολουθίας του PTPN22 γονιδίου, ο οποίος οδηγεί σε αντικατάσταση κυτοσίνης (cytosine, C) από θυμίνη (thymine, T), έχει ως αποτέλεσμα μετάλλαξη της αργινίνης (CGG) σε τρυπτοφάνη (TGG) στο κωδικόνιο 620 της Lyp. Η μετάλλαξη διαταράσσει τη Lyp-Csk αλληλεπίδραση, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη TCR σηματοδότηση και αδόκιμη παρατεταμένη ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, η οποία επάγει και συντηρεί την αυτοανοσία. Αν και είναι γνωστό ότι η Lyp αποτελεί αναστολέα του TCR σήματος, ο ρυθμιστικός μηχανισμός στον οποίο υπόκειται διερευνάται. Επομένως, η μελέτη του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού αποκτά τεράστιο κλινικό και θεραπευτικό ενδιαφέρον, καθώς η Lyp θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο παρέμβασης έναντι της πυροδοτούμενης αυτοανοσίας. Σήμερα, οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται σε παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν την κυτταρική ενεργοποίηση και πιο συγκεκριμένα την αποφωσφορυλίωση των εξαρτώμενων από την ενεργοποίηση του TCR κινασών, η οποία προάγεται από τη Lyp[4].

Πρώτη φορά οι Bottini και συν.[5] ανέφεραν ότι το 1858T αλληλόμορφο παρατηρήθηκε πιο συχνά σε ασθενείς με ΣΔ1 συγκριτικά με υγιή άτομα από Βόρεια Αμερική και Σαρδηνία. Έκτοτε, μελέτες έχουν διερευνήσει τη συσχέτιση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τον ΣΔ1 σε διάφορες εθνότητες. Το 1858T αλληλόμορφο έχει αναφερθεί να συσχετίζεται με τον ΣΔ1 σε ποικίλους πληθυσμούς[6-28]. Αυτό το αλληλόμορφο έχει συσχετιστεί με τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ)[29], τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ)[30], την ψωρίαση[31] και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα[32-36].

Στην Ελλάδα έχουν διενεργηθεί δύο μελέτες σε πληθυσμούς από την Κρήτη[37-38]. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η συχνότητα του ελάσσονος αλληλόμορφου διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών και ότι οι συνεχιζόμενες μελέτες είναι σημαντικές για να επιβεβαιώσουν προηγούμενες συσχετίσεις, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθεί ο ρόλος του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού σε παιδιά και εφήβους ελληνικής καταγωγής με ΣΔ1.

Ασθενείς και μέθοδοι

Διενεργήθηκε μελέτη ασθενών-ομάδας ελέγχου σε πληθυσμό ελληνικής καταγωγής. Μελετήθηκαν 130 παιδιά και έφηβοι (73 άρρενα, 57 θήλεα) με ΣΔ1 (μέση ηλικία εισόδου στη μελέτη 11,47±3,72 έτη, εύρος 0,83-19,21) και 135 υγιή άτομα (72 άρρενα, 63 θήλεα) χωρίς οικογενειακό ιστορικό ΣΔ1. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η γενετική ετερογένεια, συμπεριλήφθηκαν άτομα με ιστορικό τουλάχιστον τριών γενεών ελληνικής καταγωγής, αλλά μη συγγενή μεταξύ τους. Οι ασθενείς παρακολουθούνταν στο παιδοδιαβητολογικό εξωτερικό ιατρείο της Δ΄ Παιδιατρικής Κλινικής, Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ) στο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης (ΓΝΘ) Παπαγεωργίου. Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωστεί με ΣΔ1 πριν την ηλικία των 15 ετών και ήταν ινσουλινοεξαρτώμενοι. Οι παράμετροι οι οποίες συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση ήταν οι ακόλουθες: φύλο, ηλικία κατά την είσοδο στη μελέτη, ηλικία διάγνωσης, βαρύτητα της νόσου κατά τη διάγνωση (παρουσία ή όχι κετοξέωσης), ατομικό ιστορικό θυρεοειδίτιδας Hashimoto και οικογενειακό ιστορικό ΣΔ1 σε έναν τουλάχιστον συγγενή πρώτου βαθμού. Η ομάδα ελέγχου περιελάμβανε παιδιά και εφήβους ηλικίας μεγαλύτερης των 10 ετών, προσωπικό του ΓΝΘ Παπαγεωργίου και φοιτητές του Τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ. Πριν από την είσοδο στη μελέτη, ζητήθηκε η μετά από ενημέρωση συγκατάθεση από τους ενήλικες συμμετέχοντες και τους γονείς ή κηδεμόνες για άτομα ηλικίας μικρότερης των 18 ετών. Το ερευνητικό πρωτόκολλο δηλώθηκε στην υπηρεσία ClinicalTrials.gov και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του

Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του ΑΠΘ. Η μελέτη διενεργήθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια της Διακήρυξης του Ελσίνκι.

