

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



MUDr. Lenka Vargová

Název závěrečné práce

Imunointervenční terapie nově vzniklého autoimunitně podmíněného diabetu u NOD myši

Title

Immunointerventional therapy of autoimmune diabetes with recent onset in NOD mice

Typ závěrečné práce

Disertační

Školitel: prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

Konzultant: MUDr. Jan Kříž, 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.

V Praze, 29. 02. 2016

MUDr. Lenka Vargová

Podpis

Identifikační záznam:

VARGOVÁ, Lenka. *Imunointervenční terapie nově vzniklého autoimunitně podmíněného diabetu u NOD myši. [Immunointerventional therapy of autoimmune diabetes with recent onset in NOD mice]*. Praha, 2016. 107 stran, 2 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika diabetologie Institutu klinické a experimentální medicíny. Vedoucí práce Saudek, František.

Předmluva:

V roce 2006 jsem ukončila studium na lékařské fakultě v Plzni Univerzity Karlovy v Praze a nastoupila na Klinikou diabetologie Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze. Ve stejném roce jsem zahájila postgraduální studium Biomedicíny v oboru Biologie a patologie buňky na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

Působením v Laboratoři Langerhansových ostrůvků IKEM jsem se postupně naučila izolaci ostrůvků z pankreatu (lidských, potkaních, myších) a z laboratorních metod imunofluorescenční barvení ostrůvků, izolaci mRNA, western blott, RT-PCR, provádění intraperitoneálního glukózového tolerančního testu, separaci a kultivaci buněk, transplantaci ostrůvků pod renální kapsulu myši a další.

V roce 2013 jsem získala Fulbrightovo stipendium, díky kterému jsem strávila 6 měsíců v laboratoři Schulze Diabetes Institute University of Minnesota. Zde jsem se věnovala izolacím Langerhansových ostrůvků a to nejen klinicky (autotransplantace ostrůvků pacientům s chronickou pankreatitidou), ale také experimentálně (xenotransplantace ostrůvků od prasat primátům, allotransplantace ostrůvků primátů a výzkumné izolace lidských ostrůvků za účelem testování různých enzymů).

Ráda bych touto cestou poděkovala svým kolegům a samozřejmě rodině, bez kterých by vznik této práce nebyl možný. Především chci poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Františku Saudkovi, DrSc. za možnost pracovat a studovat pod jeho vedením, velmi si toho vážím. MUDr. Janu Křížovi, Ph.D. za jeho trefné připomínky a ochotu kdykoliv pomoci. Mgr. Kláře Zacharovové Ph.D. za vyhodnocování histologických obrazů, provádění laboratorních stanovení a neutuchající entuziasmus, Ing. Ireně Brabcové, Ph.D. za pomoc při stanovování profilů genové exprese, Zdeňku Cimburkovi za provádění průtokové cytometrie a Evě Dovolilové a Lence Vojtové za jejich excelentní laborantskou práci.

Tato práce vznikla za spolupodpory grantu SVV 260257 od Univerzity Karlovy v Praze, za což děkuji MUDr. Zdeňku Kostrouchovi, Ph.D.

Seznam nejčastěji použitých zkratk:

mATG – myší anti-thymocytární globulin
CD – cluster of differentiation
DM1 – diabetes mellitus 1. typu
DPP-IV – dipeptidyl peptidáza IV
GLP-1 – glucagon-like peptide 1
IL – interleukin
IPGTT – intraperitoneální glukózový toleranční test
NOD – non-obese diabetic
PLU – pankreatické lymfatické uzliny
TGF β – transformující růstový faktor β
Tregs – regulační T-lymfocyty

Obsah:

Prohlášení	2
Předmluva	3
Obsah	4
Abstrakt v českém jazyce	5
Abstrakt v anglickém jazyce	6
1. Úvod	7
2. Cíl projektu včetně stanovení hypotéz	15
3. Materiál a metody	17
3.1. Myši a měření glykémie	17
3.2. Průtoková cytometrie	19
3.3. Imunofluorescenční barvení ostrůvků	20
3.4. Morfologie ostrůvků	21
3.5. Stanovení DPP-IV	22
3.6. Stanovení TGF β	22
3.7. Profil genové exprese ve splenocytech	22
3.8. Intraperitoneální glukózový toleranční test	27
4. Statistické vyhodnocení	27
5. Experiment 1	29
5.1. Úvod a metody	29
5.2. Výsledky	29
6. Experiment 2	41
6.1. Úvod a metody	41
6.2. Výsledky	41
7. Experiment 3	47
7.1. Úvod a metody	47
7.2. Výsledky	47
8. Experiment 4	63
8.1. Úvod a metody	63
8.2. Výsledky	63
9. Diskuze	68
10. Závěry a zhodnocení cílů práce a hypotéz	81
11. Souhrn v českém jazyce	84
12. Souhrn v anglickém jazyce	85
13. Literatura	86
14. Seznam publikací	93
14.1. Publikace, které jsou podkladem disertace	93
14.2. Publikace bez vztahu k tématu disertace	93
15. Seznam příloh	94
16. Příloha 1	95
17. Příloha 2	100

Abstrakt v českém jazyce

Úvod: Diabetes mellitus 1. typu je chronické metabolické onemocnění způsobené autoimunitní destrukcí beta buněk pankreatu. Teorie vzniku onemocnění vychází zejména ze studia průběhu onemocnění u non-obese diabetic (NOD) myši, kdy k rozvoji cukrovky dochází následkem poruchy v regulaci imunitního systému.

Cíl práce: Zjistit, zda zkombinováním látek s imunosupresivním účinkem (myši anti-thymocytární globulin (mATG), gusperimus), s látkami, které podporují obnovu pankreatických beta buněk (sitagliptin), dojde ke zpomalení či zvrácení průběhu diabetu. A jakým mechanismem dané látky působí.

Materiál a metody: K pokusům byly použity samice myšního kmene NOD/ShiLtJ (H2^{g7}). U těchto myši jsme stanovovali glykémie, subpopulace T-lymfocytů pomocí průtokové cytometrie, míru zánětu a přítomnost endokrinních buněk imunohistochemickým vyšetřením řezů pankreatu. Dále jsme stanovovali koncentraci dipeptidyl peptidázy IV (DPP-IV) a transformujícího růstového faktoru β (TGF β) v krvi, profil genové exprese ve splenocytech a intraperitoneální glukózový toleranční test.

Výsledky: Výskyt remise diabetu byl pouze ojedinělý a byl spojen se sníženou koncentrací DPP-IV a zvýšenou koncentrací TGF β v krvi. Podávání sitagliptinu vedlo ke snížení hodnot TGF β . Pozitivní vliv na změnu v subpopulacích T-lymfocytů jsme zaznamenali pouze při podávání mATG. Gusperimus naopak udržoval zánětlivý proces v aktivní fázi.

Závěr: V případě již manifestního diabetu se žádná z terapií nejeví dostatečně účinná k jeho zvrácení či zpomalení průběhu choroby.

Klíčová slova: Diabetes mellitus 1. typu, NOD myš, DPP-IV, TGF β , mATG, gusperimus, sitagliptin, Tregs, autoimunita

Abstrakt v anglickém jazyce

Introduction: Type 1 diabetes mellitus is a chronic metabolic disease caused by autoimmune destruction of pancreatic beta cells. The theory of a disease onset is derived from study of disease course in non-obese diabetic (NOD) mice, in which the diabetes occurs due to a dysregulation of the immune system.

Aim of the study: To find out, if the combination of a potent immunosuppression (murine anti-thymocyte globulin (mATG), gusperimus) together with stimulation of islet regeneration (sitagliptin) will be able to slow down or reverse the course of the disease. Another aim is to identify the mechanism by which the substances act.

Material and methods: All experiments were performed in female NODShiLtJ (H2^{g7}) mice. The following parameters were examined: blood glucose, subpopulations of T-lymphocytes by flow cytometry, islet inflammation and presence of endocrine cells by immunohistochemical examination of pancreatic sections. Concentration of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and transforming growth factor β (TGF β) in blood, gene expression profile from splenocytes and intraperitoneal glucose tolerance test.

Results: Remission of diabetes was very rare and was accompanied by lowered concentration of DPP-IV and higher concentration of TGF β in blood. Administration of sitagliptin led to a decrease of TGF β values. Positive influence on T-lymphocytes subpopulations caused only mATG administration. Gusperimus, on the other hand, kept the inflammatory process in an active phase.

Conclusion: In the case of overt diabetes none of the therapies seemed to be efficient to cure or slow down the course of the disease.

Key words: Type 1 diabetes, NOD mouse, DPP-IV, TGF β , mATG, gusperimus, sitagliptin, Tregs, autoimmunity

Úvod

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je chronické metabolické onemocnění způsobené autoimunitní destrukcí beta buněk pankreatu. Beta buňky, které spolu s dalšími typy buněk tvoří Langerhansovy ostrůvky, představují endokrinní část pankreatu. Poškození beta buněk má za následek nedostatek inzulínu a hyperglykémii. Dlouhodobé působení hyperglykémie na tkáň a orgány vede ke vzniku chronických komplikací diabetu. Mezi tyto chronické komplikace patří diabetická nefropatie, která může skončit až úplnou ztrátou funkce ledvin, retinopatie vedoucí k poškození zraku a případné slepotě, neuropatie projevující se poškozením nervů a spolupodílející se na rozvoji syndromu diabetické nohy. Hyperglykémie způsobuje také závažné poškození makrovaskulárního řečiště (Nathan D.M., 2015; Pelikánová T et al., 2012).

Ačkoliv přesný způsob vzniku a rozvoje onemocnění stále není znám, je jasné, že postihuje jedince s genetickou predispozicí k onemocnění při současném působení vlivů prostředí. (Lehuen A. et al., 2010). Již před manifestací onemocnění lze v séru pacientů detekovat přítomnost autoprotilátek. Jedná se zejména o protilátky proti buňkám ostrůvků (ICA), autoprotilátky proti inzulínu (IAA), autoprotilátky proti izoformě 65 dekarboxylázy kyseliny glutamové (GADA) a proti antigenu 2 asociovanému s inzulinomem (IA-2A). Přítomnost dvou a více protilátek v séru značí progresivní průběh onemocnění. Plně rozvinutý diabetes se pak manifestuje hyperglykemií a klinickými příznaky až při poklesu množství funkčních beta buněk na 20 a méně procent jejich původní hodnoty (Knip M., Siljander H., 2008).

Protože je zkoumání vzniku a průběhu choroby u lidí velmi obtížné, používají se ke studiu DM1 dva zvířecí modely. Jsou to biobreeding potkani (Whalen B.J. et al., 2001) a non-obese diabetic (NOD) myši (Makino S. et al., 1980). Průběh autoimunitní inzulitidy je v obou modelech natolik podobný jako u lidí (včetně přítomnosti CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů

zaměřených proti ostrůvkům a genetické vazby onemocnění), že jsou oba modely považovány za vhodné pro studium patogeneze DM1 i možností léčby.

Nejdůležitější geny přispívající k vrozené predispozici jsou u lidí lokalizovány na chromozomu 6 v oblasti kódující HLA (human leukocyte antigen) II. třídy. Kromě těchto genů je s DM1 asociováno dalších deset genů či genových oblastí. Nicméně pouze u malé části jedinců (méně než 10%) s potvrzenou HLA predispozicí dojde k rozvoji klinického onemocnění (Knip M., Siljander H., 2008). Důležité je proto zjištění, že v posledních dvou dekádách výrazně stoupla incidence DM1 (Cinek O. et al., 2012) a např. ve Velké Británii stoupá o 3% ročně. Tento nárůst je tedy rychlejší než může být přičítáno genetickým změnám (Lehuen A. et al., 2010). Z tohoto důvodu se intenzivně zkoumají možné vlivy prostředí, kterými jsou např. neadekvátně zvýšená hygiena, virové nákazy, vakcinace, sluneční záření a mnoho dalších.

Aktuálně přijímaná teorie vzniku onemocnění vychází zejména ze studia průběhu onemocnění u NOD myší, kdy k rozvoji DM1 dochází následkem poruchy v regulaci imunitního systému, vedoucí k expanzi autoreaktivních CD4+ a CD8+ T-lymfocytů, autoprotilátky produkujících B lymfocytů a aktivaci přirozeného imunitního systému, které spolupracují v ničení beta buněk pankreatu.

Na základě dosud neobjasněného imunologického inzultu dochází u jedinců s genetickou predispozicí k zahájení chronického autoimunitního zánětu postihujícího selektivně beta buňky Langerhansových ostrůvků. V úvodu se v pankreatu objevují buňky přirozené imunity, jako jsou dendritické buňky, makrofágy a přirození zabíječi spolu s autoreaktivními B lymfocyty. Místem aktivace T-lymfocytů jsou pankreatické lymfatické uzliny na základě prezentace antigenů z beta buněk prostřednictvím antigen prezentujících buněk (APC). Autoreaktivní T-lymfocyty po klonální expanzi migrují do ostrůvků, kde napadají beta buňky.

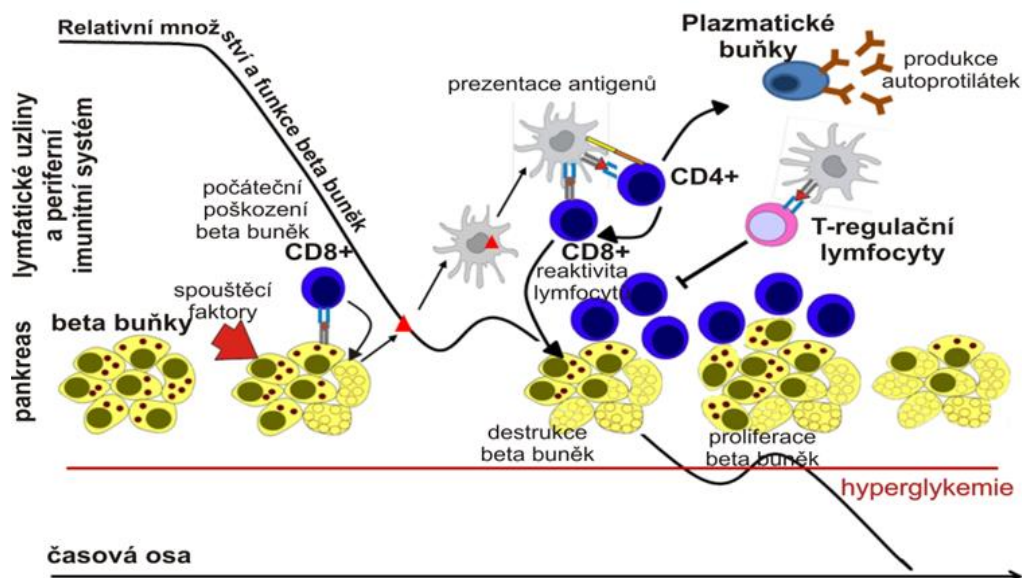
Poškození beta buněk vede k dalšímu uvolnění antigenů, které způsobuje tzv. epitope spreading (prezentaci nových autoantigenů v zánětlivě změněném imunitním systému vedoucí k nové aktivaci T-lymfocytů) (Bluestone J.A. et al., 2010).

Existuje několik možností, kterými může docházet ke smrti beta buněk vlivem působení T-lymfocytů. CD8⁺ T-lymfocyty mohou zabíjet beta buňky přes MHC (hlavní histokompatibilní komplex) I. třídy zprostředkovanou cytotoxicitu, dále oba typy buněk, CD4⁺ a CD8⁺ produkují cytokiny, jako je interferon γ (IFN γ), který aktivuje expresi receptoru buněčné smrti FAS a tvorbu chemokinů beta buňkami. Aktivace FAS prostřednictvím FAS ligand (FASL) exprimujících T-lymfocytů může zahájit apoptózu beta buněk. Produkce chemokinů beta buňkami vede k dalšímu přitahování mononukleárních buněk do ostrůvků se zesílením intenzity zánětu. Navíc IFN γ může aktivovat makrofágy a navodit zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů včetně interleukinu 1 β (IL-1 β) a tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α). Beta buňky exprimují velké množství receptoru pro IL-1 a zdají se být více citlivé k apoptóze navozené IL-1 β než ostatní endokrinní buňky (Lehuen A. et al., 2010).

Proti cytotoxickým T-lymfocytům působí regulační T-lymfocyty (Tregs), které mohou v časném stádiu destrukci beta buněk zastavit. Tregs jsou hlavním představitelem periferní tolerance k autoantigenům. Tregs jsou charakterizovány mimo jiné expresí transkripčního faktoru forkhead box P3 (FOXP3). Většina FOXP3⁺ buněk jsou CD4⁺ T-lymfocyty, které exprimují na svém povrchu molekulu CD25 (α řetězec receptoru pro interleukin 2), schopné tlumit aktivaci, proliferaci a efektorové funkce, jako je produkce cytokinů širokého spektra imunitních buněk, včetně CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů, přirozených zabíječů (Biton A. et al., 2006), B lymfocytů a APC (Sakaguchi S. et al., 2010). Jejich tlumící činnost vyžaduje preaktivaci prostřednictvím T-buněčného receptoru (TCR) a závisí na těsném kontaktu mezi odpovídající buňkou, Tregs a APC (Chentoufi A.A. et al., 2008). Důležitost Tregs podtrhuje

existence IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) syndromu, u kterého mutace ve FOXP3 vede ke vzniku autoimunitních endokrinopatií včetně DM1. Tregs inhibují diabetogenní T-lymfocyty a buňky přirozené imunity prostřednictvím interleukinu 10 (IL-10) a transformujícího růstového faktoru β (TGF β) (Lehuen A. et al., 2010).

Beta buňky v zánětlivém prostředí pouze nezanikají, ale mají i velkou snahu o regeneraci, jak bylo dokumentováno u NOD myši. U lidí jsou podobná pozorování jen obtížně proveditelná (van Belle T.L. et al., 2011) (Obr. 1).



Obr. 1: Iničiální fáze DM1 se odehrává v pankreatu, kde dendritické buňky zachycují a zpracovávají antigeny beta buněk. K poškození beta buněk může dojít přirozenou cestou nebo např. po virové infekci. V pankreatických lymfatických uzlinách pak dochází k prezentaci antigenu příslušným T-lymfocytům s následnou klonální expanzí. Dozrávají B-lymfocyty a vytvářejí se specifické protilátky. V tomto období nedochází jen k zániku, ale vznikají také nové beta buňky ve snaze udržet normoglykémii. Zánik beta buněk mohou zastavit Tregs, které tlumí diabetogenní T-lymfocyty prostřednictvím IL-10 a TGF β . V momentně, kdy se vymkne destrukce beta buněk kontrole a jejich množství klesne pod kritickou mez, dochází k manifestaci diabetu (Obrázek zhotovila K. Zacharovová dle publikace od van Belle et al, 2011, uveřejněn s jejím laskavým svolením.).

Experimentální a klinická data ukazují, že autoimunita může být tlumena až potlačena prostřednictvím imunitní intervence. Ta, pokud je zahájena včas, může alespoň zpomalit probíhající zánik beta buněk a zachovat zbytkovou sekreci inzulínu (Herold K.C. et al., 2005; Ludvigsson J. et al., 2008). K nastolení normoglykémie ale samotná imunointervence většinou nestačí. Jak prokázalo několik intervenčních studií na zvířecích modelech, je současně nutná stimulace proliferace anebo regenerace beta buněk (Ogawa N. et al., 2004; Shoda L.K. et al., 2005).

