

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Imunologie



**Mgr. Jana Sklenářová**

**Možnosti predikce a imunointervence u diabetu 1. typu**

Possibilities of prevention and immunointervention in type 1 diabetes

*Disertační práce*

Školitel: Prof. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.

Praha, 2019

## **Bibliografický záznam**

SKLENÁŘOVÁ, Jana. *Možnosti predikce a imunointervence u diabetu 1. typu. [Possibilities of prevention and immunointervention in type 1 diabetes]*. Praha, 2019. 63 s., 4 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Pediatrická klinika a Interní klinika 2LF UK a FN v Motole .Vedoucí práce Prof. MUDr Kateřina Štechová, Ph.D.

## Anotace

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, při kterém dochází ke zničení insulin produkujících beta buněk Langerhansových ostrůvků imunitním systémem.

Destrukce těchto buněk je dlouhodobý proces, k jehož iniciaci dochází měsíce i roky před klinickou manifestací. Hlavní roli v něm hrají T lymfocyty, ale podílí se na něm i další buňky. Typická je přítomnost autoantilátka v krvi a to už před propuknutím onemocnění. V současné době probíhá intenzivní výzkum s cílem určit jedince ohrožené vznikem tohoto onemocnění a vyvinout jeho účinnou prevenci.

Během svého postgraduálního studia jsem se zabývala hlavně možnostmi predikce a prevence DM1. Zkoumali jsme zavedené markery autoimunitního procesu, autoantilátka, a to, zda reflektují buněčnou reaktivitu k autoantigenům GAD65 a IA2. Zjistili jsme, že reakce na autoantigeny je velmi individuální a je ovlivněna autoantilátkovým profilem pacientů, což má význam v plánování antigen specifických imunointervenčních studií a zvýšení efektivity těchto léčebných postupů. Dále jsme se snažili o zlepšení specificity a senzitivity markeru destrukce beta buněk (specificky demetylovaná DNA), který by přispěl k poznání dynamiky úbytku beta buněk a umožnil lépe vytipovat jedince ohrožené rozvojem DM1. Pro účinnou prevenci tohoto onemocnění je důležité dobře popsat jeho patogenezi, proto jsme mimo jiné zkoumali změny v zastoupení B lymfocytárních subpopulací u diabetiků při manifestaci, dlouhodobě léčených a jejich zdravých příbuzných. Největší odchylky jsme pozorovali u časných vývojových stádií B lymfocytů. Kromě toho jsme se zabývali propojením imunitního systému a metabolických změn provázejících DM1.

Přes intenzivní snahu o vývoj preventivní léčby DM1 jsou všechny pokusy zatím víceméně neúspěšné. Nespecifické tlumení imunitního systému je spojeno s nežádoucími účinky a antigen specifické postupy jsou v současné době neúčinné. Pro efektivní prevenci tohoto onemocnění je potřeba lépe poznat dynamiku a patogenezi autoimunitního procesu a přizpůsobit terapii na míru jednotlivým pacientům.

## **Annotation**

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is an organ-specific autoimmune disease characterised by autoimmune destruction of insulin-producing beta cells in the islets of Langerhans. It is a long-term process initiated months or even years prior to the clinical onset. The main role in the pathogenesis is played by T lymphocytes but other cell types are involved as well. The presence of autoantibodies in the circulation is typical even before the disease onset. Nowadays, intensive research is focused on finding individuals at risk and developing an effective prevention.

During my postgraduate studies I was involved mainly in the research of T1D prediction and prevention. We investigated the relationship of established autoimmune markers – autoantibodies – and the cellular reactivity to GAD65 and IA2 autoantigens. We discovered that the reaction to autoantigens is very individual and it is influenced by the patient's autoantibody profile. These results could be relevant in planning antigen-specific immunointervention studies and improving their efficacy. We also made an attempt to improve specificity and sensitivity of a beta cell destruction marker (specifically demethylated DNA), which would enable better understanding of the beta cell decline and identification of individuals at risk of T1D development. In order to develop efficient prevention of the disease it is important to understand its pathogenesis. We therefore studied changes in B lymphocyte subpopulations in peripheral blood of patients at disease onset, long-term treated and their healthy relatives. The most distinct differences were seen in the early developmental stages of B lymphocytes. We also addressed the interconnection of immune system and metabolic changes that accompany T1D.

Despite the intensive research, all the attempts to prevent T1D made up to date were more or less unsuccessful. Unspecific inhibition of the immune system causes adverse effects and antigen-specific treatment is as yet inefficient. Better knowledge of dynamics and pathogenesis of the autoimmune process and personalization of the therapy is vital for successful prevention of T1D.

## **Klíčová slova**

Diabetes mellitus 1. typu, predikční markery, autoprotilátky, autoantigeny, T lymfocyty, Th17 buňky, beta buňky, B lymfocyty, cirkulující DNA

## **Keywords**

Type 1 diabetes mellitus, prediction markers, autoantibodies, autoantigens, T lymphocytes, Th17 cells, beta cells, B lymphocytes, circulating free DNA

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne

Jana Sklenářová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svojí školitelce prof. MUDr. Kateřině Štechové, PhD. a také kolegům z laboratoře LMG a Pediatrické kliniky 2LF UK a FN v Motole za cenné rady, podporu a získané zkušenosti. Svě rodině děkuji za trpělivost, podporu a povzbuzení.

# Obsah

1 Úvod.....	11
1.1 Diabetes mellitus 1. typu.....	11
1.1.1 Definice DM1.....	11
1.1.2 Léčba a komplikace.....	11
1.1.3 Epidemiologie.....	12
1.2 Současný pohled na vznik DM1.....	13
1.3 Imunopatogeneze.....	15
1.3.1 Insulitis.....	15
1.3.2 Humorální a buněčná autoreaktivita.....	16
1.3.2.1 Autoantigeny a neoantigeny.....	16
1.3.2.2 T lymfocyty.....	18
1.3.2.3 B lymfocyty.....	19
1.4 Preklinická fáze DM1 a predikční markery.....	20
1.4.1 Stádia DM1.....	20
1.4.3 Autoprotilátky.....	21
1.4.4 Glukózové markery.....	22
1.4.4.1 FPIR.....	23
1.4.4.2 Porucha glukózové tolerance.....	23
1.4.5 Genetické markery.....	23
1.4.5.1 HLA.....	23
1.4.5.2 Non-HLA geny.....	25
1.4.6 Betabuněčné markery.....	26



1.5 Možnosti intervenčních zásahů u DM1.....	28
1.5.1 Anti-CR3 protilátky.....	28
1.5.2 Blokace kostimulace T lymfocytů.....	29
1.5.3 Tregs.....	29
1.5.4 Antigen specifická terapie.....	29
1.6 Metabolismus glukózy a imunitní systém.....	30
2 Komentované publikace.....	31
2.1 Příloha 1.....	31
2.1.1 Úvod.....	31
2.1.2 Výsledky a diskuze.....	32
2.2 Příloha 2.....	34
2.2.1 Úvod.....	34
2.2.2 Výsledky a diskuze.....	35
2.3 Příloha 3.....	38
2.3.1 Úvod.....	38
2.3.2 Výsledky a diskuze.....	39
2.4 Příloha 4.....	43
2.4.1 Úvod.....	43
2.4.2 Výsledky a diskuze.....	44
3 Závěr.....	47
Seznam zkratk.....	49
Použitá literatura.....	51
Přílohy.....	64

## **1 Úvod**

### **1.1 Diabetes mellitus 1. typu**

#### **1.1.1 Definice DM1**

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, při kterém dochází ke zničení beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu imunitním systémem. Důsledkem je nedostatek insulínu, hormonu zásadního pro regulaci glukózového metabolismu. Insulin má v těle řadu účinků, z nichž nejdůležitější je regulace transportu glukózy z krve do buněk. Absence insulínu vede k hyperglykémii a nedostatku glukózy v buňkách. Mezi hlavní příznaky onemocnění patří váhový úbytek, zvýšená žízeň, časté močení a únava. Neléčená hyperglykémie vede k tvorbě ketoláték v organismu (tzv. diabetická ketoacidóza), celkovému metabolickému rozvratu, narušení vědomí, kómatu a smrti.

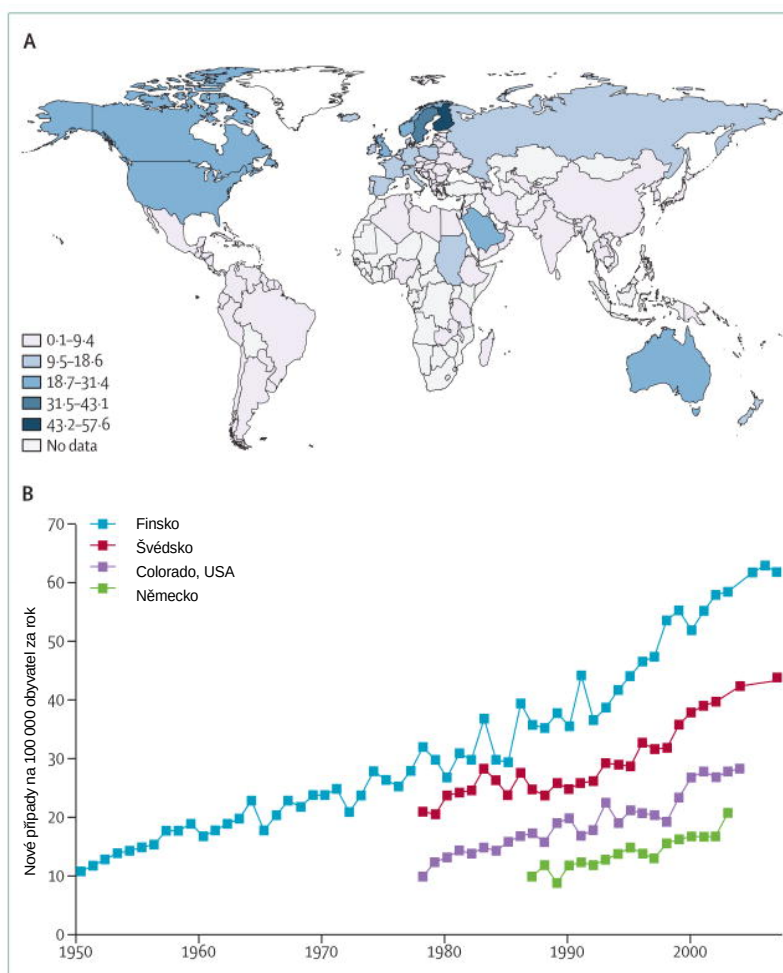
#### **1.1.2 Léčba a komplikace**

V současné době není dostupná žádná kauzální léčba a pacienti jsou tak doživotně závislí na substitučním podávání insulínu v injekční formě. Navzdory substituci insulínu je ale obtížné dosáhnout zcela fyziologické koncentrace glukózy v krvi a pacienti se tak potýkají s řadou akutních i chronických komplikací.

Mezi akutní komplikace patří hypoglykémie, hyperglykémie a diabetická ketoacidóza. Hypoglykémie vyvolaná nepřiměřenou dávkou insulínu, nadměrnou fyzickou námahou nebo nízkým příjmem potravy, může vést až k život ohrožujícímu hypoglykemickému kómatu. Diabetická ketoacidóza vzniká při nedostatku insulínu, kdy jsou jako náhradní energetické zdroje mobilizovány mastné kyseliny, jejichž štěpením vznikají ketolátky. Velké množství ketoláték v krvi způsobuje metabolickou acidózu. Při ketoacidóze je v krvi také nadbytek glukózy, která nemůže v potřebné míře vstupovat do buněk. Tato hyperglykémie je ještě zhoršována jaterní glukoneogenezí, která není dostatečně blokována insulínem, ale je naopak stimulována zvýšenou produkcí stresových hormonů (kortizol atd.). Chronické komplikace jsou výsledkem dlouhodobého působení hyperglykémie. Zvýšená glykémie navozuje neenzymatickou glykaci proteinů, která narušuje jejich funkci a také zhoršuje oxidativní stres organismu. Důsledkem je poškození cév, které se nejčastěji projevuje jako postižení ledvin, sítnice oka, nervů (tzv. diabetická mikroangiopatie) a akcelerovaná ateroskleróza (makroangiopatie). I přes pokroky v léčbě vede DM1 k významnému snížení kvality života jedince a představuje významnou zátěž i ze socioekonomického hlediska.

### 1.1.3 Epidemiologie

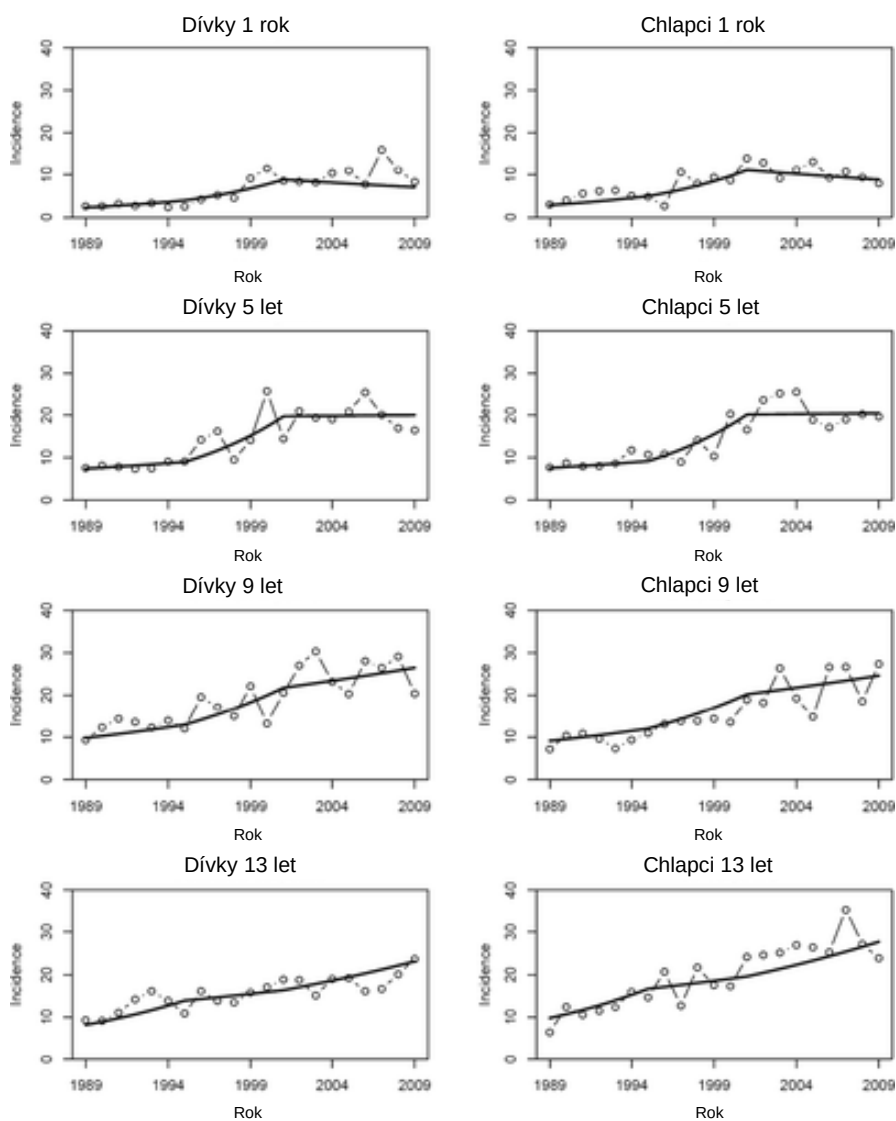
DM1 se může vyvinout v jakémkoliv věku, častější je manifestace v dětství a časně dospělosti. Nejvyšší incidence je ve většině populací v období puberty. Celosvětově se incidence DM1 zvyšuje zhruba od druhé poloviny 20. století [1]. Zatímco většina autoimunitních onemocnění postihuje spíše ženy, u DM1 je patrná mírná převaha mezi muži [2]. Incidence a prevalence DM1 se velmi liší podle geografických podmínek. Nejčastější je DM1 ve Finsku (> 60 případů na 100 000 obyvatel za rok) a na Sardinii (40 případů na 100 000 obyvatel za rok) [3], naopak vzácný je DM1 v Indii nebo Venezuele (0,1 případů na 100 000 obyvatel za rok) [4].



Obrázek 1. Incidence DM1 u dětí ve věku 0–14 let podle regionů a v průběhu času. Převzato a upraveno dle [5].

Nárůst incidence nepostihuje všechny věkové skupiny rovnoměrně, v Evropě byl největší nárůst incidence pozorován u dětí mladších 5 let [6].

Také v české populaci počet případů DM1 dlouhodobě stoupá. Silný nárůst incidence byl patrný zejména mezi lety 1996–2001, v letech 2002–2009 byl nárůst následován stagnací (viz obrázek 2) [7]. Data z 22 evropských zemí (včetně Česka) z let 1989–2013 ukazují, že incidence ve většině zemí roste ve všech věkových kategoriích (0–4, 5–9, 10–14 let). Průměrná rychlost nárůstu je 3,4 % za rok [8].



Obrázek 2. Nárůst incidence DM1 v ČR mezi lety 1989–2009. Převzato a upraveno dle [7].

## 1.2 Současný pohled na vznik DM1

Rozvoj DM1 je komplexní děj, na kterém se přibližně stejnou měrou podílí jak genetická predispozice, tak faktory vnějšího prostředí. Destrukce beta buněk je dlouhodobý proces. K iniciaci imunitní reakce proti beta buňkám dochází měsíce a často i roky před klinickou manifestací onemocnění. Preklinická fáze je charakteristická výskytem autoprotištěk proti insulinu (IAA), 65 kDa izoformě dekarboxylázy kyseliny glutamové (GAD65), antigenu asociovanému s inzulinomem (insulinoma-associated antigen 2 – IA2), zinkovému transportéru 8 (ZnT8) a dalších [9].

Do dnešní doby bylo identifikováno víc jak 40 genů asociovaných s DM1. Sílu asociace lze vyjádřit pomocí poměru pravděpodobností (odds ratio, OR) V tomto případě OR znamená poměr pravděpodobnosti, že pacient s DM1 má danou alelu a pravděpodobnosti, že pacient alelu nemá. Nejsilnější je asociace HLA regionu, který obsahuje několik genů a vykazuje extrémní polymorfismus (OR DR-DQ haplotypů se pohybuje od 0,02 do > 11). Druhá nejsilnější je asociace promotorové oblasti insulinového genu (OR 2,38). Jediné další geny, jejichž OR je vyšší než 1,5 jsou PTPN22 a IL2R. Většina ostatních alel má OR v rozmezí 1,1–1,3 [10].

Většina nositelů rizikových alel nicméně DM1 nerozvine a 80–90% pacientů nemá prvostupňového příbuzného s DM1, což ukazuje na silný vliv negenetických faktorů. Autoimunitní reakce proti beta buňkám obvykle začíná velmi brzy v životě jedince (první autoprotištěky se objevují už mezi prvním a druhým rokem života [11]. V některých studiích byl prokázán vliv kojení a způsobu porodu na riziko rozvoje DM1 [12]. Metanalýza z roku 2012 naznačuje protektivní vliv kojení na rozvoj DM1 [13]. Studie TRIGR (Trial to reduce IDDM in the genetically at risk) zkoumala vliv podávání náhrady mateřského mléka obsahující celé proteiny kravského mléka a umělého mléka ze silně hydrolyzovaného kaseinu kojencům do 8 měsíců věku. Do studie bylo zahrnuto přes 5000 účastníků z 15 zemí. Podávání hydrolyzovaného mléka nemělo vliv na rozvoj DM1 ani výskyt autoprotištěk [14].

