

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Imunologie



Mgr. Jana Včeláková

**Predikční imunologické znaky
u diabetes mellitus 1. typu**

**Immunological markers for
type 1 diabetes prediction**

Disertační práce

Doc.MUDr.Kateřina Štechová, Ph.D.

Praha, 2016

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.

Praze, 2.1.2016

Jana Včeláková

Podpis

Identifikační záznam

VČELÁKOVÁ, Jana. Predikční imunologické znaky u diabetes mellitus 1.typu [Immunological markers for type 1 diabetes prediction]. Praha, 2016. 66 s., 5 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Pediatriká klinika. Vedoucí práce Štechová, Kateřina.

Abstrakt

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, které je charakterizováno zničením beta buněk pankreatu produkujících inzulin. Hlavní roli při destrukci beta buněk hraje buněčná komponenta imunitního systému, především autoreaktivní T lymfocyty. V současné době je snaha o vytipování jedinců ve fázi prediabetu, u kterých ještě nedošlo ke klinické manifestaci choroby, a u těchto jednotlivců nasadit léčbu s cílem zastavit nebo alespoň zpomalit destrukci beta buněk.

V rámci našeho výzkumu jsme s kolegy identifikovali několik kandidátních drah a proteinů, které by mohly hrát při vzniku diabetu zásadní roli. Jedná se především o aktivaci antivirových a Th17 drah, které jsou často spojovány se vznikem DM1. Další výsledky ukazují na rozdíly v počtu dendritických buněk a v jimi produkováných cytokinech. Prokázali jsme, že reaktivita imunitního systému prvostupňových příbuzných diabetiků se velmi liší od zdravých kontrol a že ke zvolení vhodné imunointervenční léčby, bude třeba brát v potaz i protilátkový profil pacientů, neboť výše titrů protilátek asociovaných s diabetem nám s velkou pravděpodobností bude dělit DM1 do dalších podskupin, dle agresivity autoimunitního zánětu.

Imunologické pochody, heterogenita DM1 a pravděpodobně i odlišné molekulární mechanismy jeho vzniku bude nutno brát v budoucnu v úvahu při navrhování imunointervenčních studií.

Klíčová slova: Diabetes 1. typu, Langerhansovy ostrůvky, inzulitida, autoimunita, autoreaktivní T lymfocyty, Th17, DC, cytokiny, autoprotilátky, microarray

Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is an organ specific autoimmune disorder characterised by the immune-mediated destruction of insulin-producing pancreatic beta cells. Beta-cell destruction is mediated primarily by cellular components of the immune system, especially auto-reactive T cells. Nowadays, a goal of many studies is built up the best system for identification of individuals in prediabetes stage and to treat them to preserve sufficient amount of insulin producing beta cells.

We identified several candidate pathways and proteins which could be important in pathology of T1D, like an antiviral responses and differentiation of Th17 pathways. We observed differences in dendritic cells count and in their cytokines production. Our data support the notion that the establishment of proinflammatory environment in genetically predisposed individuals along with the involvement of non-specific immune mechanisms is critical for the initiation of autoimmune, destructive insulinitis. Nonetheless, patient's autoantibody profile reflects the type of cellular immune response and should be take in a count as well. This finding may be useful in design of immunointervention studies to prevent T1D.

Considering the heterogeneity of the clinical course of this disease and perhaps different mechanisms of molecular pathology, immune interventions should be more personalised.

Key words: Type 1 diabetes, islets of langerhans, insulinitis, autoimmunity, autoreactive T cells, Th17, DC, cytokines, autoantibodies, microarray

Poděkování

Největší poděkování patří mé školitelce, doc.MUDr.Kateřině Štechové, Ph.D. za profesionální vedení, cenné zkušenosti, trpělivost a péči, kterou mi věnovala po celou dobu mého studia. Dále bych chtěla poděkovat za možnost podílet se na zajímavých projektech.

Mé poděkování patří i celému kolektivu, nejen naší laboratoře, a mé rodině za podporu a přátelskou atmosféru, které se mi dostávalo v průběhu celého studia. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci všem pacientům a dobrovolníkům, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Obsah

Prohlášení.....	2
Identifikační záznam.....	3
Poděkování.....	6
Obsah	7
Abstrakt.....	9
Abstract.....	10
1 Úvod.....	11
1.1 Diabetes mellitus.....	11
1.1.1 Klasifikace diabetes mellitus	11
1.1.2 Proč je pro organismus důležitá normoglykémie?.....	12
1.1.3 Epidemiologie diabetes mellitus	13
1.1.4 Diabetes mellitus 1.typu	14
1.1.4.1 Genetické vlivy při vzniku DM1	15
1.1.4.2 Negenetické vlivy při vzniku DM1	17
1.1.4.3 Imunopatogeneze DM1	18
1.1.4.3.1 Autoreaktivní T-Lymfocyty	20
1.1.4.3.2 Role B lymfocytů.....	21
1.1.4.3.3 NKT buňky	22
1.1.4.3.4 Makrofágy a DC buňky	22
1.1.4.4 Imunologické intervence v DM1	23
1.1.4.4.1 Typy imunoterapie v DM1	24
2 Komentované publikace	27
2.1 Příloha 1	27
Healthy first degree relatives of patients with type 1 diabetes exhibit significant differences in basal gene expression pattern of immunocompetent cells compared to controls: expression pattern as predeterminant of autoimmune diabetes.	27
2.1.1 Úvod.....	27
2.1.2 Výsledky a diskuze	28
2.2 Příloha 2.....	30
The effect of diabetes-associated autoantigens on cell processes in human PBMCs and their relevance to autoimmune diabetes development.	30

2.2.1	Úvod.....	30
2.2.2	Výsledky a diskuze	31
2.3	Příloha 3	34
	The cytokine production of peripheral blood mononuclear cells reflects the autoantibody profile of patients suffering from type 1 diabetes.....	34
2.3.1	Úvod.....	34
2.3.2	Výsledky a diskuze	35
2.4	Příloha 4	38
	Decreased dendritic cell numbers but increased TLR9-mediated interferon-alpha production in first degree relatives of type 1 diabetes patients.....	38
2.4.1	Úvod.....	38
2.4.2	Výsledky a diskuze	39
2.5	Příloha 5	41
	Case report: type 1 diabetes in monozygotic quadruplets	41
2.5.1	Úvod.....	41
2.5.2	Výsledky a diskuze	42
3	Závěr	46
4	Zkratky.....	49
5	Seznam autorských publikací a prezentací	51
5.1	Publikace.....	51
5.2	Prezentace na kongresech a sympoziích:.....	54
6	Použitá literatura	56
7	Přílohy.....	67

Abstrakt

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, které je charakterizováno zničením beta buněk pankreatu produkujících inzulin. V důsledku nedostatku inzulinu vzniká hyperglykémie a následně dochází k celkovému metabolickému rozvratu. Na vzniku DM1 se mimo genetických vlivů podílí i faktory zevního prostředí. Hlavní roli při destrukci beta buněk hraje buněčná komponenta imunitního systému, především autoreaktivní T lymfocyty, které jsou polarizovány ve směru Th1. V současné době je snaha o vytipování jedinců ve fázi prediabetu, u kterých ještě nedošlo ke klinické manifestaci choroby, a u těchto jednotlivců nasadit léčbu s cílem zastavit nebo alespoň zpomalit destrukci beta buněk. Co nejdříve uchování alespoň zbytkové vlastní sekrece inzulinu je důležité z hlediska prognózy pacienta (ve smyslu rozvoje chronických diabetických komplikací).

Ve své práci jsem se zaměřila především na dětské pacienty s DM1 a jejich prvostupňové příbuzné, kteří jsou na Pediatrické klinice 2.LF UK zařazeni v Programu predikce diabetu. Podílela jsem se na výzkumu cíleném na identifikaci specifických imunologických znaků typických pro prediabetes a DM1. V rámci našeho výzkumu jsme s kolegy identifikovali několik kandidátních drah a proteinů, které by mohly hrát při vzniku diabetu zásadní roli. Jedná se především o aktivaci antivirových a Th17 drah, které jsou často spojovány se vznikem DM1. Další výsledky ukazují na rozdíly v počtu dendritických buněk a v jimi produkovaných cytokinech. Prokázali jsme, že reaktivita imunitního systému prvostupňových příbuzných diabetiků se velmi liší od bazálního nastavení zdravých kontrol, kde byla vyloučena přítomnost autoimunitních onemocnění v rodině. Důležité je ale i zjištění, že ke zvolení vhodné imunointervenční léčby, bude třeba brát v potaz i protilátkový profil pacientů, neboť výše titrů protilátek asociovaných s diabetem nám s velkou pravděpodobností bude dělit DM1 do dalších podskupin, dle agresivity autoimunitního zánětu.

K utvoření kompletního obrazu, jak vzniká DM1 chybí ještě řada poznatků. Imunologické pochody, heterogenita tohoto onemocnění a pravděpodobně i odlišné molekulární mechanismy jeho vzniku bude nutno brát v budoucnu v úvahu při navrhování imunointervenčních studií.

Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is an organ specific autoimmune disorder characterised by the immune-mediated destruction of insulin-producing pancreatic beta cells. Resulting insulinopenia leads to hyperglycemia and subsequent complex metabolic failure. Both - genetic predisposition and environmental factors influence the development of this disease. Beta-cell destruction is mediated primarily by cellular components of the immune system, especially auto-reactive T cells, which are Th1 polarised. Nowadays, a goal of many studies is built up the best system for identification of individuals in prediabetes stage and to treat them to preserve sufficient amount of insulin producing beta cells (or at least to prolong their survival).

In our laboratory we focused on paediatric patients suffering from T1D and on their first degree relatives, who are monitoring in T1D Prediction programme. We tried to find new immunologic markers which would be useful for prediabetes diagnosis. We identified several candidate pathways and proteins which could be important in pathology of T1D, like an antiviral responses and differentiation of Th17 pathways. Regarding parameters related to innate immunity we observed differences in dendritic cells count and in their cytokines production. Our data support the notion that the establishment of proinflammatory environment in genetically predisposed individuals along with the involvement of non-specific immune mechanisms is critical for the initiation of autoimmune, destructive insulinitis. Nonetheless, patient's autoantibody profile reflects the type of cellular immune response and should be take in a count as well. This finding may be useful in design of immunointervention studies to prevent T1D.

Many unknowns are still missing to fold up complete pathogenic mechanisms of T1D development. Considering the heterogeneity of the clinical course of this disease and perhaps different mechanisms of molecular pathology, immune interventions should be more personalised.

1 Úvod

1.1 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus je heterogenní skupinou chronických metabolických chorob, kde dochází k poruše metabolismu cukrů, při které organismus není schopen udržet koncentraci glukózy v krvi v mezích normy. Základním projevem je zvýšená hladina glukózy v krvi (hyperglykémie), která vzniká v důsledku nedostatku inzulínu či jeho nedostatečné účinnosti, nebo kombinací obojího.

1.1.1 Klasifikace diabetes mellitus

Důvody pro vzrůst glykémie jsou různé a podle toho rozlišujeme i několik typů diabetu. Mezi nejdůležitější patří diabetes mellitus 1. typu (DM1), který vzniká v důsledku destrukce beta-buněk pankreatu a deficiencie inzulínu a diabetes mellitus 2. typu (DM2), kde tělo na inzulín adekvátně nereaguje a ztrácí k němu vnímavost. V případě DM2 dochází k poruše produkce inzulínu až sekundárně.

Mezi další typy diabetu patří gestační diabetes mellitus, který vzniká v těhotenství vlivem fyziologických hormonálních změn či monogenně vázaný diabetes mellitus (MODY- Maturity Onset Diabetes of the Young), kde onemocnění souvisí s konkrétní genovou poruchou v regulaci metabolismu cukrů. Dále jsou zde i typy diabetů spojených s chronickým onemocněním slinivky břišní nebo s různými léky či chemikáliemi (Tabulka 1).^{1, 2}

I. DM 1. typu
a) Imunitně podmíněný
b) Idiopatický (insulin-dependentní bez přítomnosti autoprotilátek)
II. DM 2. typu
III. Ostatní specifické formy diabetu (např. MODY, chemicky indukované,...)
IV. Gestační DM

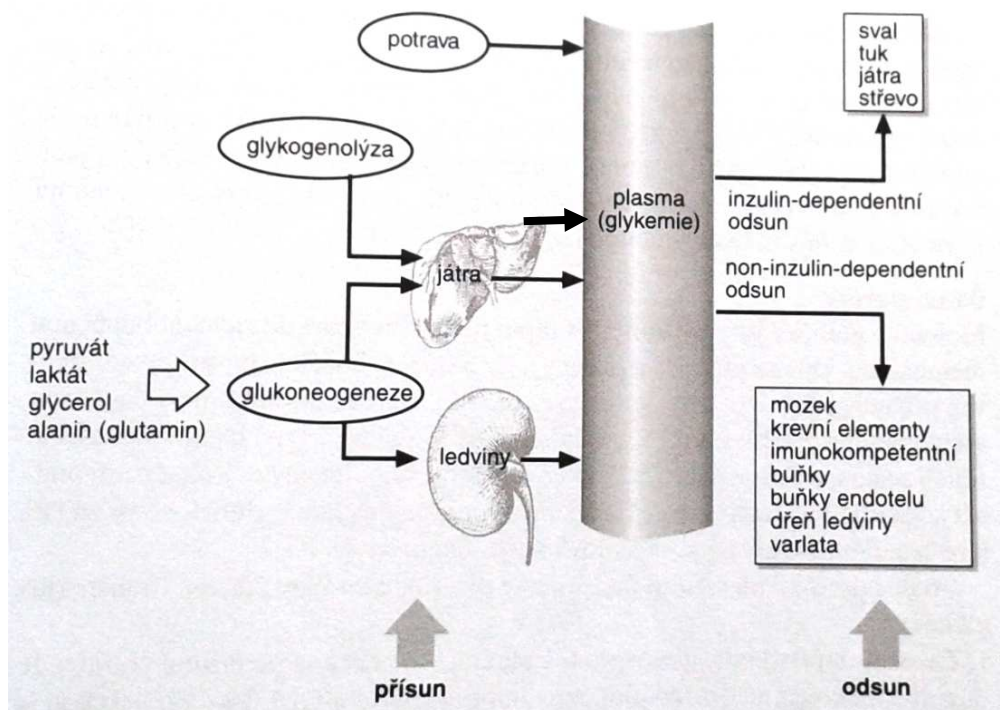
Tabulka 1: *Klasifikace DM.*^{1, 2}

1.1.2 Proč je pro organismus důležitá normoglykémie?

Glukóza je hlavním zdrojem energie pro organismus a do krve se dostává dvěma způsoby. První cesta je z jídla a druhá ze zásobního glykogenu. Hospodaření s glukózou je pod vlivem řady hormonů, kdy nejdůležitější z nich je inzulín, který se tvoří v beta buňkách pankreatu. Inzulín má v těle řadu účinků v oblasti energetického metabolismu. Především má dvě základní funkce. Zaprvé dává pokyn k ukládání glukózy do zásob v játrech, a tím snižuje glykémii, a zadruhé (v případě inzulín-dependentního transportu) umožňuje vstup glukózy do buněk, kde je následně chemicky zpracována a je z ní získána energie.^{2, 3}

Výsledkem nedostatku inzulínu, či jeho neúčinností je narušen transport glukózy z krve do buňky buněčnou membránou, což vede k hyperglykémii a nedostatku glukózy intracelulárně (Obrázek 1). Nedostatečné využití glukózy buňkami je nahrazováno jinými zdroji energie. Stimuluje se glukoneogeneze a glykogenolýza, dále se zvyšuje lipolytické štěpení triacylglycerolů na mastné kyseliny a glycerol a dochází ke vzniku ketolátek. Nadbytečná glukóza a ketolátky se dostávají do moči a způsobují nadměrné močení (polyurii).

