

# **Faktory vnějšího prostředí v patogenezi diabetes mellitus 1. typu**

## **Environmental Factors in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes Mellitus**

**Lucie Horáková**

**6. ročník, 4. kruh**

**Konzultant:**

**MUDr. Jan Novák, PhD.**

## **Abstrakt**

Diabetes mellitus 1. typu je autoimunitní onemocnění, které vzniká působením faktorů vnějšího prostředí na geneticky vnímavý terén. Stoupající incidence diabetu 1. typu v ekonomicky vyspělých státech při stejném genofondu populace předpokládá existenci faktoru vnějšího prostředí, který je za tento nárůst odpovědný. Jeho identifikace je bezpochyby důležitá pro vývoj preventivních opatření. Tato práce identifikovala analýzou literárních dat některé z podezříváných faktorů vnějšího prostředí jako jsou infekce (intrauterinní rubeola, coxsackie viry), časná expozice kojenců kravskému mléku, některé toxiny a další. Existují však i opačné teorie, které předpokládají, že vznik diabetu je důsledkem úbytku protektivního faktoru vnějšího prostředí – jedná se především o hygienickou hypotézu. U žádného z faktorů ale dosud nebyla prokázána kauzální souvislost s rozvojem onemocnění a nebylo dosud možné vyvinout preventivní schéma, kterým by se dalo účinně předcházet rozvoji diabetu 1. typu.

## **Abstract**

Type 1 diabetes mellitus is autoimmune disease that is due to the interaction of environmental factors with genetically susceptible terrain. The increasing incidence of T1DM in western countries suggests the existence of environmental factors responsible for the increasing incidence of the disease. The identification of this putative factor is crucial for the development of strategies to prevent type 1 diabetes mellitus. By the analysis of literature, we identified the susceptible factors such as infection (coxsackie virus or cognate rubeola), early exposition to the cow's milk toxins etc. There exist even opposite theories such as hygiene hypothesis suggesting that the development of T1DM might be a result of the lack of protective environmental factor. Available data do not allow to detect causal relation between any of susceptible factors and the development of T1DM and do not allow to develop any strategy to prevent type 1 diabetes mellitus.

## Obsah

Abstrakt	str. 2
Abstrakt - anglicky	str. 3
Obsah	str. 4
Úvod	str. 6
1. Diabetes mellitus 1. typu jako autoimunitní onemocnění	str. 7
2. Genetické riziko	str. 9
3. Předpoklady pro roli faktorů vnějšího prostředí v patogenezi T1DM	str. 11
4. Role infekčních agens	str. 14
4.1. Enteroviry	str. 14
4.2. Rubeola	str. 16
4.3. Lidský cytomegalovirus	str. 16
4.4. Rotaviry	str. 17
4.5. Další virové infekce	str. 17
4.6. Role mikrobiálních toxinů	str. 18
5. Mechanismus diabetogenního účinku virů	str. 19
5.1. Přímé působení viru na pankreatické $\beta$ -buňky	str. 19
5.2. Mechanismus molekulární mimikry	str. 19
5.3. By-stander activation	str. 20
6. Neinfekční agens v patogenezi diabetu 1. typu – stravovací návyky	str. 21
6.1. Kravské mléko	str. 21
6.2. Gluten a cereálie	str. 23
6.2. Vitamín D	str. 23
6.3. Vysokoenergetická zátěž	str. 24

6.4. Další nutriční faktory	str. 25
7. Protektivní role infekce a hygienická hypotéza	str. 26
Diskuze a závěr	str. 29
Seznam literatury	str. 32

## Úvod

Diabetes mellitus 1. typu je dle literárních dat onemocnění známé již tisící let. Ještě do nedávna se jednalo prakticky o maligní onemocnění, které neléčeno vedlo k rychlé smrti postižených jedinců v ketoacidotickém komatu.

Největším objevem ve výzkumu diabetu je objev inzulínu, jeho struktury a jeho role v udržování glukosové homeostázy. Jeho objev Bentingem a Bestem v roce 1921 byl po zásluze oceněn Nobelovou cenou za medicínu. Schopnost obou vědců odizolovat zvířecí inzulín a používat ho pak znamenala skutečně revoluční bod v léčbě diabetu.

Objev Bentinga a Besta umožnil vyléčit jinak ztracené pacienty v diabetickém komatu, postupem času se podařilo je dlouhodobě kompenzovat a zdálo se, že onemocnění prakticky přestává existovat. Přežívání pacientů léčených inzulínem však v následujících letech odhalilo zcela nové, dosud nepoznané, komplikace diabetu – pravidelné dekompenzace při interkurentních onemocněních, hypoglykémie a především vzdálené mikrovaskulární komplikace diabetu jako retinopatie spojená se slepotou, neuropatie vedoucí k selhání ledvin nebo vlastní mikroangiopatie - nejčastější příčina amputací končetin u dospělých.

Tyto nežádoucí projevy vedly k akceleraci výzkumu, díky kterému by se onemocnění dokázalo léčit kauzálně, ne jako doposud pouze substitucí inzulínu, nebo ještě lépe – k možnosti onemocnění účinně předcházet.

Prevence onemocnění je závislá na dokonalé znalosti jeho patogenezi a faktorů, které onemocnění spouštějí a jejich identifikace je náplní práce mnoha světových výzkumných center.

## 1. Diabetes mellitus 1. typu jako autoimunitní onemocnění

Diabetes mellitus 1. typu je orgán specifické autoimunitní onemocnění pankreatických  $\beta$ -buněk (2003). Imunitní systém, který za normálních okolností brání organismus před infekcí, se u diabetu 1. typu obrátí proti vlastním tkáním. Buňky a rozpustné mediátory imunitního systému ničí pankreatické  $\beta$ -buňky stejně účinně a velmi podobným mechanismem, jako za normálních okolností likvidují nebezpečnou infekci (Atkinson and Eisenbarth, 2001; Bach, 1994; Bach and Chatenoud, 2001; Tisch and McDevitt, 1996).

Klíčovou rolí v autoimunitním procesu, vedoucímu ke zničení pankreatických beta buněk, hrají CD4+ T lymfocyty, které celou reakci iniciují, koordinují a sami se podílejí na vlastním ničení pankreatických  $\beta$ -buněk (Bendelac et al., 1987; Dilts et al., 1999; Mathis et al., 2001; Miller et al., 1988; Wong and Janeway, Jr., 1999). Autoimunitní reakce je vedena proti antigenům pankreatických  $\beta$ -buněk exprimovaným prakticky pouze v těchto buněčných typech. Jedná se konkrétně o dekarboxylázu kyseliny glutamové, inzulin, tyrosinovou fosfatázu a některé další struktury (Abulafia-Lapid et al., 1999; Atkinson et al., 1992; Daniel et al., 1995; Honeyman et al., 1993; Kaufman et al., 1993; Roep et al., 1990; Tisch et al., 1993).

V úvodu autoimunitní reakce rozpoznává imunitní systém chybně tyto antigeny, považuje je za cizí a rozvine proti nim prakticky stejnou reakci, jakou využívá v ničení infekčních agens.

Důsledkem takovéto reakce je eliminace pankreatických  $\beta$ -buněk. Tento proces je postupný a trvá v některých případech i mnoho let. Jeho důsledkem je postupné snižování sekrece inzulinu, které se, při zničení více než 90% pankreatických  $\beta$ -buněk, projeví hyperglykemií, většinou prvním diagnostickým znakem diabetu 1. typu (Atkinson and Eisenbarth, 2001; Bach, 1994; Bach and Chatenoud, 2001; Tisch and McDevitt, 1996).

Hlavní silou, která ničí masu pankreatických  $\beta$ -buněk jsou T lymfocyty. V krvi pacientů postižených T1DM se vyskytují i protilátky proti stejným antigenům, proti kterým je vedena autoimunitní reakce. Tyto protilátky (anti GAD, anti IA-2, anti inzulínové) však nemají žádnou roli v patogenezi onemocnění. Jsou ale výbornými laboratorními markery specifickými pro T1DM, díky kterým je možno odlišit T1DM od jiných typů diabetu v případě diagnostických pochyb (**Baekkeskov et al., 1990; Bottazzo et al., 1974; Zimmet et al., 1994**).

Jednou z nejdůležitějších a dosud ne zcela uspokojivě zodpovězených otázek je – jakým způsobem dojde k chybnému rozpoznání vlastních tkání a samotnému zahájení autoimunitní reakce. Dosud není jasné, proč imunitní systém považuje vlastní tkáně za cizí a rozvine proti nim agresivní reakci.