Ve studii The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) nebyl prokázán vliv podávání antibiotik mezi 3 měsíci a 4 lety věku na výskyt autoprotištěk u dětí s vyšším genetickým rizikem [15]. Studie týkající se vlivu očkování na rozvoj DM1 zatím nepřinesly jasný výsledek. Očkování proti *Haemophilus influenzae* B bylo asociováno se zvýšeným rizikem DM1 [16] a očkování BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) s rychlejší progresí onemocnění [17, 18]. Na druhou stranu další studie neprokázaly vliv očkování proti dávivému kašli (pertuse), spalničkám + příušnicím + zarděnkám, *haemophilus influenzae* typu B, hepatitidě B, neštovicím (varicella), tetanu, dětské obrně, meningokoku, pneumokoku, klíšťové encefalitidě (TBE) ani chřipce [19 – 21].

Mezi nejčastěji diskutované vlivy patří virové infekce, zejména enteroviry. Ve finské studii Diabetes prediction and prevention (DIPP) byla prokázána časová korelace mezi prvním výskytem autoprotištěk a přítomností virové RNA v séru [22, 23]. Potenciální vysvětlení vlivu virových infekcí

na destrukci beta buněk může být přímý cytologický efekt virů nebo spuštění autoimunitního procesu, který postupně vede k destrukci beta buněk. Kromě toho byla pozorována strukturní podobnost mezi virovými a ostrůvkovými proteiny (molekulární mimikry) [12].

V poslední době se hodně diskutuje vliv střevní mikroflóry. Gastrointestinální trakt obsahuje velké množství imunitních buněk a představuje rozhraní pro interakci imunitního systému s mikroorganismy. Kromě přímé interakce s imunitním systémem střevní mikroorganismy dále ovlivňují hostitelský organismus svými metabolity vznikajícími fermentací nevstřebaných živin. Komezální organismy také představují bariéru proti kolonizaci patogenními druhy [24]. Finská studie porovnávající střevní mikrobiom u 18 protilátkově pozitivních (AB+) a 18 protilátkově negativních (AB-) dětí (z kohort TRIGR a FINDIA) zjistila zvýšené množství bakterií rodu *Bacteroides* a naopak snížené množství rodu *Bifidobacterium* a snížení laktát a butyrát produkujících bakterií u AB+ dětí [25]. Longitudinální analýza střevního mikrobiomu 22 AB+ a 22 AB- dětí ze studie BABYDIET ukázala rozdílné interakční sítě ve věku 6 a 24 měsíců, ale ne rozdíly ve složení ani diverzitě mikrobiomu [24]. Multicentrická studie TEDDY, která sbírá data o dětech z USA, Německa, Švédska a Finska ukázala, že složení mikrobiomu je velmi výrazně ovlivněno geograficky [15]. Longitudinální finská studie našla u AB+ dětí zvýšené množství *Bacteroides dorei* oproti AB- skupině. Množství *B. dorei* u AB+ dětí bylo nejvyšší mezi 7. a 8. měsícem věku a předcházelo detekci první autoprotilátky [26]. Analýza 11 dětí, ze kterých 4 po dobu sledování manifestovaly DM1 a 22 AB- dětí (z Finska a Estonska) ukázala sníženou diverzitu mikrobiomu během progresu k DM1 [27]. Ve Finsku a Estonsku je 5–6× vyšší incidence DM1 a dalších autoimunitních onemocnění než v sousedící ruské Karélii. 222 finských, estonských a ruských dětí (z regionu Karélie) bylo sledováno od narození do 3 let věku. Složení mikrobiomu korelovalo s geografickou lokací: rod *Bacteroides* byl více zastoupen u finských a estonských dětí a méně u ruských. LPS rodu *Bacteroides* je strukturně odlišné od LPS *E.coli* a méně aktivuje imunitní systém. Časná kolonizace méně imunogenními druhy zřejmě může ovlivňovat nastavení imunitního systému [28].

## **1.3 Imunopatogeneze**

### ***1.3.1 Insulitis***

Destrukce insulin produkujících beta buněk je doprovázena infiltrací imunitních buněk do ostrůvků pankreatu, tzv. insulitidou. Studium insulitidy je do značné míry limitováno obtížností přístupu k lidskému pankreatu. Většina poznatků proto pochází ze studia zvířecího modelu (non-obese diabetic mouse – NOD myš). V posledních letech se ale díky organizaci Network of Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD) [29] podařilo analyzovat vzorky od širšího spektra pacientů s DM1 a získat tím jasnější představu o insulitidě v různých fázích onemocnění.

Oproti NOD modelu je infiltrace pankreatických ostrůvků u lidí poměrně mírná a postihuje pouze malou část ostrůvků. Pseudoatrofické ostrůvky (obsahující všechny ostatní endokrinní buňky kromě beta buněk) se mohou vyskytovat současně s normálními ostrůvky a ostrůvky obsahujícími infiltrované imunitní buňky. Destruktivní proces probíhá lobulárně – často jsou nacházeny velké oblasti pankreatu obsahující pseudoatrofické ostrůvky vedle rozsáhlých oblastí obsahující nepostižené ostrůvky. Na rozdíl od NOD modelu nebyla u lidí popsána fáze předcházející infiltraci uvnitř ostrůvků, kdy se T lymfocyty hromadí na vnějším okraji (peri-insulitis) a svou organizací připomínají terciární lymfoidní orgán. Překvapivě byla insulitis popsána pouze u malého množství pacientů v preklinické fázi onemocnění (u dvou z celkem 72 studovaných případů protilátkově pozitivních jedinců bez klinického onemocnění) [30]. Naopak podobné je u lidského diabetu i NOD myši složení infiltrátu s převahou CD8+ T lymfocytů. Za nejpočetnějšími CD8+ T lymfocyty následují makrofágy (CD68+), CD4+ T lymfocyty, B lymfocyty (CD20+) a plasmatické buňky (CD138+) [31]. U pacientů s čerstvým záchytem DM1 lze rozlišit dva odlišné typy složení infiltrujících buněk, které se vzájemně liší zastoupením CD20+ B lymfocytů. Pacienti, kterým byl DM1 diagnostikován do 7 let věku, mají vyšší zastoupení CD20+ B lymfocytů (CD20Hi profil), zatímco pacienti, kteří manifestovali DM1 po 13 roce života, mají nižší zastoupení CD20+ B lymfocytů (CD20Lo profil). Pacienti, u kterých se vyvinul DM1 mezi 7 a 13 lety, mohou mít CD20 Hi či CD20 Lo profil. Zdá se, že tyto dva typy insulitidy jsou různě agresivní a destrukce beta buněk u pacientů s CD20Hi profilem probíhá rychleji [32].

Ačkoliv poruchu funkce pozorujeme pouze v případě insulin produkujících beta buněk, imunitní odpověď se neomezuje pouze na Langerhansovy ostrůvky, ale postihuje i exokrinní část pankreatu [33].

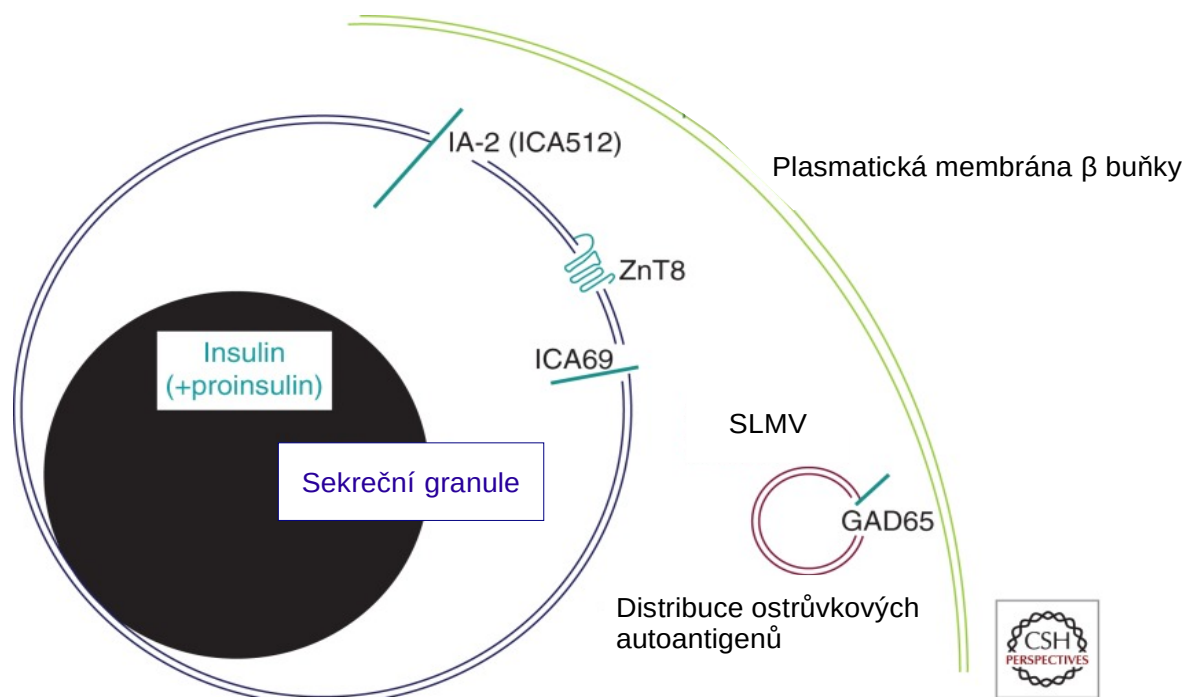
### ***1.3.2 Humorální a buněčná autoreaktivita***

#### ***1.3.2.1 Autoantigeny a neoantigeny***

Ze všech genů asociovaných s DM1 mají nejsilnější vztah k rozvoji onemocnění HLA alely. Proteiny kódované HLA geny určují repertoár peptidů prezentovaných imunitnímu systému a hrají centrální roli v adaptivní imunitní odpovědi. Antigeny rozpoznávané T a B buňkami nejsou zcela identické, ale do značné míry se překrývají. Mezi nejdůležitější dosud popsané autoantigeny patří insulin, GAD65, IA2, phogrin (IA-2beta), IGRP a ZnT8 [34]. Kromě insulinu nejsou tyto molekuly specifické pro beta buňky a vyskytují se i v jiných tkáních.

Úkolem beta buněk je regulovaná sekrece insulinu jako odpověď na metabolické potřeby organismu. Množství insulinu uvolňované při metabolickém podnětu může být vyšší, než je buňka schopna najednou vytvořit. Proto je insulin syntetizován do zásoby a skladován v sekrečních granulích v cytoplazmě. Většina dosud identifikovaných autoantigenů je součástí sekreční dráhy insulinu (viz

obrázek 3). Je možné, že opakovaná povrchová expozice může za určitých podmínek vést k iniciaci autoimunitního procesu. Následným poškozením beta buněk se imunitnímu systému odhalují další dosud skryté antigeny a dochází k rozšíření repertoáru rozeznávaných epitopů [35].



Obrázek 3. Umístění hlavních DM1 autoantigenů v beta buňkách. Sekreční váček obsahuje insulin a částečně také nezkonvertovaný proinsulin. V membráně sekrečního váčku se nacházejí další 3 důležité autoantigeny: IA2, islet cell autoantigen 69 kDa (ICA69) a ZnT8. GAD65 je lokalizován stranou od ostatních antigenů v menších váčcích podobných synaptickým (synaptic-like microvesicles – SLMVs). Převzato a upraveno dle [35].

Zatím není známo, proč jsou tyto molekuly rozpoznávány imunitním systémem navzdory mechanismům centrální a periferní tolerance. Jedním z důležitých procesů může být vznik neoantigenů posttranslační modifikací proteinů na periférii. Posttranslační modifikace mohou měnit vlastnosti epitopů, jejich vazbu na HLA I. a II. třídy a jejich rozpoznávání TCR [36].

Tkáňová transglutamináza (tTG) je enzym zodpovědný mimo jiné za modifikaci glutenu a gliadinu na (u celiakie) alergenní formu deaminací glutaminu na glutamát. tTG se vyskytuje i v ostrůvcích a bylo zjištěno, že může deaminovat proinsulin, čímž zvyšuje jeho afinitu k rizikovým HLA-DQ molekulám [37]. Deaminovaný proinsulin byl rozpoznáván T lymfocyty u většiny pacientů při manifestaci DM1.



Deaminované epitopy byly také izolovány z dendritických buněk kultivovaných s nativními ostrůvkovými antigeny [38].

Další potenciálně významná modifikace proteinů je konverze v proteinech vázaného argininu na nestandardní aminokyselinu citrulin enzymy peptidylarginin deaminázami (PADs). Citrulinace peptidů GAD65 vede k lepší vazbě na HLA-DR4 molekuly a tyto HLA komplexy jsou rozpoznávány CD4+ T lymfocyty DM1 pacientů [39].

Neoantigeny vzniklé fúzí peptidových fragmentů byly rozpoznávány klony CD4+ T lymfocytů izolovaných z NOD myši a CD4+ T lymfocytárními liniemi izolovanými z residuálních ostrůvků dárců pankreatu [40]. Důležitou roli při vzniku neoantigenů hraje lokální zánětlivé prostředí [36].

### ***1.3.2.2 T lymfocyty***

T lymfocyty jsou dlouhodobě považovány za nejdůležitější buněčnou populaci v destrukci ostrůvků. Jejich význam v tomto ději je dobře zdokumentován na zvířecím modelu DM1 (NOD myš a BB potkan). Odstranění zralých T lymfocytů u těchto dvou modelových organismů zabrání rozvoji DM1 [41 – 44]. Naopak adoptivní transfer T lymfocytů specifických pro ostrůvkové antigeny vede ke vzniku onemocnění [44, 45].

Slinivka je poměrně špatně přístupný orgán a zkoumat autoimunitní proces přímo v místě je extrémně obtížné. Biopsie představuje pro pacienta přílišné riziko a získat materiál od kadaverózních dárců je poměrně náročné a teprve v poslední době se díky iniciativě nPOD daří získávat větší množství dat tímto způsobem. Většina studií se tedy spoléhá na imunitní buňky z periferní krve.

Populace T lymfocytů v periferní krvi u diabetiků vykazují určité změny oproti zdravým kontrolám. U pacientů s DM1 bylo detekováno více cirkulujících autoreaktivních T lymfocytů s prozánětlivým fenotypem, než u zdravých kontrol [46]. Autoreaktivní T lymfocyty mají také u DM1 pacientů spíše fenotyp paměťových buněk, zatímco u zdravých kontrol se jedná spíše o naivní T lymfocyty [47, 48]. Paměťové T lymfocyty jsou spojovány s recidivou DM1 po transplantaci ostrůvků či pankreatu [49 – 51]. Autoreaktivní T lymfocyty produkují spíše prozánětlivé cytokiny u DM1 pacientů a spíše regulační cytokiny u zdravých kontrol [52, 53]. U DM1 pacientů byla zjištěna snížená funkce regulačních T buněk a rezistence efektorových T buněk k supresi Tregs [54 – 56].

Jedna z mála studií T lymfocytů v tkáních relevantních pro vývoj DM1 se zabývala klonální diverzitou a distribucí klonů T buněk [57]. Od 18 dárců (nPOD) s délkou trvání DM1 4–32 let byly získány vzorky tkáně pankreatu, pankreatických a jiných lymfatických uzlin a periferní krev. Sekvence TCR beta řetězce v těchto tkáních umožnila porovnat repertoár TCR a sdílení klonů mezi jednotlivými tkáněmi. Diverzita TCR ani sdílení TCR mezi tkáněmi se nelišilo u pacientů a kontrol. U obou skupin

byl minimální překryv TCR regulačních a konvenčních T buněk v pankreatických mízních uzlinách. Toto zjištění nepodporuje hypotézu fenotypové nestability Tregs a jejich konverzi na efektorové T lymfocyty. Autoreaktivní TCR byly častější u DM1 dárců. CDR3beta sekvence již dříve popsaného GAD65 klonu (GAD4.13) byla nalezena v několika tkáních u cca 40 % DM1 dárců. Sekvence TCR sdílené více jedinci by mohly představovat klíčové odpovědi a cíle případné imunoterapie.

Ve studii z roku 2015 byly z ostrůvků dárce s DM1 izolovány T lymfocyty, které byly *ex vivo* kultivovány a testovány na reaktivitu k peptidům proinsulinu (překrývající se sekvence, které dohromady tvořily celou molekulu) a vybrané peptidy z GAD65, IA2, IGRP, ZnT8 a HSP-6 (dříve identifikované jako CD4+ epitopy). Žádný z klonů T lymfocytů ale nebyl stimulován žádným testovaným peptidem. Všechny klony, u kterých byl identifikován rozpoznávaný epitop byly vázány na HLA-DQ8 nebo HLA-DQ8 trans-dimery [58].

V další podobné studii [59] byly ostrůvky získány od 9 dárců s DM1. Izolované ostrůvky byly rozděleny do 2 alikvot. V první alikvotě byla tkáň rozmělněna enzymy a buňky sortovány pomocí FACS. Poměr CD4+ a CD8+ lymfocytů byl 1 : 7. T buňky byly dále kultivovány a expandovány. U kontrolní skupiny (sedm zdravých jedinců a dva dárce s diabetem 2. typu – DM2) bylo v ostrůvcích nalezeno pouze několik CD8+ buněk u jednoho dárce. Ve druhé alikvotě byly ostrůvky kultivovány na gelové matrix a stimulovány TCR agonistou a cytokiny. Po deseti dnech kultivace došlo k pomnožení lymfocytů pouze u dárců s DM1 v průměru u 26 % ostrůvků. Tyto buňky byly dále expandovány. Z obou alikvot bylo získáno 50 T buněčných linií, které byly testovány na reaktivitu ke známým ostrůvkovým peptidům a modifikovaným peptidům. U 18 z nich byla nalezena reaktivita k proinsulinu, GAD65 a IA2 a několika modifikovaným peptidům.

### **1.3.2.3 B lymfocyty**

Role B lymfocytů v patogenezi DM1 není tak jednoznačná jako u T lymfocytů. DM1 je charakteristický přítomností autoprotilátek, jejich role v destrukci ostrůvků je ovšem nejasná. Samotné autoprotilátky k destrukci ostrůvků nestačí [60]. Nezanedbatelný význam B buněk v patogenezi DM1 byl prokázán na NOD modelu: myši s normálním počtem T lymfocytů, ale chybějícími B lymfocyty ne onemocní DM1 [61].

Roli B lymfocytů v patogenezi DM1 potvrzuje i klinická studie ve které podání anti-CD20 protilátky (rituximab) pacientům krátce po manifestaci DM1 mělo vliv na zachování zbytkové sekrece insulínu po dobu 1 roku [62]. B lymfocyty jsou přítomné mezi buňkami infiltrujícími ostrůvky pankreatu (podrobněji popsáno v kapitole 1.3.1 Insulinitis) a jejich množství má zřejmě vliv na rychlost progresu onemocnění [32]. Hlavní význam B lymfocytů tkví pravděpodobně v rozpoznání autoantigenů a jejich prezentaci T lymfocytům. Tento proces také vysvětluje přítomnost autoprotilátek.

B lymfocyty vznikají v kostní dřeni, kde probíhá negativní selekce (autoreaktivní klony jsou eliminovány apoptoticky) a odkud se uvolňují tzv. „transitional“ B lymfocyty do periferie.

„Transitional“ B lymfocyty dále diferencují na B lymfocyty marginální zóny (MZ) a naivní folikulární B lymfocyty (F0). MZ B lymfocyty produkují IgM a jsou nezávislé na pomoci T buněk. Naivní B lymfocyty vyžívají po setkání s antigenem, kdy migrují do sekundárních lymfoidních orgánů, kde spolupracují s T lymfocyty. Spoluprací s T lymfocyty vznikají paměťové B lymfocyty a plasmatické buňky.