Dlouhodobý vliv hyperglykémie je spojen s poruchou funkce řady orgánů. Jednak dochází k tzv. mikroangiopatii, jejímiž klinickými projevy jsou retinopatie, nefropatie a neuropatie. Dále jsou pak pacienti postiženi tzv. makrovaskulárními komplikacemi, které spočívají v akcelerované ateroskleróze. Důsledkem kombinace mikro- a makrovaskulárních komplikací je pak specifická chronická diabetická komplikace zvaná „diabetická noha“. Ve finále diabetes tak vede k významnému zhoršení kvality života a mnohdy i ke zkrácení očekávané délky dožití, i když v tomto ohledu dochází k výraznému zlepšení. Je nesporné, že diabetes představuje velkou zátěž pro jednotlivce a ze socioekonomického hlediska pak pochopitelně i pro celou společnost.^{2, 4}



Obrázek 1: Přísun a odsun glykózy z plazmy.²

Důležitým ukazatelem dlouhodobé kompenzace diabetu je množství glykovaného hemoglobinu (HbA1c). Ten vzniká v organismu neenzymatickou reakcí mezi hemoglobinem a glukózou. Jeho hodnota nepřímou odráží průměrnou koncentraci krevní glukózy za poslední 2-3 měsíce, což odpovídá průměrné době přežívání červených krvinek, která je 120 dní.⁵

U pacientů s diagnózou DM1 je jedinou a nezastupitelnou léčbou podávání inzulínu. Pokud klesá endogenní sekrece inzulínu, musí být nahrazena exogenně podávaným inzulínem. V současné době není známa jakákoliv jiná léčba DM1 i přes řadu studií, které v této oblasti probíhají.

1.1.3 Epidemiologie diabetes mellitus

Dle údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky bylo v roce 2013 v České republice léčeno 8,2% populace na diabetes. Ke konci roku 2013 se léčilo s DM2 789 900 s DM1 58 901 nemocných. Počet léčených diabetiků v naší populaci ale dlouhodobě roste.⁶

DM1 není nejčastěji se vyskytujícím typem diabetu, ale pokud jde o dětský věk, patří DM1 k nejčastěji se vyskytujícím chronickým

onemocněním vyskytujícím se ve věku do 16 let. Celosvětově je incidence a prevalence diabetu 1. typu velmi rozdílná podle geografických podmínek i etnické příslušnosti (Tabulka 2).^{2,7}

Prevalence a incidence	Vysoká	Nízká
Geografické vlivy	Sever	Jih
Sezonalita	Podzim, zima	Léto
Migrace	Přistěhovalí	Usedlí
Genetika	HLA-DR3, DR4, DQB	HLA-DR2
Rasa	Bílí	Černí
Prostředí	Finsko	Estonsko

Tabulka 2: *Epidemiologie DM1. typu.*²

Incidence DM1 se v posledních desetiletích zvyšuje především v rozvinutých zemích. Zároveň dochází ke snižování věku manifestace choroby.⁸ Pokud budou současné trendy pokračovat, mezi lety 2005-2020 se v Evropě předpokládá zdvojnásobení počtu nových případů u dětí do 5 let a zvýšení prevalence u dětí do 15 let o 70 %.⁹

Podle studie profesora Pattersona je meziroční nárůst počtu nových případů s DM1 u dětí mladších 15 let mezi 3-4 % napříč Evropou. Tyto údaje neplatí pro všechny státy Evropy. V Evropě můžeme vidět severojižní gradient výskytu DM1, kde nejvíce případů evidují skandinávské země (s výjimkou Sardinie).^{10, 11}

Od roku 1989 jsou v Českém registru dětského diabetu zaznamenávána data o dětských diabetických pacientech ve věku do 14 let. Incidence diabetu měla až do roku 2003 vzrůstající tendenci, kdy dosáhla 19,1 nově manifestovaných dětí s DM1 na 100 000 dětí za rok. Od té doby incidence DM1 klesá, nicméně od roku 1989 došlo k trojnásobnému nárůstu počtu dětí s DM1 a to především v kategorii dětí do 4 let věku.¹²

1.1.4 Diabetes mellitus 1. typu

Jedná se o autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k destrukci beta buněk pankreatu, které jsou zodpovědné za produkci inzulinu. Tato

destrukce je doprovázená zánětem, neboli inzulitidou, při které dochází k produkci autoprotilátek asociovaných s DM1.

Tyto autoprotilátky je možné ve většině případů detekovat dlouhou dobu před samotnou manifestací DM1. Mezi běžně stanovované autoprotilátky, které přispívají k diagnostice DM1 patří především protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (izoforma GAD65), tyrozinofosfatáze (IA2) a inzulinu (IAA). Neméně důležité jsou i protilátky proti zinkovému transporteru 8 (ZnT8). Jedná se o relativně nový antigen, který byl prvně popsán v roce 2007, ale v současné době jeho vyšetřování v České republice není rutinní záležitostí. Nicméně existují pacienti, kteří mají pozitivní pouze s tímto antigenem asociované autoprotilátky a mohou se tedy při vyšetření pouze výše uvedených 3 autoprotilátek jevit jako protilátkově negativní.^{13, 14}

DM1 může vzniknout v každém věku, ale setkáváme se s jeho manifestací především u mladších jedinců. Typickými příznaky jsou polyurie, polydipsie, únava, úbytek hmotnosti a nechutenství. Pokud je koncentrace cukru v krvi vyšší než 10 mmol/l, dochází ke glykosurii, postupně ke ketonurii, ketoacidóze organismu a celkovému metabolickému rozvratu. Před objevem inzulinu pacienti v tomto metabolickém rozvratu umírali. Ani dnes není možné tento stav podceňovat, protože chybná diagnóza nebo neadekvátní terapie může i dnes skončit fatálně. V každém případě diagnóza DM1 pro pacienta znamená nutnost doživotně si aplikovat injekce inzulinu, provádět tzv. selfmonitoring (měření glykémii, vyšetřování moče) a dodržovat režimová opatření.^{10, 15}

1.1.4.1 Genetické vlivy při vzniku DM1

Etiologie vzniku diabetu je stále nejasná. Ví se, že se jedná o multifaktoriální onemocnění, kde se setkávají genetické i negenetické vlivy, které spolu dosud ne zcela jasným způsobem interagují. Dědičnost predispozic pro vznik DM1 je zde nezpochybnitelná. To ukazují studie, kde jednovaječná dvojčata mají 50% riziko vzniku diabetu, oproti 8% riziku u dvojvaječných.¹⁶ Riziko vzniku DM1 je rozdílné i v závislosti, kdo v rodině trpí DM1. Pokud je to sourozenec, pak je riziko asi 8%, pokud otec, riziko je

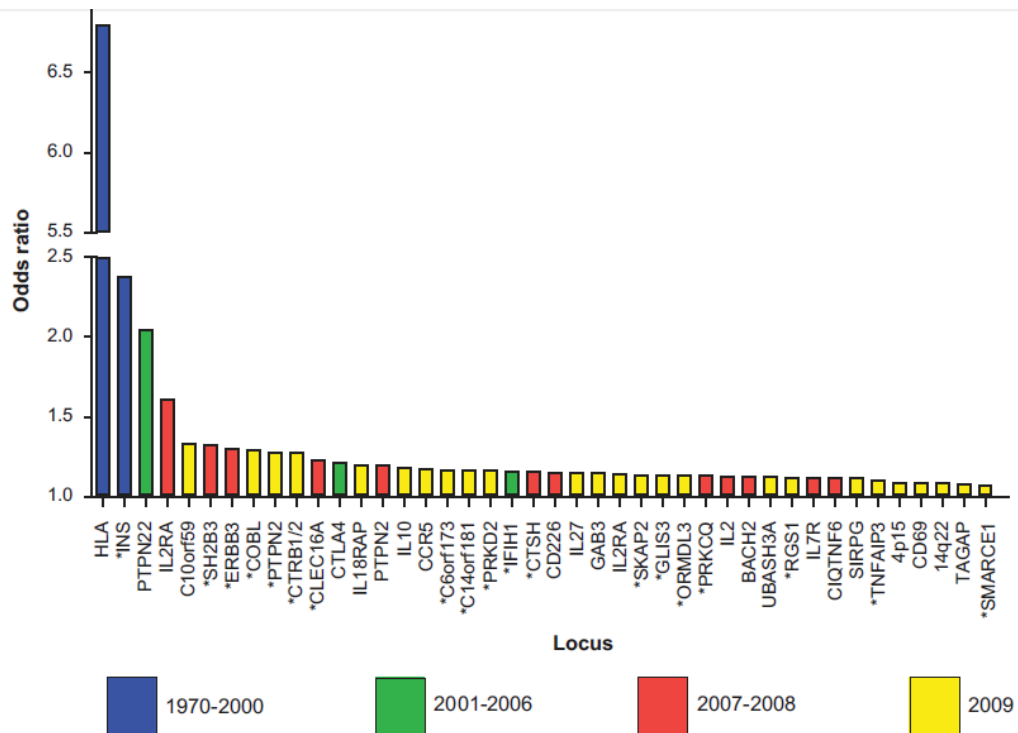
cca 5% a u matky asi 3% (nicméně zde je důležité, zda matka onemocněla DM1 před, či po otěhotnění).¹⁷

V současné době je již známo více než 50 genů, které signifikantně ovlivňují riziko vzniku DM1. Ale rozhodně se nejedná o konečné číslo.¹⁶

Míra rizika vzniku DM1 je určena polygenně. Je ale zřejmé, že přibližně 40-50% podílem se na tomto onemocnění účastní molekuly hlavního histokompatibilního systému člověka (HLA). Hlavní funkcí těchto molekul je prezentace antigenu T lymfocytům. HLA oblast se nachází na chromosomu 6p21 a je považována za velmi důležitou pro vznik mnoha autoimunitních chorob včetně DM1.¹⁵

Především polymorfismy molekul HLA II.třídy (konkrétně molekuly DRB1-DQA1-DQB1) jsou asociovány s různým stupněm genetického rizika pro vznik DM1. Mezi nejrizikovější patří haplotypy DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*02 na jednom chromozomu a DRB1*0401/02/04/05/08-DQA1*0301-DQB1*0302/04 na druhém. Na druhou stranu existují i ochranné haplotypy, mezi které patří především DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602.^{15, 18}

V lidském genomu asi neexistuje žádná jiná oblast s tak velkým vlivem na vznik DM1 jako mají HLA molekuly. Důležité jsou ale i ostatní geny jako např. inzulinový gen (INS), „cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4“ (CTLA4), „lymphoid-specific protein tyrosine phosphatase“ (PTPN22), interleukin-2 receptor (IL2RA),...(Obrázek 2).¹⁶



Obrázek 2: Na ose x jsou vyznačeny známé geny, které mají vliv na vznik DM1. Osa y znázorňuje poměr šancí vzniku DM1. Barevné kódování rozděluje jednotlivé geny dle roku objevení. Geny označené hvězdičkou jsou exprimovány v lidských ostrůvcích pankreatu.¹⁶

1.1.4.2 Negenetické vlivy při vzniku DM1

Jak jsem se již zmiňovala, DM1 je onemocnění multifaktoriální a kromě genetiky se podílí na jeho vzniku řada dalších faktorů, z kterých známe pouze útržky.

O vlivu negenetických faktorů v patogenezi diabetu mluví řada faktů. Ať již se jedná o konkordanci DM1 u monozygotních dvojčat (která rozhodně není 100%, jak by tomu bylo v případě uplatnění se pouze genetických vlivů), sezonalitu vzniku DM1, která je z velké části přisuzována častějším infekcím (především enterovirovým) v zimním období, časná expozice kravského mléka, lepku, nedostatek vitamínu D či geografické variabilitě. V této sekci by se dalo diskutovat opravdu velmi dlouho. Studií publikovaných na toto téma je velké množství a stručný

přehled negenetických faktorů asociovaných s vyšším rizikem vzniku DM1 je přiložen v tabulce (Tabulka 3).^{2, 19-21}

Mechanismus působení jednotlivých nutričních složek, které by mohly hrát roli při vzniku autoimunitní reakce proti beta buňkám pankreatu, je z velké části neznámý.²¹

Infekce	Nutriční faktory	Faktory perinatálního období a časného vývoje
Enteroviry	Doba kojení	Vyšší věk matky
Virus zarděnek	Kravné mléko ve stravě	Vyšší porodní váha
	Nitráty a nitrily	Nižší pořadí narození
	Deficit vitamínu D	Porod císařským řezem
		Inkompatibilita krevních skupin
		Omezený kontakt s jinými dětmi

Tabulka 3: Přehled negenetických faktorů asociovaných s vyšším rizikem vzniku DM1.^{2, 21}

Velmi často diskutovaná se vznikem autoimunitních onemocnění a alergií, DM1 nevyjímaje, je také hygienická hypotéza, která tvrdí, že v raném dětství je nedostatečná expozice infekčním činitelům, což má za následek ne ideální vývoj reakcí imunitního systému.^{22, 23}

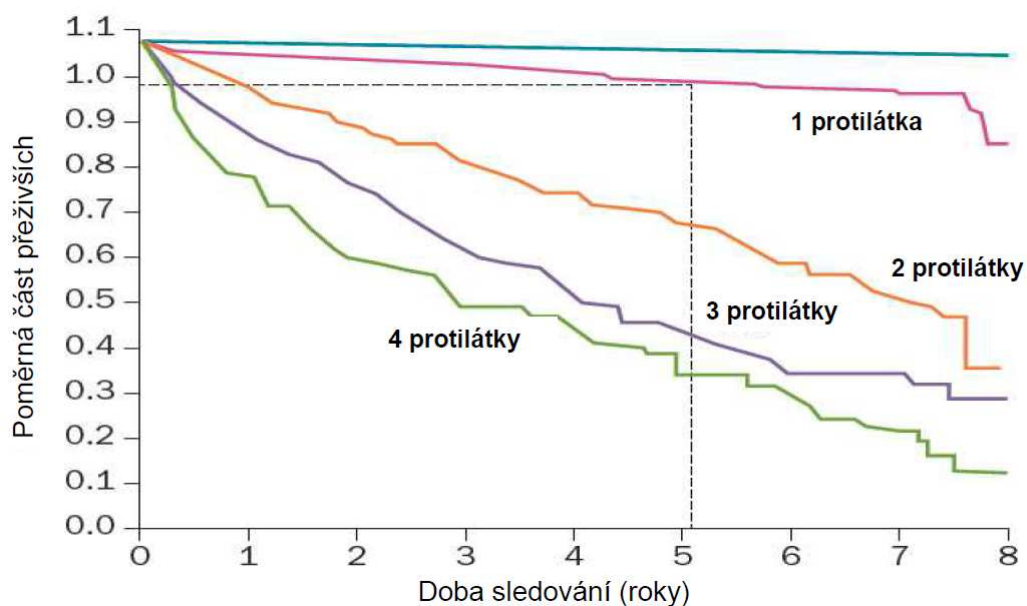
1.1.4.3 Imunopatogeneze DM1

DM1 je orgánově specifické autoimunitní onemocnění vznikající v důsledku selektivního zničení beta buněk pankreatu, které produkují inzulin.²⁴