Η μέθοδος περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: α) απομόνωση γονιδιωματικού δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος (Deoxyribonucleic Acid, DNA), β) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), γ) επώαση των προϊόντων PCR με ένζυμα περιορισμού και δ) ηλεκτροφόρηση. Συλλέχθηκαν 2 ml ολικού περιφερικού αίματος σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με αντιπηκτικό αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylene-Diamine-Tetra-acetic-Acid, EDTA). Το DNA απομονώθηκε με τη χρήση του QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc, CA, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Ενισχύθηκε ένα τμήμα του PTPN22 γονιδίου το οποίο περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό στη θέση 1858 με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές, PTPN22 F 5′-ACTGATAATGTTGCTTCAACG-G-3′ και PTPN22 R 5′-TCACCAGCTTCCTC-AACCAC-3′. Τα προϊόντα της PCR επωάστηκαν με το ένζυμο περιορισμού RsaI (Fermentas, Germany) στους 37°C για τουλάχιστον 6 ώρες. Το ένζυμο διασπά το C αλληλόμορφο σε δύο κομμάτια 172 ζευγών βάσεων (base pair, bp) και 46bp, ενώ το T αλληλόμορφο παραμένει ανέπαφο (218bp). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 2,3% με προσθήκη βρωμιούχου εθίδιου για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 19. Για την ισορροπία Hardy-Weinberg συγκρίθηκαν οι αναμενόμενες και οι παρατηρούμενες συχνότητες γονότυπων και αλληλόμορφων στις ομάδες ασθενών και ελέγχου σε 2×3 και 2×2 πίνακες, αντίστοιχα. Οι διαφορές συχνοτήτων γονότυπων και αλληλόμορφων μεταξύ ομάδων ασθενών και ελέγχου και μεταξύ υποομάδων των ασθενών με βάση τις ποιοτικές μεταβλητές αναλύθηκαν με τη δοκιμασία x^2 ή τη δοκιμασία Fisher. Για τον έλεγχο της κανονικότητας των ποσοτικών μεταβλητών εφαρμόστηκε η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Για τη σύγκριση των μέσων όρων της κανονικά κατανεμημένης ηλικίας διάγνωσης ανάλογα με τον γονότυπο εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA). Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $p<0,05$.

Αποτελέσματα

Στην παρούσα μελέτη η κατανομή των γονότυπων στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από την προβλεπόμενη από την ισορροπία Hardy-Weinberg (p=0,605 και p=0,930, αντίστοιχα). Το 1858T αλληλόμορφο εντοπίστηκε πιο συχνά στους ασθενείς (5,8%) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (3,0%) αλλά σε στατιστικά μη σημαντικό επίπεδο [p=0,137, αναλογία πιθανοτήτων, odds ratio, (OR)=2,00, και διάστημα εμπιστοσύνης, confidence interval (CI)=0,83-4,81]. Ο T1858T γονότυπος παρουσίαζε μειωμένη συχνότητα στους ασθενείς (0,8%) και δεν ανιχνεύτηκε στην ομάδα ελέγχου. Ο C1858T γονότυπος ήταν σαφώς πιο συχνός στους ασθενείς (10,0%) συγκριτικά με τα υγιή άτομα (4,3%) αλλά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Εξαιτίας της σπανιότητας του 1858T αλληλόμορφου, οι C1858T και T1858T γονότυποι ομαδοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση. Οι C1858T και T1858T γονότυποι εντοπίστηκαν συχνότερα στους ασθενείς (10,9%) συγκριτικά με τα υγιή άτομα (5,9%) αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Η κατανομή του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού στους ασθενείς με ΣΔ1 και στην ομάδα ελέγχου.

