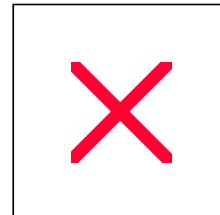


UNIVERZITA KARLOVA
V PRAZE

3. *LÉKAŘSKÁ FAKULTA*



Oddělení buněčné a molekulární biologie

Lucia Čornejová

Prevence autoimunitních chorob
Prevention of autoimmunity diseases

Diplomová práce

Praha, říjen 2006

Autor práce: **Lucia Čornejová**

Studijní program: **Všeobecné lékařství s preventivním zaměřením**

Vedoucí práce: **MUDr. Marie Černá, CSc.**

Pracoviště vedoucího práce: **Oddělení buněčné a molekulární
biologie 3. LF**

Datum a rok obhajoby: **říjen, 2006**

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 14. října 2006

Lucia Čornejová

Obsah

Úvod	4
1. Kapitola- Autoimunitní onemocnění obecně	6
1.1 Rozdělení autoimunitních onemocnění.....	6
1.2 Mechanizmy působení autoimunity.....	8
1.3 Příčiny přítomnosti autoreaktivních buněk v cirkulaci a periferních tkáních.....	12
1.4 Faktory podílející se na vzniku autoimunitních chorob.....	14
2. Kapitola- Imunopatogeneze některých autoimunitních chorob a jejich prevence	19
2.1 Diabetes mellitus 1. typu.....	20
2.1.1 Obecné poznatky.....	20
2.1.2 Imunopatogeneze a genetika.....	21
2.1.3 Prevence IDDM.....	22
2.2 Roztroušená mozkomíšní skleróza.....	27
2.2.1 Obecné poznatky.....	27
2.2.2 Imunopatogeneze a genetika.....	28
2.2.3 Prevence RS.....	32
Závěr	35
Souhrn	36
Summary	39
Seznam použité literatury	42

Úvod

Téma své diplomové práce Prevence autoimunitních chorob jsem si vybrala na základě svého zájmu o tuto problematiku. Jsou to nemoci, které jsou značně rozšířené v naší populaci, s frekvencí výskytu 5% a mnohé z nich vedou k invalidizaci a značnému omezení postiženého pacienta, čímž mají i dalekosáhlý socioekonomický dopad na naši společnost.

Z hlediska primární prevence nejsou lehké ovlivnitelné vzhledem k jejich multifaktoriální etiopatogenezi. Jejich rozvoj je spíše důsledkem komplexních interakcí mezi řadou predisponujících faktorů zahrnujících genotyp v jednom či více lokusech a spektrum vlivů okolního prostředí, které patologický proces spouští, urychlují nebo exacerbují. Prevence těchto chorob je zaměřena právě na eliminaci a úpravu vnějších vlivů. Dědičný znak, který buďto je nebo není přítomný, se nazývá diskrétní nebo kvalitativní znak. Osoba je buďto má nebo nemá. Oproti tomu stojí kvalitativní znak, což je měřitelná vlastnost jako výška, krevní tlak, hladina cholesterolu a body mass index. Pochopení dědičné podstaty variability kvantitativních znaků je základem pro porozumění tomu, jak se geny účastní na vzniku mnoha populačně častých a závažných polygenních nemocí.

Charakteristika vlastností polygenních nemocí:

1. V etiologii a patogeneze těchto nemocí se uplatňuje kaskádovitý vliv mnoha genů společně s vlivem vnějších faktorů.
2. Vykazují familiární agregaci, protože příbuzní postiženého jedince pravděpodobněji než nepříbuzné osoby nesou k onemocnění predisponující alely sdílené s postižením.
3. Dvojice příbuzných sdílející v příslušných lokusech genotypy predisponující ke vzniku onemocnění mohou být pro daný fenotyp diskordantní (vykazují neúplnou penetraci), protože v patogenezi onemocnění hrají zásadní roli i negenetické faktory jako vlivy vnějšího prostředí. Nejkrajnějším případem neúplné penetrace při shodných genotypech jsou diskordantní monozygotická dvojčata.

Všechny poznatky molekulární biologie a genetiky na tomto poli jsou nesmírně důležité k pochopení patogeneze autoimunity, vzniku jednotlivých autoimunitních chorob a možností terapeutické léčby.

Ve své diplomové práci jsem v první kapitole rozpracovala dosavadní poznatky o autoimunitě, jaké nemoci tam zařazujeme a jakými mechanismy působí. Ve druhé kapitole se budu věnovat dvou autoimunitním onemocněním, a to Diabetes mellitus 1. typu a Roztroušená mozkomíšni skleróza.

1. Kapitola- Autoimunitní choroby obecně

1.1 Rozdělení autoimunitních nemocí

Autoimunitní choroby postihují řadu orgánů endokrinního, gastrointestinálního, nervového a krevního systému, jsou známa poškození kůže, oka, pojiva, jater či ledvin.

Dělíme je na:

Orgánově specifická, kde například patří:

1. Coeliakie
2. Diabetes mellitus 1. typu
3. Roztroušená mozkomíšní skleróza
4. Hashimotova thyreoiditis
4. Thyreotoxikóza
5. Autoimunitní hepatitidy
6. Perniciózní anémie
7. Autoimunitní hemolytická anémie
8. Pemphigus vulgaris
9. Myastenia gravis

Orgánově nespecifická:

1. Revmatoidní artritida
2. Juvenilní idiopatická artritida

3. Systémový lupus erythematoses

4. Dermatomyositida

5. Sklerodermie

6. Akutní revmatická horečka

Toto tradiční členění nemocí je už dnes překonáno díky poznání patogeneze imunopatologických autoimunitních nemocí. Současné vysoce citlivé diagnostické a laboratorní metody dokazují, že u nemocí dříve označovaných jako orgánově specifické, je možné nalézt predispozice k autoimunitnímu postižení, často subklinické, i dalších tkání, orgánů nebo celých soustav.

U těchto nemocí nacházíme jisté společné znaky :

1. Výskyt onemocnění je asociován s přítomností HLA 2.třídy, pouze ankylozující spondylitida má silnou asociaci s HLA 1.třídou.
2. Častá je asociace s jinými autoimunitními chorobami.
3. Přítomnost cytotoxických T-lymfocytů a cirkulujících autoprotilátek: u lidí a v experimentu byl prokázán přenos choroby lymfocyty nebo sérem.
4. Existence definovaného autoantigenů: u řady onemocnění se již podařilo identifikovat jeden či více autoantigenů a charakterizovat některé z epitopů rozpoznávaných protilátkami a autoreaktivními T lymfocyty.
5. Infiltrace cílové tkáně lymfocyty: dochází k aktivaci buněk imunitního systému.

1.2 Mechanizmy působení autoimunity

Imunitní systém se podílí významným způsobem na zachování integrity a homeostázy organismu, tím že má schopnost rozlišovat mezi buňkami vlastního organismu a materiály pro organismus cizorodými. Tento materiál je imunitním systémem rozpoznán, destruován a eliminován.

Známe dva základní typy imunity:

1. *Nespecifická (vrozená, přirozená) imunita* je vrozená schopnost organismu rychle reagovat proti cizorodým antigenům. Mechanizmy, které sem patří se označují jako nespecifické, protože nerozeznávají specifický antigen, nejsou závislé na předchozím setkání s ním a nevytvářejí imunologickou paměť. Podílí se na ní:
 - a) Zdravá a neporušená kůže a sliznice tvoří bariéru proti pronikání cizorodých látek. Ve slinách, slzách a ve střevní stěně je enzym lysozym, který rozrušuje bakteriální stěnu. Kyselina chlorovodíková v žaludeční šťávě má silné baktericidní účinky a brání rozmnožování kvasinek a plísní.
 - b) Fagocytóza je vlastní nástroj nespecifické imunity a zahrnuje tři děje: vazba fagocytující buňky na povrch antigenu, pohlcení a spouštění mikrobicidních aktivit.
 - c) Přirozená cytotoxicita představuje 10-15% lymfocytů periferní krve, označovaných jako nulové buňky, protože nemají povrchové znaky typické pro B- a T-buňky ani specifické receptory pro antigeny. Mají však schopnost ničit cílové buňky bez předchozí senzibilizace a bez ohledu na HLA molekuly. Nesou označení NK-buňky (=Natural Killer-přirozený zabijec). Uvolňují cytotoxicky působící látky-perforiny.
 - d) Komplement je soubor více než 20 rozpustných složek, z nichž většina jsou neaktivní prekurzory enzymů. Aktivace komplementového systému probíhá kaskádovitě. K jeho hlavním funkcím patří chemotaxe, opsonizace (označení

cizorodého materiálu) pro fagocytózu a destrukce membrány různých buněk a mikroorganismů. Meziprodukty komplementové kaskády se uplatňují také při aglutinaci buněk, neutralizaci virů a vyplavování neutrofilů a monocytů z kostní dřeně.

2. *Specifická (adaptivní, získaná) imunita* je získaná schopnost organismu, která se rozvíjí s určitým zdržením po narození. Účinkuje cíleně a přesně proti konkrétnímu antigenu. Je vybavena možností imunologické paměti. Efektorovou buňkou specifické imunity je lymfocyt. Tradičně se dělí na:

a) Humorální imunitu, která je zprostředkována B-lymfocyty, jež se po setkání s antigenem aktivují na plazmatické buňky tvořící protilátky. Toto setkání se uskutečňuje prezentací antigenu B-buňce makrofágem. Makrofág cizorodu látku pohltí, částečně stráví a složky antigenní povahy exponuje na svém povrchu a nabídne lymfocytům. Spolupráce s makrofágy a T-lymfocyty je nezbytná, protože napomáhají aktivaci B-buněk. Některé lymfoblasty nepokračují v přeměně na plazmatické buňky, ale pomnoží se a diferencují v paměťové buňky, které žijí velmi dlouho, cirkulují v těle, vstupují do lymfatické tkáně, ale zůstávají „spící“. Jakmile se však setkají s tímtež antigenem, rychle reagují a začnou produkovat velké množství protilátek. Tento typ imunity se uplatňuje v obraně třemi způsoby: přímým účinkem, aktivací komplementu a opsonizací. Receptory B-buněk jsou těžké a lehké řetězce protilátek, které zůstávají vázány na povrchovou membránu a po vazbě antigenu na receptor dostává B-buňka signál k biologické odpovědi.

b) Buněčně zprostředkovanou imunitu jejíž efektorová buňka je T-lymfocyt. Uplatňuje se v obraně zejména proti virové a plísňové infekci, proti nádorovým buňkám a odpovídají za odvržení transplantátu. Tyto funkce vykonávají 3 různé subpopulace:

1. Cytotoxické T-lymfocyty: nesou fenotyp CD8 a jsou to efektorové buňky, které mohou rozpoznat cizí antigen na povrchu kterékoliv buňky těla.