Imunointervence

Z hlediska potlačení autoimunity se nejvíce účinná jeví léčba specificky zaměřená proti T-lymfocytům. Schopnost ovlivnit průběh nově vzniklého diabetu 1. typu u myši i u lidí prokázalo podávání anti-thymocytárního globulinu (ATG) (Saudek F. et al., 2004; Simon G. et al., 2008), anti-lymfocytárního séra (Maki T. et al., 1992) či anti-CD3 protilátek (Chatenoud L. et al., 1997; Herold K.C. et al., 2005; Keymeulen B. et al., 2005). Terapie anti-lymfocytárními látkami prokázala možnost zpomalení ztráty beta buněk a zachování či zlepšení tvorby inzulínu. Odpověď na léčbu byla spojena se změnou poměru CD4+ a CD8+ buněk (Herold K.C. et al., 2002). Tato léčba také vede k výraznému zvětšení populace Tregs (CD4+CD25+FoxP3+ T-lymfocytů) (Feng X. et al., 2008). Obzvláště polyklonální anti-T-lymfocytární léčba se jevila slibná jak v experimentu (Simon G. et al., 2008), tak v klinickém projektu provedeném na našem pracovišti (Saudek F. et al., 2004). Pacientům s čerstvě diagnostikovanou cukrovkou 1. typu byl podáván polyklonální králičí ATG. Úvodní studie zahrnující 25 pacientů s DM1 sledovaných po dobu 2 let prokázala významné zachování tvorby C-peptidu a nižší nároky na exogenní inzulín v porovnání s kontrolní skupinou. Navíc byla zaznamenána trvalá změna v poměru CD4+/CD8+ T-lymfocytů v periferní krvi s možným imunoregulačním efektem. Dále byl zjištěn signifikantní nárůst populace Tregs až

9 měsíců po podání ATG (data nebyla publikována). Nicméně produkce dostatečně účinných a bezpečných látek je velmi složitá a přípravky určené pro lidské užití nejsou vhodné pro výzkum na zvířatech.

Alternativou specifických anti-T-lymfocytárních látek sloužících k potlačení autoimunity mohou být imunosupresivní léky s více komplexním mechanismem účinku. Jednou z těchto látek je gusperimus (deoxyspergualin) podávaný k potlačení autoimunitní reakce u autoimunitních chorob jako lupusová nefritida (Lorenz H.M. et al., 2011) nebo Wegenerova granulomatóza (Flossmann O., Jayne D.R., 2010). V experimentu gusperimus také zabránil nebo zmírnil rozvoj roztroušené sklerózy (Schorlemmer H.U., Seiler F.R., 1991), či revmatoidní artritidy (Takagishi K. et al., 1990). Ve studiích na zvířecím modelu diabetu gusperimus snižoval výskyt diabetu u NOD myší (Haberstroh J. et al., 1995; Nicoletti F. et al., 1993). Gusperimus v kombinaci s cyklosporinem A také dočasně zabránil vzniku autoimunitního diabetu u BB potkanů (Di Marco R. et al., 1996). Gusperimus *in vitro* snižuje tvorbu cytotoxických T-lymfocytů, expresi receptoru pro interleukin 2 na CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytech, oslabuje dozrávání B-lymfocytů a snižuje tvorbu cytokinů monocytů (Nadler S.G. et al., 1995). V *in vivo* modelu blokuje dozrávání dendritických buněk v lymfatických uzlinách (Thomas J.M. et al., 1999). Gusperimus je také schopen prodloužit přijetí allo či xeno štěpů, tlumit reakci štěpu proti hostiteli či autoimunitní choroby a tlumit tvorbu protilátek. Jeho podávání snižuje translokaci transkripčního faktoru nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) do jádra, který zde reguluje velké množství genů včetně genu pro IL-1 β , IL-6, TNF α , MHC I, MHC II a dalších (Diegel M.L. et al., 2002).

Regenerace beta buněk

Bylo prokázáno, že i po 50 letech trvání DM1 lze v lidském pankreatu detekovat alespoň nějaké beta buňky (Keenan H.A. et al., 2010). Z tohoto lze usuzovat, že je možná trvalá

obnova beta buněk i přes jejich neustálý zánik. Vhodnými a dostupnými prostředky ke zvýšení množství beta buněk se zdají být analoga glucagon-like peptide 1 (GLP-1) či inhibitory jeho degradace, které představují novou skupinu léků užívaných v léčbě diabetiků 2. typu. Inkretiny, mezi které patří kromě GLP-1 a glukózo-dependentního inzulinotropního peptidu (GIP) mnoho dalších látek, jsou produkovány buňkami trávicí trubice a po požití potravy jsou uvolňovány do krevního oběhu. Inkretinový efekt je zprostředkován zejména dvěma hlavními střevními hormony, GLP-1 a GIP. Oba hormony zvyšují sekreci inzulinu pankreatickými beta buňkami v závislosti na aktuální hodnotě krevního cukru. GLP-1 navíc snižuje sekreci glukagonu z alfa buněk, podporuje proliferaci beta buněk a snižuje jejich apoptózu. (Drucker D.J., 2003; Li Y. et al., 2003; Suen C.S., Burn P., 2012; Xu G. et al., 2006).

GLP-1 je po uvolnění do krevního oběhu proteolyticky degradován během několika minut prostřednictvím dipeptidyl peptidázy-IV (DPP-IV). Tomuto lze zabránit podáním inhibitorů DPP-IV (Pospisilik J.A. et al., 2003). Inkretinová terapie vykazuje také imunologické účinky. Ovlivnění proliferace lymfocytů a zachování periferních regulačních T-lymfocytů se zdá být zprostředkováno přes GLP-1 receptor nacházející se na T-lymfocytech (Hadjiyanni I. et al., 2008). Inhibitory DPP-IV mohou navozovat svůj imunomodulační efekt zablokováním DPP-IV (CD26) molekuly na povrchu T-lymfocytů. Exprese CD26 na T-lymfocytech je zvýšena po jejich stimulaci mitogeny, antigeny, anti-CD3 protilátkami či IL-2 (Biton A. et al., 2006). Tímto způsobem aktivované CD4+ T-lymfocyty vykazují zvýšené hodnoty CD26, jakmile vstoupí do nového dělicího cyklu (Salgado F.J. et al., 2012). Využití GLP-1 analog či inhibitorů jejich degradace se zdá být zajímavé také pro léčbu nově vzniklého diabetu 1. typu. Ačkoliv již bylo publikováno několik prací s pozitivním účinkem při podávání u diabetiků 1. typu (Ellis S.L. et al., 2011; Kielgast U. et al., 2011; Kutoh E., 2011), mechanismus tohoto

působení zůstává nejasný. Žádná z těchto studií se nezaměřila na metody odhalující možnou regeneraci beta buněk či zachycení změny v imunitním profilu pacientů.

Kombinovaná léčba

Důvodem neuspokojivých výsledků monoterapií v léčbě DM1 může být to, že žádný z léčebných postupů není dostatečně účinný k potlačení autoimunitního procesu a současně schopný navodit proliferaci beta buněk pankreatu. Kombinace vhodných látek by mohla vylepšit účinek jejich léčebného potenciálu. Poznatky z experimentálních pokusů, kde kombinovaná terapie často představuje základní léčbu, silně podporují tuto hypotézu. Experimentální studie na NOD myších kombinující podání agonisty GLP-1 (exenatid-4) společně s anti-lymfocytární léčbou (Ogawa N. et al., 2004; Sherry N.A. et al., 2007) nebo GLP-1 v kombinaci s gastrinem (Suarez-Pinzon W.L. et al., 2008) ukázaly lepší vliv na potlačení diabetu v porovnání s monoterapiemi.

Cíl práce včetně stanovení hypotéz

Vzhledem k povzbudivým výsledkům dosaženým v klinické studii provedené na našem pracovišti s podáváním ATG u pacientů s čerstvým záchytem diabetu a publikacím o možnosti regenerace a replikace beta buněk při podávání látek ze skupin inkretinů jsme se rozhodli zkombinovat postupy navozující útlum autoimunity a podporující obnovu pankreatických beta buněk. Účinnost kombinované terapie byla porovnána s účinky monoterapií.

Jako experimentální model diabetu mellitu 1. typu jsme vybrali obecně akceptovanou formu autoimunitního diabetu u NOD myši (Anderson M.S., Bluestone J.A., 2005; Driver J.P. et al., 2011). Myší model nám umožnil částečně odhalit mechanismy působení použitých látek. Na rozdíl od většiny ostatních studií, které zahajovaly intervenci ještě před manifestací diabetu, byla naše studie provedena na akutně diabetických myších. Podle našeho názoru tato varianta lépe odpovídá situaci, ve které se nacházejí pacienti s DM1 v době záhytu choroby, kdy je již většina beta buněk zničena či poškozena.

Cíl práce

Zjistit, zda zkombinováním látky s imunosupresivním účinkem (myší anti-thymocytární globulin (mATG), gusperimus), s látkou podporující obnovu pankreatických beta buněk (sitagliptin), dojde ke zvrácení či zpomalení průběhu diabetu. A jakým mechanismem dané látky působí.

Na základě našich dosavadních poznatků jsme stanovili 3 hypotézy:

Hypotéza č. 1

Podávání imunopresivních látek (mATG a gusperimus) povede k zastavení či ovlivnění autoimunitního procesu. Dojde k patrným změnám v imunitním systému s ochranou beta buněk pankreatu a případné remisi již rozvinutého diabetu.

Hypotéza č. 2

Podávání inhibitoru dipeptidyl peptidázy IV (sitagliptinu) povede k morfoložickým změnám endokrinního pankreatu s možnou regenerací či proliferací beta buněk. Zaznamenáme také změny v imunitním systému.

Hypotéza č. 3

Účinek kombinované léčby povede k lepším výsledkům než podávání vybraných látek samostatně. V případě úspěšného potlačení autoimunity imunopresivními látkami dojde vlivem podávání sitagliptinu k podpoře proliferace beta buněk s obnovením jejich masy.

Materiál a metody

Abychom objasnili působení jednotlivých látek a efekt jejich kombinace, uspořádali jsme celkem 5 pokusů, které jsme následně doplnili o porovnání výsledků zjištěných u diabetických zvířat s hodnotami stanovenými u nediabetických zvířat a zvířat, která dosáhla remise.

Maximální dobu sledování jsme stanovili na 28 dní. V rámci jedné skupiny byly diabetické myši dále rozděleny do čtyř podskupin s odlišnou dobou ukončení pokusu, a to v den 0, 7, 14 a 28. Zvířata byla do podskupin rozdělována podle předem stanoveného randomizačního klíče. V těchto časových úsecích jsme prováděli stanovení subpopulací T-lymfocytů průtokovou cytometrií, imunohistochemické vyšetření řezů pankreatem, stanovení koncentrací DPP-IV a TGF β z krve, profil genové exprese splenocytů a v den 24 byl proveden intraperitoneální glukózový toleranční test. Glykémie byly měřeny v průběhu celé doby pokusu 2x týdně.

Myši a měření glykémie

Všechny experimenty byly prováděny na myších samicích kmene NOD/ShiLtJ (H2^{g7}) dodávaných od Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). U těchto zvířat se vyvíjí autoimunitní diabetes v 90-100 % do věku 30 týdnů v závislosti na chovných podmínkách (údaj z katalogu dodavatele). Myši byly chovány ve speciálních ventilovaných chovných boxech vybavených filtrací vzduchu, dostávaly autoklávovanou vodu a autoklávované standardní peletové krmivo dle libosti. Hladiny krevního cukru byly měřeny z žíly na konci ocasu a byly sledovány 2x týdně po celou dobu pokusu za pomoci glukometru Accu-Check Performa Nano (Roche, Basel, Švýcarsko). Kritériem diagnózy diabetu a tedy

zařazení zvířete do experimentální nebo kontrolní skupiny byl opakovaný záchyt náhodné glykémie vyšší než 13 mmol/l ve dvou po sobě následujících měřeních.

Všechna zvířata byla pravidelně sledována z hlediska manifestace diabetu až do věku 30 týdnů. V momentě diagnózy diabetu byla zvířata rozdělena do jedné z pěti experimentálních skupin a v průběhu jednoho týdne od manifestace onemocnění byl zahájen pokus (den 0). Věk myši zařazených do studie se pohyboval mezi 12 - 30 týdny. V průběhu celé doby pokusu nebyl zvířatům podáván exogenní inzulín. Veškeré pokusy byly schváleny Etickou komisí IKEM a TN a také Komisí pro ochranu zvířat proti týrání. Zvířata byla usmrcena vykrcením v celkové anestezii prostřednictvím srdeční punkce.

Jednotlivé skupiny

1. Diabetická kontrolní skupina (n = 28): bez specifické léčby

2. Skupina léčená myším anti-thymocytárním globulinem (mATG) (n = 28): mATG bylo poskytnuto jako dar od společnosti Genzyme, (Framingham, MA, USA) a bylo podáno ve dvou dávkách intraperitoneálně v den 0 a 4 (1 mg celkem).

3. Skupina léčená sitagliptinem (n = 28): inhibitor DPP-IV (Januvia, MSD, Hoddson, GB). 100 mg sitagliptinu bylo rozpuštěno ve 200 ml pitné vody. Při denní spotřebě vody 4-10 ml na myš, dostávaly myši sitagliptin v dávce 2-5 mg denně. Myši byly chovány s volným přístupem k takto upravené pitné vodě.

4. Skupina léčená gusperimem (n = 28): gusperimus (deoxyspergualin, Nippon Kayaku Co. LTD, Japonsko) byl podáván v dávce 2,5 mg/kg intraperitoneálně, 5 dní v týdnu po celou dobu studie. Gusperimus byl zahrnut do našeho pokusu z důvodu neočekávaného ukončení výroby mATG.

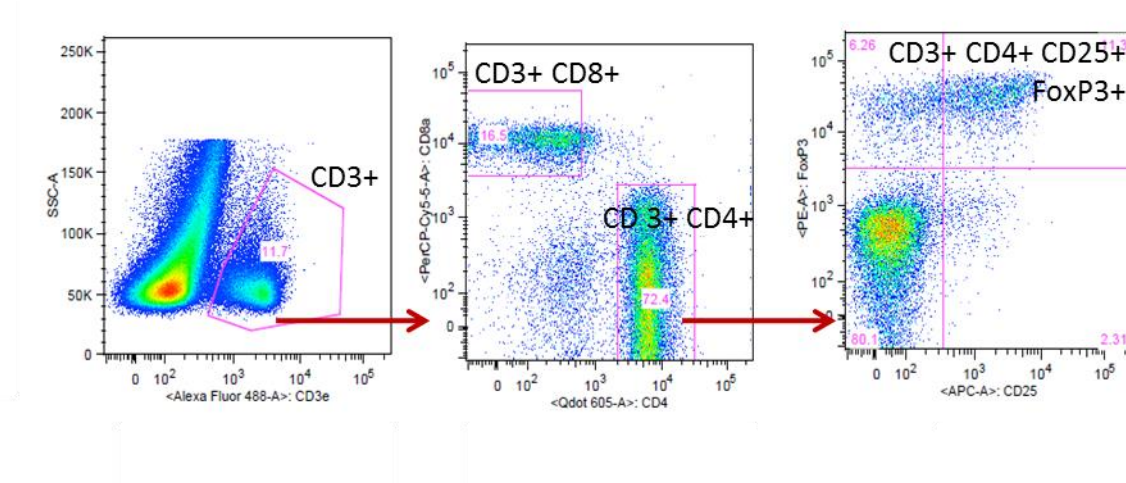
5. Skupina s kombinovanou léčbou (n = 28): myši dostávaly současně sitagliptin a gusperimus stejným způsobem jak uvedeno výše.

6. Nediabetická kontrolní skupina (n = 5): myši, u kterých nedošlo k rozvoji diabetu do 26. týdne věku, bez specifické terapie.

7. Skupina myši, které dosáhly remise (n = 5): myši, u nichž nelačné glykémie na konci pokusu byly nižší než 13 mmol/l.

Průtoková cytometrie

V den ukončení pokusu byly ze zvířat odebrány pankreatické lymfatické uzliny a slezina. Splenocyty získané jemným rozmělněním sleziny v Iscove's modified Dulbecco's mediu byly odděleny gradientovou centrifugací na Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko). Buňky pankreatických lymfatických uzlin byly získány propasírováním uzlin přes 60 µm sítko. Získané buňky byly označeny a vyšetřeny pomocí průtokové cytometrie. K obarvení buněk jsme použili fluorescenční protilátky proti povrchovým antigenům CD3, CD4, CD8, CD25 (A488 anti-CD3, eBioscience, San Diego, USA; Qdot605 anti-CD4, Invitrogen, Eugene, USA; PerCP-Cy5.5 anti-CD8, eBioscience; APC anti-CD25, vyrobena v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, Praha, Česká republika). Následně byly buňky nafixovány a permeabilizovány (FoxP3 Staining Buffer Set, eBioscience). Nitrobuněčný antigen FoxP3 byl detekován pomocí protilátky značené phycoerythrinem (eBioscience). U kontrolních vzorků byla použita odpovídající isotypová kontrola značená phycoerythrinem (eBioscience). Označené buňky byly vyhodnoceny pomocí průtokového cytometru LSR II FACSDiva softwarem (BD, San Jose, USA). Ve vzorcích byly stanoveny následující subpopulace T-lymfocytů: podíl CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocytů a populace CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulačních T-lymfocytů mezi CD4⁺ lymfocyty (Tregs) (Obr. 2).



Obr. 2: Ukázka tzv. gatování jednotlivých subpopulací stanovených průtokovou cytometrií.