Současné teorie předpokládají, že dochází k působení faktoru vnějšího prostředí na geneticky vnímavý terén. Zatímco genetické vlivy jsou poměrně dobře definovány, faktory vnějšího prostředí tak dobře známé zatím nejsou a proto se na jejich literární identifikaci zaměřila i tato moje práce.



## 2. Genetické riziko

Ještě před vlastní prací na téma faktory vnějšího prostředí v patogenezi diabetu 1. typu je třeba připomenout, že jiným rizikovým faktorem, o poznání lépe prozkoumaným, je genetické riziko.

Diabetes mellitus je polygenní onemocnění (**Redondo and Eisenbarth, 2002**). Genetika se podílí cca 30-50% na celkovém riziku vzniku onemocnění (**Barnett et al., 1981**). Je známo, že se onemocnění částečně sdružuje v rodinách. Zatímco obecné riziko rozvoje T1DM je přibližně 1:200, toto riziko se zvyšuje až na 1:7 v případě, že onemocněním je postižen příbuzný prvního řádu daného jedince (**Tillil and Kobberling, 1987; Warram et al., 1984**). Dítě diabetické matky nebo otce tak má 18 krát vyšší riziko vzniku diabetu než zbytek populace.

Genetické výzkumy ukázaly, že asi 45% genetického rizika je lokalizováno na 6. chromozómu v HLA komplexu. Jedná se o HLA molekuly 2. třídy, které poskytují jak riziko tak prevenci (**Nerup et al., 1974**). Rizikovými pro rozvoj T1DM jsou genotypy HLA DR3, HLA DR4, resp. HLA DQ2 a HLA DQ8. Tyto rizikové alely jsou přítomny u 20% populace, ale až u 90% diabetiků 1. typu (**Erlich et al., 1991**). Jejich přítomnost zvyšuje riziko vzniku T1DM cca 4,5 krát. Nejrizikovější je potom heterozygotní kombinace HLA DR3/HLA DR4, která je přítomna u 2,4% zdravých a 35% diabetiků 1. typu (**Ziegler et al., 1991**) – její přítomnost zvyšuje riziko rozvoje T1DM 14 krát.

Jak již bylo řečeno, v oblasti HLA molekul je lokalizováno nejenom genetické riziko, ale i protekce před T1DM. HLA DR2 se prakticky nikdy nevyskytuje u T1DM pacienta a je tak ve vztahu k onemocnění ochranná (**Pugliese et al., 1995**).

Další část genetického rizika není optimálně prozkoumána. V současné době je identifikováno delších 17 rizikových genetických oblastí a mnohé další na identifikaci teprve

čekají. Z těch známých bych se ještě zmínila o VNTR – variable number of tandem repeats, polymorfismu CTLA-4 genu a další (**Redondo and Eisenbarth, 2002**). Výzkum geneticky rizikových regionů je aktuální problematikou i v současnosti.

### 3. Předpoklady pro roli faktorů vnějšího prostředí v patogenezi T1DM

Je jasné, že pouze genetické riziko není odpovědné za rozvoj všech případů diabetu 1. typu. Existuje celá řada důkazů o tom, že i negenetické vlivy hrají podstatnou roli v patogenezi onemocnění.

1. Pozorování incidence diabetu u jedinců s prakticky stejnou genetickou informací ukazují, že monozygotní dvojčata mají pouze 13-33% konkordanci diabetu 1. typu (**Barnett et al., 1981; Kaprio et al., 1992**).
2. Incidence diabetu mezi různými populacemi vykazuje extrémní variabilitu. Nejnižší je v některých čínských regionech, kde se pohybuje okolo 0,1/100 000, naopak nejvyšší v severovýchodních státech, kde dosahuje až k hranici 50/100 000. 500ti násobný rozdíl v incidenci onemocnění je těžko vysvětlitelný pouze genetickými odchylkami těchto různých populací. Incidence navíc extrémně kolísá i mezi evropskými zeměmi.. Nejnižší incidence je u dětí mladších 15 let v Makedonii (3,2/100 000), nejvyšší ve Finsku, kde údaje z roku 2003 evidují 53 případů na 100 000 dětí. (**2000; Onkamo et al., 1999**).
3. Dále se popisuje nárůst incidence diabetu v definovaném časovém úseku v jedné populaci. Ve Finsku, které je jednou z nejvíce postižených a kde proto výzkum diabetu je na jedné z nejvyšších úrovní, bylo popsáno, že incidence onemocnění se zvýšila 4,5 krát od roku 1950 do současnosti. K nárůstu incidence diabetu 1. typu došlo i ve většině postkomunistických zemí s pádem původních režimů a zlepšením socioekonomické úrovně. Tato změna je jen ztěží vysvětlitelná změnou genetické informace v dané populaci, ale spíše změnami v životním stylu a životním prostředí (**2000; Gale, 2002; Gillespie et al., 2004; Onkamo et al., 1999; Rewers and Zimmet, 2004**).
4. Dalším zajímavým úkazem jsou migrační studie, které dokládají zvyšující incidenci diabetu 1. typu v populaci, která migruje z regionu s nízkou incidencí do regionu s incidencí

vyšší. Příkladem mohou být studie u balkánských utečenců do skandinávských zemí (**Knip and Akerblom, 1999; Bodansky et al., 1992**),

5. Genetické studie studující změny genofondu populace ukazují, že genetická výbava populace se mění. Bylo například popsáno, že v populaci postupně ubývá HLA alel vysoce rizikových pro rozvoj diabetu a naopak alel s nízkým rizikem ve vztahu k T1DM (nebo dokonce projektivních) přibývá. I toto je jeden z důkazů role faktorů vnějšího prostředí, který je pro rozvoj onemocnění důležitější než riziko genetické. (**Gillespie et al., 2004; Hermann et al., 2003**).

Dosavadní výzkum negenetických faktorů, které se mohou podílet na rozvoji diabetu, ukázal, že bude extrémně obtížné identifikovat tyto vlivy a to z těchto hlavních důvodů.

Především proto, že doba mezi iniciací dějů vedoucích k rozvoji onemocnění a jeho skutečnou manifestací je dlouhá, v případě některých diabetiků manifestovaných v dospělém věku dokonce až desítky let. Během této doby většinou dochází k akumulaci působení stovek faktorů a je přirozeně nesmírně obtížné určit, který z nich je přímo odpovědný za rozvoj onemocnění. Dokonce ani u vytypovaného rizikového faktoru pak nelze určit, zda jeho souvislost s rozvojem onemocnění je kauzální či nikoliv. Epidemiologické studie se většinou mohou pouze omezit na konstatování, že diabetická populace má vyšší známky expozice danému faktoru než populace zdravá. Kauzální souvislosti není možné z pochopitelných etických důvodů u pacientů prokázat a výsledky pokusů na experimentálních zvířatech nelze vždy jednoznačně aplikovat na pacienty. Dokonce ani s použitím zvířecích modelů diabetu 1. typu (NOD myši a BB krysi) se nepodařilo dosud prokázat kauzální souvislosti vlivů na vznik onemocnění (**Adorini et al., 2002; Atkinson and Leiter, 1999; Roep et al., 2004**).

Zajímavý je v tomto ohledu příklad coeliakální sprue - autoimunitního onemocnění, u kterého byl environmentální spouštěč onemocnění identifikován díky „nechtěné dietní intervenci“. Jedná se o gluten, jehož snížený příjem během druhé světové války v Holandsku

díky nedostatku pšenice v potravě (významného zdroje glutenu) a opětovné zvýšení v poválečném období vedl k objevení jeho nepostradatelné role ve vzniku coeliakie (**Knip et al., 2005**).

## 4. Role infekčních agens

Práce některých skandinávských autorů (**Kimpimaki et al., 2001**) ukazují, že manifestace diabetu, resp. detekce imunitních markerů reakce vedoucí k jeho vzniku, má sezónní charakter. Nezávislé vědecké týmy zjistily, že první diabetes specifické protilátky jsou nejčastěji detekovány v zimních měsících. Na základě těchto zjištění byla vyslovena hypotéza, že diabetes mellitus 1. typu je spouštěn faktorem vnějšího prostředí, který má sezónní variace a je běžnější v těchto studených měsících (**Hyoty and Taylor, 2002; Lammi et al., 2005; von Herrath and Oldstone, 1996**).