U DM1 pacientů lze pozorovat změny v zastoupení některých subpopulací B lymfocytů v periferní krvi. Porovnání dospělých pacientů s DM1, LADA (late autoimmune diabetes in adults), DM2 a zdravých kontrol ukázalo, že pacienti s DM1 a LADA mají zvýšené množství MZ B buněk a snížené množství F0 B buněk v porovnání se zdravými jedinci a pacienty s DM2. Pacienti s DM1 mají nejnižší zastoupení regulačních IL10 produkujících B lymfocytů, zatímco zdravé osoby mají nejvyšší množství těchto buněk. Frekvence MZ B lymfocytů a frekvence F0 B buněk pozitivně koreluje s lačným C peptidem. Frekvence B buněk produkujících IL10 koreluje negativně s hladinou glykovaného hemoglobinu [63].

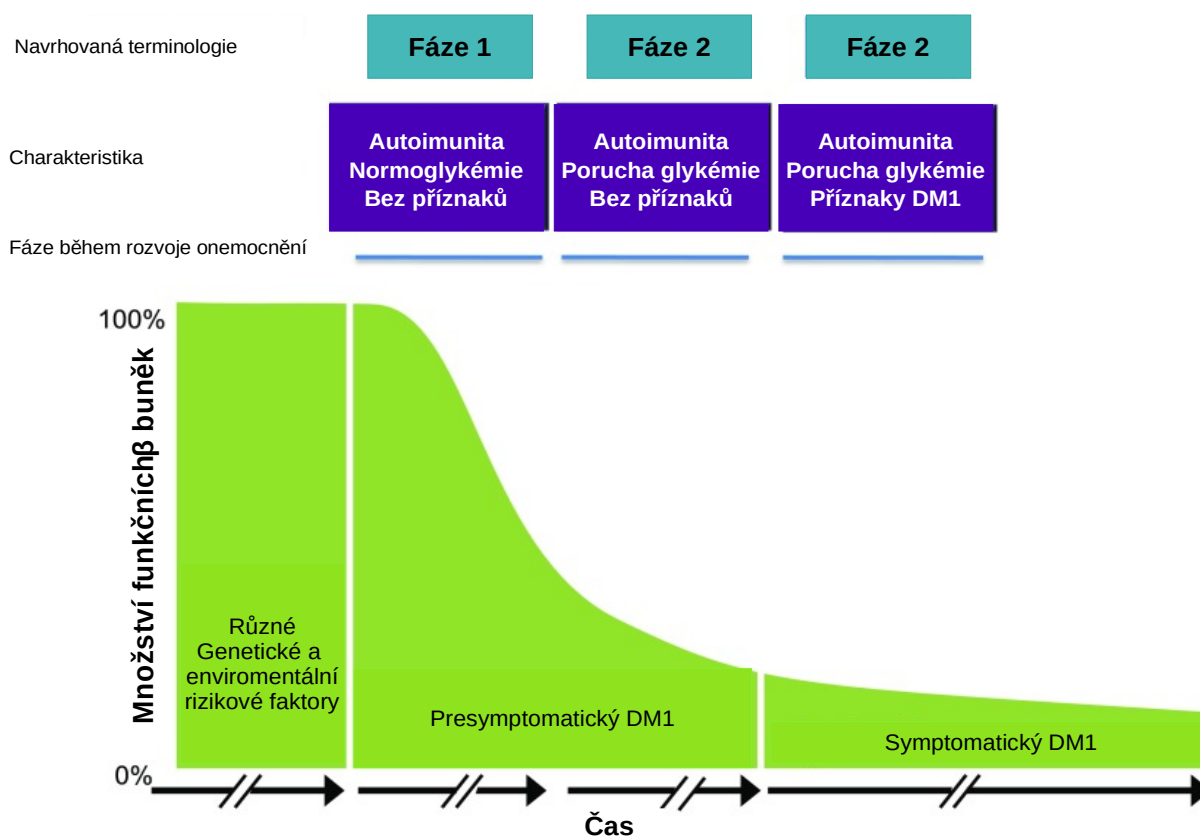
Anergie je stav, kdy při chronické stimulaci antigenem nedochází k vyvolání účinné imunitní odpovědi. Anergie vyžaduje průběžnou BCR stimulaci vedoucí k aktivaci fosfatáz [64]. Populace anergických B lymfocytů ( $B_{ND}$ ) v periferní krvi tvoří za normálních podmínek cca 2,5 % všech periferních B lymfocytů a je charakteristická fenotypem naivních IgD+ IgM- B lymfocytů. Z této populace nese 75 % buněk autoreaktivní receptor. V populaci  $B_{ND}$  jsou přítomné insulin rozpoznávající buňky u zdravých jedinců, ale ne u pacientů před a po manifestaci DM1. Pacienti více jak rok manifestaci mají stejné množství  $B_{ND}$  jako kontrolní skupina. To naznačuje porušení anergického stavu během autoimunitního procesu a participaci na vzniku DM1 [65].

## **1.4 Preklinická fáze DM1 a predikční markery**

### **1.4.1 Stádia DM1**

Prohlášení JDRF (Juvenile Diabetes Research Foundation), Endocrine Society a American Diabetes Association z roku 2015 dělí DM1 na několik stádií (viz obrázek 4) [66]. V prvním stádiu jsou přítomné dvě a více autoprotilátky, ale glykémie je normální a neprojevují se žádné klinické příznaky. Ve druhém stádiu se k protilátkám přidává porušená glukózová tolerance (viz kapitola 1.4.4 Glukózové markery), ale stále bez klinických příznaků. Třetí stádium je klinicky manifestní DM1 (autoprotilátky, hyperglykémie, polyurie, polydipsie, váhový úbytek.) Samotná přítomnost rizikových HLA alel je klasifikována jako předstádium 1. Během progresu onemocnění jednotlivými stádii dochází postupně ke snižování masy beta buněk. Zastavení autoimunitního procesu je tedy žádoucí

v co nejčasnější fázi, dokud ještě zbývá dostatek funkčních beta buněk. Primární prevencí se rozumí zásah u jedinců nesoucích rizikové geny (předstádium 1); sekundární prevence je zásah během preklinické fáze onemocnění (stádium 1 a 2); terciární prevence je potom intervence u nově manifestovaných diabetiků (stádium 3). I terciární prevence má svůj význam a zachování nebo prodloužení zbytkové sekrece insulinu může přispívat ke zlepšení kvality života pacientů.



Obrázek 4. Masa beta buněk a charakteristika jednotlivých stádií DM1. Převzato a upraveno dle [66].

#### 1.4.2 Predikční markery

#### 1.4.3 Autoprotilátky

Nejzásadnějším markerem pro detekci preklinického stádia DM1 je výskyt autoprotilátek. V různých kohortách dětí (BABYDIAB a BABYDIET, TEDDY, DIPP) sledovaných longitudinálně od narození byly autoprotilátky poprvé detekovány nejčastěji mezi 9 a 24 měsíci věku. Jako první se zpravidla objeví autoprotilátky proti insulinu, někdy lze jako první detekovat GAD65 autoprotilátky. Jen zřídka

se nejdříve objeví autoprotilátky proti IA2 a ZnT8 [11, 67, 68]. Výskyt autoprotilátek v raném věku je častější u dětí s rizikovými HLA alelami a pořadí výskytu autoprotilátek souvisí s HLA-DQ genotypem. V kohortě TEDDY se u dětí s genotypem HLA-DQ2/8, DQ8/8 a DQ4/8 jako první objevily protilátky proti insulinu, zatímco u dětí s genotypem DQ2/2 se jako první objevily protilátky proti GAD65 [11]. Čím více autoantigenů je rozpoznávaných protilátkami, tím vyšší je riziko progresu do DM1. U dětí z DAISY (Diabetes autoimmune study in the young), DIPP a BABYDIAB-BABYDIET kohort se DM1 manifestoval do 15 let od serokonverze u 12,7 % dětí s jednou protilátkou, 61,6 % dětí se dvěma protilátkami a 79,1 % dětí se třemi protilátkami [9]. Přítomnost dvou a více autoprotilátek už představuje poměrně vysoké riziko rozvoje DM1. Např. v americké studii DAISY se u protilátkově pozitivních dětí vyvinul diabetes do 5 let od serokonverze v 43,5 % případech, v německé studii BABYDIAB a BABYDIET se DM1 vyvinul u 69,7 % do 10 let a ve finské studii DIPP u 84,2 % do 15 let od serokonverze [9]. Dá se předpokládat, že celoživotní riziko rozvoje u jedinců s rizikovým genotypem a 2 a více protilátkami se blíží 100 %. Rychlejší progresu k DM1 je spojená s nižším věkem při manifestaci a rizikovým genotypem (DQ2/DQ8) [9, 69]. Rychlost progresu v přítomnosti dvou a více protilátek závisí na titru, afinitě a typu autoprotilátky [11, 69, 70].

V Bavorsku (Německo) byla v roce 2015 zahájena studie Fr1da [71] která hledá autoprotilátkově pozitivní děti v obecné populaci. Děti jsou vyšetřovány u praktického lékaře při pravidelné prohlídce ve 3 a 4 letech. Dětem pozitivním na více autoprotilátek je nabídnuta účast v intervenční studii.

#### 1.4.4 Glukózové markery

Postupným snižováním masy beta buněk dochází k poruchám glukózového metabolismu. Poruchy glykémie lze testovat pomocí měření lačné glykémie, zátěžových glukózových testů (OGTT, ivGTT) nebo glykovaného hemoglobinu (HbA1c), viz tabulka 1.

Parametr	Popis
OGTT	Test hodnotí schopnost organismu udržet normální glykémii po orálním podání glukózy. Glykémie se měří před testem a dále v 60. a 120. minutě po vypití glukózového roztoku. Tento test se často používá ve studiích preklinické fáze DM1 a k hodnocení rizika rozvoje DM1.
MMTT	Jedná se o obdobu OGTT, ale místo glukózového roztoku se používá nápoj se standardizovaným obsahem sacharidů tuků a proteinů.

ivGTT	Test sleduje glykémii a / nebo hladinu C peptidu (resp. inzulinémii) po intravenózním podání glukózy. Umožňuje vyhodnocení první fáze insulinové sekrece (FPIR – fist-phase insulin response). Snížení FPIR je časný marker poškození funkce beta buněk. *
HbA1c	Glykovaný hemoglobin se používá jako měřítko průměrné glykémie za 2–3 měsíce před měřením. Glykovaný hemoglobin vzniká neenzymatickou glykací hemoglobinu a odráží koncentraci glukózy v krvi po celou dobu existence erytrocytu (cca 120 dní). Jednotkou dle IFCC je mmol/mol (dříve %).

*Tabulka 1. Metabolické testy pro měření poruch glykémie.*

\* *Slinivka reaguje na zvýšení koncentrace glukózy v krvi již během několika minut uvolněním zásob insulinu ze zásobních granulí (FPIR). Po této první rychlé fázi nastává po cca 20–30 minutách druhá fáze při které se vylučuje nově vytvořený insulin. Sekrece insulinu se liší při intravenózním (ivGTT) a perorálním (OGTT) podáním glukózy. Pokud glukózu podáme orálně a do krve se vstřebá přes střevo, dochází ke stimulaci sekrece inkretinů a výlevu přibližně dvakrát většího množství insulinu než při intravenózním nebo intraperitoneálním podání stejného množství glukózy. Tento jev se nazývá inkretinový efekt.*

#### **1.4.4.1 FPIR**

Snížená odpověď FPIR u protilátkově pozitivních jedinců je prediktorem progresu do DM1 [72, 73]. U dětí ze studie Diabetes prevention trial – 1 (DPT-1) bylo pozorováno výrazné snížení FPIR v průběhu 18 měsíců předcházejících manifestaci DM1 [74]. FPIR byla snížena už 4–6 let před diagnózou DM1 a její pokles se zrychluje poslední 2 roky před manifestací (DIPP studie) [75].

#### **1.4.4.2 Porucha glukózové tolerance**

Definice porušené glukózové tolerance se v jednotlivých studiích může mírně lišit. Nejčastěji se jedná o jedno nebo více z následujících kritérií: a) lačná glykémie 6,1 – 6,9 mmol/l, b) při provedení OGTT jako glykémie 7,8 – 11,1 mmol/l v čase 120 min nebo c) glykémie  $\geq 11$  mmol/l v časech 30, 60 a 90 min [76]. České normy udávají rozmezí 5,6 – 6,9 mmol/l. Porušená glukózová tolerance je prediktorem progresu DM1 [76].

#### **1.4.5 Genetické markery**

Vzhledem k polygennímu charakteru DM1 a nezanedbatelnému vlivu faktorů prostředí nelze rozvoj DM1 predikovat pouze na základě genetických markerů. Většina nositelů rizikových alel DM1 nerozvine. I tak se ale jedná o užitečný nástroj, hlavně pro přípravu klinických studií.

### 1.4.5.1 HLA

Riziko DM1 je z největší míry určeno geny HLA komplexu, a to hlavně genotypem HLA-DQA1, -DQB1 a subtypy -DRB1\*04. V české populaci jsou s DM1 asociované alely DQB1\*0302, DQB1\*0201 a DQA1\*03. Naopak protektivní vliv mají alely DQB1\*0602, DQB1\*0301, DQB1\*0503, DQB1\*0603, DQA1\*01 a DQA1\*02. Ze subtypů DRB1\*04 má protektivní vliv DRB1\*0403. Z DQA1-DQB1 genotypů představuje největší riziko HLA-DQA1\*05-DQB1\*0201/DQA1\*03-DQB1\*0302 (OR = 116) [77].

V programu predikce diabetu PREDIA.CZ např. používáme pětistupňovou škálu genetického rizika založenou na HLA viz tabulka 2.

Úroveň	Kritérium pro zařazení do skupiny
<b>silně zvýšené</b>	DQA1*05-DQB1*0201/DQA1*03-DQB1*0302 pozitivní
<b>zvýšené</b>	DQA1*05-DQB1*0201/X nebo DQB1*0302/X, kde X není DQB1*0602, DQB1*0301, DQB1*0603
<b>průměrné</b>	a) Negativní současně na: DQB1*0302, DQA1*05-DQB1*0201, DQB1*0602, DQB1*0301, DQB1*0603 b) Děti s genotypy DQB1*0301/0302 nebo DQB1*0302/0603
<b>snížené</b>	DQB1*0301/X nebo DQB1*0603/X, kde X není DQB1*0302 ani DQB1*0602
<b>velmi nízké</b>	DQB1*0602/X, kde X je jakákoliv alela

Tabulka 2. Skupiny genetického rizika dle HLA a vstupní parametry pro zařazení do skupin.

Někdy se pro popis HLA používá označení pomocí sérotypů. MHC (major histocompatibility complex) antigeny byly objeveny při transplantacích pokusech a jsou zodpovědné za odhojování nekompatibilních transplantátů. Dříve se pro vyšetření HLA používala detekce genových produktů HLA genů (MHC proteiny) pomocí protilátek. Jedna protilátka může rozpoznávat několik genových produktů a jednomu sérotypu tak může odpovídat několik alel. Příklad sérotypů a genotypů relevantních pro určení rizika DM1 je uveden v tabulce 3.

sérotyp	subtypy	DQA	DQB
DQ2	2.2	0201	0202
	2.3	0302	0202
	2.5	0501	0201
DQ4	4.3	0301	0402
		0302	0402
	4.4	0401	0402
DQ8	8.1	0301	0302
		0302	0302

Tabulka 3. Jednotlivé sérotypy mohou mít několik subtypů kódovaných různými alelami. Pokud jsou geny pro alfa a beta podjednotku na stejném chromozomu (geneticky vázané) označují se jako haplotyp. Některé haplotypy představují zvýšené riziko pro rozvoj autoimunitních onemocnění.

#### 1.4.5.2 Non-HLA geny

Pomocí celogenomových asociačních studií (GWAS) bylo identifikováno více jak 60 DM1 rizikových variant v non-HLA genech. U většiny z těchto genů je OR nižší než 1,3. Mezi non-HLA rizikové geny patří např. *INS*, *PTPN22*, *CTLA-4* nebo *IL2RA*. Objev těchto genů byl přínosný pro porozumění mechanismu vzniku DM1, nicméně přítomnost některé z těchto variant má jen velmi malý dopad na celkové riziko vzniku DM1 [78, 79].

Pro určení míry rizika rozvoje polygenních onemocnění se často používají skóre rizika spočítaná pomocí statistických metod (genetic risk scores). Winkler et al. (BABYDIAB kohorta) ukázali, že analýza non-HLA genů může zpřesnit predikci rozvoje DM1 nebo progresu DM1 u protilátkově pozitivních dětí. Pro predikci DM1 u dětí s rizikovým HLA bylo nejlepší skóre získané zahrnutím 8 genů: *IFIH1*, *CTLA4*, *PTPN22*, *IL18RAP*, *SH2B3*, *KIAA0350*, *COBL* a *ERBB3* [80]. Přidání 9 jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism SNP) *PTPN22*, *INS*, *IL2RA*, *ERBB3*, *ORMDL3*, *BACH2*, *IL27*, *GLIS3* a *RNLS* signifikantně zlepšuje predikci DM1 oproti použití pouze HLA genů [81]. Podobná studie na kohortě DAISY ukázala, že přidání *PTPN22* a *UBASH3A* k typizaci HLA také zpřesnila predikci DM1 [82].



Gen pro insulin obsahuje repetitivní oblasti VNTR (variable number tandem repeats), které ovlivňují riziko vzniku DM1. Nejvyšší riziko mají homozygotní nositelé VNTR třídy I (krátké opakování), naopak nízké riziko mají nositelé VNTR třídy III (dlouhé opakování). Délka opakování ovlivňuje expresi insulinové mRNA v thymu a tím zřejmě vývoj tolerance k insulinu [83].

*PTPN22* je gen kódující fosfatázu LYP, která potlačuje aktivaci T lymfocytů. Varianta LYP asociovaná s vyšším rizikem DM1 („gain of function varianta“) inhibuje signalizaci TCR a podporuje přežívání autoreaktivních T lymfocytů v thymu [84].

CTLA-4 je molekula negativně regulující kostimulaci T lymfocytů vazbou na jejich CD80/86 receptory. Polymorfismus v *CTLA-4* vede ke změnám v posttranskripční regulaci [85].

#### **1.4.6 Betabuněčné markery**

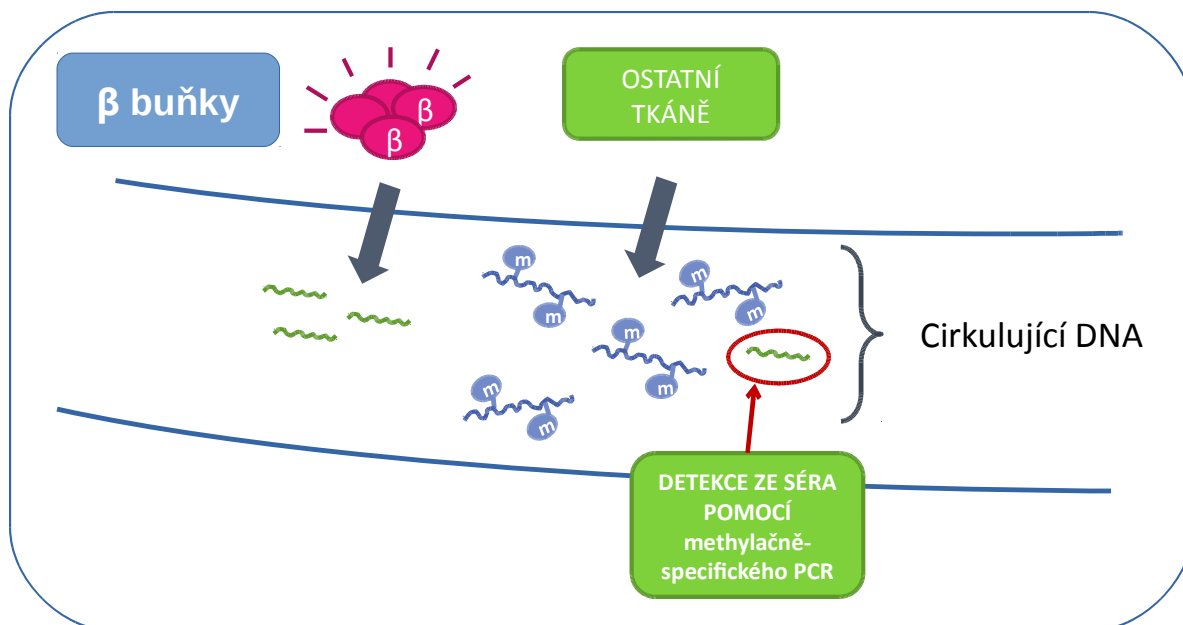
Poznatky o dynamice úbytku beta buněk a progresi DM1 během preklinické fáze jsou zatím poměrně omezené, protože nemáme k dispozici metodu měření množství beta buněk v organismu a ani metodu detekce jejich smrti.