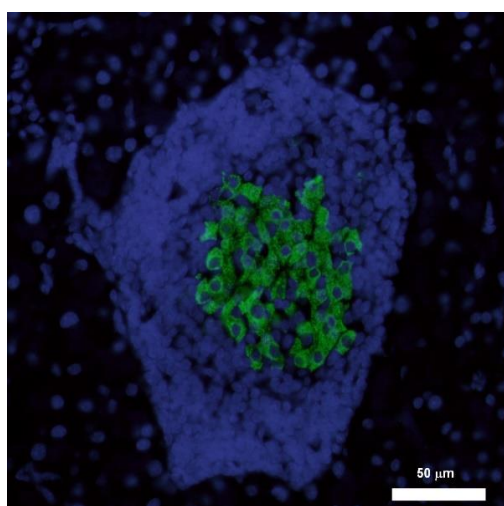
Imunofluorescenční barvení buněk ostrůvků

Přibližně polovina z každého pankreatu byla fixována ve 4 % formaldehydu a zalita do parafínu. Imunofluorescenční barvení bylo provedeno na 5 μm řezech. Před samotnou detekcí antigenu byla tkáň nejprve inkubována v Target Retrieval Solution, Citrate pH 6, (Dako, Glostrup, Dánsko) dle návodu výrobce, tj. tkáň umístěná v roztoku byla inkubována po dobu 30 min. ve vodní lázni s teplotou 97° C a posléze ponechána 15 min při pokojové teplotě. K blokování nespecifických vazebných míst bylo použito 5 % oslí sérum, které bylo aplikováno na řezy po dobu 30 min. při pokojové teplotě (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Specifické protilátky proti c-peptidu, glukagonu a Ki67 pak byly na řezech ponechány přes noc při 4° C (králičí protilátky proti c-peptidu a glukagonu; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, potkaní protilátka proti Ki67; Dako, Glostrup, Dánsko). Sekundární protilátka proti potkanímu IgG byla spojena s AlexaFluor 555 a protilátky proti králičím IgG byly spojeny s AlexaFluor 488 (oboje Invitrogene, OR, USA). Jádra byla nabarvena pomocí 4,6-diamino-2-fenylindolu (DAPI) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Řezy byly uchovány v roztoku 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu a polyvinyl alkoholu (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) v

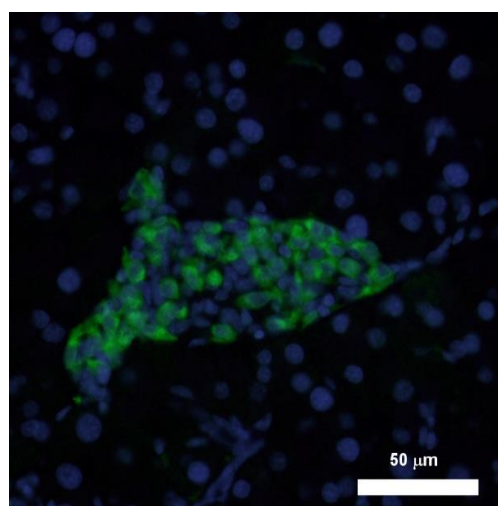
glycerolu. Následně byly vyhodnoceny na fluorescenčním mikroskopu značky Olympus BX41 vybaveném digitální kamerou Olympus DP71 (Olympus, Japonsko).

Morfologie ostrůvků

U každého zvířete byly vyšetřeny všechny ostrůvky na náhodně vybraném řezu pankreatem. Výskyt beta a alfa buněk byl hodnocen následovně: 0) žádná endokrinní buňka v místě původního ostrůvku, 1) jedna pozitivní buňka až pozitivita v 10 % plochy původního ostrůvku, 2) pozitivita v 10-50 % plochy ostrůvku, 3) pozitivita v 50-100% plochy ostrůvku. Míra infiltrace imunitními buňkami uvnitř a vně ostrůvku byla hodnocena dle Zhanga (Zhang J. et al., 2007) na řezech obarvených DAPI: 0) žádná patrná imunitní buňka, 1) infiltrováno 1-10% plochy, 2) 10-25% plochy, 3) 25-50% plochy a 4) více než 50% plochy původního ostrůvku infiltrováno imunitními buňkami (Obr. 3). Procenta byla stanovena odhadem zkušeného biologa, který hodnotil zaslepené histologické vzorky. Následně bylo stanoveno skóre jako součet bodů všech ostrůvků na řezu, dle výše uvedených škál, vydělený jejich počtem.



(A)



(B)

Obr. 3: Imunofluorescenční barvení ostrůvků s ukázkou infiltrace ostrůvků imunitními buňkami. A) 4. stupeň infiltrace ostrůvku s nálezem imunitních buněk okolo ostrůvku i mezi beta buňkami u nediabetické myši (zeleně barvení na C-peptid, modře zbarvena jádra pomocí DAPI). B) Ostrůvek s přítomnou expanzí alfa buněk a velmi nízkou infiltrací imunitními buňkami – stupeň č. 1 u diabetické myši (zeleně barvení na glukagon, modře zbarvena jádra pomocí DAPI).

Stanovení koncentrace DPP-IV v plazmě

Krevní vzorky byly získány punkcí srdce v den ukončení pokusu. 50 μ l krve bylo smícháno s citrátem sodným (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a zcentrifugováno za účelem získání plazmy. K měření koncentrace DPP-IV ve vzorku krevní plazmy byla použita proteázová esej DPP-IV-Glo™ (Madison, WI, USA). Koncentrace byla odvozena z kalibrační křivky aktivity rekombinantního proteinu DPP-IV (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Stanovení koncentrace TGF β v séru

Krevní vzorky byly získány punkcí srdce v den ukončení pokusu. Po vysrážení krve ponechané alespoň 30 min. při pokojové teplotě bylo centrifugací odděleno sérum. Ve 30 μ l séra byl TGF β stanoven metodou ELISA (BioVendor, Brno, Česká republika) dle pokynů výrobce.

Profil genové exprese ve splenocytech

Splenocyty získané jemným rozmělněním sleziny v Iscove's modified Dulbecco's mediu byly odděleny gradientovou centrifugací na Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko). Veškerá RNA byla extrahována za pomoci RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. K izolaci byl použit přístroj QIAcube (Qiagen, Hilden, Německo). RNA byla vyluhována do 14 μ l čisté vody a čistota a koncentrace RNA

byla stanovena pomocí ultrafialového-viditelného spektrofotometru (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RNA o celkovém množství 2-4 µg byla užita k syntéze cDNA za pomoci SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Profil genové exprese 11 zvolených genů (Bax, Bcl2, Fasl, Il1b, Il6, Il10, Ifng, Tnf, Nfkb1, Nfkb2, Ikbkb) byl stanoven pomocí kvantitativní real-time RT-PCR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) za použití ribozomální RNA (18S rRNA) jako vnitřní kontroly, která byla vybrána ze 4 testovaných provozních (housekeeping) genů (Actb, Hprt, Gapdh, 18S) užitím NormFinder softwaru. Ke kalibraci pro relativní kvantifikaci byla použita cDNA kontrolního vzorku. Kvantifikace mRNA byla provedena v triplicátech prostřednictvím na zakázku vyrobené TaqMan® Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems) a rychlého protokolu (TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems). Amplifikace RT-qPCR byla provedena na přístroji ABI Prism® 7900 H.T. Sequence Detection system (Applied Biosystems). Data byla vyhodnocena jako relativní množství (RQ) za použití RQ manager 1.2. software pro automatickou analýzu dat (Applied Biosystems).

Tato sada genů byla vybrána pro jejich zapojení v procesech ovlivňujících aktivaci, funkci a zánik T-lymfocytů.

Popis funkce vybraných genů dle National Center for Biotechnology Information.

V závorce je uvedený úplný název dle HUGO Gene Nomenclature Committee.

Bax (BCL2-associated X protein) Bílkovina kódovaná tímto genem spadá do skupiny BCL2 bílkovin. Členové skupiny BCL2 tvoří hetero- či homodimery sloužící jako regulátory apoptózy, které působí v širokém rozsahu buněčných aktivit. Tato bílkovina vytváří spolu s BCL2 heterodimer a působí jako aktivátor apoptózy. Uvádí se, že působí na mitochondriální napěťově závislý aniontový kanál (VDAC) a zvyšuje míru jeho otevření, což vede ke ztrátě v membránovém potenciálu a uvolnění cytochromu c. Exprese tohoto

genu je regulována nádorovým supresorem p53 a bylo prokázáno, že se podílí na apoptóze zprostředkované p53. U tohoto genu je publikováno více variant alternativního sestřihu transkriptů, které kódují různé izoformy. [provided by RefSeq, Jul 2008] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/581>

Bcl2 (B-cell CLL/lymphoma 2) Tento gen kóduje integrální protein zevní mitochondriální membrány, který zabraňuje u některých buněk, jako jsou lymfocyty, smrti apoptózou. Konstitutivní exprese BCL2, jako je tomu v případě translokace BCL2 do lokusu těžkého imunoglobulinového řetězce, je dle předpokladů příčinou folikulárního lymfomu. Dvě varianty transkriptů, vytvořené alternativním sestřihem, se liší v jejich C-terminálních koncích. [provided by RefSeq, Jul 2008] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596>

Fasl (Fas ligand) Protein kódovaný tímto genem je ligandem pro FAS. Oba jsou to transmembránové proteiny. Interakce FAS s tímto ligandem je rozhodující pro spouštění apoptózy některých typů buněk jako jsou lymfocyty. Závady v tomto genu mohou být v souvislosti s některými případy systémového lupus erythematoses (SLE). [provided by RefSeq, Jul 2008] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/356>

Il1b (interleukin 1, beta) Protein kódovaný tímto genem je členem skupiny cytokinů interleukinu 1. Tento cytokin je produkován aktivovanými makrofágy jako preprotein, který je proteolyticky zpracován na aktivní formu pomocí kaspázy 1 (CASP1/ICE). Tento cytokin je důležitým mediátorem zánětlivé odpovědi a je zapojen do různých buněčných aktivit, včetně buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy. Indukce cyklooxygenázy-2 (PTGS2/COX2) tímto cytokinem v centrálním nervovém systému (CNS) přispívá dle zjištění k přecitlivělosti na bolest při zánětu. Tento gen a osm dalších genů ze skupiny interleukinu 1 tvoří shluk cytokinových genů na chromozómu 2. [provided by RefSeq, Jul 2008] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553>

Il6 (interleukin 6) Tento gen kóduje cytokin, který působí při zánětu a zrání B-buněk. Kromě toho bylo u kódované bílkoviny prokázáno, že je endogenním pyrogenem schopným vyvolat horečku u lidí s autoimunitním onemocněním nebo infekcí. Bílkovina se vyrábí především v místech akutního a chronického zánětu, kde je vylučována do séra a indukuje transkripční zánětlivou reakci prostřednictvím receptoru pro interleukin 6 alfa. Fungování tohoto genu se podílí na široké škále se zánětem spojených chorobných stavů, včetně predispozice k vzniku a rozvoji DM1 a systémové juvenilní revmatoidní artritidy. [provided by RefSeq, Jun 2011] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>

Il10 (interleukin 10) Protein kódovaný tímto genem je cytokin produkovaný hlavně monocyty a v menší míře lymfocyty. Tento cytokin má pleiotropní účinky v imunoregulaci a zánětu. Snižuje expresi cytokinů Th1, antigenů II. třídy MHC a kostimulačních molekul na makrofázích. Zlepšuje také přežívání B lymfocytů, proliferaci a produkci protilátek. Tento cytokin může blokovat aktivitu NF-kappa B a je zapojen do regulace JAK-STAT signální dráhy. Knockoutové studie u myši naznačují funkci tohoto cytokinu jakožto základního imunoregulátoru ve střevním traktu. Mutace v tomto genu jsou spojeny se zvýšenou citlivostí na HIV-1 infekci a revmatoidní artritidu. [provided by RefSeq, May 2011] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586>

Ifng (interferon, gamma) Tento gen kóduje člena typu II interferonové skupiny. Kódovaným proteinem je rozpustný cytokin s antivirovými, imunoregulačními a protinádorovými vlastnostmi a je to mohutný aktivátor makrofágů. Mutace v tomto genu jsou spojeny s aplastickou anémií. [provided by RefSeq, Nov 2009] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3458>

Tnf (tumor necrosis factor) Tento gen kóduje multifunkční prozánětlivý cytokin, který patří do velké skupiny nádor nekrotizujícího faktoru (TNF). Tento cytokin je vylučován

převážně makrofágy. Může se vázat a tudíž působit prostřednictvím svých receptorů TNFRSF1A/TNFR1 a TNFRSF1B/TNFBFR. Tento cytokin je zapojen do regulace širokého spektra biologických procesů, včetně buněčné proliferace, diferenciaci, apoptózy, metabolismu lipidů a koagulace. Tento cytokin je zapojen do řady onemocnění, včetně autoimunitních onemocnění, rezistence na inzulín a rakoviny. Knockoutové studie na myších také navrhly neuroprotektivní funkci tohoto cytokinu. [provided by RefSeq, Jul 2008] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>

Nfkb1 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1) Tento gen kóduje 105 kDa protein, který může podstoupit kotranslační zpracování 26S proteazomem s vytvořením 50 kD proteinu. 105 kD protein je transkripční inhibitor specifický pro Rel protein a 50 kD protein je podjednotka vázající DNA proteinového komplexu NF-kappa-B (NFkB). NFkB je regulátor transkripce, který je aktivován různými intra-a extracelulárními podněty, jako jsou cytokiny, volné kyslíkové radikály, ultrafialové záření a bakteriální nebo virové produkty. Aktivovaný NFkB se přemísťuje do jádra a stimuluje expresi genů podílejících se na široké škále biologických funkcí. Nevhodná aktivace NFkB je spojována s řadou zánětlivých onemocnění, zatímco trvalá inhibice NFkB vede k nepatřičnému imunitnímu vývoji imunitních buněk nebo k opožděnému buněčnému růstu. Dvě transkripční varianty kódující odlišné izoformy byly nalezeny pro tento gen. [provided by RefSeq, Sep 2009] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4790>

Nfkb2 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)) Tento gen kóduje podjednotku komplexu transkripčního faktoru nukleárního faktoru-kappa-B (NFkB). NFkB komplex je exprimován v mnoha typech buněk a funguje jako centrální aktivátor genů podílejících se na zánětu a imunitních funkcích. Protein kódovaný tímto genem může fungovat jako transkripční aktivátor nebo represor v závislosti na jeho dimerizačním partnerovi. Protein o celkové délce p100 je kotranslačně zpracováván na p52

aktivní formu. U lymfomů z B buněk byly pozorovány chromozomální přestavby a translokace tohoto lokusu, z nichž některé mohou vést ke vzniku fúzních proteinů. K dispozici je pseudogen k tomuto genu na chromozomu 18. Alternativní sestřih vede k několika transkripčním variantám. [provided by RefSeq, Dec 2013]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4791>

Ikkkb (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta) Protein kódovaný tímto genem fosforyluje inhibitor v inhibitor/NF-kappa-B komplexu, což způsobuje uvolnění inhibitoru a aktivaci NF-kappa-B. Kódovaný protein sám o sobě se nachází v komplexu proteinů. Několik transkripčních variant, některé protein kódující a jiné ne, byly nalezeny pro tento gen. [provided by RefSeq, Sep 2011]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3551>

Popis dle NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

Intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT)

Byl naplánován na 24. den pokusu. Po nočním lačnění byla formou intraperitoneální injekce zvířeti podána glukóza (1 mg/g tělesné hmotnosti) ve formě 10 % roztoku. Hodnoty glykémii byly zjišťovány v 0., 10., 20., 30., 40., 50. a 60. min testu z žíly na konci ocasu pomocí glukometru Accu-Check Performa Nano (Roche, Basel, Švýcarsko). Z těchto hodnot byl pak vypočítán koeficient asimilace glukózy dle vzorce $x = (\ln^{C1} - \ln^{C2}) / (t^1 - t^2)$. C – glykémie, t – čas.

Statistické vyhodnocení

Výsledky jsou uvedeny jako medián (min – max). Ke statistickému vyhodnocení jsme využili počítačový software GraphPad Prism 6 po předchozí konzultaci s nezávislým

statistikem. Neparametrické testy, jako je Kruskal-Wallisův test, Mann-Whitney test nebo Studentův t-test, byly použity ke stanovení rozdílu mezi skupinami. Chí kvadrát test byl použit ke zjištění rozdílů ve stupních infiltrace. Hodnoty $P < 0,05$ jsme považovali za statisticky významné.

Experiment 1

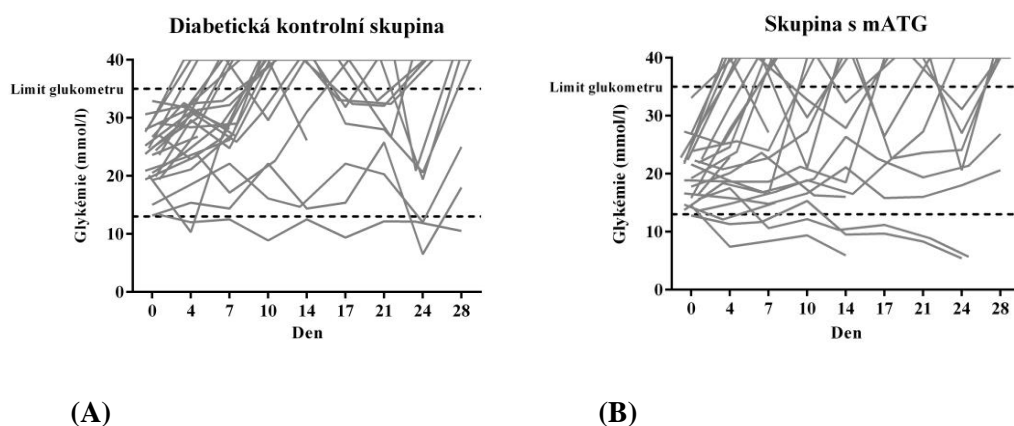
Úvod a metody

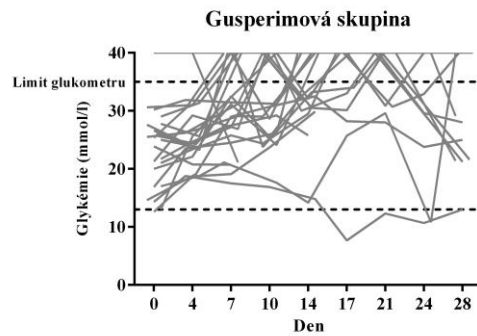
K ověření hypotézy číslo 1 (Podávání imunosupresivních látek (mATG a gusperimus) povede k zastavení či ovlivnění autoimunitního procesu. Dojde k patrným změnám v imunitním systému s ochranou beta buněk pankreatu a případné remisi již rozvinutého diabetu.) jsme sledovali glykémie, populace lymfocytů stanovené průtokovou cytometrií z pankreatických lymfatických uzlin a sleziny, provedli imunohistochemické vyšetření řezů pankreatem, stanovili koncentraci TGF β v séru a provedli IPGTT u zvířat, kterým bylo podáváno mATG či gusperimus, a porovnali je s diabetickou kontrolní skupinou.

Výsledky

Hodnoty glykemií a výskyt remise diabetu

U skupiny zvířat léčené mATG bylo dosaženo remise (hodnota krevního cukru v den ukončení pokusu nižší než 13 mmol/l) u 3 zvířat z 28. V gusperimové skupině a v diabetické kontrolní skupině se remise vyskytla po jednom případě z 28. Nejnižší hodnoty glykemií v průběhu pokusu s nadějí na rozvoj remise jsme naměřili u myší, jejichž glykémie v den zahájení pokusu nepřesáhly 16 mmol/l (Obr. 4).