Logickým kandidátem je potom infekce, speciálně některé viry, u kterých byl tento trend skutečně prokázán. Jedná se především o coxsackie a echoviry, jejichž serologický průkaz rozdělený podle ročních období a měsíců prakticky odpovídá grafům detekce diabetických protilátek (**Kimpimaki et al., 2001; Knip et al., 2005**). Enteroviry jsou také nejčastěji zmiňovaným infekčním agens ve spojení s diabetem prvního typu.

### 4.1. Enteroviry

Enteroviry jsou malé, neobalené RNA viry z rodiny pikornavirů. Mají 60 serotypů a patří mezi ně polioviry, coxsackie A a B viry, echoviry a další serotypy. Infekce těmito viry je běžná, často již v útlém věku. Viry většinou způsobí viremii s postižením různých orgánů včetně pankreatu. Většina infekcí je mírných, subklinických .

Grafy incidence enterovirové infekce odpovídají grafům incidence prvních diabetes specifických autoprottilátek a incidenci diabetu 1. typu (**Kimpimaki et al., 2001; Knip et al., 2005**). První skutečné úvahy o roli enterovirů v patogenezi T1DM ale pocházejí z konce šedesátých let, kdy Dr. Gamble (**Gamble et al., 1969**) testováním sér recentních diabetiků 1. typu neutralizačními protilátkami zjistil, že více jich je pozitivních na enteroviry (především

coxsackie B4 viry) než kontrolní skupina. Podobné výsledky byly zveřejněny i dalšími vědeckými týmy.

Dalším podstatným argumentem pro hypotézy o roli enterovirů v patogenezi T1DM je práce Dr. Atkinsona a jeho spolupracovníků. Ten v roce 1994 prokázal sekvenční homologii mezi částí autoantigenu GAD (aminokyselinami 247-249) a P2-C proteinem Coxsackie viru (aminokyselinami 37-42). Tento objev pak zdůrazňoval roli molekulární mimikry mezi těmito dvěma strukturami (**Atkinson et al., 1994**).

Roli enterovirů dále potvrzovaly některé kasuistiky. Jedná se o práce, které na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let detekovaly enteroviry přímo v pankreatech recentních diabetiků 1. typu. Některým vědcům se podařil další ojedinělý experiment. Virus izolovaný z pankreatů recentních diabetiků 1. typu byl podán experimentálním zvířatům a zanedlouho u nich indukoval rozvoj diabetu 1. typu (**Champsaur et al., 1980; Yoon et al., 1979**).

Za zmínku stojí i další kasuistika – případ švédské rodiny - publikovaná mnohem později, v roce 2004. Matka a jeden ze synů navštívili současně svého praktického lékaře pro polyurii, polydypsii a v případě syna i váhový úbytek 5kg. U obou byl po změření glykémie diagnostikován diabetes mellitu. U syna nebylo pochyb, že se jedná o diabetes mellitus 1. typu, u matky byl po vyšetření C-peptidu a protilátek proti GAD65 taktéž prokázán diabetes mellitus 1. typu. Vzhledem k tomu, že došlo k současné manifestaci onemocnění, a i proto, že matka byla vždy náchylnější k virové infekci (v minulosti prodělala i myokarditidu), byli oba pacienti i zbývající dva členové rodiny podrobněji vyšetřeni. Bylo zjištěno, že celá rodina onemocněla enterovirovou infekcí serotypizovanou jako coxsackie B virus 4 a 5. U dvou členů rodiny možná právě tato infekce pravděpodobně buď způsobila nebo akcelerovala rozvoj onemocnění (**Hindersson et al., 2005**).

Úvahy o asociaci T1DM a enterovirové infekce trvají už skoro 40 let. Přes to, že by se mohlo zdát, že o roli enterovirů ve vzniku T1DM nelze pochybovat, existuje celá řada prací,

kteřá vŷe zmŷněně hypotězy nepotvrdila nebo se je snaŷŷŷ pŷŷmo vyvrĀtŷt – za vŷechny jen Tuvemo a spolupracovnŷŷ, kteřá neprokĀzala asociaci protilĀtek proti eneterovirŷm a T1DM **(Tuvemo et al., 1989)**. Roli enterovirŷ nepotvrdily ani dvě prospektivnŷŷ studie – BABYDIAB v Německu a Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY) v Denveru **(Fuchtenbusch et al., 2001; Graves et al., 2003)**. Diskrepance ve vŷledcŷch rŷznŷch studiŷ mohout mŷt rŷzně pŷŷŷiny: odliŷně metody detekce – od detekce protilĀtek aŷ po pŷŷmŷ pŷukaz viru. DĀle skuteĀnostŷ, ŷe imunologickě parametry mohou kolŷsat, virovĀ infekce mŷŷe bŷt pŷŷŷtomna pouze v době imunologickě iniciace onemocněnŷ a ne v době jeho klinickě manifestace a dalŷŷ.

#### **4.2. Rubeola**

Nejsilnějŷŷ asociaci z infekĀnŷch agens s T1DM mĀ bezesporu rubeola, respektive jeŷŷ intrauterinnŷŷ forma. Aŷ 20% dětŷ postiŷenŷch kongenitĀlnŷŷ rubeolou vyvŷŷjŷ pozděŷji diabetes mellitus 1. typu imunologicky totoŷnŷŷ s klasickŷm T1DM **(Forrest et al., 1969)**. Lze u nich detekovat autoreaktivnŷŷ T lymfocyty zkŷŷŷŷeně reagujŷŷ mezi GAD a virem rubeoly **(Karounos et al., 1993)**. Naproti tomu postnatĀlnŷŷ rubeola prakticky nezvyŷŷuje riziko rozvoje T1DM. KongenitĀlnŷŷ rubeola zcela jistě nevysvětluje rŷst incidence diabetu, neboŷ se stĀvĀ v poslednŷch desŷtkĀch let dŷky vakcinaĀnŷm programŷm extrěmně vzĀcnou **(Hyoty and Taylor, 2002)**.

#### **4.3. Lidskŷ cytomegalovirus**

CMV byl povaŷovĀn za moŷnŷŷ potenciaĀnŷŷ faktor rozvoje diabetu 1. typu pŷedevŷŷm na zĀkladě několika kazuistik. V jedně pŷŷci byla nalezena korelace mezi vŷskytem protilĀtek proti CMV a ICA **(Nicoletti et al., 1990)**. Klony T lymfocytŷ specifickě pro GAD65 zkŷŷŷeně



reagují s peptidem CMV (**Roep et al., 2002**). Další práce ale nepotvrdily korelaci mezi titry protilátek proti CMV a ICA (**Hiltunen et al., 1995**).

Dále byla zkoumána kongenitální infekce CMV – po zveřejnění kasuistiky chlapce, který onemocněl T1DM ve 13 měsících a trpěl kongenitální CMV infekcí (**Ward et al., 1979**). Kongenitální CMV infekce jako příčina T1DM byla prakticky vyloučena rozsáhlou prospektivní studií sledující cca 40 000 dětí, kde nebyla pozorována statisticky významná asociace mezi kongenitální CMV infekcí a vznikem T1DM (**Ivarsson et al., 1993**).

O vlivu jiných infekcí na vznik diabetu 1. typu je podstatně méně informací

#### **4.4. Rotaviry**

Jejich asociace s T1DM byla zvažován i proto, že jsou nejčastější příčinou gastroenteritis u dětí. Jedna práce na malém souboru pacientů ukázala vztah mezi rotavirovou infekcí a diabetem 1. typu a dále podpořená molekulární homologií VP7 proteinu rotaviru a epitopem molekuly IA-2 respektive GAD65 (**Honeyman et al., 2000**). I tyto asociace jsou však velmi diskutabilní, nebyly potvrzeny v rozsáhlejší prospektivní studii (**Blomqvist et al., 2002**).

#### **4.5. Další virové infekce**

Podobně kontroverzní názor jako například na rotaviry existuje na vztah mezi retroviry a T1DM (v jedné práci prokázány protilátky proti retrovirům u recentních T1DM (**Hao et al., 1993**), v další ale neprokázána ani mRNA ani DNA retrovirů v genomu diabetiků 1. typu (**Muir et al., 1999**)), EB virem –především pro jeho možnou asociaci s dalším autoimunitním onemocněním – revmatoidní artritidou (**Balandraud et al., 2004**), ale protilátky proti kapsidovým proteinům EB viru jsou u diabetiků dokonce nižší než zdravé populace (**Hyoty and Taylor, 2002**). Již v padesátých letech se předpokládalo, že průušnice mohou způsobovat

T1DM, ale tato hypotéza nebyla nikdy potvrzena a onemocnění navíc bylo výrazně limitováno vakcinačními programy při stále stoupající incidenci T1DM (**Hyoty and Taylor, 2002**).