2. Pomocné T-lymfocyty: nesou koreceptory CD4 a mají nezastupitelnou regulační úlohu v celém imunitním systému.
3. Regulační T-lymfocyty: regulují funkce ostatních T a B-lymfocytů. Samy fungují pouze tehdy, jsou-li průběžně podněcovány pomocnými T-buňkami, které jsou potom aktivovanými regulačními T-buňkami tlumeny. Je to důležitý zpětnovazebný okruh, který hraje důležitou roli v autoimunitě a imunologické toleranci. (10)

Mechanismy autoimunity zahrnují:

-buněčnou imunitu danou pomocnými Th1-lymfocyty (IL-2, IFN- γ , TNF- β)

-humorální imunitu danou pomocnými Th2-lymfocyty (IL-4, IL-5, IL-13)

-také regulační funkce pomocných Th3-lymfocytů (IL-10, TGF- β 1) a regulačních CD4+25 T-lymfocytů.

Podle klasické koncepce imunopatogeneze autoimunitních nemocí jde o narušení principu tolerance, kde sehrávají klíčovou roli T lymfocyty. Ty rozpoznávají antigeny prostřednictvím receptoru pro antigen (TcR). Antigenní fragmenty vznikají po zpracování cizích antigenů v antigen prezentující buňkách (APC) vázané s HLA 1. nebo 2.třídy. Při procesu intrathymové diferenciaci a v selekčních procesech může dojít k amplifikaci nízkoafinních autoreaktivních T-lymfocytů.

Současná koncepce fungování imunitního systému vychází z poznatku, že T lymfocyty potřebují ke své aktivaci a klonální expanzi 2 typy signálů. 1.signál je zprostředkován přes TcR a 2.signál se označuje jako „kontext rozpoznávání“, což je řada akcesorních signálů. Když jeden ze signálů chybí, tak nedojde k aktivaci, ale naopak k indukci apoptózy. Kontext rozpoznávání je zprostředkován přirozenou imunitou, kde APC nebo dendritické buňky jsou schopny identifikovat mikrobiální agens pomocí PAMP (patogenem asociované molekulové vzory).

Recentně byla tato koncepce propracovaná na tzv. „danger model“. Podle tohoto modelu imunitní systém nerozlišuje mezi „non self“ a „self“, ale mezi neškodnými a škodnými signály. Tvorbou nebezpečných signálů reagují buňky našeho těla na poškození, které může být dáno jak infekcí, tak i z vlastních struktur, vznikajících v procesu apoptózy či nekrózy v průběhu obranného zánětu. Tyto nebezpečné signály pak ovlivňují imunitní systém.

Na základě hlavních efektorových mechanismů můžeme dělit autoimunitní onemocnění do dvou velkých skupin podle:

a) Významného působení efektorových T-lymfocytů:

1. Diabetes 1. Typu
2. Revmatoidní artritida
2. Roztroušená skleróza

U těchto nemocí stimulace CD4+ Th1 se podílí na destrukci Langerhansových ostrůvků pankreatu, pojivové a nervové tkáně.

b) Významného účinku autoprotilátek:

-proti povrchovým molekulám nebo molekulám mezibuněčné matrix:

1. Perniciózní anémie: Tvoří se autoprotilátky proti intrinsic faktoru, membránové bílkovině epitelových buněk, což vede ke snížení vstřebávání vitamínu B12, nezbytného pro erytropoézu.
2. Autoimunitní hemolytická anémie: Tvoří se protilátky proti antigenům na povrchu erytrocytů, které je obalují a po vazbě komplementu působí jejich destrukci.
3. Pemphigus vulgaris: Bolestivé puchýřovité onemocnění kůže způsobené autoprotilátkami proti epidermální adhezivní molekule (kadherinu)

4. Akutní revmatická horečka: Vyvolána protilátkami původně namířenými proti streptokokové infekci, které zkříženě reagují s povrchovým antigenem srdečního svalu.

-proti povrchovým receptorům:

1. Gravesova nemoc: Vznikají protilátky proti receptoru pro TSH, což vede k neregulované stimulaci štítné žlázy, spojenou se zvýšeným bazálním metabolismem, špatnou termoregulací a nervozitou.

2. Myastenia gravis: Tvoří se protilátky proti receptoru pro acetylcholin na svalových vláknech a brání přenosu signálu, což má za následek snížení hybnosti. Pokud dojde ke postižení dýchacího svalstva může být onemocnění smrtelné.

-ukládány ve formě komplexů ve tkáních:

Systémový lupus erythematosus: Protilátky jsou naměřené proti jaderným složkám a jejich komplexům (DNA, histonům). Depozita se ukládají především v pojivové tkáni, stěnách krevních kapilár a ledvinových glomerulech, kde po vazbě komplementu dochází k poškození tkáně, uvolnění dalších antigenů a zánětlivé odpovědi.

1.3 Příčiny přítomnosti autoreaktivních buněk v cirkulaci a periferních orgánech

U zdravého jedince je aktivita autoreaktivních buněk limitována řadou mechanismů, které zajišťují toleranci na vlastní antigeny. Je předmětem aktivní regulace T lymfocytů. Přesto jsou nízké hladiny autoprotilátek přítomny u všech jedinců jako součást repertoáru přirozených protilátek. Pokud dojde k selhání regulačních mechanismů, k namnožení a aktivaci autoreaktivních buněk v periferních orgánech, složky imunitního systému začnou poškozovat vlastní organismus, dochází k vývoji autoimunitního onemocnění.

Při hledání příčin proč u některých jedinců vznikají ve značném množství autoreaktivní buňky se vychází z představy o vývoji T-lymfocytů v thymu a neodpovídavosti na vlastní molekuly. Přestože thymocyty procházejí v průběhu svého vyžívání negativní selekcí (ve dřeni thymu hynou buňky s vysokou afinitou pro antigeny prezentované MHC), opouštějí thymus i autoreaktivní T-lymfocyty.

Úloha T-lymfocytů při rozvoji autoimunity:

Populace zralých pomocných a také cytotoxických T-lymfocytů prodělávají další vyžívání po další aktivaci. Výsledkem je diferenciací do podtypů pomocných (Th) a cytotoxických (Tc) T-lymfocytů. Podtyp Th1 je odpovědný za rozvoj cytotoxické reaktivity, tvorbu protilátek IgG2 a za abnormálních okolností taky imunopatologické reakce 4.typu. Th1 tvoří $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\beta$ a IL-2. Podtyp Th2 reguluje diferenciací B-lymfocytů, syntézu IgG1 a IgE. Za abnormálních okolností určuje rozvoj imunopatologické reakce 1.a 3.typu. Th2 produkuje cytokiny IL-2, IL-4 a IL-13. Th1 a Th2 jsou ve vzájemném antagonistickém vztahu. Th1 prostřednictvím $\text{INF}\gamma$ omezuje aktivitu Th2. A podobně Th2 tlumí aktivitu Th1 přes IL-4. Okolnosti, které určí do kterého podtypu budou Th0 vyžívát závisí na vlastnostech mikroprostředí. Zjednodušeně řečeno do Th1 budou vyžívát, jsou-li přítomny antigeny mikrobiálního původu a prostředí je bohaté na IL-12 a IL-18. Do Th2 budou vyžívát, když antigeny nejsou mikrobiálního původu a v prostředí je zvýšené množství IL-4 a IL-13.

Do procesu vyžívání jsou zapojeny i chemokiny. Zatím nejvíce informací pro vývoj funkčně odlišných subsetů T-lymfocytů je o C-C chemokinech. Jedním z hlavních receptorů pro tento chemokin je receptor CCR-5. U malé části lidí evropského původu je přítomna delece 32 párů bází v genu pro receptor CCR-5. V důsledku toho u nich vzniká defektní receptor, kterému chybí transmembránová část, není exprimován na povrchu APC, ale zůstává v cytoplazmě. Tato delece omezuje rozvoj Th1 reaktivity, která je podle současných představ určující pro rozvoj orgánově specifické autoimunity.

Dalším faktorem, který se může uplatňovat při vzniku autoimunitních chorob, jsou hormonální vlivy. Studium těchto vlivů ukázalo obecně vyšší výskyt autoimunitních chorob u žen než u mužů (více než 80%). Spíše výjimečně převažují muži, například u ulcerózní kolitis nebo diabetes mellitus 1. typu.

Pohlavní hormony, zvláště estrogen, progesteron a testosteron, lze považovat za základní mediátory ovlivňující imunitní odpověď. Jasný důkaz dokládá fakt že v průběhu těhotenství se klinická aktivita roztroušené sklerózy a revmatoidní artritidy snižuje, nejvíce ve třetím trimestru, kdy je hladina estrogenu a progesteronu nejvyšší. Po porodu dochází běžně k exacerbacím těchto nemocí. Je to v protikladu se situací u nemocných žen se systémovým lupus erythematoses, který se v graviditě zhoršuje. Změny klinického průběhu těchto nemocí v graviditě jsou vysvětlovány změnami aktivit imunoregulačních Th1 a Th2 T-lymfocytů.