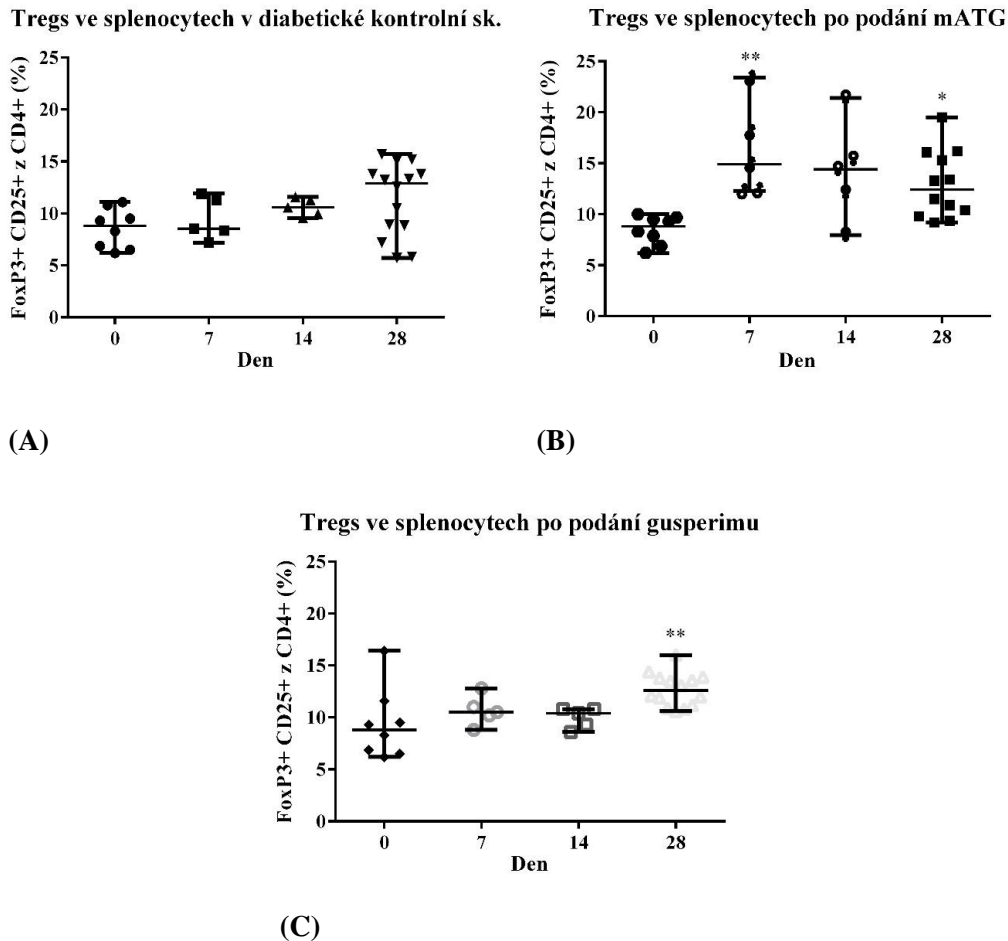


(C)

Obr. 4: Hodnoty glykemií zaznamenané v průběhu pokusu u jednotlivých myší. Spodní přerušovaná linie označuje hodnotu stanovenou pro zařazení myší do pokusu a současně hodnotu vymezující výskyt remise. Horní přerušovaná linie označuje hodnoty vyšší než je detekční limit glukometru. V diabetické kontrolní skupině (A) a skupině léčené gusperimem (C) se remise vyskytla v jednom případě. Ve skupině léčené mATG (B) ve třech případech.

Populace regulačních T-lymfocytů

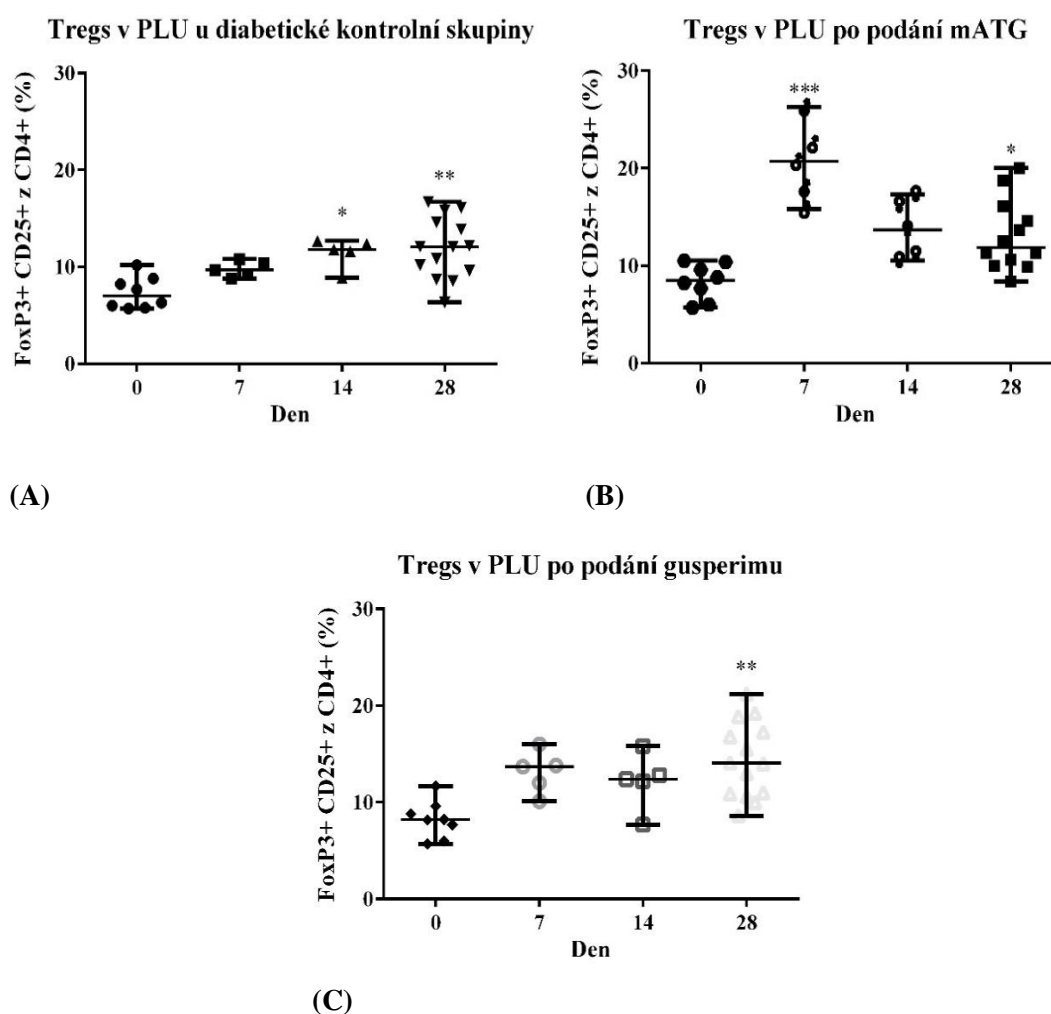
Po podání mATG se ve splenocytech zvýšil podíl Tregs na celkovém množství CD4+ T-lymfocytů z 8,8 (6,2 – 10) % v den 0 na 14,9 (12,3 – 23,4) % v den 7; $P < 0,01$. Tento nárůst zaznamenaný 7. den pokusu byl signifikantní také v porovnání s diabetickou kontrolní skupinou, kdy populace Tregs v této skupině činila 8,5 (7,2 - 11,9) %; $P < 0,01$. I přes to, že po skončení podávání mATG populace Tregs pozvolna klesala, byla tato populace nadále zvýšená i v den ukončení pokusu 12,4 (9,2 – 19,5) %; $P < 0,05$, nicméně již bez rozdílu oproti diabetické kontrolní skupině. Ve skupině léčené gusperimem vzrostla populace Tregs z 8,8 (6,2 – 16,4) % v den 0 na 12,6 (10,6 – 16,0) % v den 28; $P < 0,01$. V diabetické kontrolní skupině také došlo k nárůstu Tregs v průběhu pokusu, ale tento vzestup nebyl statisticky významný (Obr. 5).



Obr. 5: Hodnoty populace Tregs ve splenocytech u diabetické kontrolní skupiny (A) se i přes mírný nárůst na konci pokusu nijak statisticky nelišily. Po podání mATG (B) došlo k výraznému nárůstu populace Tregs z 8,8 (6,2 – 10) % v den 0 na 14,9 (12,3 – 23,4) % v den 7; $P < 0,01$. V den 28 činila populace Tregs 12,4 (9,2 – 19,5) % a byla stále signifikantně vyšší oproti vstupním hodnotám; $P < 0,05$. Ve skupině léčené gusperimem (C) došlo k nárůstu populace Tregs z 8,8 (6,2 – 16,4) % v den 0 na 12,6 (10,6 – 16,0) % v den 28; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

V buňkách pankreatických lymfatických uzlin byl opět zaznamenán výrazný vzestup populace Tregs 7. den po podání mATG, z 8,5 (5,7 – 10,5) % v den 0 na 20,7 (15,8 – 26,3) %; $P < 0,001$, následovaný poklesem. Stejně jako ve splenocytech si i v lymfatických uzlinách udržela populace Tregs vyšší hodnoty do konce pokusu v porovnání se dnem 0, kdy na konci pokusu činila populace Tregs 11,9 (8,4 – 20,0) %; $P < 0,05$. Vzhledem k vzestupu populace Tregs i u diabetické kontrolní skupiny byl statisticky významný rozdíl

mezi těmito dvěma skupinami pouze v den 7 (9,7 (8,8 – 10,8) % v diabetické kontrolní skupině, 20,7 (15,8 – 26,3) % ve skupině léčené mATG; $P < 0,01$). Počet Tregs v pankreatických lymfatických uzlinách dosáhl u diabetické kontrolní skupiny na konci pokusu hodnoty 12,1 (6,3 – 16,7) % oproti 7,0 (5,7 – 10,2) % v den 0; $P < 0,01$. K obdobnému vzestupu došlo také ve skupině léčené gusperimem z 8,2 (5,7 – 11,7) % v den 0 na 14,1 (8,6 – 21,2) % v den 28; $P < 0,01$ (Obr. 6). V den ukončení pokusu nebyl v populaci Tregs patrný rozdíl mezi skupinami.

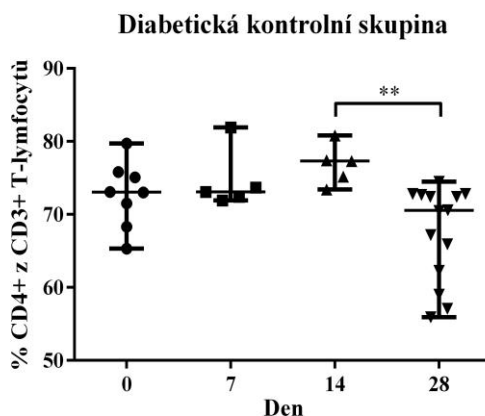


Obr. 6: Populace Tregs v PLU stoupla v diabetické kontrolní skupině (A) ze 7,0 (5,7 – 10,2) % v den 0 na 11,8 (8,9 - 12,7) % v den 14; $P < 0,05$ a na 12,1 (6,3 - 16,7) % v den 28; $P < 0,01$. Po podání mATG (B) došlo k výraznému nárůstu populace Tregs z 8,5 (5,7 – 10,5) % v den 0 na 20,7 (15,8 – 26,3) % v den 7; $P < 0,001$. V den ukončení pokusu pak činila populace Tregs 11,9 (8,4 – 20,0) %; $P < 0,05$. U skupiny léčené gusperimem (C) došlo také k nárůstu Tregs z 8,2 (5,7 – 11,7)

% v den 0 na 14,1 (8,6 – 21,2) % v den 28; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, **
*znázorňují $P < 0,001$.

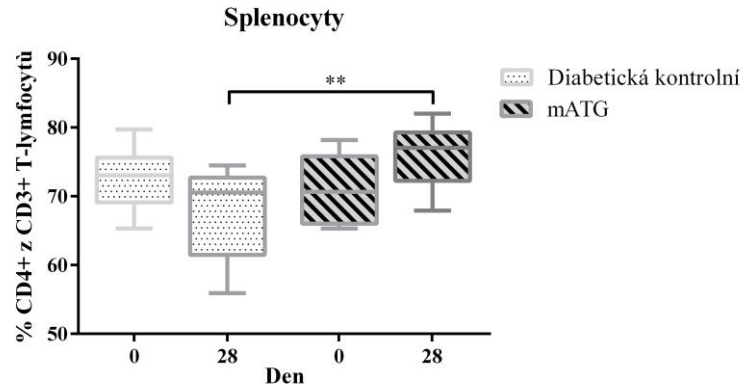
Populace CD4+ T-lymfocytů

Ve splenocytech jsme zaznamenali na konci pokusu změnu v populaci CD4+ T-lymfocytů diabetické kontrolní skupině oproti dnu 14, kdy v závěru pokusu došlo k poklesu na hodnotu 70,5 (55,9 – 74,5) % po jejím předchozím nárůstu 77,3 (73,4 – 80,8) %; $P < 0,01$. Na počátku pokusu činila populace CD4+ T-lymfocytů v diabetické kontrolní skupině 73,1 (65,3 79,7) % (Obr. 7).



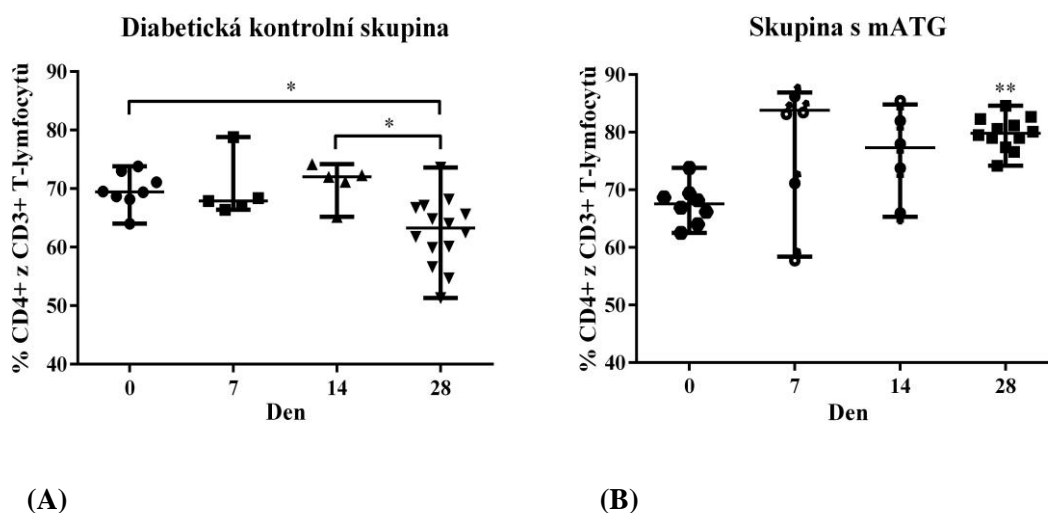
Obr. 7: Podíl CD4+ T-lymfocytů ve splenocytech u diabetické kontrolní skupiny klesl na konci pokusu na 70,5 (55,9 – 74,5) % a tím se lišil od hodnoty zjištěné 14. den, kdy tento podíl činil 77,3 (73,4 – 80,8) %; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

V den ukončení pokusu se pak lišila diabetická kontrolní skupina od skupiny léčené mATG, neboť v diabetické kontrolní skupině došlo k poklesu na 70,5 (55,9 – 74,5) %, zatímco ve skupině léčené mATG došlo k nárůstu CD4+ T-lymfocytů na 77,1 (67,9 – 82) %; $P < 0,01$ (Obr. 8).



Obr. 8: Podíl CD4+ T-lymfocytů ve splenocytech činil na konci pokusu v diabetické kontrolní skupině 70,5 (55,9 – 74,5) % a tím se lišil od skupiny léčené mATG, ve které došlo k nárůstu jejich počtu na 77,1 (67,9 – 82) %; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňuje $P < 0,01$, ***znázorňuje $P < 0,001$.

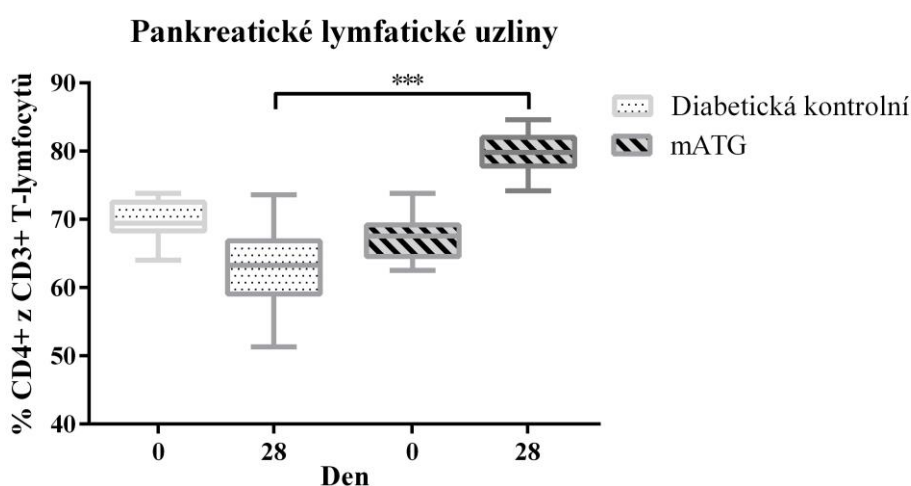
V pankreatických lymfatických uzlinách došlo opět v diabetické kontrolní skupině k poklesu podílu CD4+ T-lymfocytů z původní hodnoty 69,4 (64,0 - 73,8) % na 63,3 (51,3 - 73,6) % v den ukončení pokusu; $P < 0,05$. A také vůči dnu 14, kdy byl zaznamenán obdobný nárůst jako ve splenocytech následovaný jejich poklesem. Ve skupině léčené mATG naopak došlo od začátku do konce pokusu k nárůstu podílu CD4+ T-lymfocytů z 67,6 (62,5 - 73,8) % na 79,8 (74,2 - 84,6) %; $P < 0,01$ (Obr. 9).



Obr. 9: Podíl CD4+ T-lymfocytů se v PLU u diabetické kontrolní skupiny (A) snížil na konci pokusu na hodnotu 63,3 (51,3 - 73,6) % a tím se lišil od vstupní hodnoty, která činila 69,4 (64,0 - 73,8) %; $P < 0,05$ a od hodnoty zaznamenané v den 14, kdy činila 72,0 (65,2 - 74,2) %; $P < 0,05$.

Ve skupině léčené mATG (B) došlo po zahájení léčby k nárůstu podílu CD4+ T-lymfocytů z počáteční hodnoty 67,6 (62,5 - 73,8) % na 79,8 (74,2 - 84,6) % v den ukončení experimentu; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

V den ukončení pokusu se pak tyto dvě skupiny významně lišily. Zatímco v diabetické kontrolní skupině došlo k poklesu podílu CD4+ T-lymfocytů v PLU, ve skupině léčené mATG došlo naopak k výraznému nárůstu (Obr. 10).