Způsoby měření masy beta buněk pomocí zobrazovacích technologií (PET, MRI) jsou v současné době zkoumány, zatím však není k dispozici žádná dostatečně přesná metoda [86, 87].

Mechanismus smrti beta buněk v patogenezi DM1 není přesně známý, zdá se ale, že zahrnuje jak nekrózu (cytolytické působení T lymfocytů) tak apoptózu (mediovanou TNF a Fas/FasL) [87] Akirav et al. v roce 2011 navrhli neinvazivní metodu detekce poškození beta buněk pomocí měření specificky demethylované cirkulující DNA v séru. Diagnostické využití volné cirkulující DNA je intenzivně zkoumáno hlavně v oblasti nádorových onemocnění (tzv. „liquid biopsy“).

Methylace DNA slouží k epigenetické regulaci genové exprese. Methylová skupina může být připojena na 5' pozici cytosinu v CpG dinukleotidu. Methylace DNA zabráňuje vazbě regulačních faktorů a ovlivňuje strukturu chromatinu. Methylace (CpG bohatých) promotorů vede k umlčení genové exprese [88].

Tato metoda předpokládá, že insulinový gen (*INS*) obsahuje CpG demethylované pouze v beta buňkách (kde je insulin exprimován), zatímco v ostatních tkáních těla jsou tato místa methylovaná. Demethylovaná *INS* DNA, kterou lze detekovat v oběhu by tedy měla pocházet z beta buněk (obrázek 5).



Obrázek 5. Princip detekce smrti beta buněk pomocí specificky demethylované DNA.

První testování této metody na klinických vzorcích se zdálo být nadějně. Transientní zvýšení množství demethylované *INS* DNA k krevním oběhu bylo popsáno u pacientů po transplantaci pankreatických ostrůvků [89]. Poměrné zastoupení demethylované / methylované *INS* DNA bylo vyšší u čerstvě manifestovaných diabetiků [90, 91] a u několika vzorků pacientů v prediabetu [92]. M. Fisher et al. používají pro vyjádření výsledků nikoliv poměr, ale absolutní čísla. Tímto způsobem dokázali, že DM1 je asociován nejen se zvýšeným množstvím demethylované DNA (pocházející z beta buněk), ale i se zvýšeným množstvím methylované DNA (která může pocházet z jakékoliv jiné tkáně) [93]. Právě zvýšené množství volné DNA, které se hypoteticky může uvolňovat např. z krevních buněk během zpracování vzorku, endoteliálních buněk vlivem kolísající glykémie či z imunitních buněk během autoimunitního či jiného zánětu může představovat problém. Methylace či demethylace CpG v *INS* genu totiž není 100% specifická [89]. Dalším problémem může být specifická PCR reakce, kde se často detekuje rozdíl v 1 či 2 nukleotidech a při řádovém nadbytku methylované DNA může docházet k nespecifické vazbě primerů a tak vznikat falešně pozitivní signál nemethylované DNA.

## 1.5 Možnosti intervenčních zásahů u DM1

Navzdory vývoji nových analogů insulínu a pokrokům v technologiích umožňujících monitoring hladiny glukózy v krvi, většina pacientů nedosahuje optimální kontroly glykémie. DM1 představuje pro pacienty jak psychickou, tak fyzickou zátěž. Proto je důležitý výzkum terapeutických postupů umožňujících zachování zbytkové sekrece insulínu, zastavení autoimunitní destrukce beta buněk a prevence rozvoje tohoto onemocnění. Bylo prokázáno, že pacienti se zbytkovou sekrecí insulínu mají

menší výkyvy glykémie a lepší hodnoty HbA1c [94]. V současné době probíhá většina klinických studií u čerstvě manifestovaných pacientů, ale provádějí se i preventivní studie u jedinců s vysokým rizikem rozvoje DM1.

První pokusy o zastavení autoimunitního procesu proběhly již před delší dobou, a to pomocí imunosupresivních látek jako je cyklosporin, azathioprin či prednison. Ačkoliv přinesly pozitivní výsledky v podobě snížení dávky insulínu až kompletní remise u čerstvě manifestovaných pacientů, tento efekt nebyl trvalý a terapie byla spojená s výraznými vedlejšími účinky [95, 96]. Ačkoliv jsou novější přístupy specifitější a bezpečnější, zatím se nepodařilo dosáhnout výrazného a trvalého terapeutického efektu.

### **1.5.1 Anti-CD3 protilátky**

Vzhledem ke klíčové roli T lymfocytů v patogenezi DM1 je logické, že velké množství imunoterapeutických postupů cílí právě na tyto buňky. Příkladem je využití anti-CD3 protilátek (otelixizumab, teplizumab), které inhibují aktivaci T buněk a vedou k jejich depleci. Efektorové T lymfocyty (Teffs) jsou citlivější k působení anti-CD3 protilátek než T regulační buňky (Tregs). Podání otelixizumabu pacientům krátce po manifestaci DM1 vedlo k vyššímu zachování sekrece endogenního insulínu (C peptidu) a experimentální skupina měla oproti kontrolní nižší dávky insulínu. Avšak u více než 75 % pacientů užívajících otelixizumab došlo k reaktivaci EBV (virus Epstein-Barrové) [97].

Aby nedocházelo k reaktivaci EBV, byla v následující studii DEFEND-1 a DEFEND-2 použita nižší dávka otelixizumabu, to ale mělo za následek ztrátu účinnosti [98, 99].

V podobné studii zkoumající vliv anti-CD3 protilátky teplizumab nebyl po dvou letech od počátku léčby rozdíl v hodnotě HbA1c ani v dávce insulínu, ale skupina užívající vyšší dávku léku měla vyšší hladinu C peptidu, jehož produkce odráží endogenní sekreci insulínu [100].

### **1.5.2 Blokáce kostimulace T lymfocytů**

Jinou strategií zacílenou na T lymfocyty je blokáce kostimulačního signálu CD28-CD80/86. Abatacept je chimerický protein CTLA-4 a Fc části IgG, který se váže na CD80/86 receptor antigen prezentujících buněk a blokuje tak aktivaci, diferenciaci a proliferaci T lymfocytů. Jeho podávání pacientům krátce po manifestaci DM1 vedlo k lepšímu zachování C peptidu u experimentální skupiny [101].

Zdá se, že tyto přípravky mohou zpomalit ztrátu produkce insulínu, ale bohužel se nejedná o trvalý efekt.

### 1.5.3 Tregs

Funkce Tregs bývá u autoimunitních onemocnění narušená či utlumená. Přenos *ex vivo* expandovaných Tregs chrání NOD myši před onemocněním DM1 [102]. Tento postup je testován i u pacientů s DM1. Z periferní krve pacientů jsou izolovány Tregs, tyto buňky jsou následně kultivovány a namnoženy *in vitro* a poté aplikovány zpět pacientovi. Fáze 1 klinické studie ukázala, že tyto buňky dlouhodobě přežívají a vykazují stabilní fenotyp a zvýšenou regulační aktivitu. Tento postup neměl výrazné vedlejší účinky [103].

### 1.5.4 Antigen specifická terapie

Cílem antigen specifické terapie je tolerizace autoreaktivních T<sub>H</sub>1 a expanze autoantigen specifických Tregs. Výhodou tohoto přístupu je odbourání nežádoucí celkové imunosuprese organismu. Tolerizace k antigenu může být dosažena různými mechanismy: navozením klonální anergie, delecí nebo vyčerpání. Toho lze dosáhnout podáním vysoké dávky solubilního antigenu (vakcinace antigenem). Výsledek tolerizace je ovlivněn dávkou antigenu, frekvencí a způsobem podání. Zcela zásadní je samozřejmě výběr antigenu.

Ve studii DPT-1 byl insulin podáván orálně protilátkově pozitivním příbuzným DM1 pacientům. Ačkoliv nebyl prokázán rozdíl mezi experimentální a placebo skupinou, pozitivní efekt byl pozorován u podskupiny pacientů s vysokou hladinou IAA protilátek [104].

Neúspěšná byla studie (fáze II a fáze III) podávající GAD65-alum vakcínu čerstvě manifestovaným diabetikům. Pokles C peptidu (sekrece během MMTT) se nelišil mezi skupinami [105].

Intradermální podání peptidu C19-A3 (část proinsulinu) čerstvě manifestovaným diabetikům (fáze I, testováno na 24 subjektech) vedlo ke zvýšení peptid specifických CD4<sup>+</sup> Tr1 buněk a FoxP3 Tregs. U některých subjektů došlo k zachování sekrece C peptidu a tedy i k zachování endogenní sekrece insulinu [106].

Podávání samotného antigenu zatím nepřináší očekávané výsledky. Skupina B. Roepa se pokusila o zlepšení účinnosti antigen specifické tolerizace tak, že navrhla DNA vakcínu obsahující celou molekulu proinsulinu. Plasmid byl vytvořen se sníženým množstvím prozánětlivých hexanukleotidových motivů, které se váží na TLR9 a další DNA senzory a aktivují imunitní odpověď. Intramuskulární podání DM1 pacientům do 5 let od manifestace vedlo k vyšší hladině C peptidu oproti placebo skupině. Bylo pozorováno snížené množství proinsulin specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (ale ne ostatních CD8<sup>+</sup> T lymfocytů) [107].

Další způsob zlepšení účinku tolerizace může být enkapsulace antigenu do malých částic, které mají delší poločas *in vivo* než samotné molekuly antigenů. Spolu s antigenem mohou být enkapsulovány i

další imunomodulační látky např. rapamycin, cytokiny, „antisense“ oligonukleotidy [108, 109]. Tyto postupy jsou zatím testovány na preklinických modelech.

### **1.6 Metabolismus glukózy a imunitní systém**

Je známo, že diabetici jsou více náchylní k infekcím, které mají navíc často horší průběh. Častější jsou například infekce patogeny *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, infekce gramnegativními bakteriemi či infekce mykotické [110]. Chronická hyperglykemie zvyšuje oxidativní stres organismu a ovlivňuje imunitní systém. Hyperglykémie snižuje chemotaktickou migraci neutrofilů, jejich fagocytickou aktivitu a baktericidní mechanismy [111]. Glukóza narušuje opsonizaci mikroorganismů C3 složkou komplementu [112], glykace imunoglobulinů snižuje jejich funkci. Na pacienta s dekompenzovaným diabetem (a zvláště, pokud jsou již přítomné chronické komplikace či další komorbidity) je potřeba pohlížet jako na člověka se sekundárním imunodeficitem [113].

## 2 Komentované publikace

### 2.1 Příloha 1

#### **The cytokine production of peripheral blood mononuclear cells reflects the autoantibody profile of patients suffering from type 1 diabetes.**

**Labikova J, Vcelakova J, Ulmannova T, Petruzelkova L, Kolouskova S, Stechova K.**

Cytokine. 2014 Oct; 69(2):189-95. doi: 10.1016/j.cyto.2014.06.013. Epub 2014 Jul 1.

#### 2.1.1 Úvod

Již mnoho studií se pokoušelo zastavit rozvoj DM1 různými zásahy do imunitního systému. Některé nescifické imunointervenční postupy jsou sice schopné oddálit propuknutí DM1, zároveň ale celkově tlumí imunitní systém a jsou doprovázeny nežádoucími účinky (jako například reaktivace EBV). Cílem ideální preventivní terapie je navození tolerance ke specifickým autoantigenům a přitom nenarušit funkci imunitního systému. Postupy, které se snaží o navození tolerance k autoantigenům jsou úspěšné na zvířecích modelech, ale v klinické praxi selhávají. Většina studií použila k tolerizaci jeden vybraný antigen. Například v preventivní studii DPT-1 nebyl prokázán pozitivní efekt orálního podávání insulínu protilátkově pozitivním jedincům. Signifikantní pozitivní účinek byl ale pozorován u podskupiny subjektů s vysokou hladinou IAA protilátek (v intervenční skupině vyvinulo DM1 za rok 6,2 % jedinců, zatímco u placebo skupiny to bylo 10,4 %) [104]. V této studii jsme proto zkoumali zda protilátkový profil pacientů odráží reaktivitu lymfocytů k autoantigenům.

Ve studii byly použity vzorky periferní krve od 40 dětí s DM1 a 11 zdravých kontrol. Ze vzorků byly vyšetřeny hladiny autoprotilátek proti GAD65 a IA2 a HbA1c (vypovídá o průměrné glykémii za posledních 4–6 týdnů). Hladina IAA protilátek je u DM1 pacientů ovlivněna užíváním exogenního insulínu, proto jsme je v této studii neanalyzovali. Podle hladiny autoprotilátek jsme pacienty rozdělili do čtyř skupin: s vysokou hladinou obou autoprotilátek (skupina DP: GAD65, IA2 > 3 U/ml), s vysokou hladinou GAD65 (skupina GAD: GAD65 > 3 U/ml; IA2 < 3 U/ml), s vysokou hladinou IA2 (skupina IA2: IA2 > 3 U/ml; GAD65 < 3 U/ml) a skupina s nízkými titry obou protilátek (skupina LOW: GAD65, IA2 < 3 U/ml).

Pomocí gradientové centrifugace na Ficollu jsme z krve izolovali mononukleární buňky, které byly zamrazeny. Po rozmrazení jsme ve vzorku změřili zastoupení buněčných populací (T lymfocyty, B lymfocyty, NK buňky, Tregs a monocyty), buňky jsme dále kultivovali se syntetickými antigeny GAD65 (celý protein) a IA2 (peptid aminokyseliny 853–872) po dobu 48 hodin. Buňky byly

stimulovány třemi různými koncentracemi autoantigenů, jako pozitivní kontrolu jsme použili PHA (phytohemaglutinin). Autoantigeny použité v této studii jsme vybrali na základě výsledků workshopu Immunology of Diabetes Society T cell workshop [114, 115] a na základě našich dřívějších zkušeností [116, 117]. Po 72 hodinách kultivace s antigeny jsme měřili produkci prozánětlivých cytokinů IFN $\gamma$  a IL17 pomocí metody ELISPOT. Kvůli nenormálnímu rozložení dat a opakovanému měření vzorku (více koncentrací antigenů) jsme výsledky analyzovali pomocí GLM modelu (generalised linear mixed model) s náhodným efektem pacienta. Efekt interakce mezi způsobem stimulace a protilátkovým profilem jsme testovali pomocí chí kvadrát testu.

### 2.1.2 Výsledky a diskuze

Odpověď na stimulaci autoantigeny byla u jednotlivých pacientů velmi individuální. V použitém modelu jsme prokázali signifikantní interakci mezi způsobem stimulace a protilátkovým profilem pacientů. Oproti nestimulovaným buňkám jsme pozorovali jak snížení, tak i zvýšení, popř. žádnou změnu v produkci cytokinů. Tyto výsledky by mohly přispět k vysvětlení neúspěchu antigen-specifických imunointervenčních studií. Např. v již zmíněné DPT-1 studii orální podávání insulínu mělo pozitivní efekt u skupiny pacientů s vysokými titry IAA, a naopak negativní dopad u ostatních [104]. Reakce na autoantigeny se tedy u jednotlivých pacientů může lišit. Navíc reakce *in vivo* je ovlivněná způsobem podání, dávkou, načasováním či zvoleným adjuvans.

Bez ohledu na typ stimulace jsme u zdravých kontrol (skupina HC) naměřili nižší produkci IL17 oproti skupinám DP, GAD a IA2. Ve skupině LOW byla produkce signifikantně nižší než ve skupině IA2. Zdá se tedy, že vysoké hladiny autoprotilátek (reflektující aktivní autoimunitu) jsou spojené se zvýšenou produkcí IL17. To je v souladu s dalšími studiemi, které ukazují na význam Th17 v patogenezi DM1.

IL17 je exprimován v pankreatu NOD myši a jeho inhibice během efektorové fáze onemocnění vede oddálení onemocnění [118, 119]. U pacientů s DM1 byla v porovnání se zdravými kontrolami pozorována zvýšená frekvence IL17 produkujících CD4+ a CD8+ buněk [114, 116]. Větší množství Th17 buněk a také zvýšená sekrece IL17 po stimulaci GAD65 a proinsulinem byla prokázána v pankreatických lymfatických uzlinách pacientů [55].

Ve vzorku PBMC jsme měřili zastoupení vybraných buněčných populací a sledovali jsme vztah k cytokinové produkci a protilátkovému profilu. Hladina IA2 protilátek korelovala pozitivně s množstvím CD8+ a negativně s množstvím CD4+ T lymfocytů. Vysoká hladina IA2 autoprotilátek byla také asociována se zvýšenou produkcí IL17. Snížené množství CD4+ T buněk se tedy zřejmě týká jiných subpopulací než Th17. CD8+T lymfocyty se významně podílejí na zničení beta buněk. Protilátky proti IA2 jsou asociované se zvýšeným rizikem časného a rychlejšího rozvoje DM1 [120].

Funkční beta buňky a residuální sekrece insulínu lze detekovat po určitou dobu od manifestace onemocnění (u některých jedinců po velmi dlouhou dobu) [121]. Je tedy možné, že u IA2 pozitivních jedinců je autoimunitní proces stále aktivní a je reflektován vyšší produkcí IL17 a zvýšeným množstvím CD8+T buněk v periferní krvi.

Naopak GAD65 autoprotilátky jsou spojené s pomalejší klinickou progresí DM1 a vyšším věkem manifestace onemocnění [122]. Hladina GAD65 protilátek v naší studii pozitivně korelovala s množstvím Tregs. Pomalejší progresi DM1 může být způsobena mimo jiné regulačním působením Tregs, které se snaží tlumit autoimunitní proces. Korelace Tregs a GAD65 autoprotilátek podporuje tuto hypotézu. Již několik studií se zabývalo množstvím a supresivní funkcí Tregs v periferní krvi DM1 pacientů. Jedna z nich [123] našla u DM1 pacientů snížené množství Tregs (definované jako CD4+CD25<sup>high</sup> T lymfocyty). Další tři studie ale toto zjištění nepotvrdily [124 – 126]. My jsme naopak našli zvýšené množství Tregs (CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>) u pacientů se zvýšenou hladinou GAD65 a IA2 autoprotilátek v porovnání se zdravými kontrolami. Tento rozdíl může být způsoben rozdílnou definicí populace Tregs. Marker CD25 (alfa řetězec IL2 receptoru) není exprimován pouze na Tregs, ale také na aktivovaných T efektorových buňkách. Z tohoto důvodu se v novějších studiích používají další markery (např. CD127 nebo FoxP3). Množství Tregs také může záležet na stádiu onemocnění, a tedy autoimunitního procesu.

V této studii jsme se zabývali vlivem autoprotilátkového profilu DM1 pacientů na reaktivitu PBMC k autoantigenům. Reakce na stimulaci autoantigeny byla velmi individuální a byla ovlivněna autoprotilátkovým profilem. Je zřejmé, že imunointervenční postupy je nutné v budoucnu přizpůsobit individuálním potřebám jednotlivých pacientů.