#### **4.6. Role mikrobiálních toxinů**

Jedna z nejnovějších teorií nyní uvažuje o tom, že vyvolávatelem T1DM není přímo infekční agens, ale jeho produkt – konkrétně bakteriální toxin bafilomycin A1 (makrolid – produkt *streptomyces* spp.) Tento toxin může být součástí hlízovité zeleniny jako brambory nebo cukrové řepy. U geneticky rizikových jedinců může dle této teorie vyvolávat poškození pankreatických  $\beta$ -buněk a akcelarovat/potencovat vznik T1DM (**Myers et al., 2001**).

## 5. Mechanismus diabetogenního účinku virů

Viry a infekce obecně mohou teoreticky vyvolat autoimunitní onemocnění několika způsoby.

### 5.1. Přímé působení viru na pankreatické $\beta$ -buňky

Tento mechanismus je předpokládán u virů, které mají tropismus pro pankreatické  $\beta$ -buňky. Takováto tkáňová specifita byla prokázána pro některé viry používané experimentálně ve zvířecím modelu (např. virus encephalomyokarditidy), které však nemají žádnou roli v patogenezi lidských onemocnění. Z virů, lidských patogenů, má tropismus pro pankreas zřejmě coxsackie B virus. Infekce např. coxsackie virem B může teoreticky buď přímo zničit pankreatické  $\beta$ -buňky, spíše však umožňuje rozpoznávání antigenů infikovaných  $\beta$ -buněk cytotoxickými T lymfocyty a usnadnit zničení těchto buněk reakcí imunitního systému (**Heath and Carbone, 2001; Horwitz et al., 2002**).

### 5.2. Mechanismus molekulární mimikry

Tato teorie předpokládá, že stejné struktury jsou částí infekčních agens a vlastních tkání. Přímě bylo prokázáno, že identické molekulární sekvence jsou součástí molekuly GAD65 a kapsidovým proteinem P2C coxsackie B viru, podobnost pravděpodobně existuje i mezi sekvencemi GAD a cytomegaloviru, IA2 a enteroviry a dalšími. Teorie molekulární mimikry předpokládá, že imunitní reakce původně namířená proti infekčním agens se později obrátí proti strukturně identickým částem vlastních molekul, které postupně zničí (**Christen and von Herrath, 2004; von Herrath and Oldstone, 1996**).

### **5.3. By-stander activation**

Jedná se o ovlivnění mikroenvironmentu a cytokinového prostředí infekcí. V cirkulaci každého jedince existují potenciálně autoreaktivní T lymfocyty, které nebyly eliminovány v rámci centrální edukace v thymu díky jejich nízké afinitě k autoantigenům. Tyto buňky mohou být aktivovány nespecificky během infekce. Virová infekce může zvýšit afinitu těchto buněk uvolněním autoantigenů z buněk poškozených infekcí, aktivací antigen prezentujících buněk a zvýšené expresi kostimulačních molekul nebo deviací cytokinového prostředí k profilu Th1, který predisponuje k rozvoji autoimunitní reakce **(Christen and von Herrath, 2004; Heath and Carbone, 2001; von Herrath and Oldstone, 1996)**.

## 6. Neinfekční agens v patogenezi diabetu 1. typu – stravovací návyky

Stravovací návyky jsou faktor vnějšího prostředí, který se progresivně mění. Interaguje s největší částí imunitního systému – slizničním imunitním systémem. Jako rizikový faktor je potrava zmiňována v celé řadě onemocnění – od metabolických, přes některé typy nádorů jako například kolorektální karcinom až po autoimunitní onemocnění – diabetes mellitus 1. typu nevyjímaje.

### 6.1. Kravské mléko

Prvním typem „cizorodé“ stravy, se kterou se organismus setkává, je kravské mléko u nekojených kojenců nebo jako přídavek stravy u kojenců kojených mateřským mlékem. I vzhledem k tomu, že diabetes mellitus 1. typu byl ještě nedávno považován za juvenilní onemocnění, předpokládalo se, že raná expozice antigenům kravského mléka může být environmentálním spouštěčem onemocnění především u těchto juvenilních diabetiků 1. typu.

Důvodů k této hypotéze bylo několik.

Kravské mléko obsahuje bovinní inzulin, jehož struktura je prakticky totožná se strukturou lidského inzulinu – liší se pouze ve třech aminokyselinách – dvou v řetězci A a jedné v řetězci B. Imunitní systém navíc reaguje zkřížením proti bovinnímu a lidskému inzulinu (**Knip et al., 2005**). Kravský inzulin není jediným antigenem obsaženým v kravském mléku, který má podobnou strukturu diabetes relevantním autoantigenům. Kravský sérový albumin má podobnou sekvenci s ICA 69 a  $\beta$ -casein s glukosovým transportérem – 4 (**Vaarala, 2000**). Zkřížená reakce mezi těmito strukturami byla zvažována jako spouštěč diabetu 1. typu.

Podporou této hypotézy je celá řada epidemiologických pozorování, která udávají zvýšenou konzumaci kravského mléka u dětí, které později onemocní diabetem 1. typu, naopak nižší incidenci diabetu u dětí exkluzivně kojených alespoň v prvních měsících života

atd. (Vaarala et al., 1999; Virtanen et al., 1998). Diabetici 1. typu mají vyšší hladiny protilátek proti komponentám kravského mléka (Savilahti et al., 1988) a další práce ukázala, že přítomnost IgA protilátek proti  $\beta$ -laktoglobulinu kravského mléka je rizikovým faktorem rozvoje diabetu v mladším věku (Dahlquist et al., 1992). Další pozorování ukazují, že doba trvání kojení negativně koreluje s rizikem rozvoje diabetu 1. typu (Borch-Johnsen et al., 1984; Virtanen et al., 1998).

I tato data jsou však kontroverzní. Celá řada dalších studií nepotvrdila úvahy nad rolí expozice kravskému mléku v časných obdobích v rozvoji diabetu 1. typu. V některých pracích bylo dokonce zjištěno, že expozice kravskému mléku je nižší u diabetických dětí než u kontrol a nebyla potvrzena ani hypotéza vztahu délky trvání kojení a rizika T1DM (Dahlquist et al., 1990).

Úvahy o roli kravského mléka v patogenezi diabetu 1. typu otevírají jinou důležitou otázku a tou je role slizničního imunitního systému v patogenezi diabetu 1. typu. Orální podání antigenu totiž většinou vyvolává vznik Th3 typu imunitní odpovědi a toleranci takto podaných antigenů imunitním systémem. Podání antigenů tímto způsobem se dokonce zvažuje jako jedna z možných vakcinačních strategií k prevenci autoimunitních onemocnění (Chen et al., 1994; Chen et al., 1995). V experimentálním modelu diabetu 1. typu – u NOD myši bylo opakovaně pozorováno, že orální podání autoantigenů jako je GAD nebo inzulin vede k prevenci onemocnění. Pokud tedy existují domněnky o možné iniciaci autoimunity po orálním podání inzulinu a následné zkřížené imunitní/autoimunitní reakci, je zřejmé, že k takovému mechanismu může dojít u jedinců, který má hrubě porušenou slizniční imunitní reakci a schopnost rozvinout orální toleranci (Vaarala, 2000).

## 6.2. Gluten a cereálie

Gluten je důležitý antigen, který hraje nepostradatelnou roli v rozvoji coeliakie – zánětlivého onemocnění střev s autoimunitními rysy. Je známo, že gluten přímo indukuje rozvoj tohoto onemocnění u skupiny obyvatelstva jasně definovaného genetickým rizikem lokalizovaným v oblasti HLA molekul 2. třídy – HLA DQ2 a HLA DQ8. Je známo, že u pacientů s touto chorobou stačí pouhá eliminace glutenu ze stravy k tomu, aby došlo ke klinickému zlepšení a často úplné remisi onemocnění. Na druhou stranu je známo, že pokračující expozice glutenu i u symptomatických pacientů vede k významnému zvýšení rizika rozvoje lymfoproliferačních a především autoimunitních chorob včetně diabetu 1. typu. Nepředpokládá se však, že by konkrétně struktura glutenu měla přímou souvislost s rozvojem diabetu 1. typu. Předpokládá se spíše, že i asymptomaticky pokračující zánětlivá reakce vede k deviaci imunitní reakce k rizikovému Th1 profilu, hyperexpresi kostimulačních molekul, bystander aktivaci a dalším imunologickým jevům, které mohou nepřímo potencovat vznik diabetu 1. typu (Sollid, 2000).