Byla formulována i jiná hypotéza vysvětlující závislosti mezi graviditou a autoimunitou. Je známo že lymfoidní buňky plodu se dostávají do cirkulace matky a cirkulují tam pravděpodobně dlouhá léta po porodu. Tento jev se označuje jako mikrochimérismus. Buňky plodu jsou však odlišné od mateřských co do výbavy molekul HLA, protože jsou určeny i haplotypem HLA otce. Molekuly otcovského HLA haplotypu mohou modulovat imunologickou reaktivitu matky.

Dále existuje řada dosud neznámých příčin autoimunitních chorob, které neumíme vysvětlit, známe však řadu faktorů, které výrazně ovlivňují vznik a vývoj těchto chorob.

1.4 Faktory podílející se na vzniku a vývoji autoimunitních chorob:

1. genetické faktory

Onemocnění nejčastěji vzniká u jedinců s genetickou predispozicí, vázanou na určitý genotyp HLA 2. třídy.

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC), u člověka lidské leukocytární antigeny (HLA), jsou složeny z velké skupiny genů umístěných na krátkém raménku 6. chromozomu. Můžeme je rozdělit do 3 tříd, které jsou vysoce polymorfni. Tyto molekuly jsou zapojeny do procesu rozpoznávání antigenu, lymfocytárních interakcí a vývoje tolerance vlastních antigenů.

Geny 1. třídy (HLA-A, HLA-B a HLA-C) kódují antigeny, které jsou expromovány navšech jaderných buňkách. Molekuly HLA jsou složeny ze dvou polypeptidových podjednotek, variabilního těžkého řetězce kódovaného v MHC oblasti a beta2-mikroglobulinu, který je kódován na 15 chromozomu. Imunitní systém reaguje na peptidové fragmenty intracelulárních proteinů, které jsou zpracované velkými multifunkčními proteázami, a po vazbě na HLA 1. třídy transportovány na buněčný povrch, kde se vážou s TCR cytotoxických T-lymfocytů.

Lokus 2. třídy obsahuje několik podoblastí kódujících nejen transmembránové antigeny HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP, ale také intracelulární proteiny TAP a LMP, které se účastní procesu zpracování antigenů. Molekuly 2. třídy jsou primárně exprimovány na B-lymfocytech, makrofázích a aktivovaných T-lymfocytech. Každá molekula je heterodimér, složen z variabilních alfa a beta podjednotek, kódovaných v MHC oblasti.

Geny 3. třídy zahrnují geny pro volné molekuly úzce spjaté s imunologickými funkcemi jako properdinový faktor Bf a složky komplementu C2 a C4.

HLA alely jsou na daném chromozómu přenášeny společně jako haplotypy. Říkame, že je zde silná vazebná nerovnováha. Alely jsou kodominantní, každý rodič má dva exprimované haplotypy a předává jeden z nich svému dítěti. Výsledek je, že rodič a potomek sdílejí pouze jeden haplotyp a existuje tedy 25% šance, že dva sourozenci zdědí stejné haplotypy. Mezi

různými populacemi existuje značná variabilita v profilu a frekvenci HLA variant. HLA-A2 např. je mezi HLA-A variantama nejčastější ve všech populacích, zatímco HLA-A24 je popisována u bílé rasy, ale nikoli u černochů nebo Asiatů.

Mírou genetické predispozice je tzv. *relativní riziko* (RR), definované jako šance jedince s určitým rizikovým HLA antigenem onemocnět touto chorobou ve srovnání s jedincem, který tento antigen nemá. Nejvyšší RR je u ankylozující spondylitidy pro HLA-B27, kde činí 84.7. (1), která zároveň představuje jediné autoimunitní onemocnění asociované s HLA 1. třídou.

Jiné studie ukázaly asociaci mezi diabetem 1. typu a asparagové kyseliny v pozici 57 proteinového řetězce HLA – DQ beta. Alely spojené s vnímavostí k nemoci kódují v této pozici aminokyseliny: Ala, Ser nebo Val. Vyskytují se až u 90% pacientů. Přítomnost asparagové kyseliny v pozici 57 řetězce HLA – DQ beta je považována za protektivní. Z experimentálních modelů vyplývá, že protektivní alely mohou způsobit pozitivní selekci endogenních T lymfocytů a potlačovat vývoj autoimunitních T-lymfocytů. Genetická predispozice je často dána i celou řadou non-MHC genů, které jsou asociovány s autoimunitními chorobami, např. cytotoxic T-lymfocyte associated antigen 4 (CTLA4), protein tyrosine phosphatase (PTPN22) a tumor necrosis factor alfa (TNF). (11)

Genetická predispozice se liší u jednotlivých etnických skupin a ras. Přestože je významná, není jediná, která ovlivňuje vznik autoimunitních nemocí. Tomu nasvědčuje i fakt, že současný výskyt nemocí je pouze u 30% identických dvojčat.

2. faktory zevního prostředí : infekce, výživa, stres

Účast infekcí na vzniku autoimunity:

Jedná se především o virové infekce, které mohou iniciovat imunopatologický proces několika mechanismy:

1. Lýze buňky je následována uvolněním sekvestrovaných autoantigenů a expozicí imunitnímu systému. Podobně může virová infekce narušit bariéry oddělující imunologicky chráněné tkáně, jako CNS a oko. Virus coxsackie B je považován za predispoziční faktor vzniku diabetes mellitus 1. typu. Další viry které byly prokázány v imunopatogenezi především roztroušené mozkomíšni sklerózy jsou virus chřipky, adenoviry, HBV, spalničky, HSV a EBV.

2. Existuje podobnost antigenních epitopů virů či bakterií a vlastních struktur organismu, což vede k hypotéze nazývané se „molekulární mimikry“. Podle této teorie antigenní epitopy cizorodého antigenu vyvolávají imunitní odpověď. Antigen je zpracován APC a v komplexu s MHC molekulou je prezentován T-lymfocytům. Tyto buňky odpovídají na stimulaci a vzniká klon specifických T-lymfocytů, jehož cílem je eliminace infekce. Buňky tohoto klonu reagují s cizorodým antigenem, ale současně i s molekulami vlastních tkání, které mají podobnou strukturu. Rozpoznávání vlastních epitopů však přetrvává i v období, kdy primární infekce je již eliminována. Následně je stimulována i odpověď B lymfocytů, které tvoří autoprotilátky.

3. V důsledku infekce dochází ke zvýšené expresi stresových proteinů, HLA antigenů, adhezivních molekul a aktivaci řady proteáz, čímž se rozšiřuje spektrum autoantigenů.

Přímým působením superantigenů bakteriálního původu dochází k polyklonální stimulaci a expanzi i autoimunitních T-lymfocytů.

Další mikrobiální agens, který se může uplatňovat při vzniku autoimunitních chorob, jsou parazitární infekce.

Chronická zánětlivá reakce, indukovaná parazitární infekcí, může vést k narušení tolerance. Z četných indukčních mechanismů je významné přímé poškození tkání parazitem, ale především se uplatňuje teorie mimikrů, protože paraziti jakožto eukaryotní organizmy mají výrazné shody s člověkem ve svých strukturách. Příkladem je polysacharidový antigen Lewis-L, který je součástí povrchových antigenů schistosom, nebo Trypanosoma cruzi obsahuje molekuly, které jsou podobné antigenům v nervové tkáni člověka.

Vliv výživy na vznik autoimunity:

Existují důkazy, že na vzniku autoimunitních nemocí se uplatňuje faktor délky kojení mateřským mlékem, které má významný protektivní vliv na nezralý imunitní systém střevní sliznice kojence. Matka předává kojenci své IgG, hormony a buňky imunitního systému jako součást jeho pasivní imunity. Čím víc je kojení zkráceno, tím dříve je kojeneček exponován antigenům kravského mléka (kasein, albumin) a lepku, což může vést k nastartování imunopatologického autoimunitního procesu.

Vliv psychického stresu na vznik autoimunity:

Imunopatologický zánět se vyvíjí pravděpodobně z důvodu omezené schopnosti hypotalamo-hypofyzárního systému stimulovat nadledviny k tvorbě glukokortikoidů. Zatímco u zdravých osob je IL-6 významným podnětem pro indukci tvorby ACTH a kortizolu, u osob s autoimunitní poruchou zvýšená hladina IL-6 nevede k indukci ACTH ani kortizolu. Sympatikus a parasympatikus mohou mít jak negativní, tak pozitivní vliv.

2. Kapitola– Imunopatogeneze některých autoimunitních chorob a jejich prevence

V této kapitole se budu zabývat konkrétně dvěma autoimunitními chorobami: diabetes mellitus 1. typu a roztroušená mozkomíšní skleróza. Jedná se o autoimunitní choroby s vysokou prevalencí v naší populaci a s významným sociálním a ekonomickým dopadem na naši společnost.

Charakteristika pojmu prevence:

Primární prevence zhrnuje preventivní normy i cílené akce a aplikuje je na populaci jako celek. Jejím cílem je předejít nemoci jako takové. Dělí se na primární prevenci:

-specifickou, která je zaměřena cíleně proti konkrétní nemoci. Obsahuje např. očkování, fluoridizace pitné vody a jodizace soli. Taky se zaměřuje proti rizikům ohrožujícím populaci, jako riziko znečištění vody nebo ovzduší.

-nespecifickou, která se zaměřuje na posilování a rozvíjení zdraví populace.

Sekundární prevence se už neobrací na populaci jako celek, ale na jedince, u kterého byla zjištěna porucha zdraví. Obsahuje léčebné postupy, které vedou k úpravě a stabilizaci zdravotního stavu.

Terciární prevence se týká pacienta s chronickou nebo recidivující poruchou zdraví, kde šance na jeho úplné vyléčení je minimální. Zahrnuje v sobě postupy, které vedou k zachování kvality života a snížení počtu recidiv daného onemocnění.