## 2.2 Příloha 2

### **Alteration of B cell subsets and the receptor for B cell activating factor (BAFF) in paediatric patients with type 1 diabetes.**

Parackova Z, Klocperk A, Rataj M, Kayserova J, Zentsova I, Sumnik Z, Kolouskova S, Sklenarova J, Pruhova S, Obermannova B, Petruzelkova L, Lebl J, Kalina T, Sediva A.

Immunol Lett. 2017 Sep;189:94-100. doi: 10.1016/j.imlet.2017.04.009. Epub 2017 Apr 14.

#### 2.2.1 Úvod

B lymfocyty jsou v kontextu DM1 již dlouho známé jako buňky produkující s diabetem asociované autoantilátky (IAA, GAD65, IA2, ZnT8 a další). Nyní se však ukazuje, že jejich role ve vývoji tohoto onemocnění je komplexnější. B lymfocyty jsou přítomné mezi buňkami infiltrujícími pankreatické ostrůvky [31] a jejich množství v infiltrátu ovlivňuje rychlost destrukce beta buněk [32]. Významná pro rozvoj DM1 je zejména prezentace autoantigenů T lymfocytům a porucha v tolerogenních mechanismech B buněk [127]. V NOD modelech s MHC I nebo MHC II deficientními B lymfocyty, nedochází k rozvoji diabetu, čili prezentace antigenu CD4+ i CD8+ lymfocytům je pro rozvoj onemocnění důležitá [128, 129]. U NOD myši, kterým chybí B lymfocyty sice dochází k infiltraci, ale insulitida nevede k destrukci ostrůvků [61,130]. B lymfocyty infiltrující ostrůvky mají zvýšenou expresi MHC I. a II. třídy a také CD80 a CD86 molekul [129, 131]. Zásadní je tedy zřejmě interakce T a B buněk.

U pacientů s DM1 byly pozorovány změny v zastoupení některých subpopulací B lymfocytů. Např. ve studii Smith et al. [132] byla pozorována absence populace anergických (včetně vysokoafinitních insulin reaktivních) B lymfocytů z periferní krve u pacientů při manifestaci a u protilátkově pozitivních prediabetických subjektů. Autoři vyslovují hypotézu, že tyto buňky byly buď aktivovány a / nebo migrují do tkání. Snížení populace anergických B lymfocytů bylo také pozorováno u části zdravých sourozenců DM1 pacientů, kteří nesou HLA geny rizikové pro rozvoj DM1.

B lymfocyty prodělávají v organismu komplexní vývoj. Jsou tvořeny v kostní dřeni, kde probíhá přeskupování imunoglobulinového genu. Po vytvoření a povrchové expresi funkčního IgM jsou nezralé IgM+ B buňky testovány na reaktivitu k autoantigenům. B lymfocyty, které projdou negativní selekcí poté migrují periferií do sleziny jako takzvané „transitional“ B buňky. „Transitional“ B buňky mají dvě stádia: T1 (na periferii a při vstupu do sleziny) a T2 (ve slezině). Ve slezině diferencují buď na naivní folikulární (F0) B lymfocyty nebo na B lymfocyty marginální zóny (MZ). Naivní B buňky

jsou aktivovány po setkání s antigenem a v periferních lymfoidních orgánech dokončují svůj vývoj (ve spolupráci s T lymfocyty) na paměťové a plasmatické buňky.

BAFF (B cell activating factor) je cytokin podporující přežití a homeostázu B lymfocytů. Váže se na BAFFR receptor, který je exprimován a B i T lymfocytech. Exprese BAFFR začíná ve stádiu „transitional“ B buněk a tento receptor lze najít na všech periferních populacích B lymfocytů [133].

Role BAFF a BAFFR v patogenezi autoimunitních onemocnění je popsána zejména u systémového lupusu erythematosus, kde je jeho blokace protilátkou belimumab testována jako potenciální léčebný prostředek [134]. Význam BAFF u DM1 není zatím prozkoumán.

V této studii jsme pomocí průtokové cytometrie mapovali populace periferních B lymfocytů a expresi BAFFR u velké kohorty DM1 pacientů při manifestaci onemocnění a u dlouhodobých diabetiků. Tyto parametry jsme také zkoumali u zdravých příbuzných pacientů s DM1. Dále jsme sledovali vliv BAFF na lymfocyty *in vitro*.

### 2.2.2 Výsledky a diskuze

Populace B lymfocytů (naivní, „transitional“, MZ, paměťové a plasmablasty) byla porovnáвана u pacientů s DM1 při manifestaci (n = 60) a dlouhodobě léčených pacientů (n = 264), dále u prvostupňových příbuzných (n = 95) a zdravých kontrol (n = 53). Celkové množství B buněk se mezi kohortami nelišilo. U DM1 pacientů při manifestaci i dlouhodobých jsme pozorovali snížené množství „transitional“ B lymfocytů v porovnání se zdravými kontrolami. U dlouhodobě léčených diabetiků i zdravých kontrol se množství těchto buněk snižuje s věkem. Zastoupení „transitional“ B lymfocytů v periferní krvi nekoreluje s množstvím HbA1c (kompenzace diabetu). U dětí při manifestaci DM1 a u příbuzných diabetiků jsme zaznamenali zvýšené množství IgD-IgM<sup>+</sup> plasmablastů oproti kontrolám. Abychom zjistili vztah s diabetem asociovaných autoproti látek a zastoupení subpopulací B lymfocytů, rozdělili jsme příbuzné pacientů do dvou skupin: protilátkově pozitivní (n = 26) a negativní (n = 72). Mezi těmito skupinami jsme ale nepozorovali rozdíl v žádné ze zkoumaných populací.

Změny v poměru subpopulací B lymfocytů byly popsány i v dalších studiích, např. zvýšené množství MZ B lymfocytů u dospělých diabetiků (tato studie nesledovala množství „transitional“ B lymfocytů) [63]. Jiná studie, která se zabývala „transitional“ B lymfocyty nenašla signifikantní změny v jejich populaci v porovnání s kontrolami. Tato studie ale pracovala s menší kohortou pacientů a nerozlišovala mezi dlouhodobě léčenými pacienty a diabetiky těsně po manifestaci [135].

Expresa BAFFR na B lymfocytech byla oproti kontrolám signifikantně snižena u dlouhodobých diabetiků.

Toto snížení lze vysvětlit přítomností autoreaktivních B buněk u DM1 pacientů, které mohou snižovat expresi BAFFR po vazbě BCR receptoru [136]. Komplexní efekt BAFF na B lymfocyty je dále komplikován variabilní expresí dalších receptorů (TACI, BCMA) a účinkem stimulace TLR receptorů [137].

Expres BAFFR na T lymfocytech byla celkově nižší než na B lymfocytech. U pacientů při manifestaci jsme pozorovali nárůst BAFFR exprimujících CD4+ i CD8+ T lymfocytů v porovnání s dlouhodobými diabetiky a příbuznými. Změny exprese BAFFR zejména na T buňkách nás vedli ke studiu efektu BAFF na lymfocytech *in vitro*. Proliferaci CD4+ a CD8+ T lymfocytů a B lymfocytů jsme měřili pomocí markeru Ki67, u T buněk navíc pomocí MFI CD69. Inkubace s BAFF vedla k vyšší proliferaci B lymfocytů u dlouhodobých pacientů než u kontrol. Tento efekt se projevuje hlavně u „transitional“ B buněk, u naivních B buněk tento trend není signifikantní a u ostatních zralejších populací (MZ, paměťové buňky) se neprojevuje vůbec. Přidání BAFF do kultivačního média nemělo rozdílný vliv na proliferaci T lymfocytů u diabetiků a zdravých kontrol. BAFF působil na T lymfocyty stimulačně pouze bez přítomnosti dalšího stimulačního faktoru, přidání CD3/CD28 do média tento efekt zrušilo a přidání BAFF nevedlo ke zvýšení proliferace. Zajímalo nás, které T buněčné populace jsou nejvíce aktivovány BAFF, proto jsme zjišťovali fenotyp T buněk: naivní, centrální paměťové, efektorové paměťové a terminálně diferencované. Zjistili jsme, že BAFF působí na téměř všechny populace. Naivní T lymfocyty diabetiků měly po stimulaci BAFF signifikantně vyšší MFI CD69 než u zdravých kontrol. U ostatních populací jsme tento efekt nepozorovali.

Účinky BAFF jsou popsány hlavně u B lymfocytů, kde působí jako faktor podporující přežívání a proliferaci. Působení BAFF na T lymfocyty je prozkoumáno mnohem méně. Jedná se o molekulu působící aktivačně a kostimulačně, která zřejmě hraje v roli v kooperaci T a B lymfocytů [138, 139]. V naší studii jsme pozorovali, že BAFF aktivuje T lymfocyty a že aktivace CD4+ T buněk je výraznější u buněk izolovaných z krve DM1 pacientů oproti buňkám zdravých kontrol. Obzvláště silně jsou aktivovány naivní T lymfocyty. Spolu se zvýšenou expresí BAFFR při manifestaci DM1 to může naznačovat, že se BAFF podílí na aktivaci naivních T buněk během vývoje DM1.

V této studii jsme našli několik změn v subpopulacích B lymfocytů v periferní krvi dětí s DM1. Zjistili jsme, že vývoj periferních populací B lymfocytů je abnormální oproti zdravým kontrolám, v periferní krvi lze detekovat snížené množství ranných vývojových stádií, a naopak zvýšené množství protilátky produkujících plasmablastů. Při bližším pohledu na BAFF, hlavní faktor podporující přežití B lymfocytů, jsme zjistili, že B buňky DM1 pacientů jsou citlivější k účinkům BAFF. U pacientů při manifestaci DM1 jsme pozorovali zvýšenou expresi BAFFR na T lymfocytech. Naivní T lymfocyty DM1 pacientů byly citlivější ke stimulaci BAFF než buňky zdravých kontrol. Celkem vzato naše

výsledky ukazují, že populace B lymfocytů je u DM1 pacientů odlišný a může se podílet na dysregulaci imunity a také, že signalizace BAFF se podílí na rozvoji tohoto onemocnění.

## 2.3 Příloha 3

### **Not Only Glycaemic But Also Other Metabolic Factors Affect T Regulatory Cell Counts and Proinflammatory Cytokine Levels in Women with Type 1 Diabetes.**

Stechova K, Sklenarova J, Kratzerova T, Pithova P, Filipp D.

J Diabetes Res. 2017;2017:5463273. doi: 10.1155/2017/5463273. Epub 2017 May 3.

#### 2.3.1 Úvod

DM1 často propuká již u mladých jedinců a manifestace onemocnění je typicky asociována s akutní metabolickou poruchou. Při správné kompenzaci diabetu jsou pacienti zpočátku jinak relativně zdraví lidé s normální váhou. Po několika letech se ale jejich zdraví začíná horšit a mohou se začít objevovat chronické diabetické komplikace. Dá se říct, že jejich tělo kvůli výkyvům glykémie a tím způsobenému oxidativnímu stresu stárne rychleji než u stejně starých zdravých osob [140]. Časem také začíná být častější nadváha až obezita, která je způsobena sníženou senzitivitou k insulinu, což dále zvyšuje riziko komorbidit jako je např. metabolický syndrom a s DM1 asociované mikro- a makrovaskulární onemocnění [141]. Jelikož má imunitní systém DM1 pacientů sklon k autoreaktivitě, trpí diabetici častěji také jinými autoimunitními onemocněními (zejména autoimunitním postižení štítné žlázy) [142].

V našich předchozích studiích jsme zkoumali vliv diabetu matky na imunitní odpovědi novorozence. Konkrétně nás zajímal vliv kompenzace diabetu matky na cytokinový profil mononukleárních buněk z pupečnickové krve (cord blood mononuclear cells – CBMCs) novorozence. Ukázalo se, že CBMCs (nestimulované či stimulované autoantigeny asociovanými s DM1) dětí matek s horší kompenzací diabetu produkují menší množství cytokinů a chemokinů než buňky dětí matek s lépe stabilizovanou glykemií. Podobně při *in vitro* kultivaci CBMCs přidání glukózy do kultivačního média snižovalo produkci cytokinů buňkami [143]. Tyto výsledky vyvolaly další otázky ohledně vlivu ostatních metabolických změn spojených s DM1 na imunitní systém. Zajímalo nás, zda a jak metabolické markery jako lipidové spektrum, aterogenní index, hladina vitamínu D či hypertenze ovlivňují imunitní systém. V úvahu jsme také brali působení konečných produktů pokročilé glykace (advanced glycation end products – AGE). Pro prvotní náhled do této problematiky jsme vybrali skupinu DM1 pacientek v reprodukčním věku (které se potenciálně mohou stát matkami a působit na vývoj imunitního systému plodu).

Vyšetření lipidového spektra neboli hodnot HDL, LDL cholesterolu a triacylglycerolů slouží k vyhodnocení rizika kardiovaskulárních onemocnění. Pro odhad tohoto rizika se používá několik parametrů, které lze spočítat z hodnot lipidového spektra a to: (1) remnantní cholesterol (vysoce

aterogenní lipoproteiny), který lze zjistit odečtením hodnoty HDL a LDL od celkového cholesterolu, (2) aterogenní index, neboli poměr celkového cholesterolu a HDL cholesterolu a (3) aterogenní index plasmy, stanovený jako logaritmus aterogenního indexu.

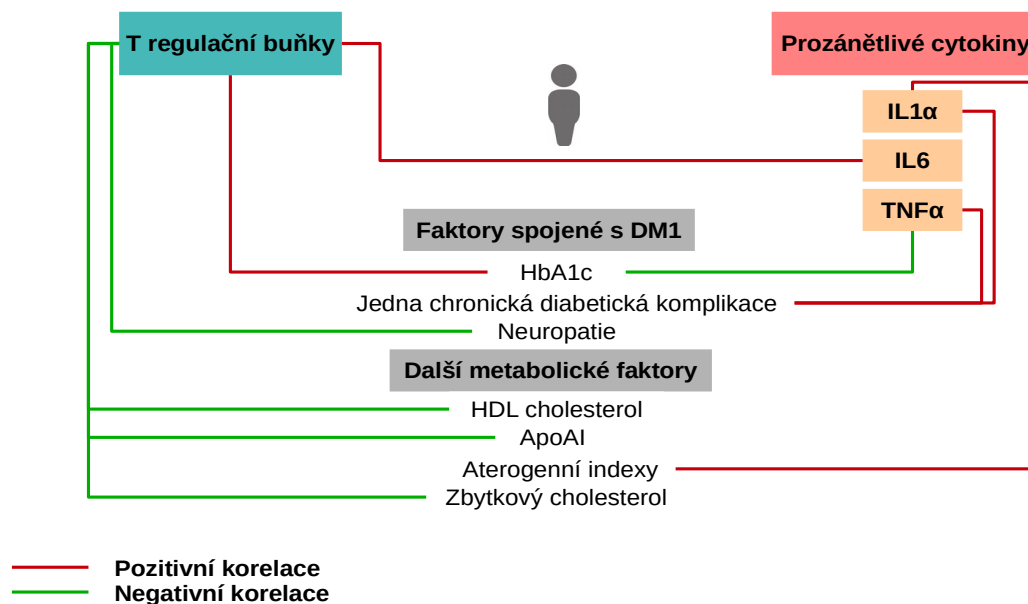
Do studie jsme zařadili 28 DM1 pacientek u kterých jsme shromáždili klinické a biochemické údaje: BMI, dávku insulinu, přítomnost dalších autoimunitních onemocnění a diabetických komplikací, insulinovou resistenci vyjádřenou jako eGDR (whole body glucose disposal rate), aterogenní indexy, hladinu HbA1c, lipidů a vitamínu D. Pacientkám jsme odebrali periferní krev, ze které jsme vyšetřovali hladinu cytokinů (IL6, IL1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), AGE a proteinů. U pacientek jsme také zjišťovali glykemickou variabilitu, kterou jsme získali pomocí kontinuálního monitoringu koncentrace glukózy v intersticiu po dobu 1 měsíce před odběrem. Dále jsme z krve izolovali mononukleární buňky a pomocí průtokové cytometrie sledovali množství Tregs (CD3+CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>/FoxP3+).

### 2.3.2 Výsledky a diskuze

Pro analýzu vztahů mezi klinickými a biochemickými parametry jsme pacientky rozdělili do tří skupin na základě hodnot HbA1c: skupina s dobrou kompenzací (HbA1c <7,5 % DCCT), horší kompenzací (HbA1c 7,5 – 9 % DCCT) a velmi špatnou kompenzací diabetu (HbA1c > 9 % DCCT). Překvapivě byla nejnižší hladina TNF $\alpha$  pozorována u skupiny s nejhorsí kompenzací DM1 v porovnání se skupinou s nejlepší kompenzací. U IL1 $\alpha$  a IL6 jsme korelaci s HbA1c nenalezli. U skupiny s nejhorsí kompenzací jsme také pozorovali nejnižší množství Tregs v periferní krvi a snížené množství vitamínu D. S množstvím vitamínu D také korelovala vyšší glykemická variabilita.

Cytokinovou produkci jsme dále korelovali s přítomností diabetických komplikací (diabetická neuropatie, nefropatie, retinopatie či syndrom diabetické nohy). V naší kohortě bylo přítomno 11 pacientek bez diabetických komplikací (skupina 0), 6 pacientek trpících jednou z těchto komplikací (skupina 1) a 11 pacientek postižených dvěma a více komplikacemi (skupina 2). Hladina IL1 $\alpha$  byla signifikantně vyšší u skupiny 1 v porovnání se skupinou 0. Obdobně produkce TNF $\alpha$  byla nejvyšší u skupiny 1 v porovnání se skupinou 2. Množství Tregs pozitivně korelovalo s přítomností diabetické neuropatie.

Aterogenní index a aterogenní index plasmy pozitivně koreloval s hladinou IL1 $\alpha$ . Množství Tregs korelovalo negativně s remnantním cholesterolem. Celkové množství CD4+ T lymfocytů korelovalo inverzně s BMI pacientek. Množství Tregs pozitivně korelovalo s množstvím IL6. Korelace imunitních a metabolických parametrů nalezených v této studii je shrnuta na obrázku 6.



Obrázek 6. Množství T regulačních buněk pozitivně koreluje s přítomností neuropatie a hladinou IL6 v séru, naopak negativně koreluje s hladinou HbA1c, HDL cholesterolu, ApoAI a zbytkovým cholesterolem. Hladina IL1 $\alpha$  a TNF $\alpha$  pozitivně koreluje s přítomností jedné diabetické komplikace. Hodnota IL1 $\alpha$  dále koreluje s aterogenními indexy. Pozorovali jsme negativní vztah mezi TNF $\alpha$  a kompenzací diabetu (HbA1c).

Je dobře známo, že u pacientů s DM1 dochází časem k oslabení imunitního systému, zvláště pokud jsou výkyvy glykémie špatně kompenzovány. Bylo prokázáno, že zvýšené množství infekčních onemocnění u diabetiků je způsobeno hyperglykemií, která vede ke komplexním změnám imunitního systému např. zhoršení funkce neutrofilů, humorální imunity a antioxidační ochrany těla [144]. K dysregulaci imunitního systému mohou přispívat také další komorbidity spojené s DM1 spolu s obezitou či nadváhou (pokud jsou přítomné).

Glykovaný hemoglobin je marker reflektující glykemický status jedince za dobu posledních tří měsíců. Je prokázáno, že hyperglykémie sama o sobě má prozánětlivé účinky [144]. V souladu s těmito fakty jsme v naší studii u pacientů s vyššími hodnotami HbA1c pozorovali snížené množství Tregs v periferní krvi. Ačkoliv je HbA1c velmi užitečný a v klinické praxi široce využívaný marker kompenzace DM1, nereflektuje glykemickou variabilitu (neboli míru kolísání glykémie), která se v poslední době čím dál tím častěji používá jako marker pro predikci rozvoje chronických diabetických komplikací. Glykemická variabilita vyjádřená jako směrodatná odchylka glykémie získané pomocí kontinuálního monitoringu koncentrace glukózy v naší studii nekorelovala s žádným ze sledovaných

imunologických parametrů. Na druhou stranu, glykemická variabilita korelovala s parametry lipidového spektra, dávkou insulínu (data nebyla zahrnuta do této publikace) a hladinou vitamínu D<sub>6</sub>. Vliv na imunitní funkce tedy bude spíše nepřímý. Výsledky této studie tedy podporují stanovisko, že vliv na imunitní funkce a přítomnost chronických diabetických komplikací je důsledkem spíše celkového času stráveného v hyperglykemickém stavu.