Některé práce ukazují, že časná expozice glutenu a cereáliím zvyšuje riziko vzniku diabetu 1. typu (Norris et al., 2003; Ziegler et al., 2003). Tato data dokonce vedle ke dvěma pilotním prospektivním studiím, ve kterých byla pacientům s pozitivními titry diabetes asociovaných protilátek podávána po dobu jednoho roku bezlepková dieta (Hummel et al., 2002; Pastore et al., 2003). Ani jedna z prací ale neprokázala pozitivní vliv takovéto intervence na průběh autoimunitní reakce proti pankreatickým  $\beta$ -buňkám.

## 6.2. Vitamín D

Úvahy o tom, že dostatečný příjem vitamínu D je protektivním faktorem rozvoje diabetu 1. typu byly založeny na dvou pozorováních.

1. Synthesa vitamínu D v kůži je závislá na slunečním svitu, který vykazuje stejné variace jako křivka incidence diabetu 1. typu (nejméně slunce v měsících s nejvyšší incidencí diabetu) a slunečního svitu je nejméně v zemích s nejvyšší prevalencí T1DM – skandinávské státy (**Knip and Akerblom, 1999; Knip et al., 2005**).
2. Suplementace vitamínu D je prevencí diabetu u NOD myši (**Giulietti et al., 2004; Mathieu et al., 2005**).

Některé práce skutečně ukázaly, že nedostatečná orální substituce vitamínu D zvyšuje riziko rozvoje T1DM (**1999; Hypponen et al., 2001; Karvonen et al., 2000**). I tato hypotéza však byla dalšími výzkumy prakticky odvržena – orální substituce vitamínu D je dodržována ve Skandinávii u 95% dětí a přesto incidence diabetu dále stoupá. Také proto, že existují severské regiony s velmi nízkou incidencí diabetu např. v Rusku.

### **6.3. Vysokoenergetická zátěž**

Poměrně nová hypotéza si všímá možné souvislosti mezi obezitou resp. váhovým přírůstkem a vznikem diabetu 1. typu. Epidemiologická data jednoznačně ukazují, že populace přibývá na váze. Jako příklad mohou posloužit data z Finska, která říkají, že průměrný BMI 15 letých dětí se zvýšil z 20,2 v roce 1980 na 21,3 v roce 1992. Teorie formulovaná Wilkinem v roce 2001 předpokládá, že nárůst váhy může akcelarovat vznik diabetu 1. typu u geneticky rizikových jedinců (**Wilkin, 2001**). Tato teorie je podložena dvěma typy pozorování – metabolicky aktivní  $\beta$ -buňka u obézních jedinců je náchylnější k cytokiny zprostředkované lýze (**Mathis et al., 2001; Palmer et al., 1989**) tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je cytokin produkovaný tukovou tkání, který akceleruje diabetes v experimentálním modelu (**Green et al., 1998**).



#### **6.4. Další nutriční faktory**

Existují celé řady prací, které se samozřejmě snaží najít další složky potravy, které mohou vyvolávat nebo potencovat rozvoj diabetu 1. typu. Jedná se většinou o epidemiologické studie sledující spotřebu dané potraviny diabetiky 1. typu a srovnávají ji se zdravou populací. Jako příklad mohou sloužit studie, o konzumaci kofeinu (**Tuomilehto et al., 1990**) nebo masa (**Muntoni and Muntoni, 2006**) a prevalencí diabetu 1. typu.

## 7. Protektivní role infekce a hygienická hypotéza

Vedle hypotéz, které předpokládají, že neznámý faktor vnějšího prostředí je spouštěčem autoimunitních dějů vedoucích k rozvoji diabetu 1. typu, existují teorie, které předpokládají pravý opak. Zjednodušeně lze říci, že předpokládají, že v prostředí existuje protektivní faktor, kterého postupně ubývá. V určitém smyslu sem lze zařadit úvahy o roli vitamínu D, především však teorie o protektivním efektu infekce. Infekce skutečně, především v experimentálních modelech, dokáže bránit rozvoji autoimunity různými mechanismy, které budou popsány dále.

Nejvýznamnější teorií je takzvaná hygienická hypotéza. Ta byla formulována v roce 1989 epidemiologem Dr. Strachanem (**Strachan, 1989**) a původně si všímala především vztahu mezi úrovní hygieny a socioekonomickým standardem na jedné straně a prevalencí astmatu a alergických chorob na straně druhé. Práce v rámci této teorie ukázaly, že vyšší hygienická úroveň, vyšší standard zdravotní péče, vyšší vzdělání, menší počet členů domácnosti a některé další ukazatele vedoucí k nižší incidenci infekčních chorob jsou spojeny s vyšší prevalencí imunoopatologií – především alergických onemocnění. Postupně byla tato teorie aplikována i na autoimunitní choroby včetně například roztroušené sklerózy mozkomíšní nebo právě diabetu 1. typu.

Hygienická teorie předpokládá, že vyvíjející se imunitní systém potřebuje stimulaci antigeny vnějšího prostředí k tomu, aby se plně vyvíjel. Nedostatek antigenní stimulace vede k tomu, že imunitní systém je náchylnější k rozvoji imunitních patologií – alergických reakcí nebo autoimunity (**Strachan, 1989**).

Jedním infekčním agens, který lze považovat za příklad hygienické hypotézy jsou paraziti. Imunitní systém se brání parazitární infekci především Th2 typem imunitní odpovědi. Tento typ imunitní reakce je zároveň protektivní ve vztahu k diabetu 1. typu – onemocnění je

způsobeno Th1 typem imunitní odpovědi a Th2 odpověď jeho rozvoji brání (**Berman et al., 1996; Cameron et al., 1997; O'Shea et al., 2002; Rapoport et al., 1993**). V některých experimentech lze dokonce podáním parazitů (*Schistosoma mansoni*) nebo jejich antigenů experimentálním zvířatům zabránit rozvoji T1DM (**Cooke et al., 1999**). Eliminace některých typů parazitů vyšším hygienickým standardem může teoreticky představovat faktor zvyšující incidenci T1DM.

Hygienická hypotéza je podporována i dalšími pokusy na experimentálních zvířatech. Obecně lze říci, že podmínkou rozvoje T1DM u experimentálních zvířat jsou sterilní podmínky a pouhé narušení sterilního prostředí významně snižuje incidenci diabetu ve zvířecích koloniích (**Bach, 2001; Pozzilli et al., 1993**). Podobný efekt má podání různých mikrobů (virus hepatitidy, LCMV – virus lymfocytární choriomeningitidy atd.) nebo jejich antigenů (BCG – bacillus Calmette Guerin, B podjednotka cholerového toxinu atd.), které také brání rozvoji T1DM (**Oldstone, 1990; Wilberz et al., 1991; Yagi et al., 1991**).

Infekce může bránit rozvoji autoimunity, konkrétně diabetu 1. typu, různými mechanismy.

1. Již dříve zmiňovaná role antigenní stimulace v dětství pro správný vývoj a fungování imunitního systému (**Bach, 2001; Strachan, 1989**).
2. Kompetice – soutěžení buněk imunitního systému buď přímo o antigeny (zjednodušeně lze říci, že buňky imunitního systému jsou tolik „zaměstnány“ reakcí proti infekčnímu agens, že jim nezbývá kapacita k reakci proti vlastním tkáním) nebo o produkty potřebné k jejich růstu. Buňky imunitního systému mohou soutěžit i například o růstové faktory, jako je IL-2 pro T lymfocyty. Růstové faktory jsou spotřebovány buňkami reagujícími proti infekci a nezbývá jich dost pro menšinové autoreaktivní buňky (**Adorini et al., 1988; Bach, 2001**).

3. Cytokiny, indukované virovou infekcí, mohou bránit rozvoji autoimunity – jedná se především o IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  (**Bach, 2001**).
4. Některé infekce mohou mít tropismus pro buňky imunitního systému jako například LCMV nebo HIV a tím teoreticky zničit efektorovou část autoimunitní reakce (**Bijlsma et al., 1988; Zinkernagel et al., 1999**).