2.1 Diabetes mellitus 1.typu

2.1.1 Obecné poznatky:

Diabetes mellitus 1.typu (T1DM) je jeden z nejvýznamnějších medicínských problémů rozvinutých zemí. V naší populaci postihuje 0,2 % obyvatel a tvoří 13-15 % všech případů diabetu. Incidence má svůj vrchol mezi 13-15 lety a pohybuje se kolem 25 na 10 000 obyvatel. Regionální rozdíly jsou značné, s nejvyšším výskytem v severských zemích (Finsko 28,6 na 100 000 obyvatel do 20 let věku) a nejnižším výskytem v jižních zemích (Francie 4,7). Variabilní je i sezónní incidence s výrazným poklesem v letních měsících. Pravděpodobně to souvisí s častějším výskytem virových infekcí v zimě, jimž se připisuje úloha spouštěcího faktoru v patogenezi onemocnění. (23). Je známo, že asi u 20% dětí, jejichž matka prodělala v těhotenství rubeolu, se později vyvine diabetes. Ukazuje se, že incidence stoupá ve všech sledovaných populacích. Optimálním cílem diagnostiky by bylo identifikovat nemocné, u kterých již probíhá patogenetický proces, ale které si ještě zachovaly dostatečnou kapacitu beta buněk Langerhansových ostrůvků. Kdybychom dokázali u těchto osob zastavit probíhající patogenetický proces, tak by se předešlo závažným komplikacím z dlouhodobé aplikace inzulínu.

T1DM je progresivní dlouhodobý patogenetický proces destrukce Langerhansových buněk pankreatu, který trvá většinou roky. Hlavním mechanismem je autoimunitní insulinitida, kde v zánětlivém infiltrátu nacházíme lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky. Imunopatologický proces je namířen proti celé řadě autoantigenů v beta buňkách pankreatu.

Ke studiu procesů vedoucích k rozvoji T1DM slouží několik zvířecích modelů, z nichž nejvýznamnější jsou NOD (non-obese diabetic) myši. U těchto geneticky predisponovaných zvířat se diabetes vyvine spontánně jako důsledek destrukce pankreatických beta buněk. Tomu předchází intenzivní buněčný infiltrát ostrůvků jako projev insulinitis, který se objevuje řady týdnů před klinickou manifestací diabetu. Rozvoji insulinitis předchází zvýšená exprese

adresinů a adhezivních molekul na endotelu pankreatických cév, které umožní migraci imunitních buněk do ostrůvků. Počátek infiltrace ostrůvků imunitními buňkami u NOD myši koinciduje s obdobím odstavení a velkými imunologickými změnami, které nastanou po vystavení střevního traktu mláďat řadě nových antigenů v běžné stravě a nově se tvořící intestinální flóře. Intenzivní stimulace T-lymfocytů v období po odstavení zvýší jejich migrační schopnosti. Rozvoj diabetu u NOD myši a člověka se liší v několika aspektech. U NOD myši je významně vyšší prevalence diabetu u samic (80% oproti 40% u samečků ve srovnání s vyrovnanou frekvencí u člověka) a vysoká konkordance u homozygotních dvojčat (90% u myši, ve srovnání s 30-50% konkordancí u člověka).

2.1.2 Imunopatogeneze a genetika

Hlavní genetickou predispozici určují alely HLA-DR3 a HLA-DR4, které byly detekovány až u 94% nemocných. (2) Nejvyšší riziko nesou haplotypy HLA-DRB1*0401 - HLA-DQA1*0301 - HLA-DQB1*0302. Naopak haplotypy HLA-DRB1*1501 – HLA-DQA1*0102 – HLA-DQB1*0602 vykazují nejvyšší protektivní účinky.

Vedle genů HLA je známo nejméně dalších 20 genů, které přispívají k rozvoji nemoci (např. geny pro pluripotentní prozánětlivý cytokin IL-1 nebo kostimulační molekulu CTLA-4). Mezi významné non-HLA geny patří gen kódující insulín. V jeho regulační oblasti je rozdílný počet tandemových opakujících se sekvencí. Tyto jsou asociované s rozvojem diabetu v různých etnických skupinách. Předpokládá se, že velikost této oblasti má přímý účinek na regulaci přepisu genu pro insulín. Polymorfismus oblasti ovlivňuje expresi insulínu v thymu v průběhu selekčních procesů vedoucích k eliminaci autoreaktivních klonů T-lymfocytů.

Autoimunitní imunopatologická reaktivita je zaměřena proti několika antigenům Langerhansových ostrůvků. Jde o insulín, dekarboxylázu kyseliny

glutamové (GAD), antigen značen jako ICA 512/IA2 (transmembránová tyrosin-fosfatáza), phogrin, stresový protein hsp65 a karboxypeptidáza H.

GAD je enzym, který syntetizuje inhibiční neurotransmitter GABA. Má dvě formy, které se vyskytují v GABAergních neuronech mozku, thymu a Langerhansových ostrůvkách pankreatu. Přítomnost autoprotilátek proti GAD (antiGAD) je rizikovým faktorem pro vznik diabetu 1. typu. U nemocných s čerstvě diagnostikovaným T1DM byly nalezeny cytotoxické CD8+ T-lymfocyty, které specificky rozpoznávaly některé peptidové úseky GAD.

Jedním z faktorů vnějšího prostředí by mohla být virová infekce coxackie B. Zjistilo se, že klíčový autoantigen GAD65 má jeden významný úsek výrazně homologický s určitým úsekem virového proteinu CoxP2-C.

V buňkách infiltrovaných ostrůvků byly prokázány ve velké míře Th1-lymfocyty, tvořící $INF\gamma$ a $TNF\alpha$. Dané cytokiny mají přímý cytotoxický efekt na beta buňky. V pankreatických ostrůvkách nemocných v prediabetické fázi je možné vidět redukci počtu beta buněk, ale známky aktivní insulinitidy jsou zřetelné jen u části nemocných.

Aspoň jedna z výše uvedených autoprotilátek se vyskytuje až u 90% nově zjištěných případů T1DM. Je vhodné a užitečné stanovit autoprotilátky i proti jiným tkáním, protože T1DM bývá často spojen s jinými autoimunitními nemocemi, především thyreoiditidou, adrenalitidou a celiakií. Bývá též součástí autoimunitního polyendokrinního syndromu.

2.1.3 Prevence T1DM:

Jak jsem se už zmínila, primární prevence je zatím v praxi obtížná, ale z efektivního hlediska by byla nejvýhodnější, protože by se zabránilo rozvoji onemocnění jako takového.

Proto byl v první polovině devadesátých let zaveden koncept predikce a prevence diabetu 1. typu. To by znamenalo identifikovat nemocné, u kterých již probíhá

imunopatologický proces, ale u kterých je dosud zachovaná dostatečná aktivita beta buněk pankreatu (tzv. recentní diabetes). Diabetes se stává klinickým manifestním až když dojde k destrukci více než 90 % ostrůvků.

Z hlediska léčebného a sekundární prevence je pro další průběh onemocnění významné zmíněné stádium recentního diabetu, kdy je sice hyperglykémie, ale reziduální sekrece inzulínu je ještě zachována. Po několika týdnech po zahájení léčby inzulínem se stává, že je možné dávku inzulínu podstatně snížit až vynechat, aniž by se zvýšila glykémie. Mluví se o remisi diabetu (honeymoon). Dříve se tento efekt připisoval mizení autoprotilátek proti ostrůvkům či inzulínu a ustupující rezistenci na inzulín. Některé novější výzkumy ukazují, že destrukce beta buněk v časně fázi T1DM závisí na rovnováze mezi poškozováním a regenerací beta buněk, která byla in vitro prokázána. Tuto regeneraci snad může podněcovat nikotínamid a vhodná dietní opatření. V úvahu přichází i názory, že glukóza může být sama o sobě škodlivá pro beta buňky (toxický efekt glukózy). Každopádně toto stádium vyžaduje největší péči a striktní udržování normoglykémie.

Kandidáti na prevenci nemoci jsou vyhledáváni v rodinách, kde onemocněním trpí oba rodiče. Nejjednodušší je stanovení protilátek proti GAD65, ICA512/IA-2, CAD65, CAD67 a klíčovým epitopům inzulínu. Pravděpodobnost progresu do klinického stádia vzrůstá se zvyšujícím se počtem pozitivních autoprotilátkových specifit. Reaktivita namířená proti jednomu autoantigenu má prediktivní hodnotu 2 až 15%, proti třem autoantigenům stoupne až na 70 až 100%. Určujícím faktorem je taky množství autoprotilátek. Jako nejcitlivější se ukazuje kombinované stanovení anti-GAD a IA-2. Prediktivní hodnota stanovení těchto protilátek dosahuje až 92%. Stanovení se provádí technikou ELISA kde se používají rekombinantní antigeny. Ideálním konečným cílem by bylo zavedení novorozeneckého screeningu rizika T1DM. Další screeningový marker, který by se mohl uplatnit jsou HLA predispoziční alely, protože až 95 % diabetiků 1. typu bílé rasy má pozitivní HLA-DR3 nebo DR4 anebo HLA-DQ, což je dokonce ještě více specifitější ukazatel sklonu

k diabetu 1. typu. (25) Pro screening je dále důležitý intravenózní glukózový toleranční test (iGTT), kterého nejrozšířenějším použitím je odhalování sourozenců s rizikem T1DM, aby se určilo, zda autoimunitní destrukce beta buněk ostrůvků snížila vrchol časné fáze odpovědi inzulinu (za 15 minut po dávce glukózy) na hladiny pod dolní limit normálních hodnot 40 mikroU/ml. Provádí se podáním rychle infuse 0,5 g/kg ideální tělesné váhy jako 25 % nebo 50 % roztok v průběhu 2-3 minut. Potom se sleduje glykémie v 0., 10., 15., 20., a 30. Minutě. Rychlost mizení glukózy odráží schopnost pacienta zbavit se nálože glukózy. Vyjadřuje se to rychlostní konstantou K, jejíž průměrná hodnota u nediabetiků je asi 1,72 % za minutu. U diabetiků je její hodnota téměř vždy menší než 1 % za minutu.