	Ασθενείς (N=130)	**Ομάδα ελέγχου (N=135)**
Γονότυπος	Συχνότητα (%)	
CC	116 (89,2)	127 (94,1)
CT	13 (10,0)	8 (5,9)
TT	1 (0,8)	0
p	0,273	
CT+TT	14 (10,8)	8 (5,9)
p	0,184	
Αλληλόμορφο		
C	245 (94,2)	262 (97,0)
T	15 (5,8)	8 (3,0)
p	0,137	
OR*	2.00 (CI** 0,83-4,81)	

*OR, odds ratio, αναλογία πιθανοτήτων
**CI, confidence interval, διάστημα εμπιστοσύνης

Καταγράφηκε τάση υψηλότερης συχνότητας των C1858T και T1858T γονότυπων στους άρρενες. Η συχνότητα των C1858T και T1858T γονότυπων στους ασθενείς ήταν 12,3% στα άρρενα έναντι 6,9% στα θήλεα άτομα, ενώ στην ομάδα ελέγχου 8,8% έναντι 4,8%, αντίστοιχα (Πίνακας 2). Ωστόσο, η κατανομή των C1858T και T1858T γονότυ-

Πίνακας 2. Η κατανομή του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού στους ασθενείς με ΣΔ1 και στην ομάδα ελέγχου ανάλογα με το φύλο.

	Άρρενα		**Θήλεα**	
	Ασθενείς (N=73)	**Ομάδα ελέγχου (N=72)**	**Ασθενείς (N=57)**	**Ομάδα ελέγχου (N=63)**
Γονότυπος	Συχνότητα (%)	Συχνότητα (%)	Συχνότητα (%)	Συχνότητα (%)
CC	64 (87,7)	67 (93,1)	52 (91,2)	60 (95,2)
CT	8 (11,0)	5 (6,9)	5 (8,8)	3 (4,8)
TT	1 (1,4)	0	0	0
p	0,416		0,475	
CT+TT	9 (12,3)	5 (6,9)	5 (8,8)	3 (4,8)
p	0,400		0,475	

πων, οι οποίοι φέρουν το προδιαθεσικό αλληλόμορφο, δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ αρρένων και θηλέων τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και κατά τη σύγκριση των ομάδων ασθενών και ελέγχου (Πίνακας 3).

Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν 7,35± 3,73 έτη. Η στατιστική ανάλυση μετά ομαδοποίηση των ασθενών με βάση την ηλικία διάγνωσης ανέδειξε ότι ο PTPN22 C1858T πολυμορφισμός είχε την ίδια επίδραση στους ασθενείς με πρώιμη εκδήλωση (ηλικία διάγνωσης ≤10 έτη) καθώς και σε εκείνους με όψιμη εκδήλωση (ηλικία διάγνωσης >10 έτη) του ΣΔ1. Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν παρόμοια στους ασθενείς με τους C1858T και T1858T γονότυπους καθώς και σε εκείνους με τον C1858C γονότυπο (7,68 και 7,31έτη αντίστοιχα, p=0,723). Επιπλέον, υπήρχε μία τάση για τους έφηβους φορείς του 1858T αλληλόμορφου να είναι πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση ΣΔ1 συγκριτικά με τους άνηβους (p=0,361).

Πίνακας 3. Η κατανομή του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού στους ασθενείς με ΣΔ1 σε σχέση με τις υπό ανάλυση παραμέτρους.

	Γονότυπος			
	CC	**CT**	**TT**	**CT+TT**
	Συχνότητα (%)			
Φύλο (άρρεν/θήλυ)	64/52 (87,7/91,2)	8/5 (11,0/8,8)	1/0 (1,4/0)	9/5 (12,3/8,8)
p	0,613		0,580	
Ηλικία διάγνωσης (≤10/>10 έτη)	79/37 (89,8/88,1)	8/5 (9,1/11,9)	1/0 (1,1/0)	9/5 (10,2/11,9)
p	0,701		0,769	
Στάδιο Tanner διάγνωσης (I/II-V)	90/26 (90,9/83,9)	8/5 (8,1/16,1)	1/0 (1,0/0)	9/5 (9,1/16,1)
p	0,373		0,320	
Κετοξέωση (+/-)	92/24 (88,5/92,3)	11/2 (10,6/7,7)	1/0 (1,0/0)	12/2 (11,5/7,7)
p	0,796		0,735	
Θυρεοειδίτιδα Hashimoto (+/-)	23/93 (85,2/90,3)	3/10 (11,1/9,7)	1/0 (3,7/0)	4/10 (14,8/9,7)
p	0,141		0,488	
Οικογενειακό ιστορικό ΣΔ1 (+/-)	18/98 (94,78/88,3)	1/12 (5,3/10,8)	0/1 (0/0,9)	1/13 (5,3/11.7)
p	0,689		0,692	

Διερευνώντας την πιθανή συσχέτιση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με πιο σοβαρή εκδήλωση κατά τη διάγνωση, όπως αυτή εκτιμήθηκε με την παρουσία ή όχι κετοξέωσης, οι ασθενείς με τους C1858T και T1858T γονότυπους παρουσίαζαν συχνότερα κετοξέωση (11,5% έναντι 7,7%) αλλά όχι σε στατιστικά υψηλότερο ποσοστό.

Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού στην αυτοανοσία. Οι φορείς των C1858T και T1858T γονότυπων παρουσίαζαν οριακά αυξημένη συχνότητα θυρεοειδίτιδας Hashimoto συγκριτικά με τους C1858C ομοζυγώτες (14,8% έναντι 9,7%). Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με το θετικό οικογενειακό ιστορικό ΣΔ1. Η κατανομή του PTPN22 πολυμορφισμού στους ασθενείς ανάλογα με τις υπό ανάλυση παραμέτρους φαίνεται στον Πίνακα 3.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη ασθενών-ομάδας ελέγχου διερευνήθηκε για πρώτη φορά ο ρόλος του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού σε παιδιά και εφήβους ελληνικής καταγωγής με ΣΔ1. Αν και επιβεβαιώθηκε σαφώς η αυξημένη συχνότητα του 1858T αλληλόμορφου στους ασθενείς με ΣΔ1, το αποτέλεσμα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Ωστόσο η OR του 1858T έναντι του 1858C αλληλόμορφου στους ασθενείς συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ήταν παρόμοια με αυτή άλλων μελετών[39].

Η πρώτη αναφορά συσχέτισης του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τον ΣΔ1 από τους Bottini και συν.[5] επιβεβαιώθηκε από αρκετές μελέτες συσχέτισης[5-26]. Το εύρημα αυτό ενισχύθηκε από πρόσφατα δημοσιευμένη μεταανάλυση[39], η οποία προτείνει ότι ο PTPN22 C1858T πολυμορφισμός μπορεί να συμβάλει στην προδιάθεση του ΣΔ1 ειδι-

κά στους πληθυσμούς της Ευρώπης και της Αμερικής. Ωστόσο, οι ερευνητές προτείνουν ότι υπάρχει ακόμη ανάγκη για περισσότερες μελέτες οι οποίες να υποστηρίζουν αυτά τα αποτελέσματα[39-44].

Οι μελέτες στους διάφορους πληθυσμούς αποκάλυψαν έμμεσα ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού, τη μεγάλη γεωγραφική διακύμανση της συχνότητας του 1858T αλληλόμορφου. Υπάρχει τάση αύξησης της συχνότητας του 1858T αλληλόμορφου σε υγιείς πληθυσμούς της λευκής φυλής στην Ευρώπη (από τον Νότο προς τον Βορρά). Πιο συγκεκριμένα, απαντά σε συχνότητα 2% στην Ιταλία, 6% στην Ισπανία, 12% στη Σουηδία και 15,5% στη Φινλανδία. Ωστόσο, φαίνεται να απουσιάζει σχεδόν από πληθυσμούς της Ασίας και της Αφρικής[40].

Στην Ελλάδα η συχνότητα του 1858T αλληλόμορφου βρέθηκε χαμηλή (2,69-2,91%) σε τρεις ανεξάρτητες ομάδες υγιών ατόμων κρητικής καταγωγής[37,38]. Ανάλογη συχνότητα (3,0%) βρέθηκε και στην ομάδα ελέγχου του υπό μελέτη πληθυσμού. Ως εκ τούτου, κύριο μέτρο σύγκρισης για το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης είναι ορθότερο να αποτελούν οι μέχρι σήμερα δημοσιευμένες μελέτες οι οποίες αφορούν σε πληθυσμούς της Νότιας Ευρώπης όπου η συχνότητα του 1858T αλληλόμορφου στην ομάδα ελέγχου είναι σχετικά χαμηλή[5-7,14]. Η χαμηλή συχνότητα του 1858T αλληλόμορφου στην παρούσα μελέτη μπορεί να είναι μία από τις αιτίες μη ανάδειξης στατιστικά σημαντικής συσχέτισης του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τον ΣΔ1, καθώς περιορίζεται η ισχύς της μελέτης. Η χαμηλή συχνότητα του ελάσσονος αλληλόμορφου υποστηρίζει την ανάγκη μεγαλύτερου δείγματος.