Prvotní poškozující faktory a deregulace imunitní odpovědi vyvolají expanzi autoreaktivních CD4+ a CD8+ T lymfocytů, dochází k masivní infiltraci pankreatických ostrůvků dendritickými buňkami (DC), makrofágy, přirozenými zabíječi (NK) a k zánětu beta buněk Langerhansových ostrůvků. Hlavní roli v tomto procesu hrají autoreaktivní T lymfocyty, které rozpoznávají antigeny tělu vlastní, prezentované HLA molekulami. Na základě této reaktivity se postupně rozvíjí autoimunitní proces proti povrchovým i cytoplazmatickým antigenům beta buněk.^{25, 26}

Po spuštění autoimunitních procesů dochází k asymptomatické fázi, kterou můžeme monitorovat pomocí autoprotilátek asociovaných s DM1 (anti-GAD65, -IA2, -ZnT8 a IAA) měsíce, i roky před samotnou manifestací diabetu. Rychlost destrukce beta buněk je závislá na věku jedince. Čím mladší, tím bývá inzulitida, neboli zánět v beta buňkách a jejich destrukce, agresivnější a rychlejší. V době, kdy dochází ke zničení 80-90 % beta buněk, začne být tělo nedostatečně zásobeno inzulínem a dochází k hyperglykémii a k nástupu DM1 příznaků.^{26, 27}

Pro predikci DM1 je důležitý nejen titer protilátek, ale především počet pozitivních autoprotilátek. Při pozitivitě pouze 1 protilátky se zvyšuje riziko vzniku DM1 jen lehce, nicméně s přibývajícím počtem pozitivních autoprotilátek se doba do manifestace DM1 markantně zkracuje, což je názorně vidět na obrázku (Obrázek 3).¹⁷



Obrázek 3: Křivka přežití, kde osa y určuje pacienty, kterým se manifestoval DM1 v závislosti na počtu pozitivních protilátek. Na ose x jsou znázorněny roky sledování od objevení první pozitivní protilátky. Počet pozitivních autoprotilátek určuje rychlost, kdy se jedinci manifestuje DM1. Čím více pozitivních autoprotilátek, tím se doma do manifestace DM1 zkracuje.¹⁷

Většina našich poznatků o imunopatogenezi DM1 je díky zvířecím modelům. V posledních 25 letech je s výzkumem DM1 nejvíce spojena BioBreeding (BB) krysa a non-obese diabetic (NOD) myš.²⁵

1.1.4.3.1 Autoreaktivní T-Lymfocyty

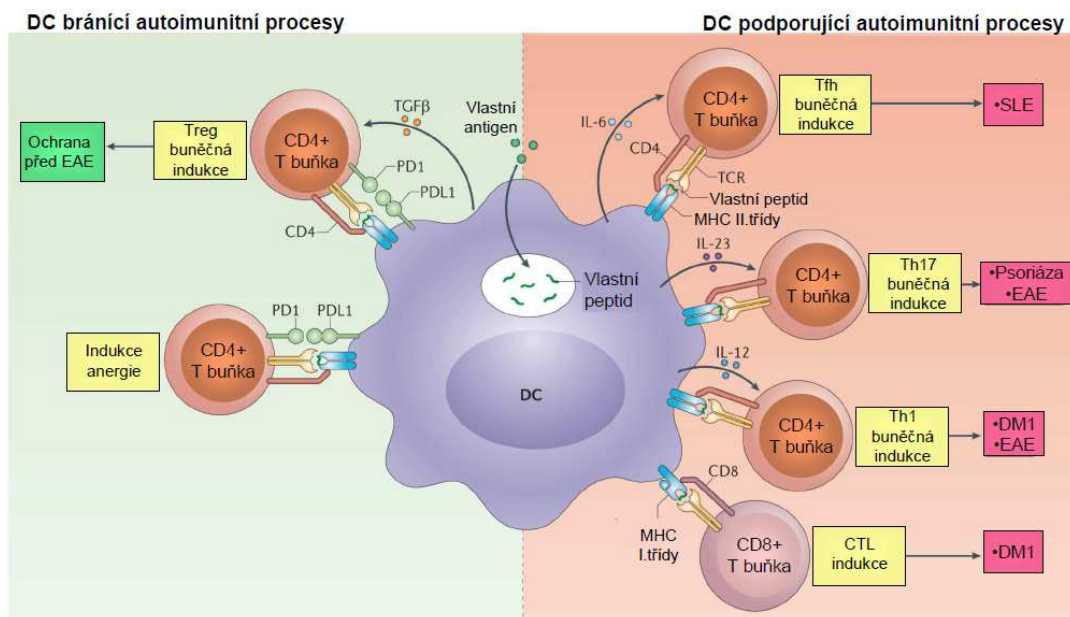
V současné době se všeobecně uznává názor, že DM1 je autoimunitní onemocnění, kde primární roli sehrávají autoreaktivní T lymfocyty a převaha polarizace imunitního spektra ve směru prozánětlivých pomocných CD4+ T lymfocytů 1 (Th1), i když toto poznání pochází prvotně ze studia zvířecích modelů (Obrázek 4).²⁴

Hlavní roli při autoimunitní destrukci beta buněk mají Th1 buňky, které produkují prozánětlivé spektrum cytokinů, především interferon gamma (IFNgama), IL-2 a tumor nekrotizující faktor alfa (TNFalfa).^{28, 29}

Na druhou stranu máme i protektivní podskupiny T lymfocytů jako Th2, které produkují cytokiny IL-4 a IL-10; Th3 s produkcí transformujícího růstového faktoru beta (TGFbeta) a regulační T lymfocyty (Treg) s produkcí IL-10 a TGFbeta, kde všechny tyto podskupiny lymfocytů chrání před vznikem DM1.²⁸

Kromě výše uvedených podskupin se v posledních letech objevují nové, jako například Th17, které jsou hojně diskutovány ve spojitosti s autoimunitním onemocněním. Jejich typickým cytokinovým spektrem je produkce IL-17A, IL-17F, IL-21 a IL-22. Role Th17 buněk je v patogenezi DM1 stále nejasná. Zdá se, že tyto buňky nejsou hlavními v iniciaci DM1, ale jsou důležité především v pozdější fázi autoimunitních procesů.^{30, 31}

Při vzniku DM1 hrají důležitou roli i cytotoxické CD8+ T lymfocyty (Tc), které rozpoznávají HLA molekuly molekuly I.třídy s navázanými endogenními antigeny (např. virové peptidy). Cytotoxické CD8+ T lymfocyty byly izolované z ostrůvkových buněk NOD myší. Jejich přítomnost vedla k progresi inzulitidy a k odhalování dalších epitopů beta buněk.^{32, 33}



Obrázek 4: Dendritické buňky mohou aktivovat, či inhibovat autoimunitní procesy. V levé části obrázku vidíme inhibici pomocí anergie a Treg buněk. V pravé části je naopak znázorněna aktivace autoimunitních pochodů a diference jednotlivých prozánětlivých podskupin T lymfocytů. DC prezentuje autoantigeny T lymfocytům, v prozánětlivém prostředí cytokinů může dojít ke vzniku autoreaktivních CD4+ T lymfocytů (folikulární Th (Tfh), Th1 a Th17) a CD8+ T lymfocytů (CTL). Tyto autoreaktivní T lymfocyty mohou vést ke vzniku řady autoimunitních onemocnění např. experimentální autoimunitní encefalomyelitis (EAE), systémový lupus erytmatoses (SLE), psoriáza či DM1.³⁴

1.1.4.3.2 Role B lymfocytů

B-lymfocyty jsou buňky imunitního systému zodpovědné především za specifickou, protilátkami zprostředkovanou imunitní odpověď. Jejich role je považována při vzniku DM1 spíše za sekundární a není patogenická. Velmi důležitá je ale detekce protilátek, které jsou dobrým znakem v predikci i diagnostice tohoto onemocnění. Role B lymfocytů a jimi produkováných protilátek je ale v patogenezi diabetu stále nejasná.³⁵

Mezi nejčastěji detekovanými protilátkami, které jsou asociované se vznikem DM1 jsou protilátky proti epitopům GAD65, IA2, IAA a nedávno

objevenému epitopu ZnT8. Dříve se ještě detekovaly protilátky proti ostrůvkovým antigenům (ICA), ale vzhledem k subjektivnímu hodnocení se nyní od tohoto stanovení ustupuje a nahrazuje se detekcí specifických protilátek (především proti GAD65 a IA2).^{10, 36}

Nedávno vyšla publikace, která diskutuje o roli B regulačních (B reg) buněk při vzniku autoimunitních onemocnění u lidí. Jejich role při vzniku DM1 je neznámá, ale z výsledků vyplývá, že B reg mohou udržovat toleranci k ostrůvkovým antigenům pomocí selektivní suprese autoreaktivních T lymfocytů. Tato suprese by mohla být způsobena zvýšenou produkcí IL-10 B reg buňkami.³⁷

1.1.4.3.3 NKT buňky

Tento buněčný podtyp může hrát roli v patogenezi DM1 u lidí i u myší a to pomocí suprese autoimunity. Je více mechanismů jak NKT buňky regulují. Prvním je předpoklad, že indukují tolerogenní dendritické buňky v pankreatických uzlinách a druhým, že k této indukci dochází pomocí regulačních cytokinů.²⁶

Chybění či snížené množství NKT buněk vede k propuknutí DM1, zatímco zvýšená frekvence těchto buněk chrání před autoimunitním onemocněním beta buněk.³⁸

1.1.4.3.4 Makrofágy a DC buňky

Autoreaktivní T buňky hrají zásadní roli při vzniku DM1, nicméně prvními buňkami, které infiltrují pankreas NOD myší, jsou makrofágy a DC.²⁵

Makrofágy a DC buňky patří mezi antigen prezentující buňky (APC), kde každý z nich má vlastní roli v imunitním systému. Nejlepšími APC pro naivní T buňky jsou DC. Funkce makrofágů je především fagocytóza a jsou první obranou proti cizorodým organismům. Oba tyto buněčné podtypy jsou schopné zvýšit expresi HLA a kostimulačních molekul na svém povrchu a aktivovat T lymfocyty.³⁵

Dendritické buňky hrají klíčovou roli v aktivaci imunitní odpovědi proti patogenům a v nastavení periferní tolerance proti vlastním antigenům.³⁹

Stojí na rozhraní mezi naivní a získanou imunitou a zdá se, že při vzniku DM1 zastávají důležité místo. Určují směr imunitní odpovědi pomocí prezentace antigenů, kostimulačními molekulami a produkcí cytokinů a tím ovlivňují nasměrování T lymfocytů, kterým antigeny předkládají.⁴⁰

Nerovnováha mezi aktivačními a inhibičními receptory exprimovanými na povrch DC je spojována se zvýšenou citlivostí k rozvoji autoimunitních onemocnění. Bylo popsáno, že změna aktivačních či inhibičních molekul exprimovaných na povrchu DC (např. diferenciační skupina 86 (CD86) či receptor podobný genu Toll (TLR)) mohou určit imunogenní fenotyp. Na druhou stranu, T buněčná tolerance může být docílena pomocí tolerogenních DC, které mají kapacitu blokovat nežádoucí imunitní odpověď u mnoha experimentálních modelů, především pomocí T buněčné anergie, expanze Treg a minimalizací B buněčné odpovědi.³⁹

DC buňky prezentující antigeny beta buněk byly nalezeny v pankreatických ostrůvcích a v lymfatických uzlinách na zvířecích modelech.⁴¹ Stále ale není jasné, proč tyto buňky aktivují imunitní odpověď namísto tolerance, když se jedná o tělu vlastní antigeny.³⁴

1.1.4.4 Imunologické intervence v DM1

Pouhých 10-15 % dětí diagnostikovaných s DM1 mají prvostupňové příbuzné s tímto onemocněním.¹⁷ V současné době jsme schopni odhalit jedince s rizikem vzniku DM1 pomocí skrínigů genetického rizika (HLA molekul) a autoprotilátek proti inzulinu, GAD65, IA2 a ZnT8 transportéru.

Nasazení vhodné imunointervenční léčby je třeba v době, kdy je zachováno co největší množství beta buněk produkujících inzulin. Již 2-3 roky po manifestaci diabetu, dochází v destrukci všech beta buněk a člověk je plně odkázán na subkutánní podávání inzulinu, kdy působení tohoto inzulinu je přeci jen trochu odlišné od vlastního inzulinu, vyprodukovaného beta buňkami a vyplaveného přímo do jater, odkud je následně distribuován dále. Vlastní, byť malé množství inzulinu, které je sice nedostatečné k udržení glukózové homeostázy, má ale velký smysl z hlediska oddálení vzniku chronických diabetických komplikací (mikrovaskulárních tj. neuropatie, retinopatie, nefropatie; makrovaskulárních tj. projevy

ischemické choroby srdeční, ischemické choroby dolních končetin, cévní mozkové příhody a kombinovaných tj. syndrom diabetické nohy).¹⁷

1.1.4.4.1 Typy imunoterapie v DM1

Imunoterapii DM1 dělíme na 3 základní typy.

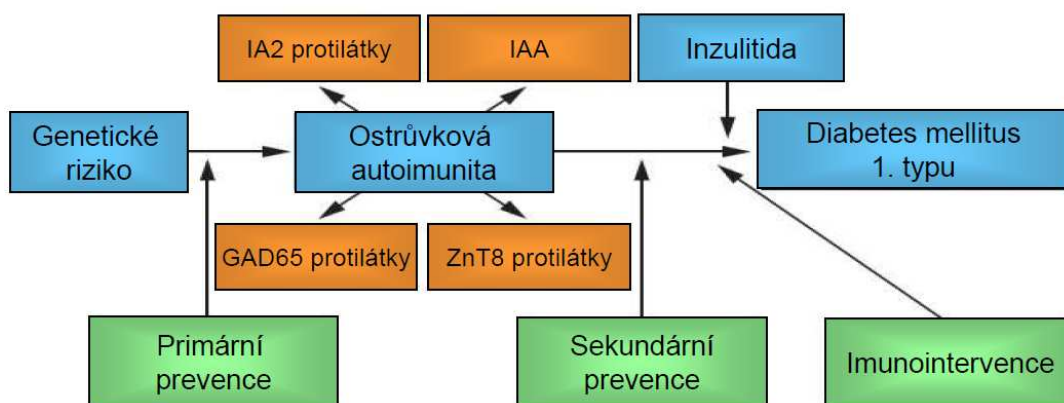
Primární prevencí je léčba jedinců na základě zvýšeného genetického rizika. Příkladem může být studie zaměřená na testování hydrolyzovaného kaseinu v mléčných formulích kojenců, která předpokládala snížení výskytu DM1 u geneticky predisponovaných jedinců.¹⁷ Nicméně prvotní výsledky tuto domněnku nepotvrdily.⁴²

Sekundární prevencí, kde se léčba zaměřuje na jedince v riziku brzkého vzniku diabetu, neboli na jedince s přítomností ostrůvkových protilátek. Zde je možné jako příklad uvést neautoantigeně specifické léčby, jako vakcinaci Bacillus Calmette–Guérin či podávání anti-CD3 monoklonální protilátky. Dále autoantigeně specifické terapie, založené na podávání orálního či nasálního inzulínu, nebo rekombinantního GAD65 antigenu.