Spolehlivé a jednoznačné markery pro takéto odlišení však ještě nebyly nalezeny. Hledání rizikových jedinců se proto zatím omezuje jen na děti z rodin s výskytem T1DM, u kterých známe vysoké empirické riziko (8).

U těchto osob je teoreticky jednak možné zasáhnout imunosupresivní terapií, ale pro značné nežádoucí vedlejší účinky těchto léčiv se to neujalo. Dále je možné pokusit se o navození tolerance. U kandidátů onemocnění se nejvíce osvědčuje opakované podávání inzulinu v dávce 0,5 U/kg nitrožilně, nosní cestou, podkožně nebo i ústy. Vedle celé molekuly inzulinu lze podávat i jeho imunogenní štěpy B9 a B23. U experimentálních zvířat se sklonem k diabetu se osvědčuje také přenos genů kódujících inzulin, naděje jsou kladeny i do laboratorní výroby buněk tvořících inzulin z kmenových buněk nebo buněk lemujících vývody pankreatu. Zajímavou možností se ukázalo podávání enzymu glukokinázy, která řídí tvorbu inzulinu v beta buňkách i produkci glukózy v játrech. Výsledky studie, zabývající se objektivizací těchto výsledků jsou odbornou veřejností netrpělivě očekávány. (26)

Zkoušelo se taky podání nikotinamidu nebo BCG vakcinace u pokusných zvířat, ale k uspokojivým výsledkům se u lidí nedošlo.

Jinou možností by mohla být příprava vakcinace proti virovým agens, které se uplatňují jako vyvolávající faktor autoimunitního zánětu v patogeneze T1DM. Tento názor vychází z poznatků tzv. hygienické hypotézy, která popisuje souvislost mezi zvýšenou incidencí autoimunitních nemocí a alergií v průmyslově vyspělých zemích západního světa s vysokým hygienickým standardem a nižší incidencí ve vývojových zemích třetího světa. Potvrzuje poznatek, že pro správné fungování imunitního systému je nevyhnutná dostatečná antigenní stimulace ještě v období jeho vývoje a zrání prvních let života člověka. Potvrzuje to i zjištění, že incidence cukrovky u NOD myši je nejvyšší, vyrůstají-li ve sterilním prostředí, zatímco při mikrobiální kontaminaci myši kolonie incidence diabetu výrazně klesá. Rozsáhle studie v dětské populaci prokázaly, že prodělání zvýšeného množství infekcí v prvních letech života je spojeno se sníženým rizikem této nemoci. Podobný ochranný efekt má i návštěva mateřské školky. Naopak kontroverzním tématem je účinek aktivní imunizace. Faktem však zůstává, že k rychlému nárůstu incidence T1DM došlo v posledních 30 letech, kdy se zcela dramaticky zlepšila zdravotní péče i socioekonomická úroveň osob ve vyspělých zemích. A proto je nezbytné hledat příčiny tohoto značného vzrůstu.

Jiným důležitým faktorem, který se uplatňuje v primární prevenci T1DM je kojenecká výživa. Z bílkovin kravského mléka jde především o bovinní albumin, kasein a hovězí inzulin. U nemocných s T1DM se nacházejí protilátky proti bovinnímu albuminu a reagují s proteinem izolovaným z beta buněk, značeným jako ICA69. Je to jeden z hlavních autoantigenů u tohoto onemocnění. Na molekule hovězího albuminu byl nalezen úsek o 17 aminokyselin, který je považován za imunodominantní a spojen s rozvojem nemoci. Dále bylo prokázáno, že T lymfocyty u nemocných s nově zjištěným T1DM reagují proliferací na stimulaci tímto peptidovým úsekem. Molekulární mimikry mezi tímto peptidovým úsekem bovinního albuminu a proteinem

ICA69 by mohly sehrávat důležitou roli v iniciaci patogenetického procesu vedoucího k T1DM.

Mnohé studie potvrdily, že časná expozice potravinovým složkám standardní výživy u kojenců může být příčinou vzniku IDDM v pozdějším období života. Zatím se neví přesně, jestli je příčinou časná expozice lepku, který je součástí příkrmů tuhé stravy u kojenců nebo expozice proteinům kravského mléka nebo oboje. Ohledně bezpečkové diety proběhla studie na NOD myším modelu. Jedné skupině myši se podávala standardní dieta s lepkem a složkami kravského mléka a druhá skupina NOD myši byla krmena bezpečkovou dietou. Obe skupiny myši potom byly sledovány 320 dní. Výsledkem této studie bylo, že u myši na bezpečkové dietě byla značně nižší incidence diabetu, v porovnání s druhou skupinou. Taky se u nich klinicky manifestoval diabetes signifikantně později. U obou skupin NOD myši se však nezjistili žádné značné rozdíly v počtu autoantilátek. (27)

Shromažďuje se stále více a více epidemiologických studií ohledně délky kojení a nástupem T1DM. (3), (4). U dětí do věku 14 let věku, které byly součástí studie v Západní Austrálii, se zjistila incidence diabetu 0,59 na 1000 dětí (5). Žádné signifikantní spojitosti s nemocí se nepotvrdily, jenom že kojení méně než 1 týden bylo méně časté u diabetiků než u nediabetických kohort. V studii 95 diabetických dětí od diabetických matek a jejich nediabetických sourozenců a vrstevníků, incidence kojení u nich byla jenom 18% , ale byla porovnatelná ve všech třech skupinách. Diabetické děti byla dvakrát více krmené umělou výživou.

V další studii, která probíhala ve skandinávských zemích se zjistilo, že děti které byly kojené měly menší incidenci T1DM v dětství (3). Autoři této studie se domnívají, že nedostatečné kojení u geneticky predisponovaných kojenců může vést k destrukci beta buněk pankreatu a později k T1DM.

Prevalence diabetu v černé populaci v Africe, kde kojení je běžný způsob výživy novorozenců až batolat, je obecně nižší než u afrických potomků žijících v západních zemích (6).

Další studie se dělala retrospektivně v Coloradském diabetickém registru za cílem určit možný vztah mezi kojením a rozvojem T1DM v dětství, v porovnání s náhodně vybranými kontrolami (7). Zjistilo se, že incidence T1DM mezi kojenými dětmi byla nižší a čím delší bylo kojení, tím byl efekt vyšší.

2.2 Roztroušená mozkomíšni skleróza

2.2.1 Obecné poznatky:

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé neurologické onemocnění, charakterizováno infiltrací leukocytů do CNS, lokální destrukci myelinových obalů nervových vláken a postupnou ztrátou oligodendrocytů a axonů. Charakteristickým morfopatologickým nálezem je tvorba plaků, jako oblast v nervové tkáni, kde dochází k demyelinizaci bílé hmoty. To je doprovázeno zánětlivým infiltrátem, který je složen především z lymfocytů, plazmatických buněk, aktivovaných makrofágů a mikroglie.

Nemoc se objevuje v časně dospělosti, jako intermitentní epizody neurologické dysfunkce. Ve většině případů probíhá jako relabující remitující forma, kde ataka je vystřídána remisí, která trvá měsíce až roky. Pak přechází do chronického progresivního stádia s nárůstem fyzických obtíží a invalidizace pacienta. Tento průběh se týká zhruba 1/3 pacientů, ve vážných případech probíhá jako primárně progresivní forma, která rychle invalidizuje nemocného.

Důsledky tohoto autoimunitního zánětu v CNS jsou závažné a představují závažnou socioekonomickou zátěž. Odhaduje se, že v lidské populaci trpí RS více než 1000 000 lidí. Výskyt vykazuje severojižní geografickou distribuci, s nejvyšším výskytem v severozápadní Evropě, severní oblast USA, Kanadě a jižní Austrálii. Naše země patří do oblasti s vysokou prevalencí. Důležité je připomenout, že obyvatelstvo v oblastech se zvýšeným rizikem RS, má poměrně jednotný etnický původ.

2.2.2 Imunopatogeneze a genetika:

Vícero rodinných studií, které se zabíraly rizikem vzniku RS u příbuzných, dvojčat, sourozenců a adoptovaných dětí pacientů s RS, jasně poukázaly na důležitost genetického faktoru. (12) Vzhledem k relativně nízké konkordanci výskytu mezi identickými dvojčaty (30%) se usuzuje, že v patogenezi sehrávají značnou roli i jiné ještě ne docela objasněné genetické (např. DNA metylace, post-translační genetické modifikace) a negenetické faktory (např. dětské infekce, výživa). Tyto genetické studie dospěly k závěru, že téměř jedna třetina genomu je spjatá s možným genetickým faktorem pro rozvoj RS a že není žádná genomová oblast, která by byla dominantní pro rozvoj RS, kromě HLA regionu. Tato oblast, která se nachází na krátkém raménku 6.chromosomu a obsahuje přes 200 genů, je ve značné míře zapojena do regulace imunitní odpovědi organismu. Zvýšené riziko nesou haplotypy HLA-DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102 a DQB1*0602. Mechanizmy působení zatím nejsou zcela objasněny, ale jedna z možností je, že MHC molekuly kódované touto oblastí, nepodstoupí negativní selekci autoreaktivních T lymfocytů v embryonálním thymu, nebo že tyto geny kodují MHC 2.třídy, které mají sklon vázat se na peptidové antigeny myelinu a tím se stimulují autoreaktivní T lymfocyty. Problémem této genomové oblasti je alelická heterogenita, která je však současně důvodem proč v některých populacích převažuje jeden typ haplotypů a v jiných zase další. Jiné zajímavé, i když ne často replikované genomové oblasti jsou: 2q24-33, 3q21-24, 5q11, 9p11, 16p13, 18p11, 11p15 a 19q13. (13-19). Poslední oblast, 19q13, je nejvíce replikovaná a obsahuje gen pro INF β , což ilustruje, že tato cesta může být klíčem v porozumění molekulárních mechanismů této nemoci.