Παράλληλα, γίνεται περισσότερο κατανοητός ο σκοπός της παρούσας μελέτης. Ως αποτέλεσμα, απαιτείται η δημοσίευση πληροφοριών σχετικά με τον ρόλο του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού σε άτομα ελληνικής καταγωγής με ΣΔ1. Μέχρι στιγμής, πρόδρομα μη δημοσιευμένα αποτελέσματα από μελέτη συσχέτισης σε δύο πληθυσμούς ασθενών ελληνικής καταγωγής με ΣΔ1 δεν επιβεβαίωσαν την καλά τεκμηριωμένη συσχέτιση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τον ΣΔ1[38] σε απόλυτη συμφωνία με την παρούσα μελέτη. Τα αποτελέσματά μας είναι τα πρώτα δημοσιευμένα και, αν και υπονοούν μία ενδεχόμενη συσχέτιση, υποδεικνύουν την ανάγκη μεγαλύτερου δείγματος. Ωστόσο, η μη ανάδειξη συσχέτισης του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τον ΣΔ1 σε παιδιά και εφήβους ελληνικής καταγωγής διατηρεί την ερευνητική αξία της, λαμβάνοντας υπόψη τη γεωγραφική διακύμανση της συχνότητας του 1858T αλληλόμορφου, τη γενετική ποικιλότητα των ατόμων και την πολυπαραγοντική φύση του ΣΔ1. Παράλληλα, κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης δεν θα πρέπει να αγνοούμε το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των πληθυσμών σε ό,τι αφορά τα HLA τάξης II γονίδια καθώς και την ποικίλη επίδραση γνωστών ή άγνωστων μέχρι στιγμής προδιαθεσικών περιβαλλοντικών παραγόντων.

Αν και ο ΣΔ1 δεν ανήκει στα αυτοάνοσα νοσήματα με φυλετική διαφοροποίηση σε ό,τι αφορά τη συχνότητα, βρέθηκε μία τάση αυξημένης συχνότητας των C1858T και T1858T γονότυπων στα άρρενα άτομα. Η μη ανάδειξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με το φύλο συμφωνεί με την πλειοψηφία των μελετών[7,12,13,18,25,27]. Αναφορικά με τη συσχέτιση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τον ΣΔ1, ορισμένες μελέτες έχουν προτείνει φυλετική διαφοροποίηση υπέρ των θηλέων[8,10,15,16] και μόνο μία μελέτη υπέρ των αρρένων[18]. Αν και λίγες μελέτες αποκάλυψαν μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με το φύλο, μία πρόσφατα δημοσιευμένη μεταανάλυση προτείνει ότι οι άρρενες φορείς του 1858T αλληλόμορφου ήταν πιο επιρρεπείς στον ΣΔ1 από τα θήλεα άτομα[44]. Επομένως, η αλληλεπίδραση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με το φύλο στον ΣΔ1 απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Έχει αναφερθεί ότι γενετικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την ηλικία διάγνωσης του ΣΔ1. Στο πλαίσιο αυτό, εξετάστηκε αν το προδιαθεσικό 1858T αλληλόμορφο επιδρά στην ηλικία διάγνωσης του ΣΔ1. Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το 1858T αλληλόμορφο προδιαθέτει σε πρωιμότερη διάγνωση. Η μέση ηλικία διάγνωσης στους φορείς του 1858T αλληλόμορφου ήταν παρόμοια συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς, σε συμφωνία με τα συμπεράσματα άλλων ερευνητών[8,12,13,21,27]. Τα αποτελέσματα σε ό,τι αφορά την ενδεχόμενη επίδραση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού στην ηλικία διάγνωσης είναι αντικρουόμενα, καθώς συσχετίστηκε με μικρότερη ηλικία διάγνωσης[16] σε δύο μελέτες και ειδικότερα στην ομάδα των θηλέων ασθενών[10,15].

Δεδομένου ότι τα αυτοάνοσα νοσήματα συσ-

σωρεύονται τόσο σε άτομα όσο και σε οικογένειες, μελετήθηκε το ενδεχόμενο της συσχέτισης του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με το ατομικό ιστορικό θυρεοειδίτιδας Hashimoto καθώς και με το οικογενειακό ιστορικό ΣΔ1, χωρίς να αποδειχθεί στον υπό μελέτη πληθυσμό. Πρόσφατα δημοσιευμένες μετααναλύσεις προτείνουν τη συσχέτιση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto[33]. Ωστόσο, μόνο δύο μελέτες αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το συνδυασμό ΣΔ1 και θυρεοειδίτιδας Hashimoto[7,9]. Επομένως, υπάρχει πεδίο περαιτέρω διερεύνησης -ιδιαίτερα σε παιδικό και εφηβικό πληθυσμό- της συνδυασμένης επίδραση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού και άλλων παραγόντων στην εκδήλωση θυρεοειδίτιδας Hashimoto σε ασθενείς με ΣΔ1. Επίσης, μελετήθηκε η συμβολή του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού στη συσσώρευση περιστατικών ΣΔ1 εντός οικογενειών. Η μη ανάδειξη αυξημένης συχνότητας του 1858T αλληλόμορφου στους ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό ΣΔ1 πιθανόν δικαιολογείται με βάση το μέγεθος του δείγματος.