Třetím typem jsou **intervenční studie** prováděné na jedincích již s manifestovaným DM1 s cílem zachovat residuální produkci inzulínu beta buňkami. I zde se dělí na antigen specifické a nespecifické. Příkladem mohou být vakcinace proinzulinem, podávání anti-CD3 či anti-CD20 protilátek (Obrázek 5).¹⁷

Z výsledků studií podávání anti-CD3 protilátky se ukazuje, že docházelo k udržení inzulínové produkce, kterou přičítají především v zachování Treg buněk, které mohou regulovat antigen specifické odpovědi související s DM1.²⁵

K Treg buňkám se v současné době upíná velká naděje v oblasti terapie. Nyní probíhá studie s podáváním vlastních, ex vivo, namnožených Treg buněk, kde prvotní výsledky ukazují nárůst titru C peptidu a nižší spotřebu endogenního inzulínu u většiny pacientů s DM1.⁴³

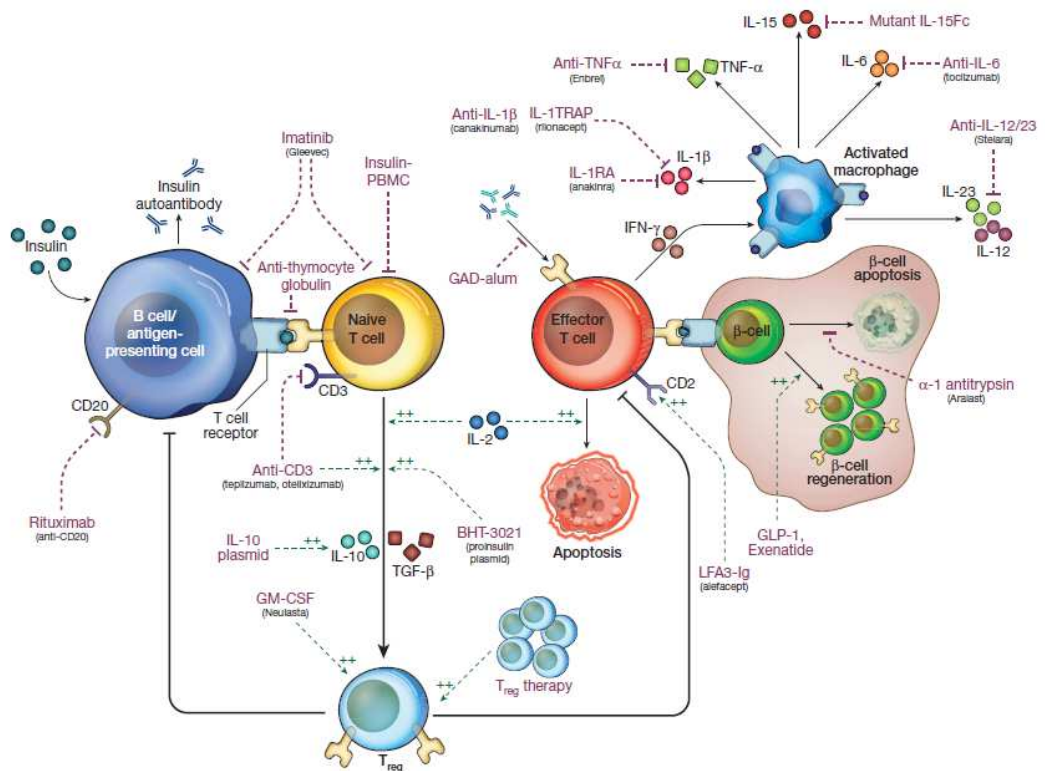


Obrázek 5: Znázornění jednotlivých stupňů imunointervence. Genetické riziko je určeno přítomností alespoň jednoho rizikového haplotypu ($DQA1^*0301-B1^*0302$ či $DQA1^*0501-B1^*0201$). Ostrůvková autoimunita je definována přítomností autoprotilátek proti GAD65, IAA, IA-2 a ZnT8 epitopu. Inzulitida je již pozdní fáze patogenních procesů, nicméně může trvat i několik let, než se objeví první příznaky DM1.¹⁷

V současné době probíhá celá řada studií, nicméně i přes veškeré snahy se stále nedaří docílit dlouhodobé ochrany beta buněk se zachováním jejich funkce (Obrázek 6).

Nadějnými se zdají být kombinované intervence s kombinací orálního či nasálního inzulínu s GAD65.

Do budoucna je hlavním cílem se zaměřit především na primární prevenci, cílit na jedince s rizikovým genotypem a minimalizovat počet jedinců s manifestací DM1. Důležité je najít mechanismus, jak změnit imunitní reakci z T buněčné na B buněčnou. K tomu ale současné poznatky nestačí a je třeba dalších studií buněčných mechanismů k lepšímu porozumění a lépe směřované léčbě.¹⁷



Obrázek 6: Cíle imunointervence u DM1. Schéma poskytuje celkový přehled klíčových drah, na které byla zaměřena terapie. Jsou zde vyznačeny testované antigenně specifické i nespecifické terapie, které měly za cíl inhibovat efektorové buňky a antigení prezentaci, ale zároveň podpořit regulační dráhy.²⁵

2 Komentované publikace

2.1 Příloha 1

Healthy first degree relatives of patients with type 1 diabetes exhibit significant differences in basal gene expression pattern of immunocompetent cells compared to controls: expression pattern as predeterminant of autoimmune diabetes.

Stechova K, Kolar M, Blatny R, Halbhuber Z, **Vcelakova J**, Hubackova M, Petruzelkova L, Sumnik Z, Obermannova B, Pithova P, Stavikova V, Krivjanska M, Neuwirth A, Kolouskova S, Filipp D.

Scand J Immunol. 2011 Sep 16. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02637.x. [Epub ahead of print]

IF 2,11

2.1.1 Úvod

V této publikaci jsme se zaměřili na hledání rozdílů v genové expresi z čerstvě izolovaných mononukleárních buněk (PBMC) odebraných od pacientů s DM1, jejich prvostupňových příbuzných (DRL) a zdravých kontrol (DV). Cílem studie bylo nalézt „prodiabetogenní“ genové dráhy, či jejich jednotlivé zástupce.

Celogenomový expresní profil byl stanovován u 9 pacientů s DM1, 10 DRL a 10 DV pomocí „microarray“ čipů s vysokým rozlišením (Obrázek 7).

Přítomnost autoprotilátek proti hlavním antigenům beta buněk je známkou ostrůvkové autoimunity, nicméně pozitivita těchto protilátek nám příliš neřekne o agresivitě a rychlosti zánětu v pankreatu. V našem Programu predikce diabetu 1.typu máme pacienty, kteří se nám manifestovali s DM1 po velmi krátké době (cca půl roku) od objevení první pozitivní protilátky, ale zároveň jsou v programu i jedinci, kteří s vysokými titry protilátek jsou stále bez příznaků DM1 i po 8, či 10 letech od objevení

protilátkové positivity. Stále si tedy klademe otázku, v čem je jejich imunita jiná a snažíme se najít další ukazatele, které bychom mohli použít k lepší stratifikaci těchto jedinců.

V posledních desetiletích probíhala řada studií, díky kterým známe hlavní geny a dráhy, které se podílejí na vzniku DM1. Především se jedná o HLA molekuly, které vážou preproinzulinové a další peptidy a prezentují je T receptorům, T a B buněčnou aktivaci, virové odpovědi, chemokinové a cytokinové signalizace, Treg buněk a důležitost APC buněk.⁴⁴

Autoreaktivní T lymfocyty jsou v periferní krvi ve velmi nízké koncentraci. U pacientů s DM1 je jejich koncentrace vyšší, nicméně metody stanovení jsou velmi obtížné a tak nám pomáhají spíše pro vědecké účely, než že by bylo možné je použít v klinické praxi.⁴⁵

Poslední desetiletí sebou přineslo „microarray“ techniky, které nám umožnily celkový náhled na genovou expresi na úrovni informační ribonukleové kyseliny (mRNA) a proteinů. Tento přístup byl použit i při výzkumu DM1 s cílem zlepšit predikci a porozumění patogeneze DM1.⁴⁶



Obrázek 7: Znáznorněný postup zpracování DNA čipu od izolace PBMC až po konečnou analýzu

2.1.2 Výsledky a diskuze

Porovnáním jednotlivých skupin mezi sebou jsme našli rozdílně exprimované geny. Největší počet odlišně exprimovaných genů jsme našli mezi skupinou DV a DRL protilátkově negativních jedinců (DRLN), kde 17 z nich patřilo do imunologických drah. Překvapivě, pouze 9 genů se lišilo mezi DM1 a DV, 12 genů mezi DRL protilátkově pozitivními jedinci (DRLP) a DV. Mezi skupinami DM1 a DRLN bylo rozdílně exprimováno pouze 13 genů. Signifikantně změněné exprese genů jsme nenalezli při porovnání DM1 s DRLP a DRLP s DRLN.

Když jsme se zaměřili na celé odlišně exprimované dráhy, tak mezi DM1 a DRLN jsme identifikovali jedinou imunologickou. Konkrétně se jednalo o dráhu C-C chemokinového receptoru 3 (CCR3), kdy tento receptor se podílí na akumulaci a aktivaci eosinofilů a dalších prozánětlivých buněk. Při porovnání DV a DRLN zase nejsignifikantněji změněná dráha byla pro IL-1 signalizaci, která je důležitá při regulaci zánětlivých reakcí.

DM1 je považována za onemocnění způsobené převážně Th1 buněčným podtypem. I my jsme při porovnání skupin DV a DRLN našli 22 odlišně regulovaných imunologických drah, mezi kterými se vyskytovala i dráha IFN γ a T buněčný receptor (TCR) signalizace.

Když jsme se zaměřili na porovnání pouze DRLN a DV, 15 z těchto 22 imunologických drah se nám shodovalo. Což naznačuje, že imunologické pochody u prvostupňových příbuzných diabetiků jsou odlišné od zdravých jedinců i bez přítomnosti inzulitidy. Tato data se shodují s nálezem Pertich 2010, kde také publikují, že DRLN exprimují prozánětlivé ostrůvkově specifické T buněčné znaky.⁴⁷

Přesto, že vznik DM1 je přisuzován především T lymfocytům, top gen rozdílně exprimovaný mezi DRLN a DV byla tyrozin kináza B lymfocytů (BLK). Zároveň signifikantně upregulované geny spojené s humorální imunitou byly i CD19 a CD22. BLK je exprimována v beta buňkách pankreatu, kde reguluje jejich funkci.⁴⁸ Navíc deplece B lymfocytů pomocí rituximabu (anti-CD20 protilátky) vede ke zpomalení progresu diabetu.⁴⁹

Další drahou změněnou mezi DRLN a DV byla dráha pro zástupce TLR. Konkrétně se jednalo o TLR2, TLR6 a jejich adaptorový protein „Toll-interleukin 1 receptor domain–containing protein“ (TIRAP). Tyto receptory váží a prezentují především bakteriální struktury, což bylo trochu překvapující zjištění, vzhledem k tomu, že vznik DM1 je spojován především s virovými infekcemi. Nicméně Zipris a kolektiv potvrdili, že po podání Kilham krysího viru BB krysám, došlo k aktivaci TLR3, 9, 4, 2, 6 a 7 a k navýšení vzniku autoimunního diabetu.⁵⁰ Reynolds a kolegové zjistili, že TLR2 signalizace u CD4+ T buněk aktivuje Th17 odpověď a reguluje patogenezi autoimunitních onemocnění.⁵¹

Nejsignifikantnější rozdíl mezi DRLN a DV byla odlišná regulace v IL-1 dráze. Jedná se o prozánětlivou dráhu, kde již několikrát byla potvrzena role IL-1 při vzniku DM1 či DM2.⁵²

Výsledky prezentované v této studii naznačují, že predispozice vzniku DM1 může být způsobena řadou genů a k tomu aby se spustily autoimunitní procesy, stačí jen nepatrná změna exprese jednotlivých genů. Prvostupňoví příbuzní diabetiků mají pravděpodobně již vrozenou odlišnou reaktivitu na vnější a vnitřní stimuly a zvýšenou prozánětlivou odpověď k nim. Zároveň je ale nezbytná přítomnost regulačních mechanismů, které udržují celý tento proces pod kontrolou.

2.2 Příloha 2

The effect of diabetes-associated autoantigens on cell processes in human PBMCs and their relevance to autoimmune diabetes development.

Vcelakova J, Blatny R, Halbhuber Z, Kolar M, Neuwirth A, Petruzelkova L, Ulmannova T, Kolouskova S, Sumnik Z, Pithova P, Krivjanska M, Filipp D, Stechova K.

J Diabetes Res. 2013;2013:589451. doi: 10.1155/2013/589451.

Epub 2013 Jun 12.

IF 1,893

2.2.1 Úvod

V této publikaci nás zajímal efekt diabetogenních autoantigenů na PBMC s cílem identifikovat procesy asociované se vznikem DM1.

Pomocí genové expresní „microarray“ jsme stanovovali expresní profil u 12 DM1, 18 DRL a 13 DV. PBMC od těchto jedinců jsme stimulovali směsí diabetogenních autoantigenů (proinzulin, IA2 a GAD65 derivovanými peptidy) po dobu 72 hodin. Abychom odlišili vliv diabetogenních autoantigenů, genovou expresní array jsme prováděli ze stimulovaných i nestimulovaných buněk, kultivovaných při stejných podmínkách.

Preklinická část DM1 je charakteristická vznikem autoreaktivních lymfocytů, které infiltrují pankreat a selektivně ničí beta buňky v Langerhansových ostrůvcích.⁵³ Je zde ale přítomna řada dalších mechanismů, které ovlivňují imunitní regulaci a prezentaci antigenů. Jedná se např. o Treg buňky, které blokují a modifikují proliferaci a produkci cytokinů CD4+ a CD8+ T buněk. Tohoto výsledku je dosaženo především produkcí protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGFbeta.⁵⁴

Patogeneze DM1 je velmi komplexní a zdaleka ne vše je nyní objasněno. Proto i v této publikaci jsme se zaměřili na identifikaci drah, či konkrétních genů, které by nám řekli více o patogenezi tohoto onemocnění.

2.2.2 Výsledky a diskuze

Při párovém porovnání jednotlivých skupin jsme našli 1318 rozdílně exprimovaných genů mezi skupinou DM1 a DV, 2222 genů mezi DRL a DM1, 1347 genů mezi skupinami DRL a DV. Při rozdělení DRL dle jejich protilátkového profilu jsme nenalezli žádné signifikantní rozdíly mezi DRLN s DV ani DRLP s DV.

Na základě výsledků jsme si vybrali 3 geny a jejich expresi ověřili metodou kvantitativní řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR). Jednalo se o geny CD4, přenašeč signálů a transkripčních faktorů 3 (STAT3) a TGFbeta, které byly signifikantně upregulované u DM1 oproti DV. I touto metodou jsme potvrdili signifikantně zvýšené exprese těchto genů u DM1 skupiny. Porovnání bylo prováděno na odlišné kohortě jedinců.

Když jsme se zaměřili na porovnání rozdílně exprimovaných drah, nejvíce, 69 jsme jich našli mezi DRL a DV, z čehož 15 % z nich náleželo imunologickým drahám. Mezi DM1 a DV jsme našli 24 % (11 z celkových 46 drah) signifikantně exprimovaných imunologických drah, kde na prvním místě byla prezentace antigenu pomocí HLA molekul II. třídy. Tento nález se shoduje s výsledky řady dalších publikací, kde je známo, že HLA molekuly se podílí ze 40-50 % na genetickém riziku vzniku DM1.¹⁵

Zajímavá pro nás byla signifikantní změna aktivace a diferenciaci Th17 dráhy mezi skupinami DM1 s DRL a DM1 s DV. Stejně tak, jako Th1/Th2 buněčná polarizace a signalizace přes TCR mezi skupinami DM1 a DV.