Předpokládá se, že na iniciaci imunopatogenetických procesů se uplatňuje rovnocenným podílem přirozená a specifická imunita.

Už několik let je ustanoven experimentální zvířecí model-EAE (experimental autoimmune encephalitis), která je indukována v geneticky vnímavém kmeni imbredních myši parenterální aplikací imunogenních složek

myelinu spolu s tzv. Freundovým adjuvans, co je suspenze usmrčených mykobakterií BCG v purifikovaném rostlinném oleji. U ovlivněných zvířat se vyvíjí onemocnění podobné RS u člověka. Výsledky modelu EAE se dají extrapolovat na RS pouze obezřetně, ale díky němu je dnes RS jednou z mála autoimunitních nemocí, pro které máme k dispozici léky modifikující průběh onemocnění.

Ukazuje se, že krevně-mozková bariéra není tak neprostupná pro buňky imunitního systému, jak se dřív předpokládalo. Je tedy pravděpodobné, že autoreaktivní lymfocyty se dostávají do úzkého kontaktu s mozkovými strukturami. Protože však fyziologicky není v tomto kompartmentu kontext rozpoznávání, nedochází ani k rozvoji zánětu. K tomu dojde jen, když se autoreaktivním T lymfocytům poskytne kontext rozpoznávání. To se může stát při infekci. Spekuluje se, že otevření hemato-encephalické bariéry, ke kterému dochází těsně po narození člověka, umožňuje vstup autoreaktivním T-lymfocytům, které unikli eliminačním procesům v thymu. Těmto t-lymfocytům v CNS je poskytnut 1.signál ale chybí tam kontext rozpoznávání. To vede k jejich apoptóze nebo anergizaci. Je možné, že u nemocných s RS nedojde k takovému otevření hemato-encephalické bariéry a autoreaktivní T-lymfocyty nejsou eliminovány. Následné otevření této bariéry, ke kterému dojde v průběhu infekčních nemocí v pozdějším věku už poskytne T-lymfocytům jak 1.signály tak kontext rozpoznávání, což vede k jejich klonální expanzi. To může být základem rozvoje autoimunitní imunopatologické aktivity.

Jak je regulován imunopatologický zánět V CNS u nemocných s RS:

Prostup aktivovaných imunitních buněk hemato-encefalickou bariérou je vícestupňový proces. Nejdřív musí projít endotelovými buňkami, na kterých je v průběhu zánětové reakce zvýšená exprese molekul HLA 2.třídy a adhezivních molekul ICAM-1 a VCAM-1. Na lymfocytech je zase zvýšená exprese L-selektinů a integrinů, jako VLA-4. Adhezivní reakce mezi VLA-4 a VCAM-1 je velmi důležitá pro vstup bariérou.

Po průniku endotelem, musí aktivované lymfocyty projít mezibuněčnou hmotou, která tvoří bazální membránu endotelových kapilár. To je umožněno tvorbou matrixových metaloproteináz (MMP), které rozkládají kolagen 4. Jejich nejvýznamnějším zdrojem jsou aktivované makrofágy, ale taky lymfocyty, mikroglie, astrocyty a endotel. Molekuly mezibuněčné hmoty na sobě poutají velké množství cytokinů, které se zapájejí do zánětlivého procesu. Rozkladem molekul mezibuněčné hmoty se uvolňuje velké množství těchto cytokinů, obzvláště chemokinů. Význam adhezivních interakcí a působení MMP v patogenezi RS je možné doložit zvýšenými hladinami solubilních forem adhezivních molekul a MMP a jejich inhibitorů v mozkomíšním moku nemocných s RS.

Pohyb imunitních buněk při zánětu v CNS je přesně regulován prostřednictvím chemokinů, které ovlivňují i následné reparační procesy. Chemokiny jsou účinné po vazbě na membránové receptory. Tyto receptory se vyznačují společnou vlastností, a to, že jsou značně „degenerované“, tj. na jeden receptor se může vázat více různých chemokinů, a opačně jeden chemokin může reagovat s více receptory. V mozkomíšním moku nemocných s RS je zvýšená koncentrace C-C chemokinů RANTES a MIP-1a.

Co je terčem imunopatologické aktivity autoreaktivních T lymfocytů v CNS:

Jde o molekuly, které jsou součástí membrán oligodendrocytů, podílejících se na tvorbě myelinových pochev. Na extracelulární straně myelinové vrstvy, v periaxonálním prostoru je lokalizován MAG (myelin associated glycoprotein), na cytoplazmatické straně se vyskytuje MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein).

Podobně je lokalizován i MBP (myelinový bazický protein), což je jeden z nejdůležitějších autoantigenů, protože obsahuje imunodominantní epitopy. U něho byly prokázány shody aminokyselinových sekvencí se sekvencemi hemaglutininů viru chřipky, adenovirů, HBV, spalniček, HSV e EBV. Na vzniku a

rozvoji RS se taky podílejí molekulové mimikry. Při nich klony T-lymfocytů rozpoznávají peptidy odvozené od MBP, který je navázán s predispoziční molekulou HLA-DR2.

RS je autoimunitní zánět, který se rozvíjí řadu let. V jeho průběhu dochází k jevu, který se označuje jako *rozšiřování imunopatologických terčů*. To znamená, že imunopatologický proces je zahájen narušením tolerance vlastního v jejím nejslabším místě. To vede k destrukci nervové tkáně a uvolnění většího množství autoantigenů. Tím je poskytován stále většímu množství T-lymfocytů první signál přes TcR. Poškozující zánět zajistí zesílenou cytokinovou aktivaci a expresi kostimulačních molekul na APC. Tím je zabezpečen dostatek druhých aktivačních signálů, čili dojde k procesu rozpoznávání. Při dlouhodobém sledování nemocných s RS můžeme zjistit tzv. *intramolekulové rozšiřování*, což znamená, že se postupně objevují další imunoreaktivní klony T-lymfocytů, které jsou zaměřené proti dalším imunoreaktivním klonům MBP. Další jev, který se vyskytuje v imunopatogeneze RS se označuje jako *intermolekulové rozšiřování terčů*. Jde o to, že funkčně významné molekuly v bunce jsou součástí nadmolekulárních komplexů a imunopatologická autoimunitní reaktivita se rozšiřuje z dominantní složky i na ostatní složky komplexu. Příkladem toho u RS je to, že tam je nejdříve autoimunitní reaktivita zaměřena proti MBP, postupně se však rozšiřuje i na MAG a MOG. Jde o sebezesilující potenciál autoreaktivity.

Úloha humorální aktivity při rozvoji RS:

U nemocných s RS dochází k intrathekální produkci protilátek, především IgG. Imunoelektroforézou lze nalézt tzv. oligoklonální proužky, které jsou považovány za důkaz oligoklonální expanze B-lymfocytů, které se nacházejí přímo v CNS až 90 % pacientů s RS.

Protilátky z likvoru byly intenzivně studované a zjistila se jejich různorodá specifita. Minoritní frakci tvoří specifické protilátky proti mikrobiálnímu agens, jako jsou především viry, např. EBV, CMV, HSV a VZV. Jsou mezi nimi taky protilátky proti *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* a jiné. Část protilátek je zaměřená proti autoantigenům CNS.

Autoprotilátky proti MBP jsou prakticky u všech nemocných, pak jsou tam přítomné protilátky proti PLP nebo MOG. U těchto nemocných je taky možné nalézt protilátky proti tau proteinu, což naznačuje přítomnost probíhajícího neurodegenerativního procesu.

Úloha autoprotilátek v poškozujícím zánětu je protichůdná. Komplexy imunoglobulinů s antigeny aktivují komplementový systém, který svojí cytolytickou aktivitou přispívá k poškození buněčných struktur CNS. Na druhé straně mohou specifické protilátky vyvazovat a tak neutralizovat autoantigeny. Protilátky usnadňují odstraňování poškozených struktur z CNS a pozitivně modulují reparační procesy.

Úloha apoptózy v imunopatogeneze RS:

Procesy apoptózy sehrávají v patogeneze RS významnou úlohu, probíhají prostřednictvím TNF α . Apoptotické buňky je možné identifikovat v placích. Buněčné komponenty CNS, včetně oligodendrocytů, exprimují proapoptotickou molekulu Apo/Fas. Její exprese se zvyšuje účinkem INF γ . T-lymfocyty nemocných s RS mají porušený proces indukce apoptózy cestou Apo/Fas. Bylo u nich nalezeno zvýšené množství této solubilné formy v likvoru. Deregulace apoptózy je důležitý faktor, který přispívá k rozvoji RS.

Úloha glutamátu v procesu poškození nervových vláken:

Ukázalo se, že příčinou poškození vláken není jenom bezprostřední působení zánětu ale taky, že T-lymfocyty jsou významným zdrojem glutamátu v místě zánětu. Glutamát se váže na své receptory na povrch neuronů i oligodendrocytů. Abnormální metabolismus glutamátu se považuje za příčinu poškození, či až smrti těchto buněk.

2.2.3 Prevence u RS:

Vzhledem k předpokládané roli infekcí v patogeneze RS bude třeba uvažovat o časovém posunu podnětů infekčního agens do pozdějšího věku, což je běžné ve vyspělých zemích. Nepochybně bude třeba zvážit dopady aktivní

imunizace, kterým je jedinec vystavován právě v kritickém období vytváření individuální imunologické aktivity. Zařazování dalších očkovacích látek a vytváření stále více komplikovaných vakcín může představovat vyšší riziko rozvoje RS pro další generace.

Další faktor, který se může uplatňovat v primární prevenci RS je kojení. Pisacane et al. dělali studii, kde zkoumali vztah mezi kojením a následním rozvojem RS v pozdějším období života (3). Pacienti s RS byli méně kojeni než zdravé kontroly. Z 93 pacientů s RS a 93 kontrol, 76 % kontrol a jenom 55% pacientů bylo kojeno 7 měsíců nebo díl. Pacienti s RS byli kojeni v průměru 4 měsíce méně než zdravé kontroly. Studie potvrdila dva až třikrát vyšší riziko vzniku RS u kojenců krmených jenom umělou výživou nebo kojených méně než 7 měsíců. Příčiny této souvislosti mohou spočívat v tom, že u kojenců na umělé výživě je rozdílné chemické složení v neocereberálním kortexu nebo při absenci dlouhodobějšího kojení chybí imunologická protekce mateřského mléka, nebo oboje.