Περιορισμοί μελέτης

Το μέγεθος του δείγματος αποτελεί ενδεχομένως περιορισμό της μελέτης. Αν και η χαμηλή συχνότητα του 1858T αλληλόμορφου στον υπό μελέτη πληθυσμό περιορίζει την ισχύ της μελέτης, πρέπει να ληφθεί υπόψη ο επιπολασμός του ΣΔ1 στην Ελλάδα. Σύμφωνα με την αναφορά της Διεθνούς Ομοσπονδίας για τον Διαβήτη για την Ελλάδα για το 2009 (http://www.idf.org/webdata/docs/idf-europe/Country report GR pub.pdf), υπολογίζεται ότι 30.000 άτομα όλων των ηλικιών έχουν διαγνωστεί με ΣΔ1. Επιπλέον, σύμφωνα με τα εθνικά δημογραφικά δεδομένα, τα παιδιά και οι ενήλικες αποτελούν περίπου το 20% του ελληνικού πληθυσμού. Ως αποτέλεσμα, ο πληθυσμός των παιδιών και εφήβων με ΣΔ1 είναι περιορισμένος συγκριτικά με εκείνον άλλων χωρών. Εντούτοις, η μελέτη συμπεριέλαβε τα παιδιά τα οποία παρακολουθούνται στο Παιδοδιαβητολογικό εξωτερικό ιατρείο της Δ΄ Παιδιατρικής Κλινικής ΑΠΘ, το οποίο αποτελεί κέντρο της Βόρειας Ελλάδας, με την εξαίρεση εκείνων χωρίς ιστορικό τουλάχιστον τριών γενεών ελληνικής καταγωγής. Προκειμένου να ανιχνευτεί η διαπιστωθείσα διαφορά του 2,8% στη συχνότητα του 1858T αλληλόμορφου με ισχύ 80% σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p<0,05$, θα έπρεπε να μελετηθεί ένας πληθυσμός 912 ατόμων, δυσανάλογος αν σκεφτεί κανείς ότι προέρχεται από ένα κέντρο αναφοράς.

Συμπεράσματα

Η ανεύρεση αυξημένης συχνότητας του 1858T αλληλόμορφου στους ασθενείς με ΣΔ1 συγκριτικά με τους μη πάσχοντες, συμφωνεί με τα αποτελέσματα παρόμοιων μελετών σε άλλους πληθυσμούς. Η αδυναμία ανίχνευσης στατιστικά σημαντικής διαφοράς ενδεχομένως οφείλεται στη μικρή συχνότητα του ελάσσονος αλληλόμορφου στον ελληνικό πληθυσμό, γεγονός που αυξάνει τις απαιτήσεις για μεγαλύτερο δείγμα. Προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τη συσχέτιση του PTPN22 C1858T πολυμορφισμού με τον ΣΔ1 σε πληθυσμό ελληνικής καταγωγής, απαιτείται μεγαλύτερο δείγμα εξαιτίας της διαπιστωθείσας σπανιότητας του 1858T αλληλόμορφου στον ελληνικό πληθυσμό.

Ευχαριστίες

Η μελέτη διενεργήθηκε με την οικονομική και επιστημονική υποστήριξη της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης και Εκπαίδευσης για τον Σακχαρώδη Διαβήτη.

Abstract

***Giza S, Goulas A, Gbandi E, Effraimidou S, Papadopoulou-Alataki E, Eboriadou M, Galli-Tsinopoulou A.* The role of PTPN22 C1858T gene polymorphism in diabetes mellitus type 1: first evaluation in Greek children and adolescents.** *Hellenic Diabetol Chron 2018; 4: 224-231.*

Introduction-Aim: Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune multifactorial disease. Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 (PTPN22) gene encodes lymphoid-specific phosphatase Lyp, an inhibitor of T cell activation. PTPN22 C1858T polymorphism was associated with T1DM in populations of Caucasian origin. The aim of this study was the investigation for the first time of the association of PTPN22 C1858T polymorphism with T1DM in Greek population.

Patients and Methods: We studied 130 children and adolescents with T1DM and 135 healthy individuals of Greek origin. The polymorphism was genotyped using polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism.

Results: C1858T and T1858T genotypes as well as 1858T allele were found more frequently in patients (10.8% and 5.8%, respectively) than in healthy individuals (5.9% and 3.0%, respectively) but at non statistically significant level. There was no statistically significant association found with gender, age at diagnosis, severity of onset, history of Hashimoto thyroiditis or family history of T1DM.