V diferenciaci Th 17 buněk hraje důležitou roli i TGFbeta, který je zásadní pro vznik CD4+CD25+ „forkhead box P3“ (Foxp3)+ Treg.⁵⁵ Zvýšená exprese IL-17, jakožto hlavního cytokinu Th17 buněčné linie, byla detekována v séru a cílových tkáních pacientů s řadou autoimunitních onemocnění. Diferenciace Th17 buněk je spouštěna TGF-beta, IL-6 a IL-21, které aktivují STAT3 a následně „retinoid-related orphan receptor gamma t“ (RORgamma t). Aktivace Th17 buněčné dráhy se zdá být důležitou u řady zánětlivých onemocnění jako např. revmatoidní artritida, celiakie či idiopatické střevní záněty.⁵⁶

Dráhy pro diferenciaci Th17, IL-22 signalizaci a vývoj TGFbeta receptorové signalizace byly mezi nejsignifikantněji změněnými drahami při porovnání DM1 a DV. Dráha Th17 a TGFbeta se objevují jako významné i mezi DM1 a DRL (Tabulka 4). Tyto výsledky jsou v souladu s našimi předchozími výsledky, kde jsme publikovali přítomnost IL-10 a TGFbeta v prediabetické fázi.^{57, 58}

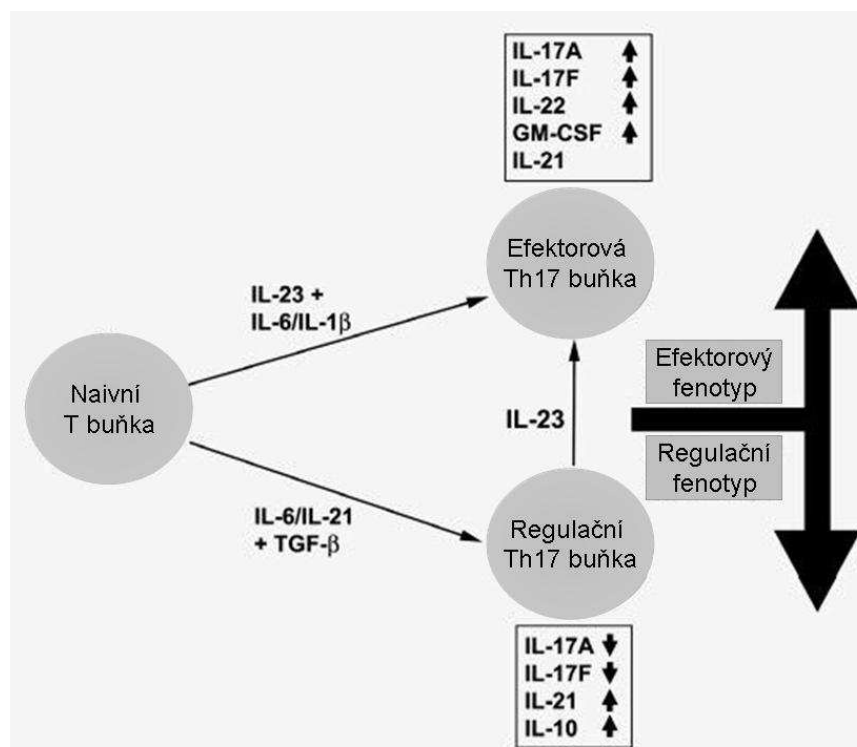
T1D (D) patients versus healthy controls (DV)	Relatives of T1D patients (DRL) versus healthy controls (DV)	T1D (D) patients versus relatives of T1D patients (DRL)
1: Antigen presentation by MHCII 7: Th17 cell differentiation 9: IL-22 signalling pathway 20: TCR and CD28 costimulation in activation of NF-kB 23: Th1 and Th2 cell differentiation 25: HTR2A induced activation of cPLA2 28: IL-13 signalling via JAK-STAT 32: Lectin induced complement pathway 33: Development of TGF-beta receptor signalling 35: T cell receptor signalling pathway 41: Immunological synapse formation	1: MIF-JAB1 signalling 27: CXCR4 signalling via second messenger 28: CXCR4 signalling pathway 32: Regulation of T cell function by CTLA-4 36: IL-7 signalling in T lymphocytes 43: IL-7 signalling in B lymphocytes 53: T cell receptor signalling pathway 55: CD28 signalling 56: Role of DAPI2 receptor in NK cells 59: Immunological synapse formation	24: Cytokine production by Th17 cells 31: TGF-beta receptor signalling 36: Th17 signalling pathway 40: Gastrin in inflammatory response

Tabulka 4: Seznam významně změněných imunologických drah mezi jednotlivými skupinami. Číselné označení vlevo u každé dráhy značí celkové pořadí mezi všemi významně změněnými drahami (nejen imunologickými).

Porovnání: 1.sloupec DM1 s DV, 2.sloupek DRL s DV, 3.sloupek DM1 s DRL.¹³

IL-22 má jak protizánětlivé, tak prozánětlivé funkce. Zodpovídá za buněčnou regeneraci, remodelaci tkání a udržování rovnováhy mezi běžnou střevní mikroflórou a imunitním systémem. Na druhou stranu jde ale o cytokin, který je produkován Th17 buňkami a zde má charakter spíše prozánětlivý. Je produkován aktivovanými T, NKT, Th1 a především Th17 buňkami.⁵⁹

Singh a kolektiv publikovali, že Th17 diferenciaci naivních T lymfocytů může být řízena dvěma směry na základě cytokinové produkce. V přítomnosti IL-23 a IL-6 dochází ke vzniku Th 17 efektorových buněk (Teff17) a k produkci velkého množství IL-22 a k indukci DM1. Zatímco v přítomnosti TGFbeta a IL-6 vznikají regulační Th17 buňky (Treg17) s nižší patogenitou a nižší produkcí IL-22 (Obrázek 8).^{60, 61}



Obrázek 8: Funkční rozdíly Th17 buněčných podtypů jsou určovány cytokinovým prostředím, ve kterém vznikají. Tyto buňky exprimují zvýšené(\uparrow) či snížené (\downarrow) množství prozánětlivých či regulačních cytokinů.⁶⁰

Článků s podobnou tematikou, které by se zabývaly celogenomovým skríníngem diabetiků a hlavně jejich příbuzných není mnoho. Navíc jsme jediní, kdo se zaměřil na stimulované vzorky diabetogenními autoantigeny.

Tato studie potvrzuje naše předchozí výsledky a shoduje se s řadou dalších prací publikovaných ostatními týmy.

2.3 Příloha 3

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.

IF 2,874

2.3.1 Úvod

DM1 je onemocnění, které je primárně spouštěno prozánětlivými Th1 lymfocyty, nicméně v poslední době se jako neméně důležitá v patogenezi DM1 zdá být i role prozánětlivých Th17 buněk.

V této studii jsme se zaměřili na pacienty s DM1 (n=40) a DV (n=11). Zajímalo nás, zda přítomnost a titr autoprotilátek asociovaných s DM1 (anti-GAD65 a IA2) ovlivní cytokinovou produkci PBMC po specifické stimulaci diabetogenními autoantigeny GAD65 a IA2. Pomocí enzymové metody (ELISPOT) jsme následně detekovali produkci IFN γ a IL-17. Zároveň jsme se dívali na poměry buněčných subpopulací (T, B, NK, Tc, Th, Treg a monocyty) pomocí průtokové cytometrie.

Probandi byli rozděleni na základě protilátkové produkce do 5 skupin. DV a 4 skupin diabetiků dle titru a typu protilátek. LOW skupinu tvořili DM1 pacienti s nízkými titry protilátek proti GAD65 a IA2 antigenu, GAD skupina se skládala z pacientů s vysokým titrem protilátek proti GAD65 antigenu, IA2 skupinu tvořili naopak pacienti s vysokým titrem protilátek proti IA2 antigenu a v poslední DP skupině byli pacienti s vysokými titry protilátek proti GAD65 i IA2 antigenu. PBMC od těchto jedinců byly stimulovány třemi různými koncentracemi antigenů GAD65 a IA2.

Destrukce beta buněk pankreatu vede k uvolňování autoantigenů a k aktivaci T lymfocytů. Odhalování buněčných epitopů způsobí amplifikaci autoimunitních procesů.²⁸ Mezi intracelulární antigeny patří i IA2

a přítomnost protilátek proti němu je spojen s vyšším rizikem rychlejší manifestace DM1.⁶²

Th17 lymfocyty jsou v poslední době v zájmu vědců a již byl prokázán jejich vliv v řadě autoimunitních onemocnění (např. revmatoidní artritida, roztroušená skleróza či idiopatické střevní záněty).^{31, 56} Role Th17 buněk v patogenezi DM1 je stále ještě nejasná, zdá se, že nejsou nezbytné k iniciaci DM1, ale mají důležitější roli až v pozdější fázi autoimunitního procesu.⁶³ Zároveň se objevují i publikace, které poukazují na duální efekt Th17 lymfocytů a dělí Th17 na T_H17.1 a T_H17.2. Naznačují, že o patogenitě těchto buněk rozhoduje vznikající podtyp Th17 buněk a T_H17.2 mohou hrát důležitou roli v prevenci autoimunitních onemocnění.^{60, 61}

Řada imunointervenčních studií se snažila o zabránění, či minimálně oddálení vzniku DM1. U nespecifické imunointervence je velké riziko nežádoucích účinků. Ideální by bylo specificky navodit toleranci k autoantigenům, bez nutnosti suprese zbytku imunitního systému. Na zvířecích modelech se ukazují být některé metody podávání autoantigenů úspěšné, nicméně klinické studie selhávají.⁶⁴⁻⁶⁶

Většina studií používala k navození tolerance pouze jeden antigen, kde snahou bylo změnit Th1 odpověď v Th2 a tím zastavit autoimunitní proces. Například studie s podáváním orálního inzulínu se ukázala být účinnou pouze pro pacienty s vysokým titrem protilátek proti inzulínu.⁶⁷ I nás proto zajímalo, zda protilátkový profil pacientů s DM1 odráží buněčné odpovědi k diabetogenním autoantigenům.

2.3.2 Výsledky a diskuze

U IFN γ a IL-17 jsme objevili signifikantní interakci mezi typem stimulace a skupinou pacientů ($p < 0,001$ pro oba cytokiny), což naznačuje, že autoantigenní stimulace má rozdílný efekt na jednotlivé skupiny v závislosti na jejich protilátkovém profilu. Produkce IFN γ negativně korelovala s množstvím NK buněk a pozitivně s T a Th lymfocyty.

V závislosti na typu stimulace jsme našli nižší produkci IL-17 u DV oproti skupinám DP ($p = 0,031$), GAD ($p = 0,03$) a IA2 ($p < 0,001$). Produkce IL-17 byla nižší i ve skupině LOW v porovnání s IA2 ($p = 0,005$). Při

porovnání nestimulovaných buněk byla signifikantně vyšší produkce IL-17 u skupiny IA2 v porovnání se skupinami LOW ($p=0,048$) a DV ($p=0,044$).

V několika člancích byla publikována zvýšená exprese IL-17 CD4+ buňkami u DM1 pacientů v porovnání se zdravými kontrolami. Nicméně se objevují i články, které poukazují na zvýšenou expresi IL-17 nejen u CD4+, ale i CD8+ buněk.^{58, 68}

Pomocí průtokové cytometrie jsme našli signifikantní rozdíly mezi Tc a Treg mezi jednotlivými skupinami. Tc byly zvýšené u IA2 skupiny oproti GAD skupině ($p=0,049$). Proporce Treg byla vyšší u DP oproti DV skupině. Titr IA2 protilátek negativně koreloval s Th ($p<0,001$) a pozitivně s Tc ($p<0,003$). Množství Treg pozitivně korelovalo s titrem GAD65 protilátek.

Překvapivě jsme nenašli korelaci mezi IFNgama, IL-17 ani mezi buněčnými populacemi a hladinou glykovaného hemoglobinu.

O cytotoxických T lymfocytech je známo, že jsou přítomny při destrukci beta buněk pankreatu. Molekula IA2 je přítomna na inzulinových sekrečních granulích v beta buňkách a jedná se o intracelulární doménu. Odhalení této molekuly a objevení se protilátek proti ní zvyšuje riziko vzniku DM1 a zkracuje dobu do jeho manifestace.^{62, 69} Beta buňky zůstávají i po manifestaci DM1 ještě nějakou dobu aktivní a sekretují zbytkové množství inzulinu. Coppieters a kolektiv poukázali, že infiltrace ostrůvků CD8+ buňkami, stejně tak, jako reziduální sekrece inzulinu, zůstávají ještě dlouhou dobu po manifestaci DM1. Délka trvání tohoto období je ale velmi individuální.⁷⁰

I z našich výsledků vyplývá, že autoimunitní proces dále probíhá i po samotné manifestaci DM1 a jedinci s přítomností protilátek proti IA2, mají i zvýšené množství CD8+ buněk a IL-17.

Na druhou stranu, přítomnost protilátek proti znaku GAD65 je charakterističtější spíše pro pacienty, kterým se manifestoval DM1 v pozdějším věku, než u mladších jedinců.⁷¹ V naší studii vidíme korelaci mezi titrem protilátek proti GAD65 epitopu a Treg buňkami. Z čehož se domníváme, že pomalejší progresse do DM1 může být způsobena regulačními mechanismy imunitního systému, které se snaží potlačovat autoimunitní procesy.

Selhání tolerantních mechanismů, vůči autoantigenům beta buněk, může být v důsledku deficitu Treg, které se podílejí na periferní toleranci. Je mnoho studií s rozporuplnými výsledky, které potvrzují snížené množství CD4+CD25+ Treg u DM1 pacientů,⁷² ale také které toto tvrzení nepotvrdily.^{54, 73, 74} My jsme našli zvýšené množství CD4+CD25^{hi}CD127^{low} pouze u skupiny DP ve srovnání s DV. Nicméně jsme měli Treg buňky specifikované přesněji i s použitím CD127 znaku a nejen pozitivitou znaku CD25, který se vyskytuje i na T efektorových buňkách. Tím by se daly vysvětlit určité diskrepance ve výsledcích.

Naše výsledky poukazují, že reaktivita jednotlivých skupin pacientů je velmi odlišná a titry protilátek budou asi v budoucích imunointervenčních studiích hrát důležitou roli. Může to alespoň částečně vysvětlit neúspěch řady imunointervenčních studií. Stejně tak i ve studii diabetes prevention trial-1 (DPT-1), kde podávali orálně inzulin jedincům s rizikem vzniku DM1, prvotní výsledky ukázaly, že podávání orálního inzulinu nijak neoddlí vznik DM1. Až při reanalýze a rozdělení jedinců dle titru IAA se ukázala být studie účinnou u jedinců s vysokými titry protilátek proti inzulinu.⁶⁷

Zdá se, že reakce na jednotlivé autoantigeny jsou velmi individuální a navíc mohou být zcela odlišné in vivo a in vitro. Neméně důležitý je i způsob a čas podání, dávka a adjuvans.

Naše výsledky poukazují na fakt, že protilátkový profil pacienta odráží i jeho buněčnou reaktivitu. Heterogenita DM1 a pravděpodobně i rozdílné mechanismy molekulární patologie této choroby zhoršuje možnost úspěšné imunointervence a bude třeba ji personalizovat.

2.4 Příloha 4

Decreased dendritic cell numbers but increased TLR9-mediated interferon-alpha production in first degree relatives of type 1 diabetes patients.

Kayserova J, Vcelakova J, Stechova K, Dudkova E, Hromadkova H, Sumnik Z, Kolouskova S, Spisek R, Sediva A.

Clin Immunol. 2014 Jul;153(1):49-55. doi: 10.1016/j.clim.2014.03.018. Epub 2014 Apr 5.