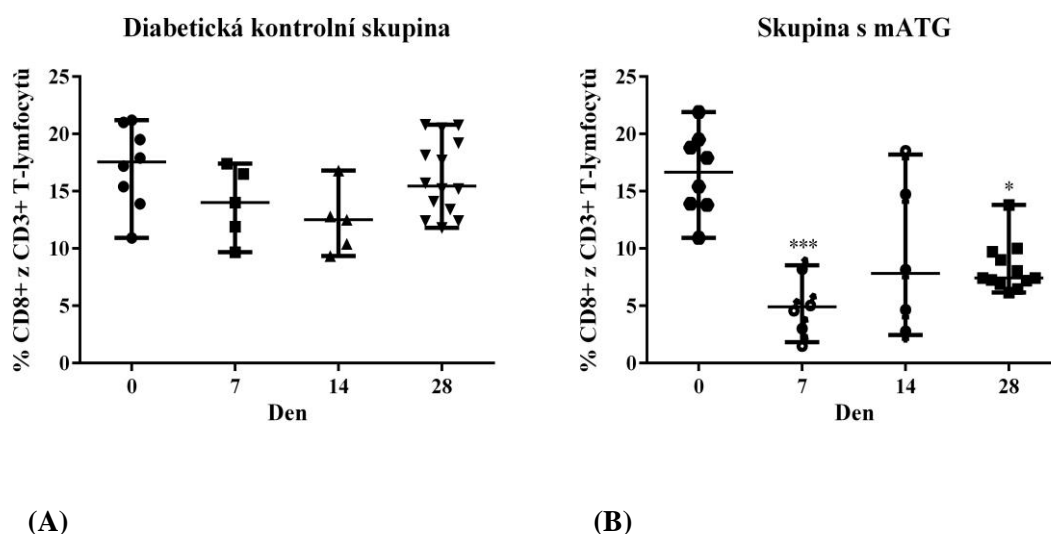
Obr. 10: Při porovnání podílu CD4+ T-lymfocytů v PLU byl na konci pokusu výrazný rozdíl mezi diabetickou kontrolní skupinou, ve které došlo k poklesu na hodnotu 63,3 (51,3 - 73,6) %, a skupinou léčenou mATG, kde došlo naopak k nárůstu na hodnotu 79,8 (74,2 - 84,6) %; $P < 0,001$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Ve skupině léčené gusperimem nedošlo k žádným významným změnám v populaci CD4+ T-lymfocytů ani v rámci skupiny, ani při porovnání s diabetickou kontrolní skupinou.

Populace CD8+ T-lymfocytů

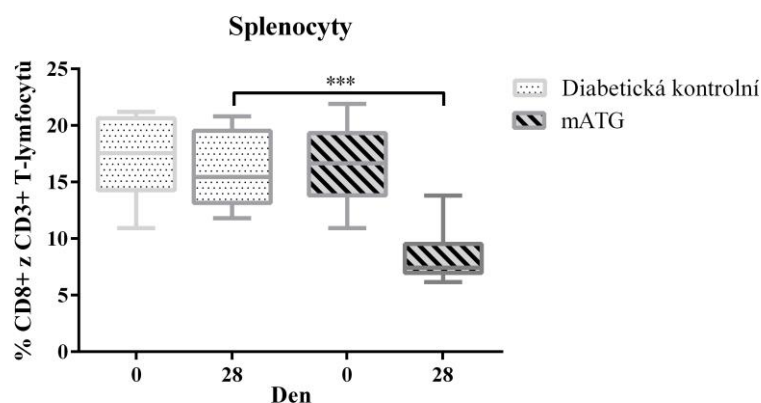
Ve splenocytech došlo po podání mATG k výraznému poklesu CD8+ T-lymfocytů z původních 16,7 (10,9 - 21,9) % na 4,9 (1,8 - 8,5) % v den 7; $P < 0,001$ a pokles přetrvával i v den ukončení pokusu, kdy populace cytotoxických lymfocytů činila 7,4 (6,2 - 13,8) %; P

< 0,05. V diabetické kontrolní skupině k významným změnám v populaci CD8+ T-lymfocytů nedošlo (Obr. 11).



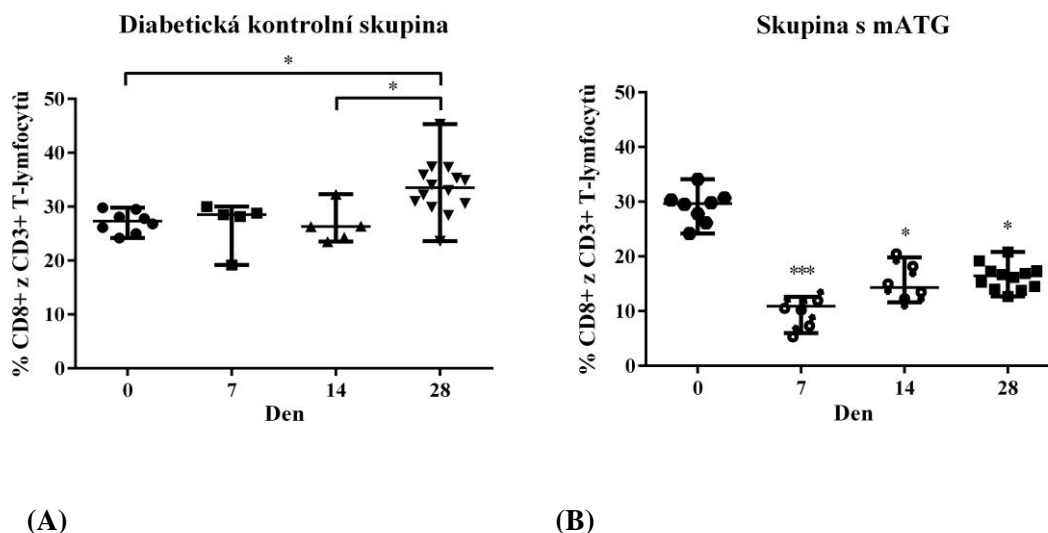
Obr. 11: Podíl CD8+ T-lymfocytů ve splenocytech se v diabetické kontrolní skupině (A) v průběhu pokusu výrazněji neměnil. Ve skupině léčené mATG (B) došlo po jeho podání k výraznému poklesu v jejich podílu z původní hodnoty 16,7 (10,9 - 21,9) % na 4,9 (1,8 - 8,5) % v den 7; $P < 0,001$. Tento pokles přetrvával až do konce experimentu, kdy podíl CD8+ T-lymfocytů činil 7,4 (6,2 - 13,8) %; $P < 0,05$ *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$. (B)

Sedmý den pokusu se pak skupina léčená mATG významně lišila od diabetické kontrolní skupiny (4,9 (1,8 - 8,5) % vs 14,0 (9,7 - 17,4) %; $P < 0,01$). V den ukončení pokusu byl pak tento rozdíl ještě výraznější (7,4 (6,2 - 13,8) % vs 15,5 (11,8 - 20,8) %; $P < 0,001$ (Obr. 12).



Obr. 12: Podíl CD8+ T-lymfocytů ve splenocytech po podání mATG výrazně poklesl. Na konci pokusu jejich hodnota činila 7,4 (6,2 - 13,8) %, čímž se výrazně odlišovala od hodnoty v diabetické kontrolní skupině, která činila 15,5 (11,8 - 20,8) %; $P < 0,001$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

V pankreatických lymfatických uzlinách byly změny ještě patrnější. V diabetické kontrolní skupině došlo k nárůstu cytotoxických T-lymfocytů na konci pokusu na 33,5 (23,6 - 45,3) % z původních 27,3 (24,2 - 29,8) %; $P < 0,05$. Tento nárůst byl signifikantní i oproti 14. dni, kdy hodnota cytotoxických T-lymfocytů činila 26,3 (23,5 - 32,3) %; $P < 0,05$. Ve skupině léčené mATG naopak došlo k razantnímu poklesu cytotoxických T-lymfocytů z původních 29,7 (24,2 - 34,1) % na 10,9 (6,0 - 12,6) %; $P < 0,001$ sedmý den pokusu a i přes mírný nárůst byl tento pokles stále signifikantní i čtrnáctý den, kdy jejich hodnota činila 14,3 (11,6 - 19,8) %; $P < 0,05$ a 28. den, kdy jejich hodnota činila 16,5 (12,7 - 20,8) %; $P < 0,05$ (Obr. 13). Vzájemně se tyto dvě skupiny lišily v průběhu celé doby pokusu, sedmý den činilo $P < 0,01$, čtrnáctý den $< 0,01$ a na konci pokusu $< 0,001$.



Obr. 13: Podíl CD8+ T-lymfocytů v PLU se v diabetické kontrolní skupině (A) na konci pokusu zvýšil na hodnotu 33,5 (23,6 - 45,3) % z hodnoty 27,3 (24,2 - 29,8) % v den 0; $P < 0,05$ a 26,3 (23,5 - 32,3) % v den 14; $P < 0,05$. Po podání mATG (B) došlo k výraznému poklesu CD8+ T-lymfocytů z původní hodnoty 29,7 (24,2 - 34,1) % na hodnotu 10,9 (6,0 - 12,6) % v den 7; $P <$

0,001, 14,3 (11,6 - 19,8) % v den 14; $P < 0,05$ a 16,5 (12,7 - 20,8) % v den ukončení experimentu; $P < 0,05$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Ve skupině léčené guserimem nedošlo k žádným významným změnám v populaci CD8+ T-lymfocytů ani v rámci skupiny, ani při porovnání s diabetickou kontrolní skupinou.

Morfologie ostrůvků

Skóre beta buněk

V době manifestace diabetu byla již většina beta buněk zničena. V průběhu celé doby pokusu zůstalo množství beta buněk na velmi nízké až téměř nulové hodnotě. Jedinou výjimku představovala skupina léčená mATG, kde množství beta buněk v průběhu času lehce vzrostlo a na konci pokusu dosáhlo hodnoty lehce převyšující ostatní diabetické skupiny, i když nesignifikantně (0,05 ve skupině s mATG vs. 0,00 v ostatních diabetických skupinách; bez signifikance).

Skóre alfa buněk

Množství alfa buněk nevykazovalo výrazné změny při vzájemném porovnání sledovaných skupin.

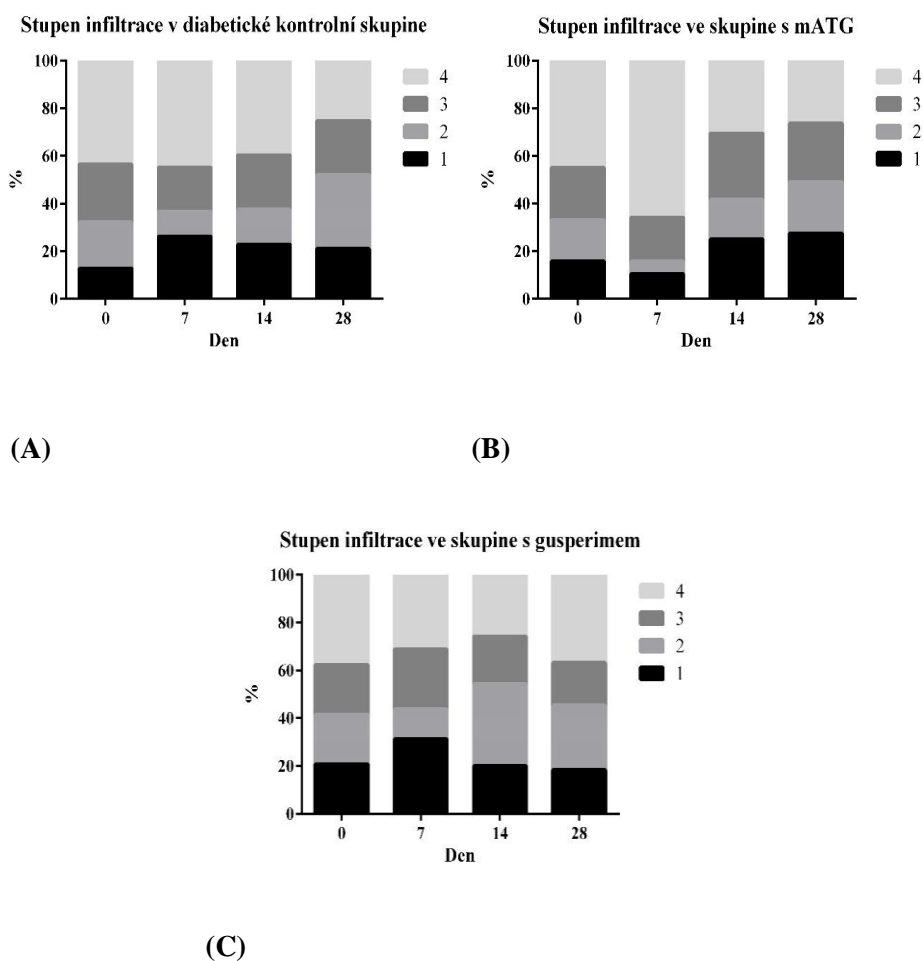
Infiltrace ostrůvků imunitními buňkami

Skóre infiltrace

Skóre infiltrace imunitními buňkami se v jednotlivých skupinách ani mezi skupinami navzájem významně nelišilo.

Stupeň infiltrace

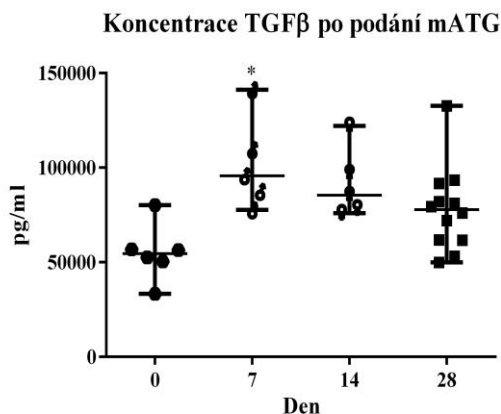
Při posouzení stupňů infiltrace došlo v průběhu pokusu ke změnám v diabetické kontrolní skupině; $P < 0,05$ a ve skupině léčené mATG; $P < 0,01$. Vzájemně se však tyto dvě skupiny nelišily. V obou skupinách došlo na konci pokusu k posunu do nižších stupňů infiltrace ostrůvků oproti vstupním hodnotám. Ve skupině léčené mATG navíc došlo 7. den pokusu k zesílení infiltrace ostrůvků s nejčtenějším zastoupením v nejtěžším 4. stupni infiltrace. Ve skupině léčené guserimem k žádným významným změnám nedošlo (Obr. 14).



Obr. 14: Stupně infiltrace Langerhansových ostrůvků imunitními buňkami. Jednotlivé sloupce představují procentuální zastoupení v jednotlivých stupních infiltrace. Stupeň 1 představuje nejmírnější, stupeň 4 nejtěžší formu infiltrace ostrůvků (viz metody). V diabetické kontrolní skupině (A) a ve skupině léčené mATG (B) došlo k posunu na konci pokusu do nižších stupňů infiltrace. Ve skupině léčené guserimem (C) nedošlo k žádným významným změnám.

Koncentrace TGFβ v séru

Ve skupině léčené mATG došlo 7. den po jeho podání k signifikantnímu vzestupu koncentrace TGF β v séru na hodnotu 95711,6 (77748,9 – 141247,6) pg/ml z původních 54526,8 (33252,4 – 80150,4) pg/ml; $P < 0,05$. Zvýšená hodnota TGF β přetrvávala i v den ukončení pokusu (Obr. 15). V diabetické kontrolní skupině ani ve skupině léčené gusperimem k žádným změnám v hodnotách TGF β nedošlo.



Obr. 15: Koncentrace TGF β v séru stoupla po podání mATG na 95711,6 (77748,9 – 141247,6) pg/ml z původních 54526,8 (33252,4 – 80150,4) pg/ml; $P < 0,05$. * znázorňuje $P < 0,05$, * * znázorňují $P < 0,01$, * * * znázorňují $P < 0,001$.

IPGTT

Ve všech vyšetřených skupinách byly hodnoty IPGTT mimo normální rozmezí bez signifikantního rozdílu mezi skupinami. Ve skupině s mATG byl koeficient asimilace glukózy 0,0067 (0,0000 - 0,0511) mmol/l/min, v diabetické kontrolní skupině 0,0076 (0,0000 - 0,0261) mmol/l/min a v gusperimové skupině činil 0,0054 (0,0000 - 0,0336) mmol/l/min).

Experiment 2

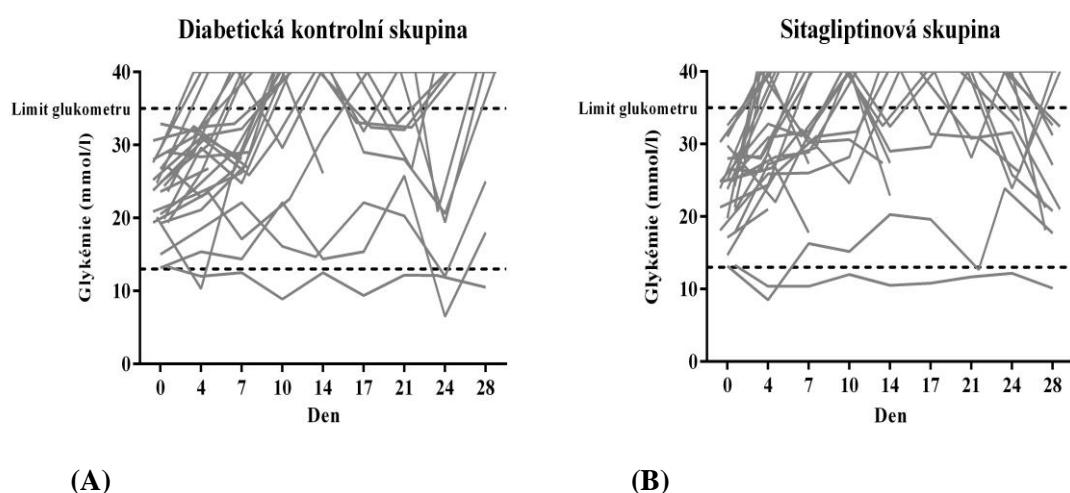
Úvod a metody

K ověření hypotézy číslo 2 (Podávání inhibitoru dipeptidyl peptidázy IV (sitagliptinu) povede k morfologickým změnám endokrinního pankreatu s možnou regenerací či proliferací beta buněk. Zaznamenáme také změny v imunitním systému.) jsme sledovali glykémie, populace lymfocytů stanovené průtokovou cytometrií z pankreatických lymfatických uzlin a sleziny, provedli imunohistochemické vyšetření řezů pankreatem, stanovili koncentrace TGF β , DPP-IV v krvi a provedli IPGTT u zvířat, kterým byl podáván sitagliptin, a porovnali výsledky s diabetickou kontrolní skupinou.

Výsledky

Hodnoty glykemií a výskyt remise diabetu

Ve skupině léčené sitagliptinem došlo k jedinému výskytu remise diabetu stejně jako v diabetické kontrolní skupině (Obr. 16).



Obr. 16: Hodnoty glykemií zaznamenané v průběhu pokusu u jednotlivých myší. Spodní přerušovaná linie označuje hodnotu stanovenou pro zařazení myší do pokusu a současně hodnotu vymezující výskyt remise. Horní přerušovaná linie označuje hodnoty vyšší než je detekční limit

glukometru. V diabetické kontrolní skupině (A) se remise vyskytla v jednom případě, stejně tak ve skupině myši léčených sitagliptinem (B)

Populace regulačních T-lymfocytů

Ve skupině léčené sitagliptinem ani v diabetické kontrolní skupině jsme nezaznamenali žádné statisticky významné změny v populacích Tregs ze splenocytů v průběhu celé doby pokusu.

V pankreatických lymfatických uzlinách došlo v obou skupinách k nárůstu v populaci Tregs bez rozdílu mezi skupinami. V sitagliptinem léčené skupině došlo sedmý den pokusu k mírnému poklesu Tregs, po kterém následoval vzestup srovnatelný s diabetickou kontrolní skupinou.