Conclusions: Increased frequency of 1858T allele in patients than in controls, implying a probable association, agrees with results of similar studies on other populations. The inability to find a statistically significant difference is probably due to the decreased frequency of minor allele in Greek population, indicating the need for a larger sample.

Βιβλιογραφία

1. *Gale EAM*. The risk of childhood type 1 diabetes in the 20th century. Diabetes 2002; 51: 3353-61.
2. *Rich SS, Concannon P, Erlich H, et al*. The type 1 diabetes genetics consortium. Ann NY Acad Sci 2006; 1079: 1-8.
3. *Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM*. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. Blood 1999; 93: 2013-24.
4. *Yu X, Sun JP, He Y, et al*. Structure, inhibitor, and regulatory mechanism of Lyp, a lymphoid-specific tyrosine phosphatase implicated in autoimmune diseases. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 19767-72.
5. *Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al*. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. Nat Genet 2004; 36: 337-8.
6. *Petrone A, Suraci C, Capizzi M, et al*. The protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 (PTPN22) is associated with high GAD antibody titer in latent autoimmune diabetes in adults: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study 3. Diabetes Care 2008; 31: 534-8.
7. *Saccucci P, Del Duca E, Rapini N, et al*. Association between PTPN22 C1858T and type 1 diabetes: a replication in continental Italy. Tissue Antigens 2008; 71: 234-7.
8. *Kahles H, Ramos-Lopez E, Lange B, Zwermann O, Reincke M, Badenhoop K*. Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. Eur J Endocrinol 2005; 153: 895-9.
9. *Dultz G, Matheis N, Dittmar M, Röhrig B, Bender K, Kahaly GJ*. The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes. Thyroid 2009; 19: 143-8.
10. *Nielsen C, Hansen D, Husby S, Lillevang ST*. Sex-specific association of the human PTPN22 1858T-allele with type 1 diabetes. Int J Immunogenet 2007; 34: 469-73.
11. *Zheng W, She JX*. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes. Diabetes 2005; 54: 906-8.
12. *Steck AK, Liu SY, McFann K, et al*. Association of the PTPN22/LYP gene with type 1 diabetes. Pediatr Diabetes 2006; 7: 274-8.
13. *Smyth D, Cooper JD, Collins JE, et al*. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. Diabetes 2004; 53: 3020-3.
14. *Smyth DJ, Cooper JD, Howson JM, et al*. PTPN22 Trp620 explains the association of chromosome 1p13 with type 1 diabetes and shows a statistical interaction with HLA class II genotypes. Diabetes 2008; 57: 1730-7.
15. *Santiago JL, Martínez A, de la Calle H, et al*. Susceptibility to type 1 diabetes conferred by the PTPN22 C1858T polymorphism in the Spanish population. BMC Med Genet 2007; 8: 54-8.
16. *Fedetz M, Matesanz F, Caro-Maldonado A, et al*. The 1858T PTPN22 gene variant contributes to a genetic risk of type 1 diabetes in a Ukrainian population. Tissue Antigens 2006; 67: 430-3.
17. *Douroudis K, Prans E, Haller K, et al*. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 gene variants at position 1858 are associated with type 1 and type 2 diabetes in Estonian population. Tissue Antigens 2008; 72: 425-30.
18. *Zhernakova A, Eerligh P, Wijmenga C, Barrera P, Roep BO, Koeleman BP*. Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population. Genes Immun 2005; 6: 459-61.
19. *Hermann R, Lipponen K, Kiviniemi M, et al*. Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes. Diabetologia 2006; 49: 1198-1208.
20. *Chelala C, Duchatelet S, Joffret M-L, et al*. PTPN22 R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. Diabetes 2007; 56: 522-6.
21. *Korolija M, Renar IP, Hadžija M, et al*. Association of PTPN22 C1858T and CTLA-4 A49G polymorphisms with type 1 diabetes in Croatians. Diabetes Res Clin Pract 2009; 86: 54-7.
22. *Stene LC, R nningen KS, Bj rnvold M, Undlien DE, Joner G*. An inverse association between history of childhood eczema and subsequent risk of type 1 diabetes that is not likely to be explained by HLA-DQ, PTPN22, or CTLA4 polymorphisms. Pediatr Diabetes 2010; 11: 386-93.
23. *Fichna M, Zurawek M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Fichna P, Nowak J*. PTPN22, PDCD1 and CYP27B1 polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Polish patients. Int J Immunogenet 2010; 37: 367-72.
24. *Zhebrun D, Kudryashova Y, Babenko A, et al*. Association of PTPN22 1858T/T genotype with type 1 diabetes, Graves' disease but not with rheumatoid arthritis in Russian population. Aging (Albany NY) 2011; 3: 368-73.
25. *Gomez LM, Anaya J-M, Gonzalez CI, et al*. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. Genes Immun 2005; 6: 628-31.
26. *Cinek O, Hradsky O, Ahmedov G, et al*. No independent role of the –1123 G > C and + 2740 A > G variants in the association of PTPN22 with type 1 diabetes and juvenile idiopathic arthritis in two Caucasian populations. Diabetes Res Clin Pract 2007; 76: 297-303.