IF 2,654

2.4.1 Úvod

Dendritické buňky hrají důležitou roli v patogenezi autoimunitních onemocnění, včetně DM1. DC stojí na rozhraní mezi naivní a získanou imunitou. Pomocí „pattern recognition receptors“ (PRR), mezi které patří i nejznámější TLR, rozpoznávají s patogeny asociované molekuly (PAMP). Následně migrují do lymfatických orgánů, kde jsou přítomny T buňky a prezentují jim navázané antigeny. Po navázání PAMP dojde k aktivaci DC, ke zvýšení exprese kostimulačních molekul na jejím povrchu a k produkci cytokinů, které ovlivňují vznik příslušných efektorových T lymfocytů.³⁴

V této studii jsme se zaměřili na reaktivitu DC po stimulaci TLR u DM1 pacientů (n=97), jejich prvostupňových příbuzných (n=67) a zdravých kontrol (n=64). Zajímalo nás množství myeloidních DC (mDC) a plasmocytoidních DC (pDC). Následně jsme se zaměřili i na produkci IFNalfa pDC buňkami po stimulaci TLR7, -8 a -9 agonisty.

V minulých desetiletích se studie diabetu zaměřovaly především na roli získané imunity, hlavně na T lymfocyty a jejich roli v destrukci beta buněk pankreatu, tak i na B lymfocyty, které produkují autoprotilátky asociované s DM1 a dokáží prezentovat antigeny.⁷⁵⁻⁷⁷ V posledních letech se ale studie zabývají i neméně důležitou rolí naivní imunity při vzniku DM1.⁷⁷ Schopnost DC regulovat imunitní prostředí je v patogenezi autoimunitních onemocnění, včetně DM1, také podstatná.

V ostrůvcích pankreatu a v lymfatických uzlinách na zvířecích modelech byly nalezeny DC, které prezentovaly antigeny beta buněk.⁴¹ Transfer DC prezentujících diabetes-specifické antigeny u myši způsobil vznik DM1.⁷⁸ Podobný efekt byl popsán i u pDC, které exprimují velké množství IFN I. typu a též byl prokázán jejich vliv při vzniku DM1 u myši.⁷⁹

Virové infekce, především enterovirové, jsou považovány za jedny z důležitých spouštěčů autoimunitních pochodů v diabetu. pDC exprimují na svém povrchu TLR7-9, které se podílejí na rozpoznávání virových infekcí.^{80,}

81

Výzkum DC je dominantou především na zvířecích modelech. My jsme se v naší publikaci zaměřili na izolaci DC z lidské periferní krve, kde množství DC je v porovnání s uzlinami, či pankreatem mnohonásobně nižší. Výsledky studií DC lidské periferní krve jsou velmi odlišné, některé nacházejí zvýšené množství pDC u diabetiků,⁸² jiné zase snížené.⁸³⁻⁸⁵

2.4.2 Výsledky a diskuze

U DM1 pacientů jsme našli signifikantně snížené množství cirkulujících mDC i pDC v porovnání s DRL ($p < 0,01$) a DV ($p < 0,001$). DRL měli také snížené množství mDC i pDC v porovnání s DV ($p < 0,01$). Když jsme rozdělili DRL dle positivity a negativity autoprotilátek, DRLP měli nižší hladiny DC v porovnání DRLN.

Zvýšené množství IFN α jsme našli pouze po stimulaci TLR9 agonistou (CpG2216). Pokud jsme porovnali koncentraci IFN α v celkovém supernatantu, kde jsme stimulovali 2×10^5 PBMC, byla signifikantně nižší u pacientů s DM1 oproti DV (čerstvě manifestovaní DM1 $p < 0,01$, dlouhodobí pacienti s DM1 $p < 0,001$). Po přepočítání koncentrace IFN α na 10 pDC byla produkce IFN α srovnatelná u DM1 i DV, ale DRL exprimovali zvýšené množství IFN α pDC buňkami ($p < 0,01$). Produkce IFN α byla vyšší především u DRLN v porovnání s DV ($p < 0,01$). Po dalším rozdělení DRLN dle genetického rizika (klasifikováno dle HLA molekul II. třídy) jsme viděli, že DRLN s nízkým genetickým rizikem mají nižší produkci IFN α oproti ostatním DRL.

Rozdíly v produkci IFNalfa po stimulaci PBMC s TLR7 (loxoribine) a TLR8 (jednovláknovou RNA (ssRNA)) a TLR9 (CpG2006) ligandy byla zanedbatelná.

Naše data poukazují na početní i funkční rozdíly DC v periferní krvi u DM1 pacientů a jejich příbuzných.

Role DC v iniciaci autoimunitního diabetu u NOD myši již byla publikována,⁸⁶ ale o roli DC při vzniku DM1 u lidí toho mnoho popsáno ještě není. Bylo publikováno několik studií, ale jejich výsledky se liší.⁸²⁻⁸⁴ I my potvrzujeme změny v DC nejen u DM1 pacientů, ale i jejich příbuzných. Našli jsme snížené množství pDC i mDC u DM1 pacientů, což je v souladu s většinou publikovaných studií.⁸³⁻⁸⁵ Rozdílné výsledky mohou být způsobené řadou rozdílů mezi jednotlivými studiemi, ať již se jedná o věkové rozložení, délka trvání diabetu nebo rozdílné metodiky.

Předchozí studie na zvířatech poukazují na důležitost IFNalfa produkovaného pDC v iniciaci autoimunitního diabetu.^{86, 87} Navíc terapie IFNalfa u lidí je v některých případech asociována se vznikem DM1.⁸⁸

Přesná role IFNalfa v iniciaci DM1 u lidí není zatím známá, ale v nedávné publikaci objasnili události, které vedou k autoimunitnímu diabetu u NOD myši a dokazují důležitost IFNalfa v patogenezi tohoto onemocnění. Mechanismus působení spočívá ve zkřížené reaktivitě mezi B-1a buňkami, neutrofily a pDC. Aktivované B-1a buňky sekretují imunoglobulin G (IgG) specifický k dvojláknové DNA. Tyto IgG aktivují neutrofily k uvolnění DNA vazebného „cathelicidin-related antimicrobial peptide“ (CRAMP), které váží vlastní DNA. Následně DNA, anti-DNA IgG a CRAMP aktivují pDC přes TLR9, což vede k produkci IFNalfa v ostrůvcích pankreatu.⁸⁹

V naší studii jsme u DM1 a u DRL se zvýšeným rizikem vzniku diabetu detekovali snížené množství pDC v jejich periferní krvi. Zároveň jsme našli rozdíly v sekreci IFNalfa pDC buňkami po stimulaci TLR9 u DRL se zvýšeným rizikem vzniku DM1. Naše data se shodují s výsledky nedávno publikovaných studií, kde také poukazují na důležitost TLR9 aktivace u pDC a produkci IFNalfa při iniciaci vzniku diabetu u NOD myši.

2.5 Příloha 5

Case report: type 1 diabetes in monozygotic quadruplets

Stechova K, Halbhuber Z, Hubackova M, Kayserova J, Petruzelkova L, **Vcelakova J**, Kolouskova S, Ulmannova T, Faresjö M, Neuwirth A, Spisek R, Sediva A, Filipp D, Sumnik Z.

Eur J Hum Genet. 2012 Apr;20(4):457-62. doi:10.1038/ejhg.2011.212. Epub 2011 Nov 23.

IF 4,380

2.5.1 Úvod

Tato studie se zabývá unikátní rodinou, kde se narodila jednovaječná čtyřčata. Monozygotitu čtyřčat jsme testovali 14 krátkými tandemovými repeticemi (STR). Jednalo se o dívky, kde u dvou z nich se současně manifestoval DM1 a třetí byla ve stejnou dobu diagnostikována v prediabetické fázi se sníženou produkcí inzulínu v první fázi stimulované inzulínové odpovědi intravenózního glukoso-tolerančního testu a zvýšenou hladinou glukózy. U všech čtyřčat byla zjištěna pozitivita autoprotilátek proti znakům GAD65 a IA2. Serologické vyšetření potvrdilo, že všechna čtyřčata a jejich otec prodělali enterovirovou infekci EV68-71 serotypu.

Zaměřili jsme se zde na patologické procesy, které přispěly k manifestaci DM1 u takto unikátní kohorty. Všem rodinným příslušníkům jsme odebrali krev, z které jsme následně vyizolovali imunokompetentní buňky a provedli genovou expresní array, kvantifikaci jednotlivých buněčných subpopulací (Treg a DC) a cytokinovou produkci. Výsledky jsme porovnávali se zdravými kontrolami.

Při vzniku DM1 je důležitá interakce mezi vnějšími faktory, tak geny. Mezi vnější faktory patří i infekční agens jako například viry, které jsou často spojovány se vznikem DM1. Řada nedávných studií potvrzuje roli enterovirových infekcí při vzniku DM1.⁹⁰⁻⁹²

K ochraně před vznikem DM1 by bylo třeba směřovat imunointervenční studie do prediabetické fáze ještě před klinickými projevy diabetu. Toto období je ale těžce identifikovatelné a je třeba se zaměřit na

další znaky, které by nám tuto fázi pomohli lépe specifikovat. V současné době nám k detekci prediabetické fáze asi nejvíce pomáhá sledování autoprotilátek proti beta buňkám pankreatu a metabolické testy. Nicméně samotná přítomnost těchto protilátek není dostačující ke spuštění destrukce beta buněk pankreatu.^{93, 94}

2.5.2 Výsledky a diskuze

Z výsledků genové exprese mezi 10 nejsignifikantněji změněných imunologických drah při porovnání diabetických a nediabetických čtyřčat patřily hned 4, které byly spojeny s antivirovou odpovědí. Jednalo se o aktivaci protivirových interferonů, „Toll-IL-1-resistance (TIR) domain-containing adaptor inducing IFNbeta“ (TRIF) specifická TLR3 a TLR4 signalizační dráhy, IFNalfa/beta signalizaci a antigenní prezentaci pomocí HLA I.třídy. Signifikantně změněné dráhy byly i pro interleukinovou signalizaci a T-buněčnou diferenciaci (IL-4, -9, -12 a -27).

U všech členů rodiny jsme našli snížené množství Treg, pDC a mDC v porovnání se zdravými kontrolami.

PBMC diabetických čtyřčat produkovaly velké množství TGFbeta1 a naopak koncentrace IL-10 byly nízké nebo zcela nedetekovatelné. Naprosto opačné titry těchto cytokinů byly detekovány u prediabetické sestry. PBMC ostatních členů rodiny, bez známek diabetu, produkovaly střední až nízké titry IL-10 a množství produkovaného TGFbeta1 bylo nízké až nedetekovatelné. V produkci IL-13 jsme nenalezli žádné rozdíly u jednotlivých rodinných zástupců. Vysokou koncentraci IFNgama jsme zjistili u nediabetického čtyřčete a zaznamenanou hladinu IL-17 pouze u jejich otce.

Po specifické stimulaci PBMC TLR9 ligandem jsme zachytili zvýšenou produkci IFNalfa u nediabetických čtyřčat, jejich starší sestry a matky v porovnání s kontrolami. Diabetická čtyřčata měla jen slabě zvýšenou produkci IFNalfa vůči kontrolám.

Manifestace DM1 u sourozenců ve stejnou dobu je velmi vzácná. Navíc, pokud se jedná o jednovaječná čtyřčata, která byla počata spontánně, jde téměř o unikátní záležitost.

Interakce mezi genetickou predispozicí a vnějšími faktory hraje při vzniku DM1 zásadní roli. Role virových infekcí, stravovacích návyků, stresové faktory či hygienická hypotéza je při jeho vzniku taktéž důležitou součástí.⁹⁵

V našem případě, čtyřčata vyrůstala ve stejném prostředí, byla stejně dlouho kojena a strava se u nich také výrazně nelišila. Navštěvovala stejnou školku, byla stejně očkovaná a netrpěla žádnou závažnou dětskou chorobou. Rodiče se zmiňovali, že asi měsíc před manifestací diabetu obě DM1 čtyřčata prodělala respirační infekci. My jsme serologicky potvrdili prodělanou enterovirovou infekci u všech čtyřčat a jejich otce.

Virové infekce mají vliv na patologické procesy u DM1. V tomto se naše data shodují s řadou dalších publikací, které potvrzují, že konkrétně enterovirové infekce jsou časté mezi pacienty s DM1.⁹⁶

Naše výsledky z genových expresí také poukazují na přítomnost virové infekce, která pravděpodobně přispěla k manifestaci DM1 u dvou čtyřčat. Antivirová produkce interferonů byla u DM1 sester nejsignifikantněji změněnou drahou. Mezi dalšími důležitými drahami pojíci se s virovou odpovědí se nacházeli TRIF závislá TLR3 a TLR4 antivirová reaktivita, IFNalfa/beta signalizace a antigenní prezentace pomocí HLA molekul I.třídy.

TLR jsou receptory rozpoznávající PAMP. TLR3 rozpoznává virovou dvouvláknovou RNA, zatímco TLR4 proteinové struktury virů. Navíc TLR3 a TLR4 signalizují skrz TRIF, který spouští antivirovou odpověď imunitního systému, produkci interferonů I.typu, prozánětlivých cytokinů a „myeloid differentiation primary response gene 88“ (MyD88) nezávislou maturaci DC.⁹⁷⁻⁹⁹ IFN nemusí jen samy o sobě působit jako prodiabetogenní, spouštěním Th1 odpovědi, ale také mohou způsobit upregulaci HLA molekul I.třídy na beta buňkách pankreatu a tím iniciovat diabetogenní proces.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Mezi dalšími signifikantně změněnými drahami mezi DM1 a ne-DM1 čtyřčaty jsou cytokinové signalizace přes IL-27, -4, -12 a -9 ovlivňující T buněčnou diferenciaci. Slibnými kandidáty na diabetogenní znaky se zdají být především IL-27 a -9. IL-27 je klíčový regulátor IL-10 a IL-17 u lidských CD4+ T lymfocytů.¹⁰³ Nowac a kolektiv zase identifikovali IL-9 jako

důležitého prostředníka v diferenciaci Th17 buněk a jimi zprostředkovanými prozánětlivými onemocněními. Ukázalo se, že IL-9 je synergista TBGbeta při diferenciaci naivních CD4+ buněk do Th17 buněk a zároveň blokuje funkci Treg.¹⁰⁴

Analýza čerstvě izolovaných PBMC pomocí průtokové cytometrie ukázala na snížené množství pDC a/nebo mDC u prvostupňových příbuzných diabetických čtyřčat. Navíc všichni členové rodiny měli snížená množství Treg. Vrabelova a kolektiv také sledovali početní a funkční odchylky u prvostupňových příbuzných DM1 pacientů a zjistili snížené množství a funkční defekty Treg především u příbuzných s rizikovým genotypem.¹⁰⁵

Dominantní exprese TGFbeta oproti IL-10 u diabetických čtyřčat prozatím nikde publikována nebyla. Naše laboratoř se ale již dříve zabývala expresí těchto dvou cytokinů u dětí s DM1 a jejich příbuzných s rizikovým genotypem, kde zvýšené hladiny obou cytokinů byly zaznamenány u pacientů s DM1.⁵⁸

Otevírá se zde otázka, proč pouze dvě ze čtyřčat onemocněla diabetem, ač přítomnost enterovirové infekce byla potvrzena u všech čtyř a všechna měla pozitivní protilátky proti ostrůvkovým antigenům. Bohužel neznáme jejich protilátkový status před jejich příchodem s manifestací, čili se více upínáme k variantě, že hlavním spouštěčem byla ona enterovirová infekce. Navíc důležité je i množství viru a stav imunitního systému v době infekce. Bylo prokázáno, že progresi z autoimunitní inzulitidy do DM1 může vzrůst po enterovirové infekci.⁹²

Identický genotyp čtyřčat nám nezaručuje synchronizaci manifestace diabetu. Důležitou roli představují i prodělané infekce jedinců, nastavení imunitního systému, které je zcela individuální a s tím souvisí i stupeň genové metylace (případně dalších epigenetických změn). Všechny tyto parametry nejsou zanedbatelné a mohou ovlivnit dobu manifestace i u geneticky identických jedinců.