Jak horší hodnoty HbA<sub>1c</sub>, tak vyšší glykemická variabilita byla asociována s se sníženou hladinou vitamínu D. Většina vzorků byla odebrána během jara – léta, a tak jeho hladina neměla být ovlivněna nízkou expozicí slunečnímu záření. Vitamín D je důležitý pro správnou funkci imunitního systému a podle některých studií je jeho nízká hladina asociována se vznikem některých autoimunitních onemocnění včetně DM1. Vitamín D zřejmě ovlivňuje např. negativní selekci v thymu, odpovědovost na vnější pro-apoptotickou signalizaci, funkci regulačních T lymfocytů FoxP3+ Tregs a Tr1 nebo „přepínání“ fenotypu mezi Th1 a Tr1 [145]. Naše výsledky napovídají, že k nízkým hladinám vitamínu D u DM1 alespoň částečně přispívá špatná kompenzace onemocnění. Existují studie, podle kterých je nízká hladina tohoto vitamínu asociována s metabolickým syndromem, a naopak vitamín D může různými mechanismy ovlivňovat kontrolu glykémie. Vztah mezi DM1 a vitamínem D je tedy velmi komplexní [146, 147].

Poněkud překvapivě byla špatná kontrola glykémie asociována s nízkou hladinou TNF $\alpha$  v séru. Vysoké hladiny TNF $\alpha$  a IL1 $\alpha$  byly patrné u pacientů s jednou chronickou diabetickou komplikací. Tyto cytokiny jsou produkovány typicky aktivovanými makrofágy, ale mohou je tvořit i jiné buněčné typy např. neutrofilů, endoteliální a epiteliální buňky. IL1 $\alpha$  má širokou škálu účinků od centrální role v imunitní odpovědi k metabolickým a hematopoetickým aktivitám. Byla nalezena asociace mezi genetickými variantami IL1 $\alpha$  a diabetickou nefropatií [148] a je tedy možné, že IL1 $\alpha$  se přímo podílí na vzniku diabetických komplikací. Zvýšené hladiny tohoto cytokinu u pacientů s jednou diabetickou komplikací mohou znamenat, že procesy vedoucí ke vzniku diabetických komplikací jsou u uvedených osob stále aktivní, zatímco u pacientů s několika komplikacemi už došlo k vyčerpání imunitních procesů a změněné aktivaci mechanismů vrozené imunity vedoucí k nižším hladinám IL1 $\alpha$ .

Dále jsme našli zvýšené množství Tregs u pacientů s diabetickou neuropatií. Zde můžeme pouze spekulovat, jaký mechanismus vedl k tomuto jevu. U DM1 byla pozorována snížená funkce Tregs a je např. možné, že snížená funkce, kompenzovaná zvýšeným množstvím těchto buněk na periférii, může souviset s poškozením nervů [149, 150].

Je zajímavé, že vyšší množství Tregs bylo asociováno s vysokou hladinou IL6 v séru, ačkoliv IL6 inhibuje funkci transkripčního faktoru FoxP3 a vede k diferenciaci na prozánětlivý fenotyp Th17 [151]. Toto pozorování podporuje hypotézu, že u DM1 existuje nerovnováha hlavních transkripčních faktorů FoxP3 (Tregs) a ROR $\gamma$ t (Th17). Poměr exprese těchto dvou faktorů během diferenciaci Th



lymfocytů určuje typ imunitní odpovědi Treg / Th17. Diferenciace na Th17 a Treg fenotyp také nemusí být konečná a mezi těmito dvěma liniemi existuje velká míra plasticity [152].

U DM1 pacientů lze s přibývajícím věkem často pozorovat znaky podobné DM2 či metabolickému syndromu. To nás vedlo ke sledování faktorů spojených s metabolickým syndromem. Ani hypertenze ani insulinová rezistence nekorelovaly se sledovanými imunitními faktory. Naproti tomu hmotnost negativně korelovala s celkovým množstvím CD4+ T buněk. To je v souladu s poznatky ohledně snížení některých populací lymfocytů u pacientů ohrožených rozvojem DM2 [153].

V naší studii jsme pozorovali pozitivní korelaci mezi hladinou HDL (a hlavním proteinovým komponentem HDL ApoAI) a Tregs. Je známo, že HDL cholesterol ovlivňuje polarizaci T lymfocytů a ApoAI reguluje funkci Tregs buněk u některých myších modelů [154, 155].

Celkově výsledky této studie ukazují komplikovaný vztah mezi glykemickými, lipidovými a imunitními parametry u žen s DM1. Z našich dat vyplývá, že nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje imunitní parametry (např. množství periferních Tregs či hladinu TNF $\alpha$ ) je celkový čas strávený ve stavu hyperglykémie – měřený jako hodnota HbA1c. Glykemická variabilita naopak zřejmě nemá přímý vliv na studované parametry, na druhou stranu koreluje s některými metabolickými parametry jako je hladina vitamínu D a může tak mít určitý klinický a prognostický potenciál. U mnoha neimunitních parametrů je složité určit vztah příčiny a následku, jejich asociace ale naznačuje, že zabránit u DM1 pacientů nárůstu BMI a rozvoji dyslipidémie by mohlo vést k příznivější dlouhodobé prognóze. Spojení glykemických a lipidových charakteristik může v klinické praxi přinést názornější pohled na imunitní funkce a dlouhodobou prognózu pacientů.

## 2.4 Příloha 4

### Glucokinase Gene May Be a More Suitable Target Than the Insulin Gene for Detection of $\beta$ Cell Death.

Sklenarova J, Petruzelkova L, Kolouskova S, Lebl J, Sumnik Z, Cinek O.

Endocrinology. 2017 Jul 1;158(7):2058-2065. doi: 10.1210/en.2016-1923.

#### 2.4.1 Úvod

Autoimunitní proces vedoucí k destrukci beta buněk pankreatu začíná měsíce i roky před klinickou manifestací DM1. Příčiny ani průběh preklinické fáze nejsou zatím přesně popsány. Autoprotilátky se na destrukci ostrůvků přímo nepodílejí a jedná se pouze o nepřímý marker. Metabolické markery lze detekovat až v pozdní fázi, kdy už je velké množství beta buněk zničeno. Pro studium preklinické fáze DM1 a pro účinnou prevenci jsou potřeba metody umožňující měření zbývající masy beta buněk nebo jejich probíhající destrukci.

Nedávno byla v několika studiích popsána metoda využívající pro detekci probíhající destrukce beta buněk měření volné demethylované DNA v séru nebo plasmě [89 – 93, 156]. Methylace DNA na CpG dinukleotidu slouží v buňce k regulaci genové exprese. Promotory bývají většinou demethylované v buňkách či tkáních, kde jsou silně exprimovány, zatímco promotory inaktivovaných genů bývají methylované. Tato metoda předpokládá, že během destrukce ostrůvků se do krevního oběhu uvolňuje malé množství DNA pocházející z beta buněk. Jelikož insulin je ve větší míře exprimován pouze v beta buňkách, jeho promotor obsahuje demethylované CpG dinukleotidy v beta buňkách, zatímco v ostatních tkáních jsou tyto sekvence methylované. V některých z výše zmíněných studií byl jako cílová sekvence použit promotor insulinového genu [89, 93], který ale obsahuje repetitivní sekvence, což značně komplikuje design přesné kvantitativní PCR reakce. Některé skupiny proto používají sekvenci exonu 2 insulinového genu [90 – 92]. CpG dinukleotidy demethylované v exonu 2 jsou ovšem kromě beta buněk demethylované i v dalších tkáních [89].

V této studii jsme se proto pokusili zlepšit přesnost této metody nahrazením *INS* genu jinou sekvencí, která je specificky demethylovaná v beta buňkách. Glukokinázový gen (*GCK*) obsahuje dva promotory. Neuroendokrinní promotor je aktivní v beta buňkách, neuronech senzitivních ke glukóze v hypothalamu a v některých enteroendokrinních buňkách. Jaterní promotor je aktivní v játrech [157]. Naši metodu jsme zacílili do neuroendokrinního promotoru *GCK*.

Methylované a demethylované CpG dinukleotidy lze detekovat pomocí bisulfitové konverze DNA. Jedná se o chemickou konverzi cytosinu na uracil, přičemž methylovaný cytosin je před konverzí chráněn. Methylační status cílového úseku jsme ověřovali pomocí sekvenace DNA (po bisulfitové

konverzi) izolované z krve a z pankreatických ostrůvků. Množství methylované a demethylované DNA jsme měřili pomocí metody droplet digital PCR (ddPCR). Metoda využívá 2 fluorescenčně značené sondy – jednu pro methylovanou a jednu pro demethylovanou DNA. Sondy se váží na úsek neuroendokrinního *GCK* promotoru obsahující 3 CpG dinukleotidy. Pro validaci metody jsme vytvořili plasmidy obsahující methylovanou a demethylovanou cílovou sekvenci. Metodu jsme dále porovnávali s dříve publikovanou ddPCR esejí zacílenou do *INS* promotoru [93]. Methylaci cílové sekvence u obou metod jsme ověřovali na DNA z různých tkání (ostrůvky, krev, mozek, ledviny, tlusté a tenké střevo, játra, plíce a žaludek). Cirkulující demethylovanou DNA jsme detekovali u pacientů těsně po manifestaci DM1, protilátkově pozitivních příbuzných diabetiků a zdravých kontrol.

#### 2.4.2 Výsledky a diskuze

Nejprve jsme ověřili methylační status cílové *GCK* sekvence v pankreatických ostrůvcích a v krvi. 3 vybrané CpG dinukleotidy byly převážně methylované v krvi (16 ze 17 klonů) a demethylované v DNA z ostrůvků (10 z 16 klonů). Poté jsme navrhli methylačně specifickou ddPCR reakci se dvěma sondami pro detekci methylované a demethylované DNA. Vlastnosti PCR eseje jsme ověřili pomocí plasmidů obsahující methylovanou a demethylovanou cílovou sekvenci. Plasmidy v koncentracích  $2,5 \times 10^1$  až  $10^4$  kopií/reakci jsme měřili v různých vzájemných poměrech. Stejná měření jsme provedli i pro *INS* metodu. Zatímco *GCK* metoda nedetekovala falešně pozitivní signál demethylované DNA ani v přítomnosti vysoké koncentrace methylované DNA ( $2,5 \times 10^4$  kopií/reakci), metoda zacílená do *INS* promotoru ukazovala falešně pozitivní signál při vysokém pozadí methylované DNA (koncentrace  $2,5 \times 10^3$  a  $10^4$  kopií/reakci). *INS* metoda tedy není vhodná pro detekci demethylované DNA, pokud pozadí methylované DNA přesáhne koncentraci  $10^3$  kopií/reakci. Zatímco *GCK* sonda se váže na sekvenci obsahující 3 CpG nukleotidy (sonda pro methylovanou a demethylovanou DNA se tedy liší ve 3 nukleotidech), sonda pro detekci *INS* sekvence rozpoznává sekvenci obsahující pouze jeden CpG dinukleotid a je tedy více náchylná k nespecifické vazbě na templát. To může být velmi důležité pro klinické použití metody. Množství DNA uvolněné do krevního oběhu z ostrůvků je velmi malé v porovnání s DNA uvolněné z dalších tkání a vzorky cirkulující DNA ze séra i z plasmy běžně obsahují násobně vyšší množství methylované DNA.

Pomocí *GCK* a *INS* metody jsme změřili míru methylace cílových sekvencí v DNA extrahované z různých tkání – pankreatických ostrůvků, krve, mozku, ledvin, jater, tenkého a tlustého střeva, žaludku a plic. Cílová CpG místa byla demethylovaná v ostrůvcích (89 % v *GCK* a 69 % v *INS* genu). V ostatních tkáních byly tyto CpG dinukleotidy převážně methylované. Detekovaná sekvence v *GCK* genu vykazovala vyšší míru methylace než *INS* ve všech tkáních kromě ledvin. Není známo nakolik jednotlivé tkáně přispívají k množství cirkulující DNA, ale celková míra methylace se zdá být vyšší u *GCK* promotoru. Zejména nízká methylace *GCK* sekvence v krvi je ale výhodou pro klinické použití.

Při zpracování vzorků krve může snadno docházet ke kontaminaci DNA z krevních buněk. Při prodlevě mezi odběrem krve a separací séra či plasmy může docházet k poškození krevních buněk. Je také důležité odstranit ze séra / plasmy zbytky buněk buď pomocí filtrace či přidáním jednoho kola centrifugace.

V naší studii jsme analyzovali vzorky periferní krve od celkem 59 dětí: 25 pacientů s DM1 do 4 týdnů od manifestace onemocnění, 14 protilátkově pozitivních příbuzných DM1 pacientů z programu PREDIA.CZ a 20 zdravých kontrol. Množství materiálu nám umožnilo změřit demethylovanou DNA *GCK* i *INS* esejí u většiny vzorků, ale ne u všech. Obě eseje byly použity u 23 DM1 pacientů, 9 protilátkově pozitivních dětí a 20 zdravých kontrol. Obě metody detekovali přibližně stejné množství methylované DNA, ale *INS* esej detekovala větší množství demethylované DNA (*GCK*: 0–15 kopií / 250  $\mu$ l séra, medián 2 kopie / 250  $\mu$ l séra; *INS*: 1,3–225 kopií / 250  $\mu$ l séra, medián 14 kopií / 250  $\mu$ l séra). Množství demethylované *INS* DNA pozitivně korelovalo s množstvím demethylované *GCK* DNA ( $p < 10^{-4}$ ), v případě methylované DNA byla pozitivní korelace ještě výraznější ( $p < 10^{-9}$ ). U obou metod jsme také pozorovali velmi silnou pozitivní korelaci mezi množstvím methylované a demethylované DNA (*GCK*:  $p < 10^{-6}$ ;  $p < 10^{-14}$ ) Tento fakt vyvolává otázku, zda demethylovaná DNA nepochází ze stejného zdroje jako methylovaná DNA spíše než z beta buněk. Methylace cílové sekvence v tkáních mimo pankreatické ostrůvky totiž nikdy není 100%. Množství demethylované *GCK* DNA, kterou jsme detekovali ve vzorcích séra je velmi nízké (medián 2 kopie / 250  $\mu$ l). Přesnost měření takto nízkých koncentrací není optimální. Pro spolehlivou detekci demethylované DNA by bylo potřeba větší množství vzorku.

Množství demethylované *INS* ani *GCK* DNA nebylo signifikantně zvýšené u žádné ze zkoumaných skupin. Při použití poměru demethylované / methylované DNA se výsledky obou metod lišily. *GCK* metoda našla hraničně signifikantní zvýšení poměru u protilátkově pozitivních dětí (v porovnání s DM1 pacienty  $p = 0,04$ ; a zdravými kontrolami  $p = 0,06$ ). Zatímco *INS* metoda našla zvýšený poměr u zdravých kontrol v porovnání s DM1 pacienty ( $p = 0,01$ ). Tento nesoulad je zřejmě způsoben velmi nízkou koncentrací demethylované *GCK* DNA ve vzorcích. Pro spolehlivou detekci by bylo potřeba větší množství vzorku. Dalším faktorem může být, že měření demethylované *INS* DNA může být zkresleno nespecifickou vazbou sond při vysokém pozadí methylované DNA.

Ačkoliv změnou cílové sekvence do neuroendokrinního *GCK* promotoru se zlepšila specifická methylace a ddPCR metoda pro detekci demethylované *GCK* DNA má lepší analytické parametry než *INS* metoda, klinické použití této metody pro detekci probíhající destrukce beta buněk je zatím stále neuspokojivé. Přímé srovnání dvou metod zacílených do *INS* a *GCK* genů vede k pochybám, zda DNA detekovaná těmito metodami v dřívějších publikacích opravdu pochází z beta buněk. Zdá se, že pro detekci demethylované DNA z beta buněk by bylo potřeba větší množství séra, správné zpracování

vzorku krve s ohledem na možnou kontaminaci buněčnou DNA a kombinace více specifických markerů.

### 3 Závěr

V průběhu svého postgraduálního studia jsem se zabývala diabetem mellitem 1. typu, konkrétně možnostmi jeho predikce a prevence, dysregulací imunitního systému u pacientů a jejich souvislostí s metabolickými změnami provázejícími toto onemocnění.

K typickým projevům DM1 dochází v momentě, kdy je většina beta buněk zničena a zbývající beta buňky nejsou schopné svou produkcí insulinu pokrýt potřeby organismu. Vzhledem k relativně dlouhé preklinické fázi onemocnění by bylo ideální rozvoji onemocnění předcházet. Antigen specifická imunoterapie se jeví jako nejlepší řešení, protože netlumí celkovou funkci imunitního systému, ale snaží se o navození tolerance ke konkrétním autoantigenům. Proběhlo již několik studií, které zkoušely podávat s diabetem asociované autoantigeny pacientům, nepřinesly však očekávané výsledky. V naší *in vitro* studii jsme zkoumali vliv autoprotilátkového profilu DM1 pacientů na reaktivitu jejich PBMCs na autoantigeny. Zjistili jsme, že reaktivita k autoantigenům je velice individuální a je ovlivněna i autoprotilátkovým profilem. Zdá se, že autoprotilátkový profil odráží různé nastavení imunitního systému, či rozdílnou fázi autoimunitní destrukce i po klinické manifestaci onemocnění. Tyto poznatky by mohly být užitečné při plánování imunointervenčních studií. Je pravděpodobné, že antigen specifická terapie nebude účinná u všech případů DM1 a bude potřeba ji pacientům připravit „na míru“.

Autoprotilátky jsou velice užitečný nástroj pro predikci DM1, jedná se ovšem pouze o nepřímé markery, které nevypovídají o úbytku beta buněk. Metabolické markery poukazující na nedostatek insulinu a dysregulaci glykémie se ale objeví až v momentě, kdy je většina beta buněk zničená. Marker sledující úbytek beta buněk v organismu by byl velmi užitečný pro zpřesnění určení rizika rozvoje DM1 a objasnění dynamiky autoimunitní destrukce těchto buněk. Objevilo se několik studií, které se pokoušely detekovat zánik beta buněk pomocí měření DNA z nich uvolněné. Pokusili jsme se zlepšit vlastnosti této metody změnou cílové sekvence na neuroendokrinní promotor glukokinázového genu, který je aktivní pouze v beta buňkách a jehož demethylace je specifitější. Dále jsme se zaměřili na zpracování vzorku, abychom se vyhnuli kontaminaci buněčnou DNA a navrhli jsme velmi citlivou kvantitativní ddPCR esej. Bohužel jsme zjistili, že cílové DNA je v krevním oběhu velmi malé množství a pro její detekci by bylo potřeba větší množství vzorku, než je prakticky možné získat pro výzkumné účely (preklinická fáze DM1 často probíhá už v dětském věku, první autoprotilátka se nejčastěji objeví mezi 1. a 2. rokem). Získané výsledky jsou v tomto případě spíše negativní, nicméně pro další hledání podobných markerů důležité.