27. *Chagastelles PC, Romitti M, Trein MR, Bandinelli E, Tschiedel B, Nardi NB*. Association between the 1858T allele of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 and type 1 diabetes in a Brazilian population. Tissue Antigens 2010; 76: 144-8.

28. *Baniasadi V, Das SN*. No evidence for association of PTPN22 R620W functional variant C1858T with Type 1 diabetes in Asian Indians. J Cell Mol Med 2008; 12: 1061-2.

29. *Lea WW, Lee YH*. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update. Lupus 2011; 20: 51-7.

30. *Totaro MC, Tolusso B, Napolioni V, et al*. PTPN22 1858C>T polymorphism distribution in Europe and association with rheumatoid arthritis: case-control study and meta-analysis. PLoS One 2011; 6: e24292.

31. *Lee YH, Bae SC, Song GG*. The association between the functional PTPN22 1858 C/T and MIF 2173 C/G polymorphisms and juvenile idiopathic arthritis: a meta-analysis. Inflamm Res 2012; 61: 411-5.

32. *Li Y, Liao W, Chang M, et al*. Further genetic evidence for three psoriasis-risk genes: ADAM33, CDKAL1, and PTPN22. J Invest Dermatol 2009; 129: 629-34.

33. *Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG*. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and systemic sclerosis: a meta-analysis. Mol Biol Rep 2012; 39: 3103-8.

34. *Luo L, Cai B, Liu F, Hu X, Wang L*. Association of Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor 22 (PTPN22) C1858T gene polymorphism with susceptibility to autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. Endocr J 2012; 59: 439-45.

35. *Roycroft M, Fichna M, McDonald D, et al*. The tryptophan 620 allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) gene predisposes to autoimmune Addison's disease. Clin Endocrinol (Oxf) 2009; 70: 358-62.

36. *Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, et al*. Evaluating the role of the genetic variations of PTPN22, NFKB1, and FcGRIIIA genes in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. Inflamm Bowel Dis 2007; 13: 1212-9.

37. *Zervou MI, Castro-Giner F, Sidiropoulos P, Boumpas DT, Tosca AD, Krueger-Krasagakis S*. The protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 R620W polymorphism does not confer susceptibility to psoriasis in the genetic homogeneous population of Crete. Genet Test Mol Biomarkers 2010; 14: 107-11.

38. *Eliopoulos E, Zervou MI, Andreou A, et al*. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetically homogeneous population of Crete. Lupus 2011; 20: 501-6.

39. *Peng H, Zhou M, Xu W-D, et al*. Association of PTPN22 C1858T polymorphism and type 1 diabetes: a meta-analysis. Immunol Invest 2012; 41: 484-96.

40. *Tang S, Peng W, Wang C, Tang H, Zhang Q*. Association of the PTPN22 gene (+1858C/T, -1123G/C) polymorphisms with type 1 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Res Clin Pract 2012; 97: 446-52.

41. *Lee YH, Song GG*. Meta-analysis of the family-based association between the PTPN22 C1858T polymorphism and type 1 diabetes. Mol Biol Rep 201; 40: 211-15.

42. *Zheng J, Ibrahim S, Petersen F, Yu X*. Meta-analysis reveals an association of PTPN22 C1858T with autoimmune diseases, which depends on the localization of the affected tissue. Genes Immun 2012; 13: 641-52.

43. *Wang XF, Chen ZX, Shao YC, et al*. Population-based and family-based studies on the protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 gene polymorphism and type 1 diabetes: a meta-analysis. Gene 2013; 517: 191-6.

44. *Xuan C, Lun LM, Zhao JX, et al*. PTPN22 gene polymorphism (C1858T) is associated with susceptibility to type 1 diabetes: a meta-analysis of 19,495 cases and 25,341 controls. Ann Hum Genet 2013; 77: 191-203.

Λέξεις-κλειδιά:
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1
PTPN22
Παιδιά
Έφηβοι
Ελληνικός πληθυσμός

Key-words:
Type 1 Diabetes Mellitus
PTPN22
Children
Adolescents
Greek population