V naší nedávné publikaci jsme prokázali, že rozdíly v metylaci specifických buněk (CD4+ a CD14+) hrají pravděpodobně roli při vzniku DM1. Provedli jsme metylační studii u našich čtyřčat a potvrdili, že diabetická čtyřčata měla 164 rozdílně methylovaných prób oproti

nediabetickému čtyřčeti a prediabetické čtyřče bylo někde mezi nimi. 11 z těchto práb je lokalizováno v regionech, které jsou spojovány se vznikem DM1.¹⁰⁶

Tato studie podporuje „fertile-field“ hypotézu, která předpokládá, že autoimunitní onemocnění může být způsobeno řadou mikrobiálních a virových infekcí.¹⁰⁷ Naše výsledky poukazují na aktivaci antivirové odpovědi, která pravděpodobně vyústila v manifestaci DM1 u dvou ze čtyřčat. Nicméně přítomnost enterovirové infekce byla potvrzena u více rodinných příslušníků, kteří diabetem neonemcněli. Z toho vyplývá, že genetická predispozice je důležitá, ale vnější faktory mají při vzniku onemocnění také značnou váhu.

3 Závěr

Naše práce byla zaměřena především na hledání nových znaků, které by pomohly zpřesnit diagnostiku DM1 a především období před samotnou manifestací této choroby. V současné době je velkým pomocníkem detekce autoprotilátek asociovaných s DM1, nicméně sama pozitivita protilátek nám příliš neřekne o agresivitě inzulitidy a době do manifestace diabetu. Proto se snažíme najít i další znaky, které se liší mezi diabetiky, prediabetiky a zdravými kontrolami.

Z našich prací je patrné, že samotní prvostupňoví příbuzní pacientů s diabetem mellitus 1.typu mají již bazálně nastavenou jinou reaktivitu imunitního systému oproti zdravým kontrolám a zapojení nespecifických imunitních reakcí je nezbytné k iniciaci inzulitidy.

Dívali jsme se na rozdíly mezi jednotlivými skupinami pacientů s DM1, jejich prvostupňovými příbuznými a zdravými kontrolami po specifické autoantigenní stimulaci. Našli jsme největší rozdíly mezi DM1 skupinou a zdravými kontrolami především v prezentaci antigenů pomocí HLA molekul II. třídy, což je již dlouho známé, a následně v indukci Th17 a Th22 specifických buněčných pochodů. Kde obě tyto dráhy jsou často spojovány se vznikem autoimunitních onemocnění. Geny exprimované v Th17 a TGFbeta kaskádě by mohly být slibnými (pre)diabetickými znaky.

Zajímala nás i otázka, zda podle titru protilátek asociovaných s DM1, je možné blíže specifikovat agresivitu tohoto onemocnění. Zaměřili jsme se pouze na pacienty s DM1, které jsme rozdělili podle titru protilátek a po specifické stimulaci diabetogenními autoantigeny o různých koncentracích, jsme se dívali na reakce PBMC. Potvrdili jsme, že autoprotilátkový profil odráží i buněčnou reaktivitu. Viděli jsme, že vysoký titr IA2 protilátek je asociován se zvýšenou koncentrací IL-17 a zvýšeným množstvím Tc lymfocytů u těchto pacientů. Tento poznatek by mohl hrát v budoucnu roli při navrhování dalších imunointervenčních studií.

Jak již v této práci bylo několikrát řečeno, DM1 je přisuzováno spíše autoreaktivním T lymfocytům. V poslední době se ale ukazuje čím dál více, že i přirozená imunita je velmi důležitá pro vznik této choroby. Proto jsme

se zaměřili i na DC, které stojí na pomezí mezi přirozenou a získanou imunitou a jsou hlavními antigen prezentujícími buňkami. I v této práci jsme porovnávali pacienty s DM1, jejich prvostupňové příbuzné a zdravé kontroly. Naše výsledky ukazují na porušenou funkci DC v periférii, která je typická především pro prediabetické období. Našli jsme snížené množství mDC i pDC u DM1 pacientů a jejich prvostupňových příbuzných v porovnání s kontrolami. Zároveň jsme analyzovali i produkci INFalfa po specifické stimulaci TLR9 ligandem, která byla zvýšená u příbuzných DM1 pacientů, vyjma autoprotilátkově negativních s ochranným genotypem. V tomto kontextu se zdá, že role pDC v patologii diabetu nebude zanedbatelná.

DC buňkami a genovou expresí jsme se zabývali i v naší další publikaci, kdy jsme měli jedinečnou příležitost se zaměřit na unikátní rodinu s jednovaječnými čtyřčaty, kde dvěma ze čtyřčat se manifestoval DM1 ve stejnou dobu a jedno čtyřče bylo v prediabetické fázi. Z výsledků „microarray“ byla patrná antivirová aktivace imunitního systému, která byla sérologicky potvrzena přítomností enterovirové infekce. Zdá se, že přítomnost virové infekce, aktivace IL-27 a IL-9 cytokinové signalizace přispěla k manifestaci DM1 u dvou ze čtyřčat. Množství Treg, pDC a/nebo mDC byla u všech členů rodiny snižena. U nediabetických členů rodiny byla nalezena zvýšená exprese IFNalfa. Tato rodina je ukázkovým příkladem, že vnější faktory hrají při vzniku diabetu nezanedbatelnou roli i u geneticky identických jedinců.

Tato dizertační práce shrnuje poznatky naší laboratoře za posledních několik let. Zdaleka se ale nejedná o veškeré publikované výsledky. Dále jsme se zabývali i rozdíly v eozinofilech a jimi produkovanými defenziny u DM1 pacientů, expresí protilátek proti ZnT8 transportéru u DM1 pacientů a benefitem jejich detekce. Dlouhodobě se zabýváme i výzkumem pupečnickové krve diabetických matek, kde se zaměřujeme na řadu znaků, včetně zastoupení Treg. Zároveň jsme měli příležitost spolupracovat na metylační analýze naší unikátní rodiny se čtyřčaty, kde se ukazuje, že epigenetika hraje také velmi důležitou roli při vzniku DM1.

DM1 je komplikované autoimunitní onemocnění, s neznámým patologickým původem. Je spousta poznatků o mechanismech iniciace

inzulitidy, nicméně komplexní znalost těchto pochodů nám stále chybí. V této práci jsem se snažila o shrnutí našich výsledků a pevně věřím, že jsme naší vynaloženou prací přispěli alespoň trochu k porozumění, jak vzniká DM1.

4 Zkratky

APC	Antigen prezentující buňka
BB	BioBreeding krysa
BLK	Tyrozín kináza B lymfocytů
Breg	Regulační B lymfocyt
CCR3	C-C chemokinového receptoru 3
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Deoxyribonukleová kyselina získaná umělým přepisem z mRNA reverzní transkripcí
CRAMP	Cathelicidin-related antimicrobial peptide
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTL	Cytotoxický T lymfocyt
DC	Dendritická buňka
DM1	Diabetes mellitus 1. typu
DM2	Diabetes mellitus 2. typu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DP	Skupina pacientů s vysokými titry protilátek proti GAD65 a IA2 antigenu
DPT-1	Diabetes prevention trial-1
DRL	Prvostupňový příbuzný diabetika 1. typu
DRLN	DRL protilátkově negativní
DRLP	DRL protilátkově pozitivní
DV	Zdravá kontrola
EAE	Experimentální autoimunitní encefalomyelitis
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSpot
Foxp3	Forkhead box P3
GAD65	Izoforma dekarboxylázy kyseliny glutamové
HbA1c	Glykovaný hemoglobin
HLA	Hlavní histokompatibilní systém člověka
HLA-DR,-DP,-DQ	Lokusy HLA
IA2	Izoforma tyrozinové fosfatázy
IAA	Inzulinové protilátky
ICA	Protilátky proti Langerhansovým ostrůvkům
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Imunoglobulin G
IL	Interleukin
IL2RA	IL-2 receptor

INS	Inzulínový gen
LOW	Skupina pacientů s nízkými titry protilátek proti GAD65 a IA2 antigenu
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
mRNA	Informační RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NK	Natural killer
NKT	NK T lymfocyty
NOD	Non-obese diabetic myš
PAMP	S patogeny asociované molekuly
PBMC	Mononukleární buňky z periferní krve
PRR	Pattern recognition receptors
PTPN22	Lymphoid-specific protein tyrosine phosphatase
qRT-PCR	Kvantitativní řetězova reakce v reálném čase
RNA	Ribonukleová kyselina
RORgamma t	Retinoid-related orphan receptor gamma t
SLE	Systémový lupus erythematodes
ssRNA	Jednovláknová RNA
STAT3	Přenašeč signálů a transkripčních faktorů 3
STR	Krátké tandemové repetice
T1D	Type 1 diabetes mellitus
Tc	Cytotoxický T lymfocyt
TCR	T buněčný receptor
Teff17	Th17 efektorové buňky
Tfh	Folikulární pomocné T-lymfocyty
TGFbeta	Transformující růstový faktor beta
Th	Pomocný T lymfocyt
TIR	Toll-IL-1 receptor
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor domain–containing protein
TLR	Receptor podobný genu Toll
TNFalfa	Tumor nekrotizující faktor alfa
Treg	Regulační T lymfocyt
Treg17	Regulační Th17 buňky
TRIF	Toll-IL-1-resistance (TIR) domain-containing adaptor inducing IFNbeta
ZnT8	Zinkový transportér 8

5 Seznam autorských publikací a prezentací

5.1 Publikace

Diabetic Medicine (IF 3,115)

Substantial proportion of MODY among multiplex families participating in a Type 1 diabetes prediction programme.

Petruzelkova L, Dusatkova P, Cinek O, Sumnik Z, Pruhova S, Hradsky O, **Vcelakova J**, Lebl J, Kolouskova S.

Diabet Med. 2015 Dec 7. doi: 10.1111/dme.13043. [Epub ahead of print]

Cytokine (IF 2,874)

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.

Journal of Clinical Immunology (IF 2.654)

Decreased dendritic cell numbers but increased TLR9-mediated interferon-alpha production in first degree relatives of type 1 diabetes patients.

Kayserova J, **Vcelakova J**, Stechova K, Dudkova E, Hromadkova H, Sumnik Z, Kolouskova S, Spisek R, Sediva A.:

Clin Immunol. 2014 Jul;153(1):49-55. doi: 10.1016/j.clim.2014.03.018.
Epub 2014 Apr 5.

Diabetic Medicine (IF 3,241)

The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children from the onset of Type 1 diabetes mellitus.

Petruzelkova L, Ananieva-Jordanova R, **Vcelakova J**, Vesely Z, Stechova K, Lebl J, Dusatkova P, Sumnik Z, Coles R, Powell M, Furmaniak J, Rees Smith B, Kolouskova S.:
Diabet Med. 2013 Aug 19. doi: 10.1111/dme.12308. Epub 2013 Sep 13

Diabetologia (IF 6,487)

DNA methylation in monozygotic quadruplets affected by type 1 diabetes.

Disanto G, **Vcelakova J**, Pakpoor J, Elangovan RI, Sumnik Z, Ulmannova T, Ebers GC, Ramagopalan SV, Stechová K.:
Diabetologia. 2013 Sep;56(9):2093-5. doi: 10.1007/s00125-013-2972-3. Epub 2013 Jun 23.

Journal of Diabetes Research (IF 1,893)

The effect of diabetes-associated autoantigens on cell processes in human PBMCs and their relevance to autoimmune diabetes development.

Vcelakova J, Blatny R, Halbhuber Z, Kolar M, Neuwirth A, Petruzelkova L, Ulmannova T, Kolouskova S, Sumnik Z, Pithova P, Krivjanska M, Filipp D, Stechova K.:
J Diabetes Res. 2013;2013:589451. doi: 10.1155/2013/589451. Epub 2013 Jun 12.

European Journal of Human Genetics (IF 4,380)

Case report: type 1 diabetes in monozygotic quadruplets.

Stechova K, Halbhuber Z, Hubackova M, Kayserova J, Petruzelkova L, **Vcelakova J**, Kolouskova S, Ulmannova T, Faresjö M, Neuwirth A, Spisek R, Sediva A, Filipp D, Sumnik Z.:
Eur J Hum Genet. 2012 Apr;20(4):457-62. doi: 10.1038/ejhg.2011.212. Epub 2011 Nov 23.

Cellular Immunology (IF 1,974)

Eosinophils from patients with type 1 diabetes mellitus express high level of myeloid alpha-defensins and myeloperoxidase.

Neuwirth A, Dobeš J, Oujezdská J, Ballek O, Benešová M, Sumník Z, **Včeláková J**, Koloušková S, Obermannová B, Kolář M, Stechová K, Filipp D.:

Cell Immunol. 2012;273(2):158-63. doi:

10.1016/j.cellimm.2011.12.001. Epub 2012 Jan 2.

Scandinavian Journal of Immunology (IF 2,11)

Healthy first degree relatives of patients with type 1 diabetes exhibit significant differences in basal gene expression pattern of immunocompetent cells compared to controls: expression pattern as predeterminant of autoimmune diabetes.

Katerina Stechova¹, Michal Kolar², Radek Blatny³, Zbynek Halbhuber³, **Jana Vcelakova¹**, Miluse Hubackova¹, Lenka Petruzelkova¹, Zdenek Sumnik¹, Barbora Obermannova¹, Pavlina, Pithova⁴, Vendula Stavikova¹, Maria Krivjanska², Ales Neuwirth⁵, Stanislava Kolouskova^{1*}, Dominik Filipp^{5*}:

Scand J Immunol. 2011 Sep 16. doi: 10.1111/j.1365-

3083.2011.02637.x.

Aktuální gynekologie a porodnictví (Český recenzovaný časopis)

T regulační buňky v pupečnickové krvi dětí diabetických matek.