Je obecně přijímaným faktem, že DM1 je onemocněním mediované T lymfocyty. Nicméně se jedná o komplexní poruchu imunitního systému, která postihuje i ostatní buněčné typy. B lymfocyty se kromě

tvorby autoprotilátek podílejí na patogenezi DM1 také prezentací antigenu. Rozhodli jsme se zkoumat změny v populacích B lymfocytů během různých fází DM1: preklinické, při manifestaci onemocnění a u pacientů léčených již delší dobu. U DM1 pacientů (při manifestaci onemocnění i později) jsme pozorovali snížené množství „transitional“ B buněk. U pacientů léčených delší dobu byla navíc na B lymfocytech snížená exprese BAFFR. Exprese BAFFR byla naopak zvýšená na T lymfocytech pacientů při manifestaci. To je v souladu s celkovým nastavením imunitního systému, kdy při manifestaci onemocnění jsou aktivní autoimunitní procesy vedoucí k destrukci beta buněk, a naopak s časovým odstupem se projevuje mírná dysfunkce imunitního systému a větší sklon k některým infekčním onemocněním. Aktivace CD4+ T buněk BAFF je výraznější u buněk izolovaných z krve DM1 pacientů oproti buňkám zdravých kontrol. Spolu se zvýšenou expresí BAFFR při manifestaci DM1 to může naznačovat, že se BAFF podílí na aktivaci naivních T buněk během vývoje DM1. Zdá se tedy, že vývoj B lymfocytů je oproti zdravým kontrolám odlišný a odlišné nastavení B lymfocytů se může podílet na dysregulaci imunitního systému a BAFF signalizace může mít roli ve vývoji DM1.

Navzdory substituční insulinové léčbě dochází u DM1 pacientů k výkyvům glykémie, což zvyšuje oxidativní stres organismu a vede k vývoji chronických diabetických komplikací. Je známo, že dysregulace glukózové homeostázy působí i na imunitní systém a vede ke zhoršení funkce neutrofilů, humorální imunity a antioxidační ochrany těla. Důsledkem je, že diabetici trpí zvýšeným množstvím infekčních onemocnění. Tato fakta spolu s výsledky našich předchozích studií zabývajících se vlivem kompenzace diabetu matky na imunitní systém plodu nás vedli k otázkám ohledně působení metabolických změn spojených s diabetem na imunitní funkce. Kromě kompenzace DM1 vyjádřené hodnotou HbA1c a glykemickou variabilitou jsme analyzovali další parametry jako lipidové spektrum či hladinu vitamínu D. Zjistili jsme, že spíše než glykemickou variabilitou, je imunitní systém ovlivněn celkovou dobou strávenou v hyperglykémii. U pacientů s horší kompenzací jsme pozorovali snížené množství Tregs. Naopak pozitivně korelovalo množství Tregs s hladinou HDL cholesterolu a s přítomností diabetické neuropatie. Celkově výsledky této studie ukazují komplikovaný vztah mezi glykemickými, lipidovými a imunitními parametry u DM1.

DM1 je komplexní onemocnění na jehož vzniku se podílí mnoho faktorů genetických i enviromentálních. I přes desetiletí výzkumu zůstávají příčiny vzniku DM1 zatím nejasné. Relativně dlouhá preklinická fáze nicméně dává naději na vývoj preventivní léčby. V této práci jsem se snažila o shrnutí současného pohledu na patogenezi DM1, markerů používaných pro výzkum i v klinické praxi a možností imunointervence. Doufám, že naše práce alespoň částečně přispěla k porozumění tomuto onemocnění a jeho budoucí léčbě.

## Seznam zkratek

DM1	Diabetes mellitus 1. typu
GAD65	Glutamic acid decarboxylase 65 kDa isoform
IA2	Insulinoma-associated antigen 2
ZnT8	Zinc Transporter 8
TRIGR	Trial to reduce IDDM in the genetically at risk
TEDDY	The Environmental Determinants of Diabetes in the Young
NOD	Non-obese diabetic mouse
LPS	Lipopolysacharid
HLA	Human leucocyte antigen
TCR	T cell receptor
tGT	Tissue transglutaminase
nPOD	Network for pancreatic organ donors
LADA	Late autoimmune diabetes of adulthood
BCR	B cell receptor
DAISY	Diabetes autoimmunity study in the young
DIPP	Diabetes prediction and prevention
OGTT	Oral glucose tolerance test
ivGTT	Intravenous glucose tolerance test
HbA1c	Glykovaný hemoglobin
FPIR	First phase insulin response
EBV	Epstein-Barr virus
Treg	T regulační buňky



Teff	Efektorové T buňky
DPT-1	Diabetes prevention trial 1
IAA	Insulin autoantibodies
MHC	Major histocompatibility complex
CBMCs	Cord blood mononuclear cells
LDL	Low density lipoprotein
HDL	High density lipoprotein
AGE	Advanced glycation end product
BMI	Body mass index
PCR	Polymerase chain reaction

## Použitá literatura

1. Tuomilehto J: **The emerging global epidemic of type 1 diabetes.** *Curr Diab Rep* 2013, **13**:795–804.
2. Ostman J, Lonnberg G, Arnqvist HJ, Blohme G, Bolinder J, Ekbom Schnell A, Eriksson JW, Gudbjornsdottir S, Sundkvist G, Nystrom L: **Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002.** *J Intern Med* 2008, **263**:386–94.
3. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G, Group ES: **Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study.** *Lancet* 2009, **373**:2027–33.
4. Group DP: **Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999.** *Diabet Med* 2006, **23**:857–66.
5. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW: **Type 1 diabetes.** *Lancet* 2014, **383**:69–82.
6. Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J: **Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study.** *Lancet* 2008, **371**:1777–82.
7. Cinek O, Kulich M, Sumnik Z: **The incidence of type 1 diabetes in young Czech children stopped rising.** *Pediatr Diabetes* 2012, **13**:559–563.
8. Patterson CC, Harjutsalo V, Rosenbauer J, Neu A, Cinek O, Skrivarhaug T, Rami-Merhar B, Soltesz G, Svensson J, Parslow RC, et al.: **Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989-2013: a multicentre prospective registration study.** *Diabetologia* 2019, **62**:408–417.
9. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, Winkler C, Ilonen J, Veijola R, Knip M, et al.: **Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children.** *JAMA* 2013, **309**:2473–9.
10. Noble JA, Erlich HA: **Genetics of type 1 diabetes.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, **2**:a007732.
11. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark A, Hagopian WA, Rewers MJ, She JX, Simell OG, Toppari J, et al.: **The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study.** *Diabetologia* 2015, **58**:980–7.
12. Knip M, Simell O: **Environmental triggers of type 1 diabetes.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, **2**:a007690.
13. Cardwell CR, Stene LC, Ludvigsson J, Rosenbauer J, Cinek O, Svensson J, Perez-Bravo F, Memon A, Gimeno SG, Wadsworth EJK, et al.: **Breast-feeding and childhood-onset type 1 diabetes: a pooled analysis of individual participant data from 43 observational studies.** *Diabetes Care* 2012, **35**:2215–2225.

14. Writing Group for the TRIGR Study Group, Knip M, Åkerblom HK, Al Taji E, Becker D, Bruining J, Castano L, Danne T, de Beaufort C, Dosch H-M, et al.: **Effect of Hydrolyzed Infant Formula vs Conventional Formula on Risk of Type 1 Diabetes: The TRIGR Randomized Clinical Trial.** *JAMA* 2018, **319**:38–48.
15. Kempainen KM, Ardisson AN, Davis-Richardson AG, Fagen JR, Gano KA, León-Novelo LG, Vehik K, Casella G, Simell O, Ziegler AG, et al.: **Early childhood gut microbiomes show strong geographic differences among subjects at high risk for type 1 diabetes.** *Diabetes Care* 2015, **38**:329–332.
16. Classen JB, Classen DC: **Clustering of cases of insulin dependent diabetes (IDDM) occurring three years after hemophilus influenza B (HiB) immunization support causal relationship between immunization and IDDM.** *Autoimmunity* 2002, **35**:247–253.
17. Wahlberg J, Fredriksson J, Vaarala O, Ludvigsson J, Abis Study Group: **Vaccinations may induce diabetes-related autoantibodies in one-year-old children.** *Ann N Y Acad Sci* 2003, **1005**:404–408.
18. Huppmann M, Baumgarten A, Ziegler A-G, Bonifacio E: **Neonatal Bacille Calmette-Guerin vaccination and type 1 diabetes.** *Diabetes Care* 2005, **28**:1204–1206.
19. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M: **Childhood vaccination and type 1 diabetes.** *N Engl J Med* 2004, **350**:1398–1404.
20. DeStefano F, Mullooly JP, Okoro CA, Chen RT, Marcy SM, Ward JI, Vadheim CM, Black SB, Shinefield HR, Davis RL, et al.: **Childhood vaccinations, vaccination timing, and risk of type 1 diabetes mellitus.** *Pediatrics* 2001, **108**:E112.
21. Beyerlein A, Strobl AN, Winkler C, Carpus M, Knopff A, Donnachie E, Ankerst DP, Ziegler A-G: **Vaccinations in early life are not associated with development of islet autoimmunity in type 1 diabetes high-risk children: Results from prospective cohort data.** *Vaccine* 2017, **35**:1735–1741.
22. Lönnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, Savola K, Muona P, Simell T, Koskela P, et al.: **Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study.** *Diabetes* 2000, **49**:1314–1318.
23. Oikarinen S, Martiskainen M, Tauriainen S, Huhtala H, Ilonen J, Veijola R, Simell O, Knip M, Hyöty H: **Enterovirus RNA in blood is linked to the development of type 1 diabetes.** *Diabetes* 2011, **60**:276–279.
24. Endesfelder D, Engel M, Zu Castell W: **Gut Immunity and Type 1 Diabetes: a Melange of Microbes, Diet, and Host Interactions?** *Curr Diab Rep* 2016, **16**:60.
25. de Goffau MC, Luopajarvi K, Knip M, Ilonen J, Ruohtula T, Härkönen T, Orivuori L, Hakala S, Welling GW, Harmsen HJ, et al.: **Fecal microbiota composition differs between children with  $\beta$ -cell autoimmunity and those without.** *Diabetes* 2013, **62**:1238–1244.
26. Davis-Richardson AG, Ardisson AN, Dias R, Simell V, Leonard MT, Kempainen KM, Drew JC, Schatz D, Atkinson MA, Kolaczowski B, et al.: **Bacteroides dorei dominates gut microbiome**

- prior to autoimmunity in Finnish children at high risk for type 1 diabetes. *Front Microbiol* 2014, **5**:678.
27. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyötyläinen T, Hämäläinen A-M, Peet A, Tillmann V, Pöhö P, Mattila I, et al.: **The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes.** *Cell Host Microbe* 2015, **17**:260–273.
  28. Vatanen T, Kostic AD, d’Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, Yassour M, Kolde R, Vlamakis H, Arthur TD, Hämäläinen A-M, et al.: **Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans.** *Cell* 2016, **165**:842–853.
  29. Pugliese A, Yang M, Kusmarteva I, Heiple T, Vendrame F, Wasserfall C, Rowe P, Moraski JM, Ball S, Jebson L, et al.: **The Juvenile Diabetes Research Foundation Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD) Program: goals, operational model and emerging findings.** *Pediatr Diabetes* 2014, **15**:1–9.
  30. In’t Veld P: **Insulitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models.** *Semin Immunopathol* 2014, **36**:569–79.
  31. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG: **Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes.** *Clin Exp Immunol* 2009, **155**:173–81.
  32. Leete P, Willcox A, Krogvold L, Dahl-Jorgensen K, Foulis AK, Richardson SJ, Morgan NG: **Differential Insulitic Profiles Determine the Extent of beta-Cell Destruction and the Age at Onset of Type 1 Diabetes.** *Diabetes* 2016, **65**:1362–9.
  33. Campbell-Thompson M, Rodriguez-Calvo T, Battaglia M: **Abnormalities of the Exocrine Pancreas in Type 1 Diabetes.** *Curr Diab Rep* 2015, **15**:79.
  34. Stadinski B, Kappler J, Eisenbarth GS: **Molecular targeting of islet autoantigens.** *Immunity* 2010, **32**:446–56.
  35. Arvan P, Pietropaolo M, Ostrov D, Rhodes CJ: **Islet autoantigens: structure, function, localization, and regulation.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, **2**.
  36. Roep BO, Kracht MJ, van Lummel M, Zaldumbide A: **A roadmap of the generation of neoantigens as targets of the immune system in type 1 diabetes.** *Curr Opin Immunol* 2016, **43**:67–73.
  37. Strollo R, Vinci C, Arshad MH, Perrett D, Tiberti C, Chiarelli F, Napoli N, Pozzilli P, Nissim A: **Antibodies to post-translationally modified insulin in type 1 diabetes.** *Diabetologia* 2015, **58**:2851–2860.
  38. McLaughlin RJ, de Haan A, Zaldumbide A, de Koning EJ, de Ru AH, van Veelen PA, van Lummel M, Roep BO: **Human islets and dendritic cells generate post-translationally modified islet autoantigens.** *Clin Exp Immunol* 2016, **185**:133–140.
  39. McGinty JW, Chow I-T, Greenbaum C, Odegard J, Kwok WW, James EA: **Recognition of posttranslationally modified GAD65 epitopes in subjects with type 1 diabetes.** *Diabetes* 2014, **63**:3033–3040.

40. Delong T, Wiles TA, Baker RL, Bradley B, Barbour G, Reisdorph R, Armstrong M, Powell RL, Reisdorph N, Kumar N, et al.: **Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion.** *Science* 2016, **351**:711–714.
41. Ogawa M, Maruyama T, Hasegawa T, Kanaya T, Kobayashi F, Tochino H, Uda H: **The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mice.** *Biomed Res* [date unknown], **1985**:103–106.
42. Like AA, Kislauskis E, Williams RR, Rossini AA: **Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat.** *Science* 1982, **216**:644–646.
43. Ikehara S, Good RA, Nakamura T, Sekita K, Inoue S, Oo MM, Muso E, Ogawa K, Hamashima Y: **Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**:2483–2487.
44. Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH: **Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors.** *Diabetes* 1993, **42**:44–55.
45. Whalen BJ, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA: **Adoptive transfer of autoimmune diabetes mellitus to athymic rats: synergy of CD4+ and CD8+ T cells and prevention by RT6+ T cells.** *J Autoimmun* 1994, **7**:819–831.
46. Arif S, Moore F, Marks K, Bouckennooghe T, Dayan CM, Planas R, Vives-Pi M, Powrie J, Tree T, Marchetti P, et al.: **Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death.** *Diabetes* 2011, **60**:2112–9.
47. Monti P, Heninger A-K, Bonifacio E: **Differentiation, expansion, and homeostasis of autoreactive T cells in type 1 diabetes mellitus.** *Curr Diab Rep* 2009, **9**:113–118.
48. Oling V, Reijonen H, Simell O, Knip M, Ilonen J: **Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type 1 diabetes.** *Cell Immunol* 2012, **273**:133–139.
49. Velthuis JH, Unger WW, van der Slik AR, Duinkerken G, Engelse M, Schaapherder AF, Ringers J, van Kooten C, de Koning EJ, Roep BO: **Accumulation of autoreactive effector T cells and allo-specific regulatory T cells in the pancreas allograft of a type 1 diabetic recipient.** *Diabetologia* 2009, **52**:494–503.
50. Hilbrands R, Huurman VAL, Gillard P, Velthuis JHL, De Waele M, Mathieu C, Kaufman L, Pipeleers-Marichal M, Ling Z, Movahedi B, et al.: **Differences in baseline lymphocyte counts and autoreactivity are associated with differences in outcome of islet cell transplantation in type 1 diabetic patients.** *Diabetes* 2009, **58**:2267–2276.
51. Vendrame F, Pileggi A, Laughlin E, Allende G, Martin-Pagola A, Molano RD, Diamantopoulos S, Standifer N, Geubtner K, Falk BA, et al.: **Recurrence of type 1 diabetes after simultaneous pancreas-kidney transplantation, despite immunosuppression, is associated with autoantibodies and pathogenic autoreactive CD4 T-cells.** *Diabetes* 2010, **59**:947–957.

52. Chujo D, Foucat E, Nguyen T-S, Chaussabel D, Banchereau J, Ueno H: **ZnT8-Specific CD4+ T cells display distinct cytokine expression profiles between type 1 diabetes patients and healthy adults.** *PLoS One* 2013, **8**:e55595.
53. van Lummel M, Duinkerken G, van Veelen PA, de Ru A, Cordfunke R, Zaldumbide A, Gomez-Touriño I, Arif S, Peakman M, Drijfhout JW, et al.: **Posttranslational modification of HLA-DQ binding islet autoantigens in type 1 diabetes.** *Diabetes* 2014, **63**:237–247.
54. Buckner JH: **Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases.** *Nat Rev Immunol* 2010, **10**:849–859.
55. Ferraro A, Socci C, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, Nano R, Olek S, Maffi P, Scavini M, et al.: **Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes.** *Diabetes* 2011, **60**:2903–2913.
56. Schneider A, Rieck M, Sanda S, Pihoker C, Greenbaum C, Buckner JH: **The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells.** *J Immunol Baltim Md 1950* 2008, **181**:7350–7355.
57. Seay HR, Yusko E, Rothweiler SJ, Zhang L, Posgai AL, Campbell-Thompson M, Vignali M, Emerson RO, Kaddis JS, Ko D, et al.: **Tissue distribution and clonal diversity of the T and B cell repertoire in type 1 diabetes.** *JCI Insight* 2016, **1**:e88242.
58. Pathiraja V, Kuehlich JP, Campbell PD, Krishnamurthy B, Loudovaris T, Coates PTH, Brodnicki TC, O’Connell PJ, Kedzierska K, Rodda C, et al.: **Proinsulin-specific, HLA-DQ8, and HLA-DQ8-transdimer-restricted CD4+ T cells infiltrate islets in type 1 diabetes.** *Diabetes* 2015, **64**:172–182.
59. Babon JAB, DeNicola ME, Blodgett DM, Crèvecoeur I, Buttrick TS, Maehr R, Bottino R, Naji A, Kaddis J, Elyaman W, et al.: **Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes.** *Nat Med* 2016, **22**:1482–1487.
60. Wong FS, Wen L, Tang M, Ramanathan M, Visintin I, Daugherty J, Hannum LG, Janeway CA, Shlomchik MJ: **Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse.** *Diabetes* 2004, **53**:2581–2587.
61. Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH, Shultz LD: **B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed congenic” stock of NOD.Ig mu null mice.** *J Exp Med* 1996, **184**:2049–2053.
62. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Marks JB, McGee PF, Moran AM, et al.: **Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function.** *N Engl J Med* 2009, **361**:2143–2152.
63. Deng C, Xiang Y, Tan T, Ren Z, Cao C, Huang G, Wen L, Zhou Z: **Altered Peripheral B-Lymphocyte Subsets in Type 1 Diabetes and Latent Autoimmune Diabetes in Adults.** *Diabetes Care* 2016, **39**:434–440.
64. Gauld SB, Benschop RJ, Merrell KT, Cambier JC: **Maintenance of B cell energy requires constant antigen receptor occupancy and signaling.** *Nat Immunol* 2005, **6**:1160–1167.