Výhody nějaké specifické diety v sekundární či terciární prevenci pacientů s RS zatím nebyly zcela potvrzeny. Je však časté, že malnutrice může exacerbovat symptomatologii RS. Existují důkazy, že vysoký příjem satureovaných tuků v potravě zvyšuje incidenci RS. A naopak, některé epidemiologické studie, že nenasycené mastné kyseliny mají pozitivní efekt na průběh této nemoci. Příjem vitamínu D je spojován s nižší incidencí RS, protože příznivě ovlivňuje funkce imunitního systému. Též riziko osteoporózy je u pacientů s RS vysoké, a proto se doporučují podávat profylaktické dávky vitamínu D a kalcia již od počátku nemoci. Význam minerálů, stopových prvků, vitamínů či rybího oleje je zatím v prevenci této nemoci nejasná. (28)

Jiný důležitý faktor, který se může uplatňovat v sekundární či terciární prevenci RS je spojitost průběhu této nemoci a gravidity u pacientek s RS. Gravidita je obdobím extrémních, ale postupně se rozvíjejících hormonálních změn se značným dopadem na imunitní systém, včetně autoimunitních procesů. Zjistilo se, že v průběhu gravidity dochází k přirozenému útlumu Th1 a aktivaci Th2 odpovědi. (20). Klinické zkušenosti nepotvrdily dříve předpokládané

jednoznačné tvrzení negativního ovlivnění průběhu RS v těhotenství. Naopak u mnoha pacientek byla pozorována stabilizace onemocnění. Souvisí to s kaskádou změn, které souvisí s vlastními imunoregulačními mechanismy směřujícími k převaze imunosupresivních okruhů. (21). Imunitně zranitelné období, které přináší zvýšenou aktivitu RS, je poporodní 6měsíční období. Tady byl zaznamenán zvýšený počet relapsů u pacientek s relabující remitující formou RS a u progresivní formy častěji dochází k prohloubení neurologického deficitu. Jako možné vysvětlení se uvádí, že během gravidity jsou zvýšené hladiny estrogenu a progesteronu, což podporuje Th2 typ T-lymfocytární odpovědi. Po porodu naopak, dojde k útlumu Th2 aktivity a akceleraci Th1 odpovědi, což je spojeno s vyšším výskytem relapsů RS. (22) všeobecně platí, že gravidita u pacientek s RS by měla být plánovaná s ohledem na aktuální stav a medikaci. Je třeba brát na zřetel nejen negativní dopad imunosupresivní medikace na vývoj plodu, ale i skutečnost, jak je matka schopna po porodu o dítě pečovat.

V Austrálii proběhla prospektivní dvouletá studie na 101 pacientů s RS, kde se sledovali a hodnotili kritické faktory stresových životních událostí, jako trvání stresu, četnost, závažnost, závislost na nemoci, emoční labilita a frustrace ze ztráty životních cílů. Výsledkem byl poznatek, že akutní, ne chronický stres, četnost a ne závažnost stresu, zvyšuje riziko nových relapsů onemocnění. Vyšší riziko se prokázalo u pacientů mužského pohlaví a u těch, kteří byli v počátečních stadiích nemoci. (29). Pokračování této studie si dalo za cíl určit, které faktory, jako životní stresové události, nemoc, životní styl, demografické nebo psychosociální vlivy, jsou přímo nebo nepřímo spojeny s novým relapsem RS. Výsledkem bylo, že nový relaps RS byl přímo ovlivněn především frekvencí akutních stresových událostí a zvládnutí situací, které vyžadují sociální podporu. Z toho plyne, že pacienti s RS by se měli vyhýbat situacím z kterých plyne vícečetný akutní stres a měli by mít přístup k vhodným formám sociální podpory. Dále by měli být ujištěni, že chronický stres, který je spojen s jejich nemocí, nemá vliv na zvýšené riziko nových relapsů. (30)

Závěr

Autoimunitní choroby jsou ve většině případů závažné dlouhodobé poruchy, které vedou často k omezení až invalidizaci postiženého pacienta. Mnohé z autoimunitních nemocí vykazují polygenní dědičnost, což je důležité z hlediska jejich prevence, která se zaměřuje především na ovlivnění zevních patogenetických faktorů. A proto všechny nové poznatky získané na poli genetickém, imunologickém a psychosociálním mají nesmírný význam pro uplatnění vhodné terapie a prevence těchto chorob.

Souhrn

Autoimunita je imunitní odpověď organismu zaměřena proti jeho vlastním komponentám (autoantigenům), vznikají autoreaktivní lymfocyty a autoprotilátky. V imunopatogeneze jde o narušení principu tolerance vlastního, kde sehrávají klíčovou roli T lymfocyty. Ty rozpoznávají antigeny prostřednictvím receptoru pro antigen (TcR). Antigenní fragmenty vznikají po zpracování cizích antigenů v APC (antigen prezentující buňky), vázané s HLA-1. nebo 2.třídy. Pak se může porucha vyskytnout při procesu intrathymové diferenciaci a v selekčních procesech, které vedou ke zvýšenému množství nízkoafinních autoreaktivních T-lymfocytů. Současná koncepce fungování imunitního systému vychází z poznatku, že T-lymfocyty potřebují ke své aktivaci a klonální expanzi 2 typy signálů. 1. signál je zprostředkován přes TcR a 2. signál se označuje jako „kontext rozpoznávání“, což je řada akcesorních signálů. Když jeden se signálů chybí, tak nedojde k aktivaci, ale naopak k indukci apoptózy. Kontext rozpoznávání je zprostředkován pomocí přirozené imunity, kde APC nebo dendritické buňky jsou schopny identifikovat mikrobiální agens PAMP (patogenem asociované molekulové vzory). Pokud dojde k selhání regulačních mechanismů, k namnožení a aktivaci autoreaktivních buněk v periferních orgánech, a složky imunitního systému začnou poškozovat vlastní organismus, dochází k vývoji autoimunitního onemocnění. Autoimunitní choroby postihují řadu orgánů endokrinního, gastrointestinálního, nervového a krevního systému, jsou známa poškození kůže, oka, pojiva, jater či ledvin.

V etiopatogeneze se uplatňují jak genetické faktory, tak faktory zevního prostředí (infekce, výživa, stres).

Diabetes mellitus 1.typu je progresivní dlouhodobý patogenetický proces destrukce Langerhansových buněk pankreatu, který trvá většinou roky. U člověka byla nalezena chromosomální oblast asociována se vznikem diabetes mellitus 1. typu. V bíle populace určují vnímavost alely HLA DR3 a HLA DR4, protože až 94% nemocných nese tyto alely. Nejvyšší riziko nesou haplotypy HLA DRB1*0401, HLA DQA1*0301 a HLA DQB1*0302. Autoimunitní imunopatologická reaktivita je zaměřena proti několika antigenům Langerhansových ostrůvků. Jde o inzulín, dekarboxylázu kyseliny glutamové (GAD) a jiné. Imunopatologická aktivita je zprostředkována subsetem Th1 T-lymfocytů. Jedním z predispozičních faktorů by mohla být virová infekce, nutriční faktory, jako délka kojení, předčasná expozice kojence bílkovinám kravského mléka a lepku. V první polovině devadesátých let byl zaveden koncept predikce a prevence diabetu 1.typu. Podle něj je důležité identifikovat nemocné, u kterých již probíhá imunopatologický proces, ale u kterých je dosud zachována dostatečná aktivita beta buněk pankreatu. Jako nejcitlivější se jeví stanovit autoprotilátky anti-GAD, IA-2 a proti inzulínu, dále pak genetický screening predispozičních HLA alel a provedení iGTT u rizikových jedinců. U těchto osob je teoreticky jednak možné zasáhnout imunosupresivní terapií, což však nese riziko závažných nežádoucích vedlejších účinků, jednak je možné pokusit se o navození tolerance podáváním nízkých dávek inzulínu, což se jeví jako nejúspěšnější intervence. Experimentálně se zkoušelo u NOD myši použití nikotinamidu a BCG vakcinace ale u lidí se úspěšné výsledky neprokázali. Jako slibné preventivní opatření se zdá být eliminace kravských bílkovin a lepku z kojenecké výživy.

Roztroušená skleróza je chronické zánětlivé neurologické onemocnění, charakterizováno infiltrací leukocytů do CNS, lokální destrukci myelinových obalů nervových vláken a postupnou ztrátou oligodendrocytů a axonů. Charakteristickým morfolopatologickým nálezem je tvorba plaků. V patogeneze se uplatňují jak enviromentální faktory tak genetická predispozice. Zvýšené riziko

nesou haplotypy HLA DRB1*1501 - DRB5*0101 - DQA1*0102 - DQB1*0602. V imunopatogenezi RS sehrává důležitou roli i humorální imunita čehož důkazem je, že u nemocných s RS dochází k intrathekální produkci protilátek, především IgG. Imunoelektroforézou lze nalézt tzv. oligoklonální proužky, které jsou považovány za důkaz oligoklonální expanze B-lymfocytů, které se nacházejí přímo v CNS až 90 % pacientů s RS. V primární prevenci RS bude třeba směřovat k časovému posunu podnětů infekčního agens do pozdějšího věku, což je běžné ve vyspělých zemích. Nepochybně bude třeba zvážit dopady aktivní imunizace, kterým je jedinec vystavován právě v kritickém období vytváření individuální imunologické aktivity. Další faktor, který se může uplatňovat v primární prevenci RS je kojení. Víceero studií potvrdilo dva až třikrát vyšší riziko vzniku RS u kojenců krmených jenom umělou výživou nebo kojených méně než 7 měsíců. V sekundární a terciární prevenci sehrávají značnou roli výživa (dostatek vitamínu D a nenasycených mastných kyselin v potravě pacientů) a eliminace četných akutních stresových událostí z každodenního života pacientů. U pacientek trpících RS se potvrdilo, že gravidita má stabilizující vliv na průběh onemocnění, rizikové je však poporodní období, které nese zvýšené riziko relapsů a chronifikace RS.