Populace CD4+ T-lymfocytů

V populaci CD4+ T-lymfocytů nedošlo po podání sitagliptinu ve splenocytech ani v pankreatických lymfatických uzlinách k žádným změnám. Žádný rozdíl jsme nepozorovali ani při porovnání s diabetickou kontrolní skupinou.

Populace CD8+ T-lymfocytů

Ani v populaci CD8+ T-lymfocytů nedošlo po podání sitagliptinu k žádným změnám. Žádný rozdíl jsme taktéž nepozorovali ani při porovnání s diabetickou kontrolní skupinou.

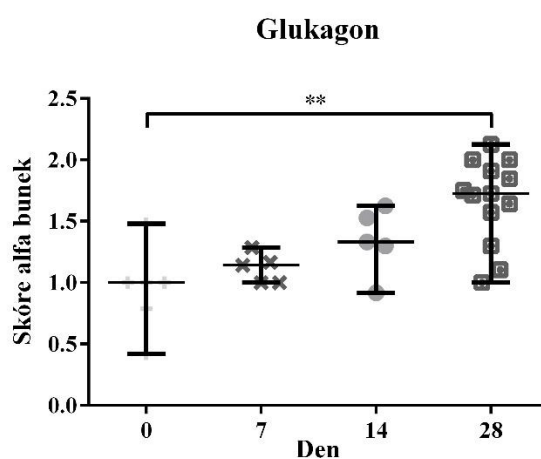
Morfologie ostrůvků

Skóre beta buněk

Množství beta buněk se v sitagliptinem léčené skupině v průběhu pokusu nezměnilo. Žádný rozdíl jsme nezaznamenali ani při porovnání s diabetickou kontrolní skupinou.

Skóre alfa buněk

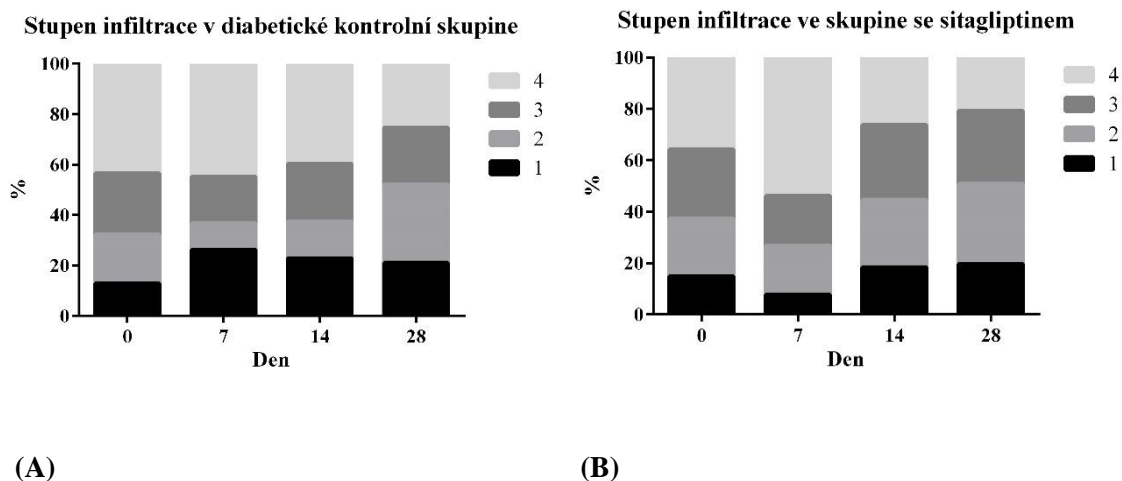
V sitagliptinem léčené skupině jsme na konci pokusu zaznamenali nárůst v množství alfa buněk z původní hodnoty skóre 1,00 (0,42 - 1,48) na 1,73 (1,00 - 2,13); $P < 0,01$ (Obr. 17). Nicméně i přes tento nárůst se skupina léčená sitagliptinem na konci pokusu nelišila ve skóre alfa buněk od diabetické kontrolní skupiny.



Obr. 17: Při imunohistochemickém barvení řezů pankreatu na glukagon jsme v sitagliptinem léčené skupině zaznamenali v ostrůvcích nárůst množství alfa buněk z původní hodnoty skóre 1,00 (0,42 - 1,48) na 1,73 (1,00 - 2,13); $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Infiltrace ostrůvků imunitními buňkami

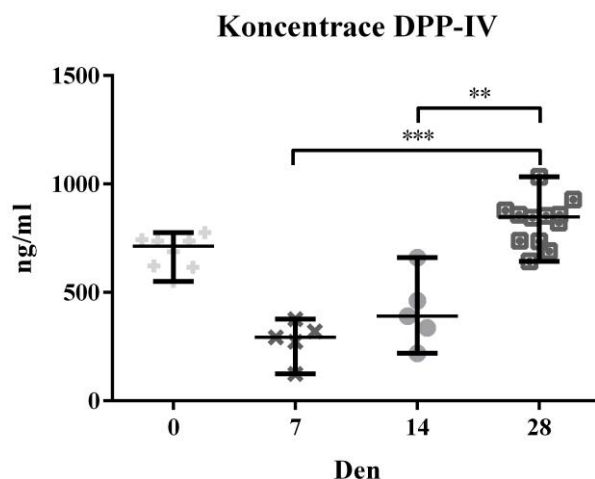
Skóre infiltrace ani stupeň infiltrace se v sitagliptinem léčené skupině nelišil od diabetické kontrolní skupiny. Nicméně v sitagliptinem léčené skupině je patrný 7. den pokusu posun infiltrace do vyšších stupňů, který následně mizí (Obr. 18).



Obr. 18: Stupně infiltrace Langerhansových ostrůvků imunitními buňkami. Jednotlivé sloupce představují procentuální zastoupení v jednotlivých stupních infiltrace. Stupeň 1 představuje nejmírnější, stupeň 4 nejtěžší stupeň infiltrace ostrůvků (viz metody). Sitagliptinem léčená skupina (B) se od diabetické kontrolní skupiny (A) v průběhu pokusu významně nelišila.

Koncentrace DPP-IV v plazmě

Ve skupině léčené sitagliptinem byl předpokládaný pokles v hodnotě DPP-IV zaznamenán pouze sedmý den, z původní hodnoty 712,9 (550,0 – 775,2) ng/ml v den 0 klesla koncentrace 7. den na 292,9 (124,5 – 376,8) ng/ml; bez signifikance. Tento pokles ale nebyl trvalý a od 14. dne koncentrace DPP-IV stoupala. V dalším průběhu hodnota DPP-IV dokonce stoupla na hodnoty vyšší než úvodní i přes trvalé podávání sitagliptinu na hodnotu 848,7 (642,6 – 1033,6) ng/ml. Čímž došlo k signifikantnímu nárůstu oproti dnům 7, kdy hodnota DPP-IV činila 292,9 (124,5 – 376,8) ng/ml; $P < 0,001$, a 14, kdy byla hodnota 390,4 (219,6 – 660,9) ng/ml; $P < 0,01$) (Obr. 19).

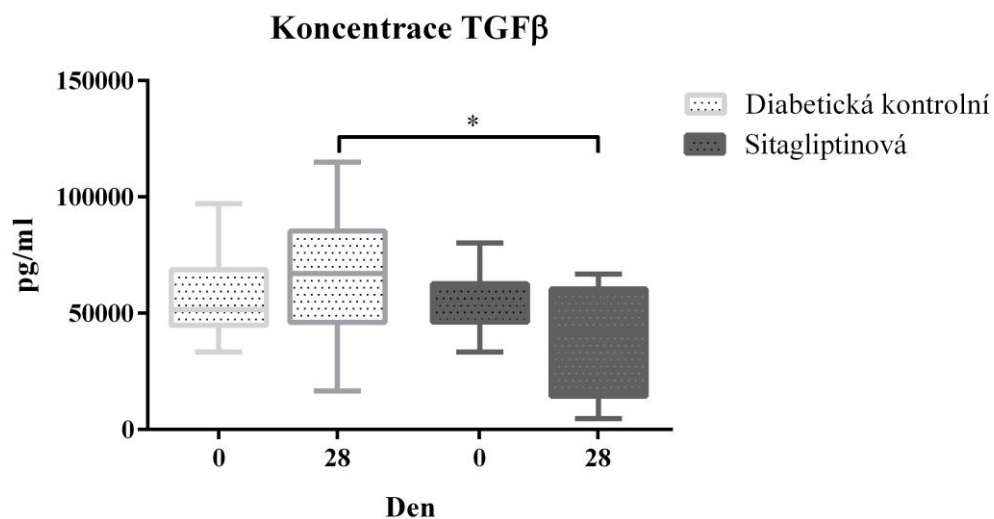


Obr. 19: Koncentrace DPP-IV v sitagliptinem léčené skupině klesla 7. den pokusu na hodnotu 292,9 (124,5 – 376,8) ng/ml. Dále pak její hodnota stoupla na hodnotu 390,4 (219,6 – 660,9) ng/ml v den 14 a 848,7 (642,6 – 1033,6) ng/ml v den 28. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Mírný nárůst koncentrace DPP-IV v průběhu pokusu byl zaznamenán také v diabetické kontrolní skupině (z 619,1 (230,5 – 775,2) ng/ml v den 0 na 851,1 (289,2 – 1623,0) ng/ml v den 28; bez signifikance). Oproti sitagliptinem léčené skupině se diabetická kontrolní skupina lišila jen sedmý den pokusu (292,9 (124,5 – 376,8) ng/ml vs 506,1 (456,2 - 659,0) ng/ml; $P < 0,01$). Po dvou týdnech již nebyl patrný rozdíl mezi sitagliptinem léčenou a diabetickou kontrolní skupinou (390,4 (219,6 - 660,9) ng/ml vs. 610 (221,0 - 925,2) ng/ml; bez signifikance).

Koncentrace TGF β v séru

Podávání sitagliptinu vedlo ke snížení sérové koncentrace TGF β na 41223,9 (4627,5 - 66779,9) pg/ml. U diabetické kontrolní skupiny jsme naopak zaznamenali mírný nárůst na hodnotu 67050,3 (16617,1 - 114930,6) pg/ml. Díky těmto změnám se pak tyto dvě skupiny na konci pokusu v hodnotách TGF β vzájemně lišily (Obr. 20).



Obr. 20: Koncentrace TGF β v séru u diabetické kontrolní skupiny na konci pokusu mírně stoupla na 67050,3 (16617,1 - 114930,6) pg/ml, zatímco v sitagliptinem léčené skupině naopak klesla na 41223,9 (4627,5 - 66779,9) pg/ml, čímž se tyto dvě skupiny vzájemně lišily; $P < 0,05$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

IPGTT

V koeficientu asimilace glukózy nebyl rozdíl mezi sitagliptinem léčenou a diabetickou kontrolní skupinou.

Experiment 3

Úvod a metody

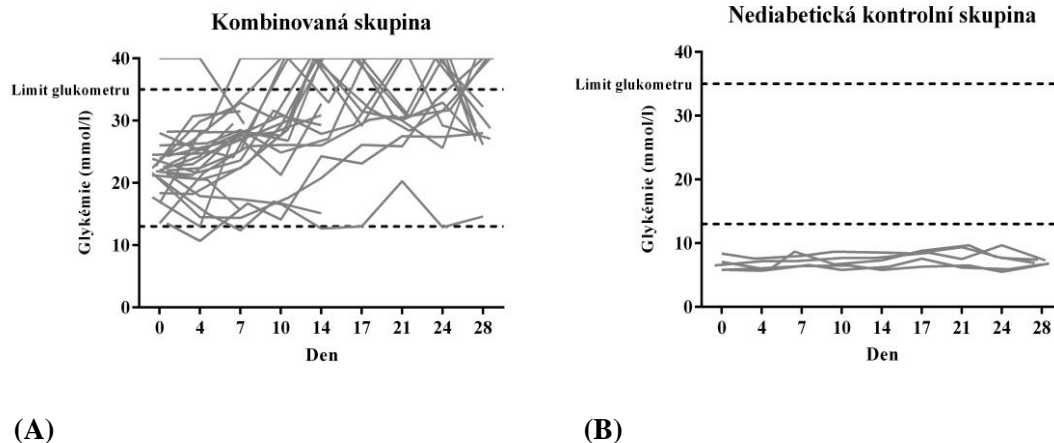
K ověření hypotézy č. 3 (Účinek kombinované léčby povede k lepším výsledkům než podávání vybraných látek samostatně. V případě úspěšného potlačení autoimunity imunosupresivními látkami dojde vlivem podávání sitagliptinu k podpoře proliferace beta buněk s obnovením jejich masy.) jsme opět sledovali změny v populacích imunokompetentních buněk, morfologii pankreatu a změny v koncentracích TGF β , DPP-IV a provedli IPGTT. Navíc jsme tato sledování doplnili o vyhodnocení změn v profilu genové exprese splenocytů.

Vzhledem k ne příliš povzbudivým výsledkům s podáváním gusperimu a sitagliptinu v předchozích dvou experimentech jsme náš experiment rozšířili o skupinu nediabetických myší. A zaměřili se na zjištění rozdílů mezi diabetickými a nediabetickými zvířaty a jakým způsobem ovlivňují tyto parametry podávané látky.

Výsledky

Hodnoty glykemií a výskyt remise diabetu

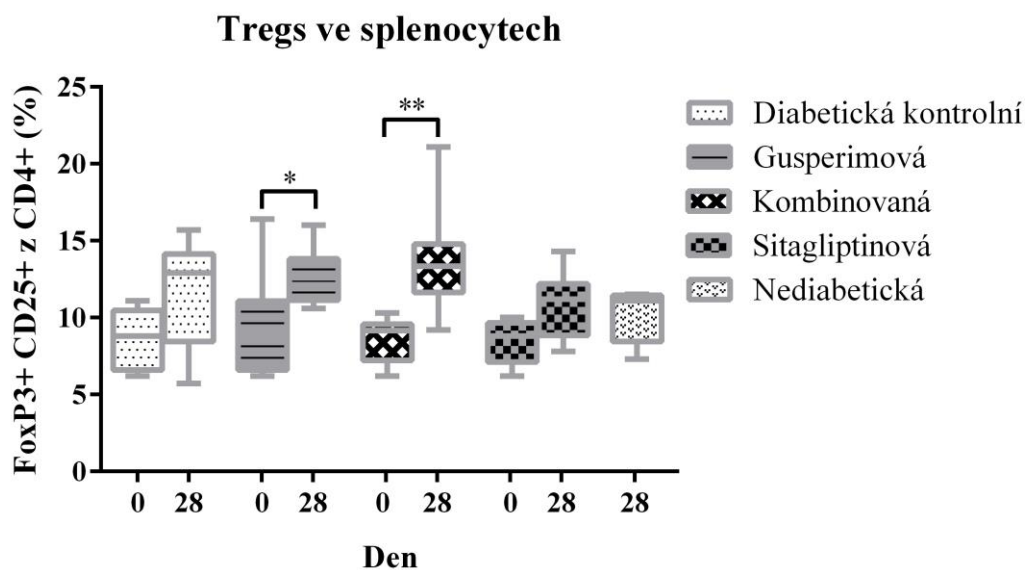
Ve skupině s kombinovanou léčbou nebylo dosaženo remise u žádného z pokusných zvířat. Ve skupině léčené sitagliptinem nebo gusperimem samotným došlo k jednomu výskytu remise diabetu stejně jako v diabetické kontrolní skupině. U nediabetické kontrolní skupiny nepřesáhly glykémie odebírané u zvířat, která nebyla lačná, hodnotu 10 mmol/l (Obr. 21).



Obr. 21: Hodnoty glykémii zaznamenané v průběhu pokusu u jednotlivých myší. Spodní přerušovaná linie označuje hodnotu stanovenou pro zařazení myší do pokusu a současně hodnotu vymezující výskyt remise. Horní přerušovaná linie označuje hodnoty vyšší než je detekční limit glukometru. Ve skupině zvířat s kombinovanou léčbou jsme nezaznamenali žádný výskyt remise (A), u nediabetické kontrolní skupiny (B) nepřesáhly nelačné glykémie hodnotu 10 mmol/l.

Populace regulačních T-lymfocytů

Ve všech diabetických skupinách jsme pozorovali ve splenocytech nárůst regulačních T-lymfocytů v průběhu pokusu. Na konci pokusu byly populace Tregs u diabetických zvířat lehce vyšší oproti nediabetické kontrolní skupině. Nejvyšší nárůst Tregs jsme zaznamenali ve skupině léčené gusperimem a ve skupině s kombinovanou léčbou. Ve skupině léčené gusperimem vzrostla populace z 8,8 (6,2 - 16,4) % v den 0 na 12,6 (10,6 - 16,0) % v den 28; $P < 0,05$, ve skupině s kombinovanou léčbou stoupla populace z 9,2 (6,2 - 10,3) % v den 0 na 13,2 (11,6 - 15,7) % v den 14; $P < 0,05$ a na 13,5 (9,2 - 21,1) % v den 28; $P < 0,01$. Ve skupině léčené sitagliptinem samotným ani v diabetické kontrolní skupině jsme nezaznamenali žádné statisticky významné změny v populacích Tregs ze splenocytů v průběhu celé doby pokusu (Obr. 22).

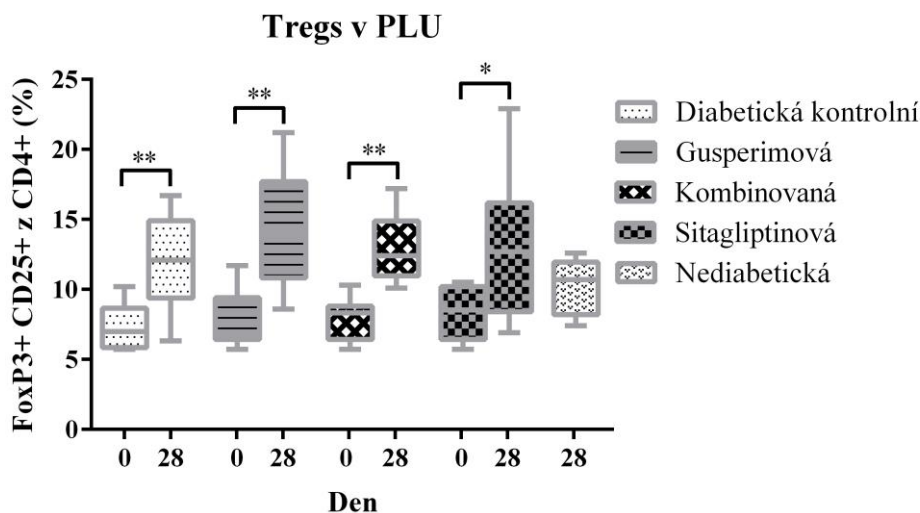


Obr. 22: Ve slezině stoupla populace Tregs ve skupině léčené gusperimem z 8,8 (6,2 - 16,4) % v den 0 na 12,6 (10,6 – 16,0) % v den 28; $P < 0,05$ a ve skupině s kombinovanou léčbou z 9,2 (6,2 – 10,3) % v den 0 na 13,5 (9,2 – 21,1) % v den 28; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

V pankreatických lymfatických uzlinách došlo v diabetických skupinách k ještě výraznějšímu nárůstu v populaci regulačních T-lymfocytů, než jak tomu bylo ve splenocytech a kromě skupiny léčené sitagliptinem byl tento nárůst v průběhu studie plynulý. V sitagliptinem léčené skupině došlo v jako jediné naopak sedmý den k poklesu Tregs na 6,9 (5,1 – 12,8) %, po kterém následoval vzestup srovnatelný s ostatními skupinami. Sedmý den pokusu se proto sitagliptinová skupina lišila od skupiny léčené gusperimem, kde hodnota populace Tregs vzrostla již na 13,7 (10,1 - 16,0) %; $P < 0,05$.