65. Smith MJ, Packard TA, O'Neill SK, Henry Dunand CJ, Huang M, Fitzgerald-Miller L, Stowell D, Hinman RM, Wilson PC, Gottlieb PA, et al.: **Loss of anergic B cells in prediabetic and new-onset type 1 diabetic patients.** *Diabetes* 2015, **64**:1703–1712.
66. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Herold KC, Krischer JP, Lernmark Å, et al.: **Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association.** *Diabetes Care* 2015, **38**:1964–1974.
67. Ziegler A-G, Bonifacio E, BABYDIAB-BABYDIET Study Group: **Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes.** *Diabetologia* 2012, **55**:1937–1943.
68. Parikka V, Näntö-Salonen K, Saarinen M, Simell T, Ilonen J, Hyöty H, Veijola R, Knip M, Simell O: **Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk.** *Diabetologia* 2012, **55**:1926–1936.
69. Steck AK, Vehik K, Bonifacio E, Lernmark A, Ziegler A-G, Hagopian WA, She J, Simell O, Akolkar B, Krischer J, et al.: **Predictors of Progression From the Appearance of Islet Autoantibodies to Early Childhood Diabetes: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY).** *Diabetes Care* 2015, **38**:808–813.
70. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJK, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler A-G: **Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics.** *Diabetes* 2004, **53**:384–392.
71. Raab J, Haupt F, Scholz M, Matzke C, Warncke K, Lange K, Assfalg R, Weininger K, Wittich S, Löbner S, et al.: **Capillary blood islet autoantibody screening for identifying pre-type 1 diabetes in the general population: design and initial results of the Fr1da study.** *BMJ Open* 2016, **6**:e011144.
72. Siljander HT, Hermann R, Hekkala A, Lähde J, Tanner L, Keskinen P, Ilonen J, Simell O, Veijola R, Knip M: **Insulin secretion and sensitivity in the prediction of type 1 diabetes in children with advanced  $\beta$ -cell autoimmunity.** *Eur J Endocrinol* 2013, **169**:479–485.
73. Vardi P, Crisa L, Jackson RA: **Predictive value of intravenous glucose tolerance test insulin secretion less than or greater than the first percentile in islet cell antibody positive relatives of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients.** *Diabetologia* 1991, **34**:93–102.
74. Sosenko JM, Skyler JS, Beam CA, Krischer JP, Greenbaum CJ, Mahon J, Rafkin LE, Matheson D, Herold KC, Palmer JP, et al.: **Acceleration of the loss of the first-phase insulin response during the progression to type 1 diabetes in diabetes prevention trial-type 1 participants.** *Diabetes* 2013, **62**:4179–4183.
75. Koskinen MK, Helminen O, Matomäki J, Aspholm S, Mykkänen J, Mäkinen M, Simell V, Vähä-Mäkilä M, Simell T, Ilonen J, et al.: **Reduced  $\beta$ -cell function in early preclinical type 1 diabetes.** *Eur J Endocrinol* 2016, **174**:251–259.
76. Sosenko JM: **Staging the progression to type 1 diabetes with prediagnostic markers.** *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2016, **23**:297–305.

77. Cinek O, Kolousková S, Snajderová M, Sumník Z, Sedláková P, Drevínek P, Vavrinec J, Ronningen KS: **HLA class II genetic association of type 1 diabetes mellitus in Czech children.** *Pediatr Diabetes* 2001, **2**:98–102.
78. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, et al.: **Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes.** *Nat Genet* 2009, **41**:703–707.
79. Pociot F: **Type 1 diabetes genome-wide association studies: not to be lost in translation.** *Clin Transl Immunol* 2017, **6**:e162.
80. Winkler C, Krumsiek J, Lempainen J, Achenbach P, Grallert H, Giannopoulou E, Bunk M, Theis FJ, Bonifacio E, Ziegler A-G: **A strategy for combining minor genetic susceptibility genes to improve prediction of disease in type 1 diabetes.** *Genes Immun* 2012, **13**:549–555.
81. Winkler C, Krumsiek J, Buettner F, Angermüller C, Giannopoulou EZ, Theis FJ, Ziegler A-G, Bonifacio E: **Feature ranking of type 1 diabetes susceptibility genes improves prediction of type 1 diabetes.** *Diabetologia* 2014, **57**:2521–2529.
82. Steck AK, Dong F, Wong R, Fouts A, Liu E, Romanos J, Wijmenga C, Norris JM, Rewers MJ: **Improving prediction of type 1 diabetes by testing non-HLA genetic variants in addition to HLA markers.** *Pediatr Diabetes* 2014, **15**:355–362.
83. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD: **The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes.** *Nat Genet* 1997, **15**:293–297.
84. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Taskén K, Cucca F, et al.: **Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant.** *Nat Genet* 2005, **37**:1317–1319.
85. de Jong VM, Zaldumbide A, van der Slik AR, Laban S, Koeleman BPC, Roep BO: **Variation in the CTLA4 3'UTR has phenotypic consequences for autoreactive T cells and associates with genetic risk for type 1 diabetes.** *Genes Immun* 2016, **17**:75–78.
86. Alavi A, Werner TJ: **Futility of attempts to detect and quantify beta cells by PET imaging in the pancreas: why it is time to abandon the approach.** *Diabetologia* 2018, **61**:2512–2515.
87. Wilcox NS, Rui J, Hebrok M, Herold KC: **Life and death of  $\beta$  cells in Type 1 diabetes: A comprehensive review.** *J Autoimmun* 2016, **71**:51–58.
88. Miranda TB, Jones PA: **DNA methylation: the nuts and bolts of repression.** *J Cell Physiol* 2007, **213**:384–390.
89. Husseiny MI, Kaye A, Zebadua E, Kandeel F, Ferreri K: **Tissue-specific methylation of human insulin gene and PCR assay for monitoring beta cell death.** *PLoS One* 2014, **9**:e94591.
90. Akirav EM, Lebastchi J, Galvan EM, Henegariu O, Akirav M, Ablamunits V, Lizardi PM, Herold KC: **Detection of  $\beta$  cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:19018–19023.



91. Usmani-Brown S, Lebastchi J, Steck AK, Beam C, Herold KC, Ledizet M: **Analysis of  $\beta$ -cell death in type 1 diabetes by droplet digital PCR.** *Endocrinology* 2014, **155**:3694–3698.
92. Herold KC, Usmani-Brown S, Ghazi T, Lebastchi J, Beam CA, Bellin MD, Ledizet M, Sosenko JM, Krischer JP, Palmer JP, et al.:  **$\beta$  cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals.** *J Clin Invest* 2015, **125**:1163–1173.
93. Fisher MM, Watkins RA, Blum J, Evans-Molina C, Chalasani N, DiMeglio LA, Mather KJ, Tersey SA, Mirmira RG: **Elevations in Circulating Methylated and Unmethylated Preproinsulin DNA in New-Onset Type 1 Diabetes.** *Diabetes* 2015, **64**:3867–3872.
94. Palmer JP, Fleming GA, Greenbaum CJ, Herold KC, Jansa LD, Kolb H, Lachin JM, Polonsky KS, Pozzilli P, Skyler JS, et al.: **C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001.** *Diabetes* 2004, **53**:250–264.
95. Silverstein J, Maclaren N, Riley W, Spillar R, Radjenovic D, Johnson S: **Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus.** *N Engl J Med* 1988, **319**:599–604.
96. Assan R, Feutren G, Debray-Sachs M, Quiniou-Debrie MC, Laborie C, Thomas G, Chatenoud L, Bach JF: **Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus.** *Lancet Lond Engl* 1985, **1**:67–71.
97. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, Gorus F, Goldman M, Walter M, Candon S, et al.: **Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes.** *N Engl J Med* 2005, **352**:2598–2608.
98. Aronson R, Gottlieb PA, Christiansen JS, Donner TW, Bosi E, Bode BW, Pozzilli P, DEFEND Investigator Group: **Low-dose otelexizumab anti-CD3 monoclonal antibody DEFEND-1 study: results of the randomized phase III study in recent-onset human type 1 diabetes.** *Diabetes Care* 2014, **37**:2746–2754.
99. Ambery P, Donner TW, Biswas N, Donaldson J, Parkin J, Dayan CM: **Efficacy and safety of low-dose otelexizumab anti-CD3 monoclonal antibody in preserving C-peptide secretion in adolescent type 1 diabetes: DEFEND-2, a randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-centre study.** *Diabet Med J Br Diabet Assoc* 2014, **31**:399–402.
100. Hagopian W, Ferry RJ, Sherry N, Carlin D, Bonvini E, Johnson S, Stein KE, Koenig S, Daifotis AG, Herold KC, et al.: **Teplizumab preserves C-peptide in recent-onset type 1 diabetes: two-year results from the randomized, placebo-controlled Protégé trial.** *Diabetes* 2013, **62**:3901–3908.
101. Orban T, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Marks JB, Monzavi R, et al.: **Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *Lancet Lond Engl* 2011, **378**:412–419.
102. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA: **In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes.** *J Exp Med* 2004, **199**:1455–1465.

103. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, Herold KC, Lares A, Lee MR, Li K, et al.: **Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells.** *Sci Transl Med* 2015, **7**:315ra189.
104. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, Cuthbertson D, Rafkin-Mervis LE, Chase HP, Leschek E: **Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1.** *Diabetes Care* 2005, **28**:1068–1076.
105. Ludvigsson J, Krisky D, Casas R, Battelino T, Castaño L, Greening J, Kordonouri O, Otonkoski T, Pozzilli P, Robert J-J, et al.: **GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus.** *N Engl J Med* 2012, **366**:433–442.
106. Alhadj Ali M, Liu Y-F, Arif S, Tatovic D, Shariff H, Gibson VB, Yusuf N, Baptista R, Eichmann M, Petrov N, et al.: **Metabolic and immune effects of immunotherapy with proinsulin peptide in human new-onset type 1 diabetes.** *Sci Transl Med* 2017, **9**.
107. Roep BO, Solvason N, Gottlieb PA, Abreu JRF, Harrison LC, Eisenbarth GS, Yu L, Leviten M, Hagopian WA, Buse JB, et al.: **Plasmid-encoded proinsulin preserves C-peptide while specifically reducing proinsulin-specific CD8<sup>+</sup> T cells in type 1 diabetes.** *Sci Transl Med* 2013, **5**:191ra82.
108. Yeste A, Takenaka MC, Mascanfroni ID, Nadeau M, Kenison JE, Patel B, Tukpah A-M, Babon JAB, DeNicola M, Kent SC, et al.: **Tolerogenic nanoparticles inhibit T cell-mediated autoimmunity through SOCS2.** *Sci Signal* 2016, **9**:ra61.
109. Phillips B, Nylander K, Harnaha J, Machen J, Lakomy R, Styche A, Gillis K, Brown L, Lafreniere D, Gallo M, et al.: **A microsphere-based vaccine prevents and reverses new-onset autoimmune diabetes.** *Diabetes* 2008, **57**:1544–1555.
110. Klekotka RB, Mizgała E, Król W: **The etiology of lower respiratory tract infections in people with diabetes.** *Pneumonol Alergol Pol* 2015, **83**:401–408.
111. Nielson CP, Hindson DA: **Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro.** *Diabetes* 1989, **38**:1031–1035.
112. Hostetter MK: **Handicaps to host defense. Effects of hyperglycemia on C3 and Candida albicans.** *Diabetes* 1990, **39**:271–275.
113. Giri B, Dey S, Das T, Sarkar M, Banerjee J, Dash SK: **Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity.** *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2018, **107**:306–328.
114. Peakman M, Tree TI, Endl J, van Endert P, Atkinson MA, Roep BO, Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T-cell Assays in Type 1 Diabetes: **Characterization of preparations of GAD65, proinsulin, and the islet tyrosine phosphatase IA-2 for use in detection of autoreactive T-cells in type 1 diabetes: report of phase II of the Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T-cell assays in type 1 diabetes.** *Diabetes* 2001, **50**:1749–1754.

115. Schloot NC, Meierhoff G, Karlsson Faresjö M, Ott P, Putnam A, Lehmann P, Gottlieb P, Roep BO, Peakman M, Tree T: **Comparison of cytokine ELISpot assay formats for the detection of islet antigen autoreactive T cells. Report of the third immunology of diabetes society T-cell workshop.** *J Autoimmun* 2003, **21**:365–376.
116. Stechova K, Bohmova K, Vrabelova Z, Sepa A, Stadlerova G, Zacharovova K, Faresjö M: **High T-helper-1 cytokines but low T-helper-3 cytokines, inflammatory cytokines and chemokines in children with high risk of developing type 1 diabetes.** *Diabetes Metab Res Rev* 2007, **23**:462–471.
117. Vrabelova Z, Hrotekova Z, Hladikova Z, Bohmova K, Stechova K, Michalek J: **CD 127- and FoxP3+ expression on CD25+CD4+ T regulatory cells upon specific diabetogenic stimulation in high-risk relatives of type 1 diabetes mellitus patients.** *Scand J Immunol* 2008, **67**:404–410.
118. Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, Jegga AG, Hutton JJ, Aronow BJ, Katz JD: **Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse.** *Physiol Genomics* 2005, **21**:201–211.
119. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AMJ: **Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice.** *Diabetes* 2009, **58**:1302–1311.
120. Pietropaolo M, Towns R, Eisenbarth GS: **Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, **2**.
121. Coppieters KT, Dotta F, Amirian N, Campbell PD, Kay TWH, Atkinson MA, Roep BO, von Herrath MG: **Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients.** *J Exp Med* 2012, **209**:51–60.
122. Graham J, Hagopian WA, Kockum I, Li LS, Sanjeevi CB, Lowe RM, Schaefer JB, Zarghami M, Day HL, Landin-Olsson M, et al.: **Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes.** *Diabetes* 2002, **51**:1346–1355.
123. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, et al.: **Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes.** *J Clin Invest* 2002, **109**:131–140.
124. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA: **CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes.** *J Autoimmun* 2005, **24**:55–62.
125. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TIM: **Defective suppressor function in CD4(+)/CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes.** *Diabetes* 2005, **54**:92–99.
126. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA: **Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes.** *Diabetes* 2005, **54**:1407–1414.
127. Hinman RM, Cambier JC: **Role of B lymphocytes in the pathogenesis of type 1 diabetes.** *Curr Diab Rep* 2014, **14**:543.
128. Noorchashm H, Lieu YK, Noorchashm N, Rostami SY, Greeley SA, Schlachterman A, Song HK, Noto LE, Jevnikar AM, Barker CF, et al.: **I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes**

- is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice.** *J Immunol Baltim Md 1950* 1999, **163**:743–750.
129. Mariño E, Tan B, Binge L, Mackay CR, Grey ST: **B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes.** *Diabetes* 2012, **61**:2893–2905.
  130. Hulbert C, Riseili B, Rojas M, Thomas JW: **B cell specificity contributes to the outcome of diabetes in nonobese diabetic mice.** *J Immunol Baltim Md 1950* 2001, **167**:5535–5538.
  131. Hussain S, Delovitch TL: **Dysregulated B7-1 and B7-2 expression on nonobese diabetic mouse B cells is associated with increased T cell costimulation and the development of insulinitis.** *J Immunol Baltim Md 1950* 2005, **174**:680–687.
  132. Smith MJ, Rihanek M, Wasserfall C, Mathews CE, Atkinson MA, Gottlieb PA, Cambier JC: **Loss of B-Cell Anergy in Type 1 Diabetes Is Associated With High-Risk HLA and Non-HLA Disease Susceptibility Alleles.** *Diabetes* 2018, **67**:697–703.
  133. Smulski CR, Eibel H: **BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival.** *Front Immunol* 2018, **9**:2285.
  134. Garcia A, De Sanctis JB: **A Review of Clinical Trials of Belimumab in the Management of Systemic Lupus Erythematosus.** *Curr Pharm Des* 2016, **22**:6306–6312.
  135. Thompson WS, Pekalski ML, Simons HZ, Smyth DJ, Castro-Dopico X, Guo H, Guy C, Dunger DB, Arif S, Peakman M, et al.: **Multi-parametric flow cytometric and genetic investigation of the peripheral B cell compartment in human type 1 diabetes.** *Clin Exp Immunol* 2014, **177**:571–585.
  136. Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler A-K, Rizzi M: **B cell biology: an overview.** *Curr Allergy Asthma Rep* 2014, **14**:434.
  137. Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, Mostowski H, Verthelyi D, Akkoyunlu M: **Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion.** *Eur J Immunol* 2007, **37**:1785–1795.
  138. Zhang F, Song S-S, Shu J-L, Li Y, Wu Y-J, Wang Q-T, Chen J-Y, Chang Y, Wu H-X, Zhang L-L, et al.: **BAFF upregulates CD28/B7 and CD40/CD154 expression and promotes mouse T and B cell interaction in vitro via BAFF receptor.** *Acta Pharmacol Sin* 2016, **37**:1101–1109.
  139. Ye Q, Wang L, Wells AD, Tao R, Han R, Davidson A, Scott ML, Hancock WW: **BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses.** *Eur J Immunol* 2004, **34**:2750–2759.
  140. McDaniel CF: **Diabetes: A model of oxidative accelerated aging.** *Age* 1999, **22**:145–148.
  141. Polsky S, Ellis SL: **Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus.** *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015, **22**:277–282.
  142. Kurien M, Mollazadegan K, Sanders DS, Ludvigsson JF: **Celiac Disease Increases Risk of Thyroid Disease in Patients With Type 1 Diabetes: A Nationwide Cohort Study.** *Diabetes Care* 2016, **39**:371–375.

143. Stechova K, Spalova I, Durilova M, Bartaskova D, Cerny M, Cerna M, Pithova P, Chudoba D, Stavikova V, Ulmannova T, et al.: **Influence of maternal hyperglycaemia on cord blood mononuclear cells in response to diabetes-associated autoantigens.** *Scand J Immunol* 2009, **70**:149–158.
144. Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C: **Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis.** *Indian J Endocrinol Metab* 2012, **16 Suppl 1**:S27-36.
145. Hayes CE, Hubler SL, Moore JR, Barta LE, Praska CE, Nashold FE: **Vitamin D Actions on CD4(+) T Cells in Autoimmune Disease.** *Front Immunol* 2015, **6**:100.
146. Strange RC, Shipman KE, Ramachandran S: **Metabolic syndrome: A review of the role of vitamin D in mediating susceptibility and outcome.** *World J Diabetes* 2015, **6**:896–911.
147. Thomas GN, Scragg R, Jiang CQ, Chan W, Marz W, Pilz S, Kim HC, Tomlinson B, Bosch J, Lam TH, et al.: **Hyperglycaemia and vitamin D: a systematic overview.** *Curr Diabetes Rev* 2012, **8**:18–31.
148. Nazir N, Siddiqui K, Al-Qasim S, Al-Naqeb D: **Meta-analysis of diabetic nephropathy associated genetic variants in inflammation and angiogenesis involved in different biochemical pathways.** *BMC Med Genet* 2014, **15**:103.
149. Hull CM, Peakman M, Tree TIM: **Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it?** *Diabetologia* 2017, **60**:1839–1850.
150. Bour-Jordan H, Thompson HL, Giampaolo JR, Davini D, Rosenthal W, Bluestone JA: **Distinct genetic control of autoimmune neuropathy and diabetes in the non-obese diabetic background.** *J Autoimmun* 2013, **45**:58–67.
151. Ziegler SF, Buckner JH: **FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation.** *Microbes Infect* 2009, **11**:594–598.
152. Kleinewietfeld M, Hafler DA: **The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity.** *Semin Immunol* 2013, **25**:305–312.
153. Cucak H, Vistisen D, Witte D, Philipsen A, Rosendahl A: **Reduction of specific circulating lymphocyte populations with metabolic risk factors in patients at risk to develop type 2 diabetes.** *PloS One* 2014, **9**:e107140.
154. Zeng C, Shi X, Zhang B, Liu H, Zhang L, Ding W, Zhao Y: **The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications.** *J Mol Med Berl Ger* 2012, **90**:175–186.
155. Wilhelm AJ, Zabalawi M, Owen JS, Shah D, Grayson JM, Major AS, Bhat S, Gibbs DP, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG: **Apolipoprotein A-I modulates regulatory T cells in autoimmune LDLr<sup>-/-</sup>, ApoA-I<sup>-/-</sup> mice.** *J Biol Chem* 2010, **285**:36158–36169.
156. Husseiny MI, Kuroda A, Kaye AN, Nair I, Kandeel F, Ferreri K: **Development of a quantitative methylation-specific polymerase chain reaction method for monitoring beta cell death in type 1 diabetes.** *PloS One* 2012, **7**:e47942.

157. Iynedjian PB: **Molecular physiology of mammalian glucokinase.** *Cell Mol Life Sci CMLS* 2009, **66**:27–42.

## **Přílohy**