Tereza Ulmannová¹, Jindra Norková², Jana Včeláková¹, Dagmar Bartášková³, Ivana Špálová^{4*}, Kateřina Štechová^{1*}:

Actual Gyn 2012, 4, 53-58

5.2 Prezentace na kongresech a sympoziích:

Seznam zahrnuje pouze přednášky a postery, kde jsem první autor, či přednášející

PŘEDNÁŠKA - 24.-25.4.2013, ČR, Praha, Studentská vědecká konference 2013, Aktivace Th17 dráhy u pacientů s diabetem 1.typu a jejich prvostupňových příbuzných

PŘEDNÁŠKA - 9.-12.11.2012, Slovinsko, GOZD MARTULJEK, 18th Annual Meeting of the Middle-European Society FOR Paediatric Endocrinology (MESPE), The prevalence of ZnT8 autoantibodies in Czech children at the onset of type 1 diabetes mellitus and dynamic changes of serum ZnT8 autoantibody concentrations over time

POSTER - 5-8.9.2012, Scotland, Glasgow, European Congress of Immunology, Activation of Th17 pathway in potentially prediabetic first degree relatives and type 1 diabetic patients after exposure of diabetes-associated autoantigens

PŘEDNÁŠKA - 16.2.2012, ČR, Praha, IKEM, Cytokiny 2012, Vztah Th17 lymfocytů ke vzniku autoimunitních onemocnění se zaměřením na diabetes 1. typu

POSTER - 30.9.2011-3.10.2011, Slovensko, Smolenice, EASD-SGGD, HLA Genotyping importance for T1D prediction and its correlation with autoantibody status

PŘEDNÁŠKA - 4.-6.11.2011, ČR, Poděbrady, Postgraduálního diabetologického semináře: „Diabetes mellitus - aktuální v diabetologii“, Význam genetického rizika v predikce diabetu mellitu prvního typu

PŘEDNÁŠKA - 27-28.5.2011, ČR, Brno, Dny dětské diabetologie, Výskyt autoantilátok ve vztahu ke genotypu a riziku vzniku T1D

PŘEDNÁŠKA - 14-16.4.2011, ČR, Luhačovice, XLVII Diabetologické dny,
Role autoprotilátek v predikci diabetu 1.typu

POSTER - 24-27.3.2011; Švýcarsko, Davos, WIRM V, Protein and gene expression pattern in potentially prediabetic first degree relatives and recent onset type 1 diabetic patients

POSTER - 31.10.2010-3.11.2010, Korea; Seoul, IDS2010, Protein and gene expression profile in newly-onset type 1 diabetic patients and in their potentially prediabetic first-degree relatives

6 Použitá literatura

1. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. Jan 2014;37 Suppl 1:S14-80.
2. Pelikánová T, Bartoš V a kol. *Praktická diabetologie*: Maxdorf; 2010.
3. Lebl J, Průhová Š, Šumník Z. *Abeceda diabetu: příručka pro děti a mladé dospělé, kteří chtějí o diabetu vědět víc* Maxdorf; 2008.
4. Tuch B, Dunlop M, Proietto J. *Diabetes Research, Second Edition*. Taylor & Francis, 2002.
5. Kojic Damjanov S, Deric M, Eremic Kojic N. Glycated hemoglobin A1c as a modern biochemical marker of glucose regulation. *Med Pregl*. 2014 Sep-Oct;67(9-10):339-44.
6. Zvolský M. Činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky v roce 2013. 02/ 2015 <http://www.uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-diabetologie-pece-diabetiky-roce-2013>.
7. Perušičová J. Diabetes mellitus - diagnóza klasifikace, epidemiologie. *POSTGRADUÁLNÍ MEDICÍNA*. 2005;PM 4/2005:404-407.
8. Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*. 2008 May 24;371(9626):1777-82. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60765-5.
9. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. 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 Jun 13;373(9680):2027-33. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60568-7. Epub 2009 May 27.
10. Štechová K, Perušičová J, Honka M. *Diabetes mellitus 1. typu*: Maxdorf; 2014.
11. Patterson CC, Gyurus E, Rosenbauer J, et al. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-

- 2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*. Aug 2012;55(8):2142-2147.
12. Data z českého registru dětského diabetu - <http://www.lmg.cz/wp-content/uploads/cteni9.pdf>.
 13. Vcelakova J, Blatny R, Halbhuber Z, et al. The effect of diabetes-associated autoantigens on cell processes in human PBMCs and their relevance to autoimmune diabetes development. *J Diabetes Res*. 2013;2013:589451.
 14. Petruzelkova L, Ananieva-Jordanova R, Vcelakova J, et al. The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children from the onset of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*. Feb 2014;31(2):165-171.
 15. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*. Dec 2011;11(6):533-542.
 16. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes*. Jul 2010;59(7):1561-1571.
 17. Lernmark A, Larsson HE. Immune therapy in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. Feb 2013;9(2):92-103.
 18. Valdes AM, Thomson G, Graham J, et al. D6S265*15 marks a DRB1*15, DQB1*0602 haplotype associated with attenuated protection from type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. Dec 2005;48(12):2540-2543.
 19. Dahlquist G. Non-genetic risk determinants of type 1 diabetes. *Diabete Metab*. 1994 May-Jun;20(3):251-7. 1994.
 20. Malcova H, Sumnik Z, Drevinek P, Venhacova J, Lebl J, Cinek O. Absence of breast-feeding is associated with the risk of type 1 diabetes: a case-control study in a population with rapidly increasing incidence. *Eur J Pediatr*. 2006 Feb;165(2):114-9. Epub 2005 Oct 7. 2006.
 21. Mendlová P, Koloušková S, Šumník Z, Vavřínek Jan. Vliv výživy na riziko vzniku diabetes mellitus 1.typu. *Interní medicína pro praxi*. 2004;11:531-534.

22. Gale EA. A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia*. Apr 2002;45(4):588-594.
23. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*. Apr 2010;160(1):1-9.
24. Štechová K. Imunologické puzzle aneb Imunitní mechanismy při vzniku diabetu 1. typu. *Lékařské listy*. 2009;PM 4/2009:404-407.
25. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. Apr 29 2010;464(7293):1293-1300.
26. Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. Immunogenetics of Type 1 Diabetes Mellitus. *Mol Aspects Med*. Jan 8 2015.
27. Wang B, Tisch R. Parameters influencing antigen-specific immunotherapy for type 1 diabetes. *Immunol Res*. 2008;41(3):175-187.
28. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem Biophys*. 2007;48(2-3):159-163.
29. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. Oct 30 2014.
30. Labikova J, Vcelakova J, Ulmannova T, Petruzalkova L, Kolouskova S, Stechova K. The cytokine production of peripheral blood mononuclear cells reflects the autoantibody profile of patients suffering from type 1 diabetes. *Cytokine*. Oct 2014;69(2):189-195.
31. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. Aug 27 2009;361(9):888-898.
32. Eisenbarth GS. *Immunology of Type 1 Diabetes*: Plenum; 2004.
33. Anderson B, Park BJ, Verdaguer J, Amrani A, Santamaria P. Prevalent CD8(+) T cell response against one peptide/MHC complex in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 3 1999;96(16):9311-9316.

34. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. Aug 2013;13(8):566-577.
35. Wong FS, Wen L. B cells in autoimmune diabetes. *Rev Diabet Stud*. Fall 2005;2(3):121-135.
36. Roep BO, Peakman M. Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Apr 2012;2(4):a007781.
37. Kleffel S, Vergani A, Tezza S, et al. Interleukin-10+ Regulatory B Cells Arise Within Antigen-Experienced CD40+ B Cells to Maintain Tolerance to Islet Autoantigens. *Diabetes*. Jan 2015;64(1):158-171.
38. Novak J, Griseri T, Beaudoin L, Lehuen A. Regulation of type 1 diabetes by NKT cells. *Int Rev Immunol*. Jan-Apr 2007;26(1-2):49-72.
39. Mackern-Oberti JP, Llanos C, Vega F, et al. Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. Feb 2015;14(2):127-139.
40. Lehuen A, Diana J, Zaccane P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*. Jul 2010;10(7):501-513.
41. Calderon B, Suri A, Miller MJ, Unanue ER. Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 22 2008;105(16):6121-6126.
42. Knip M, Akerblom HK, Becker D, et al. Hydrolyzed infant formula and early beta-cell autoimmunity: a randomized clinical trial. *JAMA*. Jun 11 2014;311(22):2279-2287.
43. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up. *Clin Immunol*. 2014 Jul;153(1):23-30. doi: 10.1016/j.clim.2014.03.016. Epub 2014 Apr 1. 2014.
44. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 2010 Apr 23;32(4):457-67. doi: 10.1016/j.immuni.2010.04.001.

45. Tree TI, Peakman M. Autoreactive T cells in human type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Mar 2004;33(1):113-133, ix-x.
46. Reynier F, Pachot A, Paye M, et al. Specific gene expression signature associated with development of autoimmune type-1 diabetes using whole-blood microarray analysis. *Genes Immun.* Apr 2010;11(3):269-278.
47. Petrich dML, Fu J, Connor K, et al. IFN-gamma and IL-10 islet-antigen-specific T cell responses in autoantibody-negative first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. *SO - Diabetologia.* 2010 Jul;53(7):1451-60. doi: 10.1007/s00125-010-1739-3. Epub 2010 Apr 6.
48. Borowiec M, Liew CW, Thompson R, et al. Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 25;106(34):14460-5. doi: 10.1073/pnas.0906474106. Epub 2009 Aug 10.
49. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med.* Nov 26 2009;361(22):2143-2152.
50. Zipris D, Lien E, Xie JX, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA. TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *J Immunol.* Jan 1 2005;174(1):131-142.
51. Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Dec;21(6):413-23. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.10.002. Epub 2010 Nov 11.
52. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1998 Jun;14(2):129-51.
53. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med.* Aug 8 1985;313(6):353-360.

54. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. Jan 2005;54(1):92-99.
55. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
56. Costa VS, Mattana TC, da Silva ME. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Jun;88(3):222-6. doi: 10.1016/j.diabres.2010.03.014. Epub 2010 Apr 14.
57. Ryden A, Stechova K, Durilova M, Faresjo M. Switch from a dominant Th1-associated immune profile during the pre-diabetic phase in favour of a temporary increase of a Th3-associated and inflammatory immune profile at the onset of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009 May;25(4):335-43. doi: 10.1002/dmrr.958.
58. Stechova K, Bohmova K, Vrabelova Z, et al. 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 Sep;23(6):462-71.
59. Nikoopour E, Bellemore SM, Singh B. IL-22, cell regeneration and autoimmunity. *Cytokine*. Nov 29 2014.
60. Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, Bellemore SM, Nikoopour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *Indian J Med Res*. 2013 Nov;138(5):591-4. 2013.
61. Singh B, Nikoopour E, Huszarik K, Elliott JF, Jevnikar AM. Immunomodulation and regeneration of islet Beta cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res*. Oct 2011;31(10):711-719.
62. Morran MP, Casu A, Arena VC, et al. Humoral autoimmunity against the extracellular domain of the neuroendocrine autoantigen IA-2 heightens the risk of type 1 diabetes.

Endocrinology. 2010 Jun;151(6):2528-37. doi: 10.1210/en.2009-1257. Epub 2010 Apr 9.

63. Bending D, De la Pena H, Veldhoen M, et al. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest*. 2009 Mar;119(3):565-72. doi: 10.1172/JCI37865. Epub 2009 Feb 2.
64. Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M, et al. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med*. Apr 1 1996;183(4):1561-1567.
65. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, et al. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. *J Clin Invest*. Feb 1995;95(2):628-634.
66. Tisch R, Liblau RS, Yang XD, Liblau P, McDevitt HO. Induction of GAD65-specific regulatory T-cells inhibits ongoing autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes*. Jun 1998;47(6):894-899.
67. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care*. May 2005;28(5):1068-1076.
68. Peakman M, Tree TI, Endl J, van Endert P, Atkinson MA, Roep BO. 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*. Aug 2001;50(8):1749-1754.
69. 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*. Oct 2012;2(10).

70. Coppieters KT, Dotta F, Amirian N, et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J Exp Med*. Jan 16 2012;209(1):51-60.
71. Graham J, Hagopian WA, Kockum I, et al. Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes*. May 2002;51(5):1346-1355.
72. Kukreja A, Cost G, Marker J, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*. Jan 2002;109(1):131-140.
73. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. Feb 2005;24(1):55-62.
74. 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*. May 2005;54(5):1407-1414.
75. Miao D, Yu L, Eisenbarth GS. Role of autoantibodies in type 1 diabetes. *Front Biosci*. 2007;12:1889-1898.
76. Wong FS, Hu C, Xiang Y, Wen L. To B or not to B--pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol*. 2010 Dec;22(6):723-31. doi: 10.1016/j.coi.2010.10.002. Epub 2010 Nov 1. 2010.
77. Zipris D. Innate immunity and its role in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. Aug 2008;15(4):326-331.
78. Ludewig B, Odermatt B, Landmann S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med*. Oct 19 1998;188(8):1493-1501.
79. Stewart TA, Hultgren B, Huang X, Pitts-Meek S, Hully J, MacLachlan NJ. Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science*. Jun 25 1993;260(5116):1942-1946.
80. Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral

infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol.* Jan 2005;26(3):221-229.

81. Martinez J, Huang X, Yang Y. Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 6 2010;107(14):6442-6447.
82. Allen JS, Pang K, Skowera A, et al. Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture. *Diabetes.* Jan 2009;58(1):138-145.
83. Hinkmann C, Knerr I, Hahn EG, Lohmann T, Seifarth CC. Reduced frequency of peripheral plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes. *Horm Metab Res.* Nov 2008;40(11):767-771.
84. Nieminen JK, Vakkila J, Salo HM, et al. Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2012 Nov;35(11):2303-10. doi: 10.2337/dc11-2460. Epub 2012 Jul 11.
85. Chen X, Makala LH, Jin Y, et al. Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood. *Clin Immunol.* 2008 Dec;129(3):413-8. doi: 10.1016/j.clim.2008.08.013. Epub 2008 Sep 30.
86. Diana J, Gahzarian L, Simoni Y, Lehuen A. Innate immunity in type 1 diabetes. *Discov Med.* Jun 2011;11(61):513-520.
87. Li Q, McDevitt HO. The role of interferon alpha in initiation of type I diabetes in the NOD mouse. *Clin Immunol.* 2011 Jul;140(1):3-7. doi: 10.1016/j.clim.2011.04.010. Epub 2011 Apr 22.
88. Nakanishi K, Saitoh S. Clinical and genetic characteristics of patients with type 1 diabetes associated with interferon therapy. *Diabetes Care.* 2011 Feb;34(2):471-3. doi: 10.2337/dc10-1237.
89. Diana J, Simoni Y, Furio L, et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat Med.* 2013 Jan;19(1):65-73. doi: 10.1038/nm.3042. Epub 2012 Dec 16. 2013.

90. Oikarinen S, Martiskainen M, Tauriainen S, et al. Enterovirus RNA in blood is linked to the development of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011 Jan;60(1):276-9. doi: 10.2337/db10-0186. Epub 2010 Oct 13.
91. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009 Jun;52(6):1143-51. doi: 10.1007/s00125-009-1276-0. Epub 2009 Mar 6.
92. Stene LC, Oikarinen S, Hyoty H, et al. Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes*. 2010 Dec;59(12):3174-80. doi: 10.2337/db10-0866. Epub 2010 Sep 21.
93. Staeva-Vieira T, Peakman M, von Herrath M. Translational mini-review series on type 1 diabetes: Immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2007 Apr;148(1):17-31.
94. Achenbach P, Bonifacio E, Ziegler AG. Predicting type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2005 Apr;5(2):98-103.
95. von Herrath M. Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. *Diabetes*. 2009 Jan;58(1):2-11. doi: 10.2337/db08-9027.
96. Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ*. 2011 Feb 3;342:d35. doi: 10.1136/bmj.d35.
97. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863. Epub 2010 Apr 20.
98. Barton GM. Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol*. Feb 2007;19(1):33-40.

99. Seya T, Oshiumi H, Sasai M, Akazawa T, Matsumoto M. TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons. *Int J Biochem Cell Biol.* Mar 2005;37(3):524-529.
100. Siren J, Pirhonen J, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):1932-7.
101. von Herrath M. *Diabetes: A virus-gene collaboration:* Nature. 2009 May 28;459(7246):518-9. doi: 10.1038/459518a.
102. von Herrath MG, Dockter J, Oldstone MB. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity.* 1994 Jun;1(3):231-42.
103. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2009 Aug 15;183(4):2435-43. doi: 10.4049/jimmunol.0900568. Epub 2009 Jul 22.
104. Nowak EC, Weaver CT, Turner H, et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med.* 2009 Aug 3;206(8):1653-60. doi: 10.1084/jem.20090246. Epub 2009 Jul 13.
105. 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 Apr;67(4):404-10. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02074.x. Epub 2008 Feb 1.
106. Disanto G, Vcelakova J, Pakpoor J, et al. DNA methylation in monozygotic quadruplets affected by type 1 diabetes. *Diabetologia.* Sep 2013;56(9):2093-2095.
107. von Herrath MG, Fujinami RS, Whitton JL. Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nat Rev Microbiol.* 2003 Nov;1(2):151-7.

7 Přílohy