V den ukončení pokusu se jednotlivé diabetické skupiny mezi sebou nelišily, ale významně se lišily v porovnání s hodnotami na počátku pokusu. V diabetické kontrolní skupině došlo k nárůstu ze 7,0 (5,7 – 10,2) % v den 0 na 12,1 (6,3 – 16,7) % v den 28; $P < 0,01$. V gusperimové z 8,2 (5,7 – 11,7) % na 14,1 (8,6 – 21,2) %; $P < 0,01$. Ve skupině s kombinovanou léčbou z 8,3 (5,7 – 10,3) % na 12,4 (10,1 – 17,2) %; $P < 0,01$. A

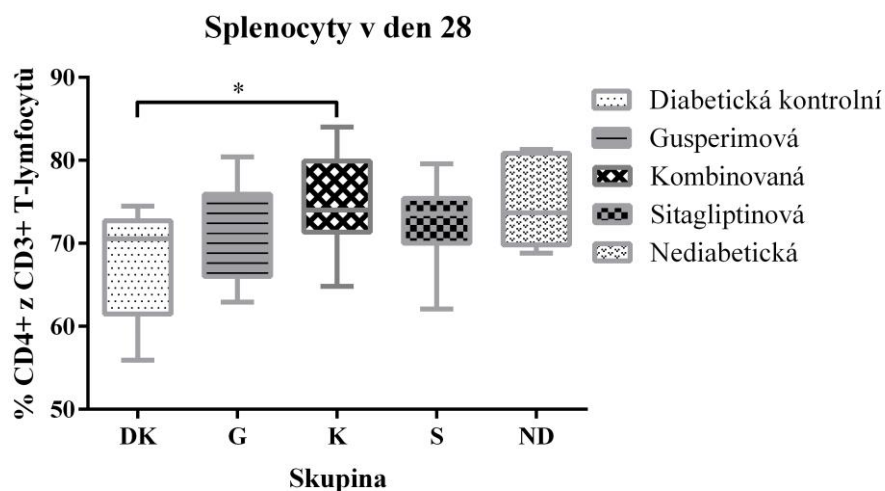
v sitagliptinové z 8,5 (5,7 - 10,5) % na 12,7 (6,9 - 22,9) %; $P < 0,05$. V den ukončení pokusu byla populace Tregs ve všech diabetických skupinách mírně vyšší v porovnání s nediabetickou kontrolní skupinou; bez signifikance (Obr. 23).



Obr. 23: V pankreatických lymfatických uzlinách došlo k nárůstu Tregs ve všech diabetických skupinách. V diabetické kontrolní skupině ze 7,0 (5,7 - 10,2) % v den 0 na 12,1 (6,3 - 16,7) % v den 28; $P < 0,01$. V gusperimové z 8,2 (5,7 - 11,7) % na 14,1 (8,6 - 21,2) %; $P < 0,01$. Ve skupině s kombinovanou léčbou z 8,3 (5,7 - 10,3) % na 12,4 (10,1 - 17,2) %; $P < 0,01$. A v sitagliptinové z 8,5 (5,7 - 10,5) % na 12,7 (6,9 - 22,9) %; $P < 0,05$. * znázorňuje $P < 0,05$, ** znázorňují $P < 0,01$, *** znázorňují $P < 0,001$.

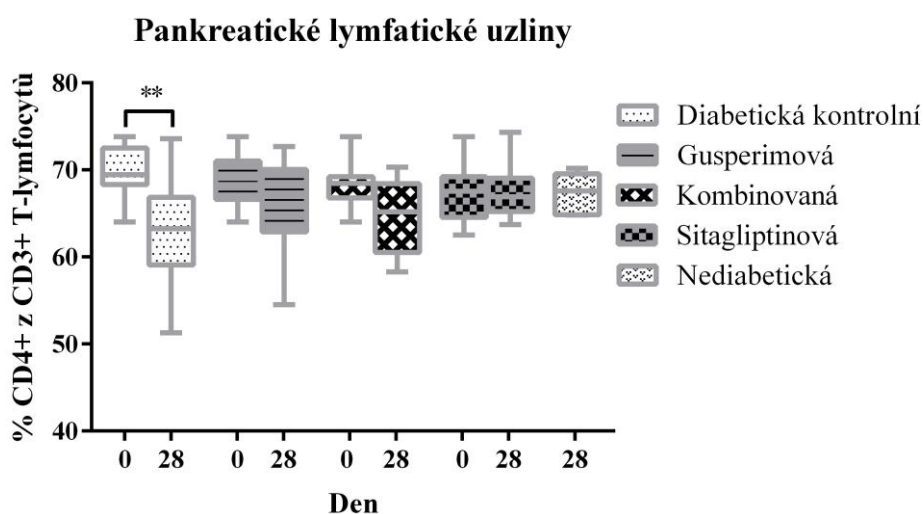
Populace CD4+ T-lymfocytů

Ve splenocytech došlo na konci pokusu v diabetické kontrolní a gusperimové skupině k mírnému poklesu CD4+ T-lymfocytů, zatímco ve skupině s kombinovanou léčbou a ve skupině léčené sitagliptinem se tato populace nezměnila. Z tohoto důvodu se na konci pokusu pak odlišovala skupina s kombinovanou léčbou 74,0 (64,8 - 84,0) % od diabetické kontrolní skupiny 70,5 (55,9 - 74,5) %; $P < 0,05$. Vůči nediabetické kontrolní skupině jsme na konci pokusu v hodnotě CD4+ T-lymfocytů nezaznamenali žádný rozdíl (Obr. 24).



Obr. 24: Populace CD4+ T-lymfocytů klesla v diabetické kontrolní skupině na konci pokusu na hodnotu 70,5 (55,9 - 74,5) %, čímž se lišila od skupiny s kombinovanou léčbou, ve které činila hodnota CD4+ T-lymfocytů 74,0 (64,8 - 84,0) %; $P < 0,05$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

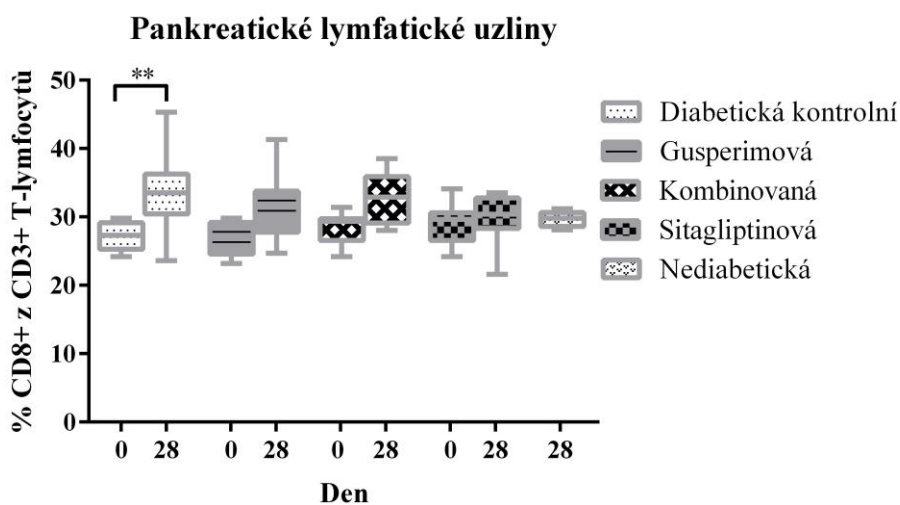
V pankreatických lymfatických uzlinách došlo na konci pokusu k mírnému poklesu CD4+ T-lymfocytů ve všech diabetických skupinách. Největší rozdíl jsme zaznamenali v diabetické kontrolní skupině, kde CD4+ T-lymfocyty klesly z hodnoty 69,4 (64,0 - 73,8) % v den 0 na 63,3 (51,3 - 73,6) %; $P < 0,01$. V den 28 se ale jednotlivé skupiny mezi sebou nelišily. Ani při porovnání s diabetickou či nediabetickou kontrolní skupinou (Obr. 25).



Obr. 25: V pankreatických lymfatických uzlinách došlo k nejvýraznějšímu poklesu CD4+ T-lymfocytů u diabetické kontrolní skupiny z hodnoty 69,4 (64,0 - 73,8) % v den 0 na 63,3 (51,3 - 73,6) % v den 28; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Populace CD8+ T-lymfocytů

Ve splenocytech jsme nezaznamenali v populaci CD8+ T-lymfocytů žádné významné změny. V pankreatických lymfatických uzlinách došlo sice ve všech skupinách k mírnému nárůstu v populaci cytotoxických T-lymfocytů, ale pouze v diabetické kontrolní skupině byl tento nárůst signifikantní z hodnoty 27,3 (24,2 - 29,8) % v den 0 na 33,5 (23,6 - 45,3) %; $P < 0,01$. Při porovnání diabetických skupin s nediabetickou kontrolní skupinou jsme opět nezaznamenali žádný rozdíl (Obr. 26).

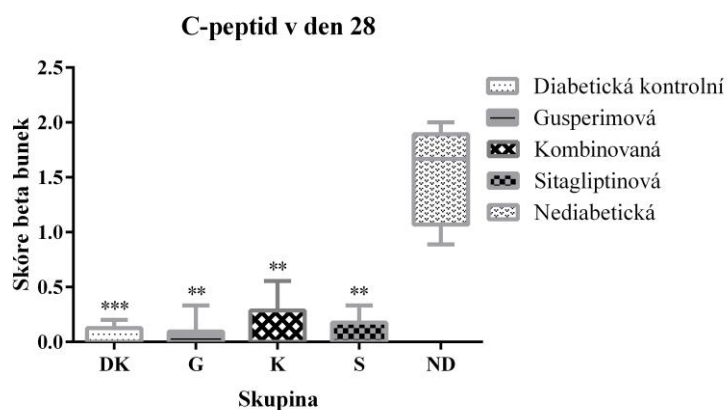


Obr. 26: V pankreatických lymfatických uzlinách došlo k nárůstu CD8+ T-lymfocytů ve všech skupinách, ale nejvýraznější byl tento nárůst u diabetické kontrolní skupiny, ve které činila hodnota na počátku pokusu 27,3 (24,2 - 29,8) % a na konci pokusu 33,5 (23,6 - 45,3) %; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Morfologie ostrůvků

Skóre beta buněk

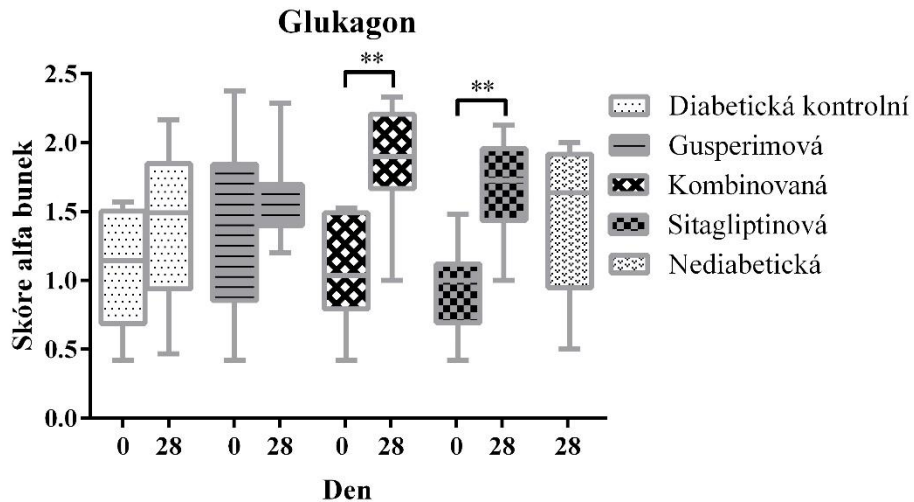
V době manifestace diabetu byla již většina beta buněk zničena. Ve všech diabetických skupinách bylo množství beta buněk výrazně sníženo již v den zahájení pokusu a v průběhu celé doby pokusu zůstalo množství beta buněk na velmi nízké až téměř nulové hodnotě. Velké rozdíly, jak se dalo předpokládat, byly na konci pokusu v porovnání s nediabetickou kontrolní skupinou (Obr. 27).



Obr. 27: Skóre beta buněk činilo na konci pokusu v nediabetické kontrolní skupině 1,667 (0,889 - 2,000), čímž se jasně lišilo od diabetické kontrolní skupiny se skóre 0,000 (0,000 - 0,200), skupiny léčené gusperimem se skóre 0,000 (0,000 - 0,333), skupiny s kombinovanou léčbou se skóre 0,000 (0,000 - 0,556) a skupiny léčené sitagliptinem se skóre 0,000 (0,000 - 0,333). *znázorňuje $P < 0,05$, *znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

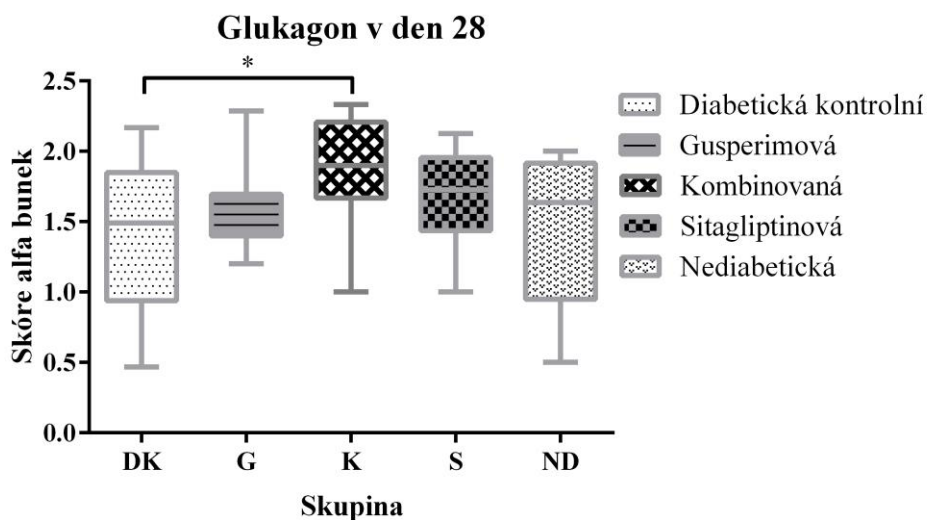
Skóre alfa buněk

Nárůst množství alfa buněk jsme zaznamenali ve všech skupinách. Ve skupině léčené sitagliptinem a ve skupině s kombinovanou léčbou byl ale tento vzestup nejvýraznější (z hodnoty skóre 1,04 (0,42 - 1,53) v den 0 na 1,87 (1,00 - 2,33) v den 28; $P < 0,01$ ve skupině s kombinovanou léčbou a z hodnoty skóre 1,0 (0,42 - 1,48) v den 0 na 1,73 (1,00 - 2,13) v den 28; $P < 0,01$ v sitagliptinem léčené skupině) (Obr. 28).



Obr. 28: Skóre alfa buněk vzrostlo nejvýrazněji ve skupinách, kterým byl podáván sitagliptin. Ve skupině s kombinovanou léčbou došlo k nárůstu skóre z hodnoty 1,04 (0,42 - 1,53) v den 0 na 1,87 (1,00 - 2,33) v den 28; $P < 0,01$ a ve skupině se sitagliptinem samotným z hodnoty 1,0 (0,42 - 1,48) v den 0 na 1,73 (1,00 - 2,13) v den 28; $P < 0,01$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

I přes tento nárůst v rámci skupiny se však skóre alfa buněk na konci pokusu nelišilo od skóre v nediabetické kontrolní skupině. Ale lišilo se mezi diabetickou kontrolní skupinou (1,49 (0,47 - 2,17)) a skupinou s kombinovanou léčbou (1,87 (1,00 - 2,33)); $P < 0,05$ (Obr. 29).

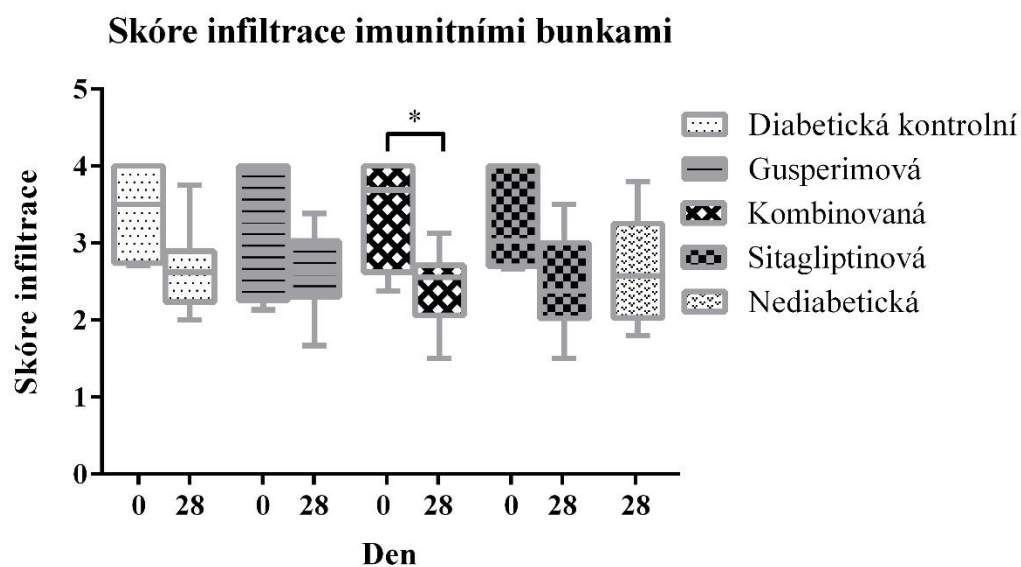


Obr. 29: V den ukončení pokusu činilo skóre alfa buněk ve skupině s kombinovanou léčbou 1,87 (1,00 - 2,33), čímž se lišilo od diabetické kontrolní skupiny, kde hodnota skóre alfa buněk činila 1,49 (0,47 - 2,17); $P < 0,05$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Infiltrace ostrůvků imunitními buňkami

Skóre infiltrace

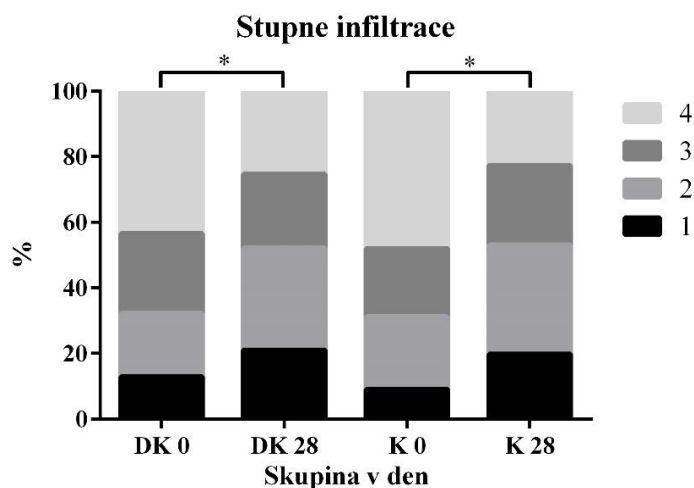
Skóre infiltrace imunitními buňkami v průběhu pokusu pokleslo ve všech diabetických skupinách a v den ukončení pokusu se nelišilo od nediabetické kontrolní skupiny. Nejvýraznější pokles jsme zaznamenali ve skupině s kombinovanou léčbou, ve které bylo na počátku skóre infiltrace ze všech diabetických skupin nejvyšší a činilo 3,69 (2,38 - 4,00) s následným poklesem na 2,56 (1,50 - 3,13) v den ukončení pokusu; $P < 0,05$ (Obr. 30).