## Diskuse a závěr

Diabetes mellitus 1. typu je orgán specifické autoimunitní onemocnění. Imunologická reakce pozdního typu přecitlivělosti vede ke ničení pankreatických  $\beta$ -buněk produkujících inzulin. Absolutní inzulinová deficience má za následek hyperglykémii, ketoacidotické koma a smrt. Objev inzulinu umožnil léčit akutní stavy, odhalil ale další tváře nemoci – vzdálené diabetické komplikace, dekompenzace diabetu, hypoglykémie a další.

Současná medicína se snaží nejenom substitučně léčit diabetes mellitus 1. typu a vyvíjet co nejdokonalejší inzulinové režimy, ale také onemocnění léčit kauzálně. Existuje celá řada strategií, které se snaží zachránit inzulinovou sekreci a suprimovat autoimunitní reakci. Optimální strategií by zcela jistě byla prevence. K tomu, aby bylo vhodné vyvinout účinnou preventivní strategii, je nutné znát dokonale patogenezí onemocnění a faktory, které je spouštějí.

Diabetes mellitus 1. typu má genetický základ. Onemocnění asociuje s rizikovými HLA molekulami 2. třídy HLA DR3 nebo HLA DR4. Genetická informace se na riziku vzniku diabetu 1. typu podílí pouze zhruba 30-50%. Za zbytek rizika jsou odpovědné faktory vnějšího prostředí.

O existenci rizikových faktorů vnějšího prostředí svědčí řada studií, které ukazují rozdíly v prevalenci nebo incidenci onemocnění u geneticky podobných skupin obyvatelstva. Jsou to například studie jednovaječných dvojčat, studie prevalence diabetu v různých populacích, mezi kterými se prevalence liší až 500x, studie incidence diabetu v jedné etnické skupině v různých časových obdobích, migrační studie a mnohé další. Všechny tyto práce předpokládají, že v prostředí existuje rizikový faktor, kterého přibývá, stejně tak jako stoupá incidence onemocnění, nebo protektivní faktor, kterého naopak ubývá.

Existence takovéhoho faktoru je velmi atraktivní z pohledu preventivních strategií, protože jeho pouhá eliminace nebo substituce by mohla vést ke snížení incidence nebo úplné eradikaci diabetu 1. typu.

Velkou skupinou potenciálních rizikových faktorů jsou různé typy infekce. Práce především skandinávských autorů (severské země mají nejvyšší prevalenci diabetu 1. typu) identifikovaly celou řadu suspektních infekcí, především virových. Pravděpodobně nejrizikovější je pro vznik diabetu 1. typu kongenitální infekce rubeolou, která vede ke vzniku diabetu 1. typu až u 20% postižených jedinců. Tato infekce ale zcela jistě nevysvětlí stoupající incidenci diabetu vzhledem ke svému významnému úbytku díky vakcinačním programům. Vedle infekcí rotaviry, retroviry, CMV a dalšími, je nejvíce pozornosti věnováno enterovirům, konkrétně coxsackie. Nejenom pro jejich sekvenční homologii s autoantigenem – molekulou GAD, ale i proto, že různé práce ukazují zvýšené titry protilátek proti antigenům coxsackie v době manifestace onemocnění, a proto, že incidence diabetu 1. typu podle měsíců prakticky odpovídá grafu enterovirových infekcí. Celá řada prací ale na druhou stranu tuto asociaci vyvrací.

Důvodů, které mohou vysvětlit takto rozdílné názory je celá řada. Studie používají různé metody detekce virové infekce od přímé detekce virové DNA až po detekci protilátek proti virům. Virová infekce je dynamický proces, během kterého nemusí být všechny imunologické parametry exprimovány konstantně a mohou výrazně kolísat. Navíc doba mezi manifestací onemocnění a prvotním inzuletem vedoucím k iniciaci autoimunitních dějů může být velmi dlouhá a v tom případě je velmi obtížné tento prvotní impulz identifikovat.

Dalšími rizikovými faktory jsou různé nutriční zvyky. Za všechny je třeba jmenovat časnou expozici kojenců kravskému mléku. To obsahuje antigeny (například bovinní inzulin nebo  $\beta$ -casein), které mohou zkříženě reagovat s diabetickými autoantigeny – inzulinem, ICA a dalšími. Expozice kojenců kravskému mléku byla zvažována jako rizikový faktor vzniku

diabetu 1. typu do té míry, že byla zahájena preventivní studie s podáváním vysoce hydrolyzovaného mléka kojencům (studie TRIGR). Výsledky této studie však nepřinášejí příliš optimismu stejně jako v případě infekce coxsackie viry. Názory na roli kravského mléka v rozvoji diabetu 1. typu jsou velmi různorodé.

Příčiny diskrepancí jsou podobné jako v případě infekce – doba mezi manifestací onemocnění a prvotním inzuletem vedoucím k iniciaci autoimunitních dějů může být velmi dlouhá a v tom případě je velmi obtížné tento prvotní impuls identifikovat.

V současné době je velmi populární i opačné hypotézy, které předpokládají, že diabetes mellitus 1. typu je způsoben úbytkem protektivního faktoru ve vnějším prostředí. Příkladem je hygienická hypotéza, která dává do souvislosti zvýšený hygienický standart související s nižší incidencí infekčních onemocnění na straně jedné a zvýšenou incidencí alergických a autoimunitních onemocnění na straně druhé. Infekce skutečně může být důležitá pro správnou funkci imunitního systému, jeho „zaškolení“ v dětství s nižší pravděpodobností rozvoje autoimunity v dospělosti. I tato hypotéza má řadu kritiků, stejně jako všechny výše zmíněné teorie.

Závěrem je nutné zdůraznit, že identifikace environmentálního spouštěče diabetu 1. typu a obecně i dalších onemocnění je velmi důležité. Identifikace tohoto zatím neznámého faktoru by v budoucnu umožnila jednoduchou, pravděpodobně ekonomicky nenáročnou, prevenci tohoto onemocnění. Onemocnění, u kterého sice dokážeme úspěšně léčit jeho akutní projevy, ale nedokážeme zabránit jeho devastujícímu vlivu na dlouhodobou morbiditu populace.

## Seznam literatury

(1999). Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia* 42, 51-54.

(2000). Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 355, 873-876.

(2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1, S5-20.

Abulafia-Lapid,R., Elias,D., Raz,I., Keren-Zur,Y., Atlan,H., and Cohen,I.R. (1999). T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J Autoimmun* 12, 121-129.

Adorini,L., Gregori,S., and Harrison,L.C. (2002). Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med* 8, 31-38.

Adorini,L., Muller,S., Cardinaux,F., Lehmann,P.V., Falcioni,F., and Nagy,Z.A. (1988). In vivo competition between self peptides and foreign antigens in T-cell activation. *Nature* 334, 623-625.

Atkinson,M.A., Bowman,M.A., Campbell,L., Darrow,B.L., Kaufman,D.L., and Maclaren,N.K. (1994). Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 94, 2125-2129.

Atkinson,M.A. and Eisenbarth,G.S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221-229.

Atkinson,M.A., Kaufman,D.L., Campbell,L., Gibbs,K.A., Shah,S.C., Bu,D.F., Erlander,M.G., Tobin,A.J., and Maclaren,N.K. (1992). Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 339, 458-459.

Atkinson,M.A. and Leiter,E.H. (1999). The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 5, 601-604.

Bach,J.F. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15, 516-542.

Bach,J.F. (2001). Protective role of infections and vaccinations on autoimmune diseases. *J Autoimmun* 16, 347-353.

Bach,J.F. and Chatenoud,L. (2001). Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu Rev Immunol* 19, 131-161.

Baekkeskov,S., Aanstoot,H.J., Christgau,S., Reetz,A., Solimena,M., Cascalho,M., Folli,F., Richter-Olesen,H., and De Camilli,P. (1990). Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347, 151-156.