Summary

Autoimmunity is immune response pointed against the own body components (autoantigenes) and gives origin to autoreactive T cells and auto-antibodies. The altered principle of tolerance to the own structures and T cells play the most important role in the immunopathogenesis. T cells recognize antigens by T cell receptor (TcR). Antigen fragments originate after connection with HLA 1. or 2.class in Antigen Presenting Cells (APC). The defect can arise in the process of intrathymal differentiation and the selective processes which lead to the increase number of low-affinity autoreactive T cells. Present concept of immunity system activity comes from the knowledge that T cells need to their activation and clonal expansion two types of signals. The first type of signal is arranged by TcR and the second one is called „context of recognition“ which includes numbers of accessory signals. If one of the signal is missing, the activation cannot process and the apoptosis is induced. The context of recognition is mediated by natural immunity where APC and dendritic cells are able to identify microbiological agents by Pathogen associated molecular patterns (PAMP). When regulatory mechanisms fails and autoreactive cells activate and multiply in the periphery organs, the immunity system starts to damage organism and the autoimmunity diseases can come up. Autoimmunity diseases can affect a lot of systems, e.g. gastrointestinal, endocrine, neuronal and haematopoietic organs. There are known affections of skin, eye, liver, kidneys or connective tissues. In the etiopathogenesis can be found genetic factors as well as environmental ones (stress, infections, alimentation).

Diabetes mellitus 1.type is a progressive long-term pathogenetic process which leads to destruction of Langerhans pancreatic cells and lasts years. There were identified alleles which determine sensibility to this disease among the white human population. They are HLA-DR3 - HLA-DR4 and they can be found in the 94% of diabetic patients. The highest risk is connected with the haplotypes

HLA-DRB1*0401 – HLA-DQA1*0301 – HLA-DQB1*0302.

Immunopathologic activity is centred against a few antigens of Langerhans islets. One of them is insulin and glutamic acid decarboxylase (GAD). The activity is mediated by subset Th1 of T-lymphocytes. One of the important precipitating factors could be infection, nutrition factors such as breast feeding period or early exposition to cow's milk proteins and gluten. In the first half of the nineties there was established Concept of prediction and prevention in T1DM. According to this concept it is very important to identify the patients in which the immunopathologic process has been started but their beta cells activity is still sufficient. The most sensitive way how to do it, is to determine anti-GAD, IA-2, antibodies against insulin, then genetic screening for predisposing HLA haplotypes and iGTT in the high risk patients. In these persons it is theoretically possible to use immunosuppressive therapy which unfortunately has a lot of adverse effects or evoke tolerance by administration of low insulin doses which seems to be the most successful intervention. There has been tried to use nicotinamide or BCG vaccination in NOD mice but the successful results observed experimentally was not proved in human individuals. The biggest successes so far have been proved by elimination of cow's protein and gluten from infantile nutrition .

Multiple sclerosis is chronic inflammatory neurologic disease characterised by leukocyte infiltration in CNS, local destruction of myelin, oligodendrocytes and axons. There are genetic factors and environmental ones in the etiopathogenesis. Haplotypes HLA-DRB1*1501 - DRB5*0101 - DQA1*0102 - DQB1*0602 have higher risk. In the immunopathogenesis of multiple sclerosis play an important role the humoral immunity, which is proved by the presence of intrathecal production of antibodies, mainly IgG. The oligoclonal stripes can be found by immunoelectrophoresis which proved the oligoclonal expansion of B lymphocytes and they are present in the 90% of patients with multiple sclerosis. Primary prevention should be concerned to the fact that in the developed countries infections come in the older age to the

human life and the influence of active immunization which is applied in the early age, exactly in the critical period of immunity development. Another factor which should be mentioned is breastfeeding. A few studies proved that there is twice or three times higher risk of multiple sclerosis among the children fed up exclusively by alimentation artificial or breastfed less than seven months. In the secondary and tertiary prevention nutrition factors (sufficiency of vitamin D and saturated fatty acids) and elimination of multiple acute stress events from every day life play an important role. In the female patients with multiple sclerosis gravidity has stabilizing influence in the disease progress. The high risk of next relaps and chronification of the disease comes in the after delivery six months long period.

Seznam použité literatury :

1. Tlaskalová-Hogenová H. et.al. Pokroky v imunologii. 2. přeprac.vyd. Praha: Česká imunologická společnost, 2000. 130s.
2. Krejsek O., Kopecký O. Klinická imunologie. 1.vyd. Pardubice: NUCLEUS HK,2004, 968s, ISBN 80-86225-50-X
3. Pisacane A, Impaglazzo N, Russo M et al: Breastfeeding and multiple sclerosis, Br Med J 308:1411, 1994.
4. Borch-Johnsen K, Joner G, Mandrup-Poulsen T et al: Relation between breastfeeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus, Lancet 2: 1083, 1984.
5. Fort P, Lanes R, Dahlem S et al: Breastfeeding and insulin-dependent diabetes mellitus in children, J AM Coll Nutr 5:439, 1986.
6. Kostraba JN, Steenkiste AR, Dorman JS et al: Early infant diet and risk of IDDM in blacks and whites, Diabetic care 15:626, 1992
7. Mazer EJ, Hamman RF, Gay EC et al: Reduced risk of IDDM among breastfed children: the Colorado IDDM Registry, Diabetes 37:1625, 1988.
8. Anděl M. et al: Diabetes mellitus a další poruchy metabolismu. 1. Vyd. Praha: Galén, 2001, 210s, ISBN 80-7262-047-9
9. Nussbaum R, McInnes R, Willard H: Klinická genetika. 6. Vyd. Praha: TRITON, 2004. 426s. ISBN 80-7254-475-6
10. Trojan S et al: Lékařská fyziologie. 3. Vyd. Praha: Grada, 1999. 616s. ISBN 80-7169-788-5
11. Serrano NC., Millan P., Paez MC. Non-HLA associations with autoimmunity diseases. Autoimmunity reviews /online/. 2002. /cit 2006-11-17/. Dostupné: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=16483921&query_hl=4&itool=pubmed_docsum. ISSN: 1568-9972

12. Sadovnick AD, Dyment D, Ebers GC. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Epidemiologic reviews* 2006. 19:99-106
13. Haines J, Pericac-Vance M, Seboun E, and Multiple Sclerosis Genetic Group. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. *Nat Genet* 1996., 13.,469-71
14. Sawcer S, Jones H, Feakes R, Gray R et al: A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* 1996, 13, 464-8
15. Brodley S, Sawcer S, D'Alfonso S et al: A genome screen for multiple sclerosis in italian families. *Genes Immun* 2001, 4, 205-10.
16. Coraddu F, Sawcer S, D'Alfonso S et al: A genome screen for multiple sclerosis in Sardinian multiplex families. *Euro J Hum Genet* 2001, 19, 621-6.
17. Ban M, Steward GJ, Bennetts BH, Heard R et al: A genome screen for linkage in Australian sibling-pairs with multiple sclerosis. *Genes Immun* 2002, 3, 464-9.
18. Akeson E, Oturai A, Berg J et al: A genome wide screen for linkage in Nordic sib.pairs with multiple sclerosis, *genes Immun* 2002, 3, 279-85.
19. Havrdova E, *Neuroimunologie*. Praha: Maxdorf, 2001.s. 236.
20. Krajíčková D. Těhotenství a roztroušena skleróza *Praktický lékař* 1999, 79, 557-8.
21. Hernán MA, Hohol MJ, Olek MJ et al: Oral contraceptives and the incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2000, 55, 848-54.
22. Bartoš V, Pelikánová T, et al: *Praktická diabetologie*. Praha: Maxdorf, 1996. 376s. ISBN 80-85800-31-4
23. Svačina S, Keil R, Kvapil M et al: *Trendy soudobé diabetologie, svazek 6*. Praha: Galén, 2002. 146s. ISBN 80-7262-153-X
24. Greenspan FS, Baxter JD.: *Základní a klinická endokrinologie*. Praha: Nakladatelství H&H, 2003, 1.vyd. 843s. ISBN 80-86022-56-0
25. Nouza K, Nouza M: *Imunologie diabetes mellitus*. *Sanquis*. č.34, 46.s. /online/ 2004 /cit.2006-11-20/ dostupné z: <http://www.sanquis.cz/clanek.php?id-clanek=454>

26. Funda D, Kaas A, Tlaskalová-Hogenová H et al: Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Inter Science*. Volume 15. Issue 5. P323-327. /online/ 1999 /cit. 2006-11-20/ dostupné z: <http://www.3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/688000481/ABSTRACT?CRET>
27. Schwarz S, Leweling H: Multiple sclerosis and nutrition. *Review* 1. 11 (1): 24-32 /online/ 2005 feb. /cit.2006-11-21/ dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi?CMD=DisplayFiltered>
28. Brown RF, Tennant CC, Sharrock M: Relationship between stress and relapse in multiple sclerosis: Part I. Important features. *Mult Scler*. 2006 Aug;12(4):453-64. /cit. 2006-11-21/ PMID: 16900759 [PubMed - indexed for MEDLINE] dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=16900759&itool=iconabstr&query_hl=1&itool=pubmed_docsum
29. Brown RF, Tennant CC, Sharrock M: Relationship between stress and relapse in multiple sclerosis: Part II. Direct and indirect relationships. *Mult Scler*. 2006 Aug;12(4):465-75. /cit. 2006-11-21/ PMID: 16900760 [PubMed - indexed for MEDLINE] dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=16900760&query_hl=1&itool=pubmed_docsum