- Balandraud,N., Roudier,J., and Roudier,C. (2004). Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 3, 362-367.
- Barnett,A.H., Eff,C., Leslie,R.D., and Pyke,D.A. (1981). Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20, 87-93.
- Bendelac,A., Carnaud,C., Boitard,C., and Bach,J.F. (1987). Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med* 166, 823-832.
- Berman,M.A., Sandborg,C.I., Wang,Z., Imfeld,K.L., Zaldivar,F., Jr., Dadufalza,V., and Buckingham,B.A. (1996). Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 157, 4690-4696.
- Bijlsma,J.W., Derksen,R.W., Huber-Bruning,O., and Borleffs,J.C. (1988). Does AIDS 'cure' rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* 47, 350-351.
- Blomqvist,M., Juhela,S., Erkkila,S., Korhonen,S., Simell,T., Kupila,A., Vaarala,O., Simell,O., Knip,M., and Ilonen,J. (2002). Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 511-515.
- Bodansky,H.J., Staines,A., Stephenson,C., Haigh,D., and Cartwright,R. (1992). Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population. *BMJ* 304, 1020-1022.
- Borch-Johnsen,K., Joner,G., Mandrup-Poulsen,T., Christy,M., Zachau-Christiansen,B., Kastrup,K., and Nerup,J. (1984). Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis. *Lancet* 2, 1083-1086.
- Bottazzo,G.F., Florin-Christensen,A., and Doniach,D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2, 1279-1283.
- Cameron,M.J., Arreaza,G.A., Zucker,P., Chensue,S.W., Strieter,R.M., Chakrabarti,S., and Delovitch,T.L. (1997). IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol* 159, 4686-4692.
- Champsaur,H., Dussaix,E., Samolyk,D., Fabre,M., Bach,C., and Assan,R. (1980). Diabetes and Coxsackie virus B5 infection. *Lancet* 1, 251.
- Chen,Y., Inobe,J., Marks,R., Gonnella,P., Kuchroo,V.K., and Weiner,H.L. (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376, 177-180.
- Chen,Y., Kuchroo,V.K., Inobe,J., Hafler,D.A., and Weiner,H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.
- Christen,U. and von Herrath,M.G. (2004). Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Mol Immunol* 40, 1113-1120.

- Cooke,A., Tonks,P., Jones,F.M., O'Shea,H., Hutchings,P., Fulford,A.J., and Dunne,D.W. (1999). Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol.* *21*, 169-176.
- Dahlquist,G., Savilahti,E., and Landin-Olsson,M. (1992). An increased level of antibodies to beta-lactoglobulin is a risk determinant for early-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus independent of islet cell antibodies and early introduction of cow's milk. *Diabetologia* *35*, 980-984.
- Dahlquist,G.G., Blom,L.G., Persson,L.A., Sandstrom,A.I., and Wall,S.G. (1990). Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood. *BMJ* *300*, 1302-1306.
- Daniel,D., Gill,R.G., Schloot,N., and Wegmann,D. (1995). Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol* *25*, 1056-1062.
- Dilts,S.M., Solvason,N., and Lafferty,K.J. (1999). The role of CD4 and CD8 T cells in the development of autoimmune diabetes. *J Autoimmun* *13*, 285-290.
- Erlich,H.A., Griffith,R.L., Bugawan,T.L., Ziegler,R., Alper,C., and Eisenbarth,G. (1991). Implication of specific DQB1 alleles in genetic susceptibility and resistance by identification of IDDM siblings with novel HLA-DQB1 allele and unusual DR2 and DR1 haplotypes. *Diabetes* *40*, 478-481.
- Forrest,J.M., Menser,M.A., and Harley,J.D. (1969). Diabetes mellitus and congenital rubella. *Pediatrics* *44*, 445-447.
- Fuchtenbusch,M., Irnstetter,A., Jager,G., and Ziegler,A.G. (2001). No evidence for an association of coxsackie virus infections during pregnancy and early childhood with development of islet autoantibodies in offspring of mothers or fathers with type 1 diabetes. *J. Autoimmun.* *17*, 333-340.
- Gale,E.A. (2002). The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* *51*, 3353-3361.
- Gamble,D.R., Kinsley,M.L., FitzGerald,M.G., Bolton,R., and Taylor,K.W. (1969). Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br. Med. J.* *3*, 627-630.
- Gillespie,K.M., Bain,S.C., Barnett,A.H., Bingley,P.J., Christie,M.R., Gill,G.V., and Gale,E.A. (2004). The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet* *364*, 1699-1700.
- Giulietti,A., Gysemans,C., Stoffels,K., van,E.E., Decallonne,B., Overbergh,L., Bouillon,R., and Mathieu,C. (2004). Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* *47*, 451-462.
- Graves,P.M., Rotbart,H.A., Nix,W.A., Pallansch,M.A., Erlich,H.A., Norris,J.M., Hoffman,M., Eisenbarth,G.S., and Rewers,M. (2003). Prospective study of enteroviral infections and development of beta-cell autoimmunity. Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetes Res. Clin. Pract.* *59*, 51-61.

- Green,E.A., Eynon,E.E., and Flavell,R.A. (1998). Local expression of TNFalpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity* 9, 733-743.
- Hao,W., Serreze,D.V., McCulloch,D.K., Neifing,J.L., and Palmer,J.P. (1993). Insulin (auto)antibodies from human IDDM cross-react with retroviral antigen p73. *J. Autoimmun.* 6, 787-798.
- Heath,W.R. and Carbone,F.R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 47-64.
- Hermann,R., Knip,M., Veijola,R., Simell,O., Laine,A.P., Akerblom,H.K., Groop,P.H., Forsblom,C., Pettersson-Fernholm,K., and Ilonen,J. (2003). Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with Type 1 diabetes--indication of an increased environmental pressure? *Diabetologia* 46, 420-425.
- Hiltunen,M., Hyoty,H., Karjalainen,J., Leinikki,P., Knip,M., Lounamaa,R., and Akerblom,H.K. (1995). Serological evaluation of the role of cytomegalovirus in the pathogenesis of IDDM: a prospective study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 38, 705-710.
- Hindersson,M., Elshebani,A., Orn,A., Tuvemo,T., and Frisk,G. (2005). Simultaneous type 1 diabetes onset in mother and son coincident with an enteroviral infection. *J. Clin. Virol.* 33, 158-167.
- Honeyman,M.C., Coulson,B.S., Stone,N.L., Gellert,S.A., Goldwater,P.N., Steele,C.E., Couper,J.J., Tait,B.D., Colman,P.G., and Harrison,L.C. (2000). Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 49, 1319-1324.
- Honeyman,M.C., Cram,D.S., and Harrison,L.C. (1993). Glutamic acid decarboxylase 67-reactive T cells: a marker of insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 177, 535-540.
- Horwitz,M.S., Ilic,A., Fine,C., Rodriguez,E., and Sarvetnick,N. (2002). Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. *J. Clin. Invest* 109, 79-87.
- Hummel,M., Bonifacio,E., Naserke,H.E., and Ziegler,A.G. (2002). Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects. *Diabetes Care* 25, 1111-1116.
- Hyoty,H. and Taylor,K.W. (2002). The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 45, 1353-1361.
- Hyponen,E., Laara,E., Reunanen,A., Jarvelin,M.R., and Virtanen,S.M. (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358, 1500-1503.
- Ivarsson,S.A., Lindberg,B., Nilsson,K.O., Ahlfors,K., and Svanberg,L. (1993). The prevalence of type 1 diabetes mellitus at follow-up of Swedish infants congenitally infected with cytomegalovirus. *Diabet. Med.* 10, 521-523.

- Kaprio,J., Tuomilehto,J., Koskenvuo,M., Romanov,K., Reunanen,A., Eriksson,J., Stengard,J., and Kesaniemi,Y.A. (1992). Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 35, 1060-1067.
- Karounos,D.G., Wolinsky,J.S., and Thomas,J.W. (1993). Monoclonal antibody to rubella virus capsid protein recognizes a beta-cell antigen. *J. Immunol.* 150, 3080-3085.
- Karvonen,M., Viik-Kajander,M., Moltchanova,E., Libman,I., LaPorte,R., and Tuomilehto,J. (2000). Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 23, 1516-1526.
- Kaufman,D.L., Clare-Salzler,M., Tian,J., Forsthuber,T., Ting,G.S., Robinson,P., Atkinson,M.A., Sercarz,E.E., Tobin,A.J., and Lehmann,P.V. (1993). Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366, 69-72.
- Kimpimaki,T., Kupila,A., Hamalainen,A.M., Kukko,M., Kulmala,P., Savola,K., Simell,T., Keskinen,P., Ilonen,J., Simell,O., and Knip,M. (2001). The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 4782-4788.
- Knip,M. and Akerblom,H.K. (1999). Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107 Suppl 3, S93-100.
- Knip,M., Veijola,R., Virtanen,S.M., Hyoty,H., Vaarala,O., and Akerblom,H.K. (2005). Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2, S125-S136.
- Lammi,N., Karvonen,M., and Tuomilehto,J. (2005). Do microbes have a causal role in type 1 diabetes? *Med. Sci. Monit.* 11, RA63-RA69.
- Mathieu,C., Gysemans,C., Giulietti,A., and Bouillon,R. (2005). Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 48, 1247-1257.
- Mathis,D., Vence,L., and Benoist,C. (2001). beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414, 792-798.
- Miller,B.J., Appel,M.C., O'Neil,J.J., and Wicker,L.S. (1988). Both the L<sub>yt</sub>-2<sup>+</sup> and L<sub>3</sub>T<sub>4</sub><sup>+</sup> T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 140, 52-58.
- Muir,A., Ruan,Q.G., Marron,M.P., and She,J.X. (1999). The IDDMK(1,2)22 retrovirus is not detectable in either mRNA or genomic DNA from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 48, 219-222.
- Muntoni,S. and Muntoni,S. (2006). Epidemiological association between some dietary habits and the increasing incidence of type 1 diabetes worldwide. *Ann. Nutr. Metab* 50, 11-19.
- Myers,M.A., Mackay,I.R., Rowley,M.J., and Zimmet,P.Z. (2001). Dietary microbial toxins and type 1 diabetes--a new meaning for seed and soil. *Diabetologia* 44, 1199-1200.

- Nerup,J., Platz,P., Andersen,O.O., Christy,M., Lyngsoe,J., Poulsen,J.E., Ryder,L.P., Nielsen,L.S., Thomsen,M., and Svejgaard,A. (1974). HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2, 864-866.
- Nicoletti,F., Scalia,G., Lunetta,M., Condorelli,F., Di,M.M., Barcellini,W., Stracuzzi,S., Pagano,M., and Meroni,P.L. (1990). Correlation between islet cell antibodies and anti-cytomegalovirus IgM and IgG antibodies in healthy first-degree relatives of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 55, 139-147.
- Norris,J.M., Barriga,K., Klingensmith,G., Hoffman,M., Eisenbarth,G.S., Erlich,H.A., and Rewers,M. (2003). Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 290, 1713-1720.
- O'Shea,J.J., Ma,A., and Lipsky,P. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2, 37-45.
- Oldstone,M.B. (1990). Viruses as therapeutic agents. I. Treatment of nonobese insulin-dependent diabetes mice with virus prevents insulin-dependent diabetes mellitus while maintaining general immune competence. *J Exp Med* 171, 2077-2089.
- Onkamo,P., Vaananen,S., Karvonen,M., and Tuomilehto,J. (1999). Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 42, 1395-1403.
- Palmer,J.P., Helqvist,S., Spinas,G.A., Molvig,J., Mandrup-Poulsen,T., Andersen,H.U., and Nerup,J. (1989). Interaction of beta-cell activity and IL-1 concentration and exposure time in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 38, 1211-1216.
- Pastore,M.R., Bazzigaluppi,E., Belloni,C., Arcovio,C., Bonifacio,E., and Bosi,E. (2003). Six months of gluten-free diet do not influence autoantibody titers, but improve insulin secretion in subjects at high risk for type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88, 162-165.
- Pozzilli,P., Signore,A., Williams,A.J., and Beales,P.E. (1993). NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunol Today* 14, 193-196.
- Pugliese,A., Gianani,R., Moromisato,R., Awdeh,Z.L., Alper,C.A., Erlich,H.A., Jackson,R.A., and Eisenbarth,G.S. (1995). HLA-DQB1\*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* 44, 608-613.
- Rapoport,M.J., Jaramillo,A., Zipris,D., Lazarus,A.H., Serreze,D.V., Leiter,E.H., Cyopick,P., Danska,J.S., and Delovitch,T.L. (1993). Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 178, 87-99.
- Redondo,M.J. and Eisenbarth,G.S. (2002). Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia* 45, 605-622.
- Rewers,M. and Zimmet,P. (2004). The rising tide of childhood type 1 diabetes--what is the elusive environmental trigger? *Lancet* 364, 1645-1647.

- Roep,B.O., Arden,S.D., de Vries,R.R., and Hutton,J.C. (1990). T-cell clones from a type-1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. *Nature* 345, 632-634.
- Roep,B.O., Atkinson,M., and von Herrath,M. (2004). Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* 4, 989-997.
- Roep,B.O., Hiemstra,H.S., Schloot,N.C., de Vries,R.R., Chaudhuri,A., Behan,P.O., and Drijfhout,J.W. (2002). Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 958, 163-165.
- Savilahti,E., Akerblom,H.K., Tainio,V.M., and Koskimies,S. (1988). Children with newly diagnosed insulin dependent diabetes mellitus have increased levels of cow's milk antibodies. *Diabetes Res.* 7, 137-140.
- Sollid,L.M. (2000). Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 18, 53-81.
- Strachan,D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259-1260.
- Tillil,H. and Kobberling,J. (1987). Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 36, 93-99.
- Tisch,R. and McDevitt,H. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85, 291-297.
- Tisch,R., Yang,X.D., Singer,S.M., Liblau,R.S., Fugger,L., and McDevitt,H.O. (1993). Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366, 72-75.
- Tuomilehto,J., Tuomilehto-Wolf,E., Virtala,E., and LaPorte,R. (1990). Coffee consumption as trigger for insulin dependent diabetes mellitus in childhood. *BMJ* 300, 642-643.
- Tuvemo,T., Dahlquist,G., Frisk,G., Blom,L., Friman,G., Landin-Olsson,M., and Diderholm,H. (1989). The Swedish childhood diabetes study III: IgM against coxsackie B viruses in newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic children--no evidence of increased antibody frequency. *Diabetologia* 32, 745-747.
- Vaarala,O. (2000). The role of the gut in beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes: a hypothesis. *Pediatr. Diabetes* 1, 217-225.
- Vaarala,O., Knip,M., Paronen,J., Hamalainen,A.M., Muona,P., Vaatainen,M., Ilonen,J., Simell,O., and Akerblom,H.K. (1999). Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 48, 1389-1394.
- Virtanen,S.M., Hypponen,E., Laara,E., Vahasalo,P., Kulmala,P., Savola,K., Rasanen,L., Aro,A., Knip,M., and Akerblom,H.K. (1998). Cow's milk consumption, disease-associated autoantibodies and type 1 diabetes mellitus: a follow-up study in siblings of diabetic children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabet. Med.* 15, 730-738.
- von Herrath,M.G. and Oldstone,M.B. (1996). Virus-induced autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 8, 878-885.

- Ward,K.P., Galloway,W.H., and Auchterlonie,I.A. (1979). Congenital cytomegalovirus infection and diabetes. *Lancet I*, 497.
- Warram,J.H., Krolewski,A.S., Gottlieb,M.S., and Kahn,C.R. (1984). Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N. Engl. J. Med.* *311*, 149-152.
- Wilberz,S., Partke,H.J., Dagnaes-Hansen,F., and Herberg,L. (1991). Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* *34*, 2-5.
- Wilkin,T.J. (2001). The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. *Diabetologia* *44*, 914-922.
- Wong,F.S. and Janeway,C.A., Jr. (1999). The role of CD4 vs. CD8 T cells in IDDM. *J Autoimmun* *13*, 290-295.
- Yagi,H., Matsumoto,M., Kishimoto,Y., Makino,S., and Harada,M. (1991). Possible mechanism of the preventive effect of BCG against diabetes mellitus in NOD mouse. II. Suppression of pathogenesis by macrophage transfer from BCG-vaccinated mice. *Cell Immunol* *138*, 142-149.
- Yoon,J.W., Austin,M., Onodera,T., and Notkins,A.L. (1979). Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N. Engl. J. Med.* *300*, 1173-1179.
- Ziegler,A.G., Schmid,S., Huber,D., Hummel,M., and Bonifacio,E. (2003). Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* *290*, 1721-1728.
- Ziegler,R., Alper,C.A., Awdeh,Z.L., Castano,L., Brink,S.J., Soeldner,J.S., Jackson,R.A., and Eisenbarth,G.S. (1991). Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* *40*, 709-714.
- Zimmet,P.Z., Elliott,R.B., Mackay,I.R., Tuomi,T., Rowley,M.J., Pilcher,C.C., and Knowles,W.J. (1994). Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin in islet cell antibody positive presymptomatic type 1 diabetes mellitus: frequency and segregation by age and gender. *Diabet Med* *11*, 866-871.
- Zinkernagel,R.M., Planz,O., Ehl,S., Battegay,M., Odermatt,B., Klenerman,P., and Hengartner,H. (1999). General and specific immunosuppression caused by antiviral T-cell responses. *Immunol. Rev.* *168*, 305-315.