Obr. 30: Skóre infiltrace imunitními buňkami kleslo v průběhu pokusu ve všech diabetických skupinách. Nejvýraznější pokles byl ve skupině s kombinovanou léčbou, kde hodnota skóre na počátku pokusu činila 3,69 (2,38 - 4,00) a na konci pokusu 2,56 (1,50 - 3,13); $P < 0,05$. * znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Stupeň infiltrace

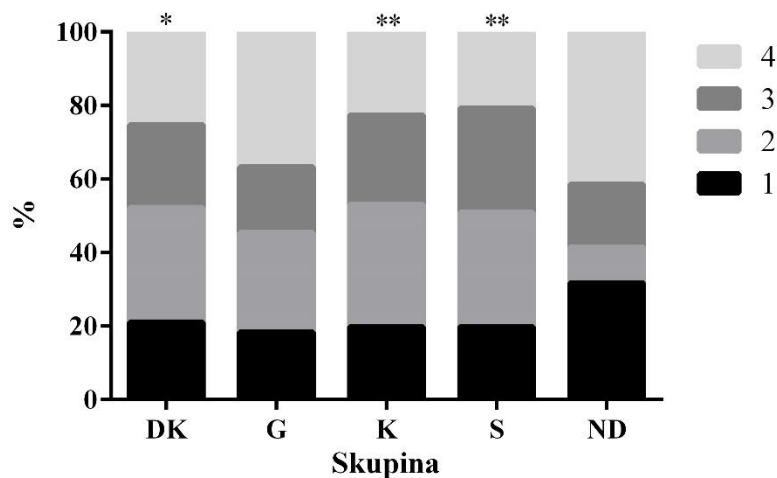
V průběhu pokusu se v rámci jedné skupiny lišil stupeň infiltrace ve skupině s kombinovanou léčbou a v diabetické kontrolní skupině; $P < 0,05$. V těchto skupinách byla na počátku pokusu infiltrace nejvíce zastoupena nejtěžším stupněm s přesmykem do lehčích forem na konci pokusu (Obr. 31).



Obr. 31: Znáznorněno procentuální zastoupení jednotlivých stupňů infiltrace v den zahájení a ukončení pokusu u diabetické kontrolní skupiny (DK) a skupiny s kombinovanou léčbou (K). Stupeň 1 představuje nejlehčí stupeň infiltrace imunitními buňkami. Stupeň 4 nejtěžší (viz metody). U obou skupin došlo v průběhu pokusu k posunu z těžší formy postižení ostrůvků zánětem do lehčí. *znázornňuje $P < 0,05$, **znázornňují $P < 0,01$, ***znázornňují $P < 0,001$.

Jednotlivé diabetické skupiny se v průběhu pokusu nelišily od diabetické kontrolní skupiny. V den ukončení pokusu se pak od nediabetické kontrolní skupiny ve stupních infiltrace lišila skupina s kombinovanou léčbou a léčbou sitagliptinem; $P < 0,01$ a také diabetická kontrolní skupina; $P < 0,05$. Skupina léčená gusperimem se od nediabetické kontrolní skupiny nelišila (Obr. 32).

Stupně infiltrace v den 28



Obr. 32: Znáznorněno procentuální zastoupení jednotlivých stupňů infiltrace v den ukončení pokusu. Nejvíce se od nediabetické kontrolní skupiny odlišovala skupina s kombinovanou léčbou a skupina léčená sitagliptinem, ve kterých byl zaznamenán nejvýraznější pokles ve 4, tj. nejtěžším stupni infiltrace ostrůvků. Podobný, ale méně výrazný pokles byl zaznamenán také u diabetické kontrolní skupiny. Bez poklesu v tíži infiltrace byla skupina léčené gusperimem, proto se statisticky nelišila od nediabetické kontrolní skupiny. * znázorňuje $P < 0,05$, ** znázorňují $P < 0,01$, *** znázorňují $P < 0,001$.

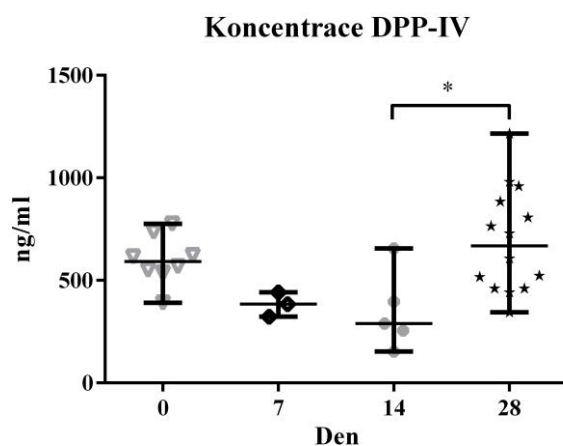
Regenerace buněk pankreatu

K posouzení možné regenerace endokrinní složky pankreatické tkáně jsme se pokusili detekovat proliferující buňky pomocí protilátky proti Ki67. Současný výskyt positivity na c-peptid či glukagon společně s Ki67 byl však velmi nízký a v žádné ze sledovaných skupin nedošlo ke statisticky významným změnám.

Koncentrace DPP-IV v plazmě

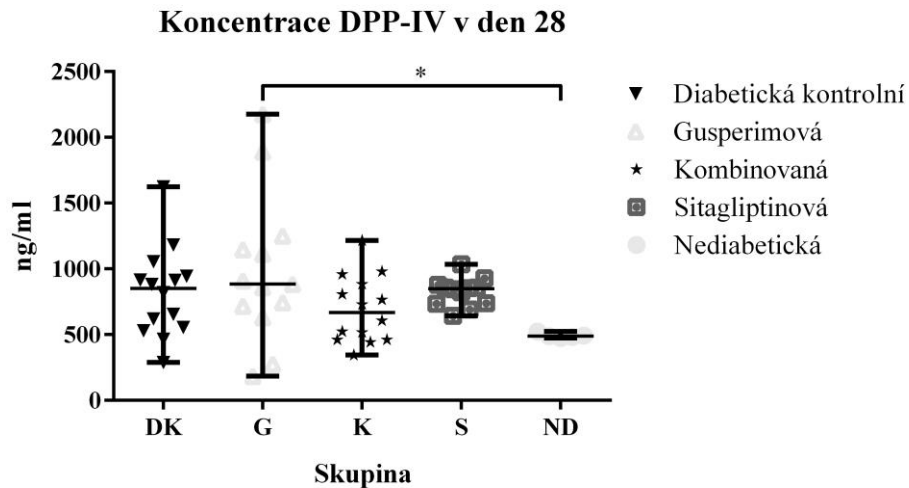
Díky sledování hodnot DPP-IV u všech skupiny, nejen léčených DPP-IV inhibitorem, jsme zjistili zajímavé výsledky. Koncentrace DPP-IV v sitagliptinem léčené skupině klesla 7. den pokusu na hodnotu 292,9 (124,5 – 376,8) ng/ml z původní hodnoty 712,9 (550,0 – 775,2) ng/ml. Dále pak její hodnota stoupala na hodnotu 390,4 (219,6 – 660,9) ng/ml v den

14 a 848,7 (642,6 – 1033,6) ng/ml v den 28. Ve skupině s kombinovanou léčbou byl účinek sitagliptinu na koncentraci DPP-IV ještě méně výrazný než u skupiny léčené sitagliptinem samotným. Pouze ne zcela signifikantní pokles byl patrný v den 14 (289,5 (153,4 – 655,9) ng/ml) v porovnání se dnem 0 (592,2 (390,5 – 775,2 ng/ml). Od tohoto dne pak dále došlo k signifikantnímu nárůstu koncentrace na hodnotu 668,2 (344,2 – 1215,5) ng/ml v den 28; $P < 0,05$ (Obr. 33).



Obr. 33: Koncentrace DPP-IV poklesla ve skupině s kombinovanou léčbou 14 den na hodnotu 289,5 (153,4 – 655,9) ng/ml s následným vzestupem na hodnotu 668,2 (344,2 – 1215,5) ng/ml v den 28; $P < 0,05$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

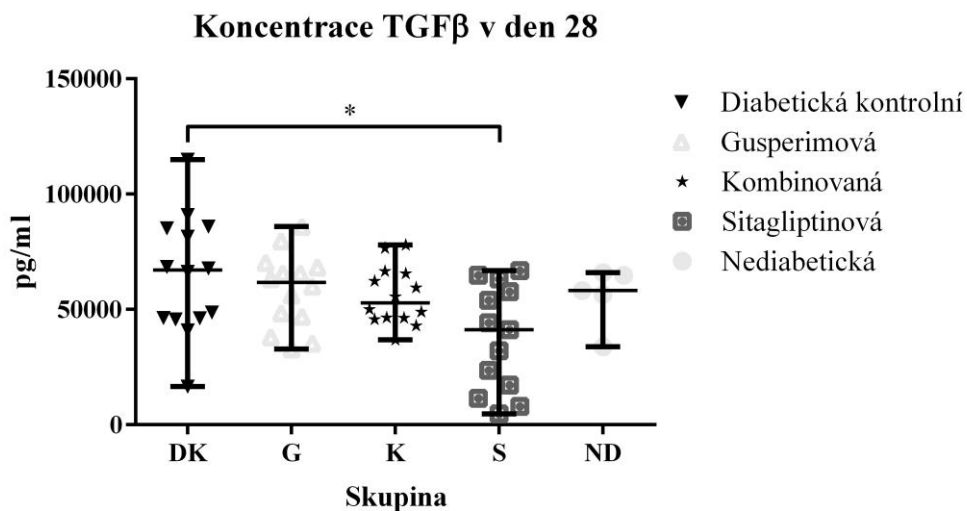
Ve skupině léčené gusperimem koncentrace DPP-IV v průběhu pokusu trvale narůstala (z 619,1 (452,9 – 1270,9) ng/ml v den 0 na 885,3 (183,4 – 2175,4) ng/ml v den 28; bez signifikance). Mírný nárůst koncentrace DPP-IV v průběhu pokusu byl zaznamenán také v diabetické kontrolní skupině (z 619,1 (230,5 – 775,2) ng/ml v den 0 na 851,1 (289,2 – 1623,0) ng/ml v den 28; bez signifikance). V den ukončení pokusu pak byla hodnota DPP-IV ve skupině léčené gusperimem nejvyšší a lišila se od nediabetické kontrolní skupiny, kde koncentrace DPP-IV činila 488,6 (473,2 – 523,4) ng/ml; $P < 0,05$ (Obr. 34). Jednotlivé diabetické skupiny se na konci pokusu mezi sebou nelišily.



Obr. 34: Koncentrace DPP-IV byla na konci pokusu nejvyšší ve skupině léčené gusperimem, kde činila 885,3 (183,4 – 2175,4) ng/ml, čímž se ze všech diabetických skupin nejvíce odlišovala od hodnot naměřených u nediabetické kontrolní skupiny, ve které byla koncentrace DPP-IV 488,6 (473,2 – 523,4) ng/ml; $P < 0,05$. * znázorňuje $P < 0,05$, ** znázorňují $P < 0,01$, *** znázorňují $P < 0,001$.

Koncentrace TGFβ v séru

Hodnoty koncentrace TGFβ se v průběhu pokusu mezi jednotlivými skupinami příliš nelišily. Pouze ve skupině léčené sitagliptinem samotným došlo na konci pokusu k poklesu TGFβ, čímž se lišila od diabetické kontrolní skupiny (Obr. 35).

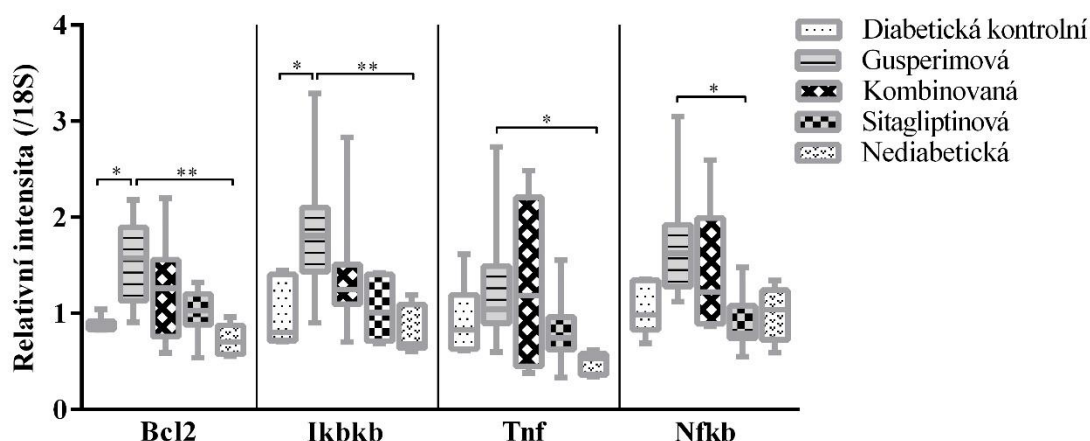


Obr. 35: Hodnota TGF β na konci pokusu klesla ve skupině léčené sitagliptinem na hodnotu 41223,9 (4627,5 - 66779,9) pg/ml a tím se tato skupina lišila od diabetické kontrolní skupiny, kde hodnota TGF β činila 67050,3 (16617,1 - 114930,6) pg/ml; $P < 0,05$. * znázorňuje $P < 0,05$, ** znázorňuje $P < 0,01$, *** znázorňuje $P < 0,001$.

Profil genové exprese splenocytů

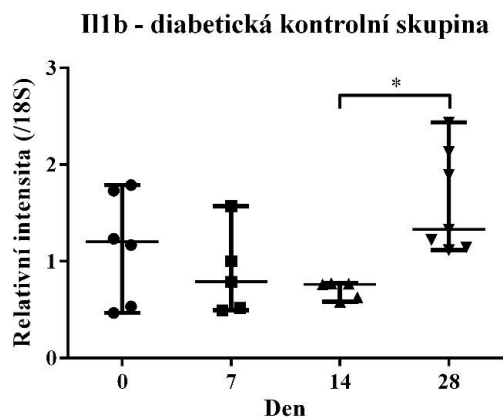
Abychom si blíže ozřejmili mechanismy účinku jednotlivých látek na imunitní systém, zaměřili jsme se na změny v profilu genové exprese splenocytů. Relativní intenzita genové exprese Nfkb2 se ve skupině s kombinovanou léčbou snížila v průběhu pokusu z 1,632 (1,205 - 2,941) na 1,048 (0,463 - 1,673), $P < 0,05$. Genová exprese proapoptotického genu Bax, genů pro FasI, Il6 a Infg se v průběhu pokusu v rámci jednotlivých skupin ani mezi skupinami navzájem výrazněji nelišily. Ve skupině léčené gusperimem došlo k vzestupu relativní intenzity genové exprese Ikbkb z hodnoty 0,990 (0,522 – 1,989) v den zahájení pokusu na hodnotu 1,809 (0,902 – 3,29) v den ukončení, $P < 0,01$. Tento nárůst vedl k tomu, že se skupina léčená gusperimem na konci pokusu lišila od nediabetické 0,682 (0,601 - 1,192), $P < 0,01$ i diabetické 0,800 (0,709 - 1,449), $P < 0,05$ kontrolní skupiny. Dále byla v den ukončení pokusu ve skupině léčené gusperimem zvýšená relativní intenzita exprese genu pro Bcl2 oproti nediabetické i diabetické kontrolní skupině 1,575 (0,909 - 2,182) vs 0,702 (0,554 - 0,961), $P < 0,01$; vs 0,869 (0,829 - 1,042), $P < 0,05$. Zvýšené exprese genů pro Nfkb1 1,626 (1,120 - 3,047) vs 0,788 (0,548 - 1,479); $P < 0,01$ a Il10 3,239 (0,445 - 7,447) vs 0,490 (0,195 - 1,638); $P < 0,05$ vůči sitagliptinem léčené skupině. Oproti nediabetické kontrolní skupině byla ve skupině léčené gusperimem zvýšena exprese genu pro Tnf 0,533 (0,340 - 0,617) vs 1,042 (0,599 - 2,730), $P < 0,05$ (Obr. 36).

Profil genové exprese v den 28



Obr. 36: Profil genové exprese v den ukončení pokusu. Relativní intenzita genové exprese pro gen Bcl2 byla nejvyšší u gusperimové skupiny, kde činila 1,575 (0,909 - 2,182), zatímco v diabetické kontrolní skupině 0,869 (0,829 - 1,042); $P < 0,05$ a v nediabetické kontrolní skupině 0,702 (0,554 - 0,961); $P < 0,01$. Expresí genu pro Ikbkb byla také nejvyšší u gusperimové skupiny, kde dosahovala hodnoty 1,809 (0,902 - 3,29), zatímco v diabetické kontrolní skupině 0,800 (0,709 - 1,449); $P < 0,05$ a v nediabetické kontrolní skupině 0,682 (0,601 - 1,192); $P < 0,01$. Expresí genu pro Tnf dosáhla v gusperimové skupině hodnoty 1,042 (0,599 - 2,730), čímž se lišila od nediabetické kontrolní skupiny, kde činila hodnota 0,533 (0,340 - 0,617); $P < 0,05$. U genu kódujícího Nfkb1 byla nejnižší hodnota zaznamenána v sitagliptinové skupině, a to 0,788 (0,548 - 1,479), nejvyšší v gusperimové skupině 1,626 (1,120 - 3,047); $P < 0,05$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

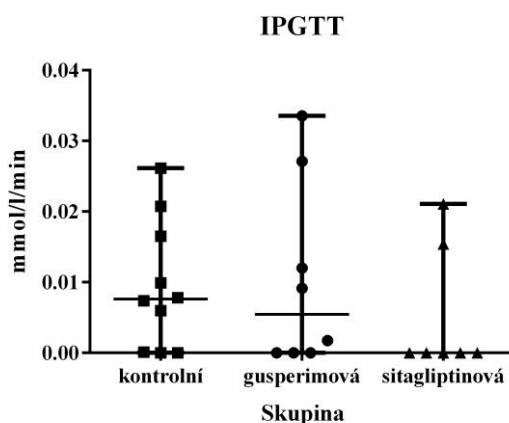
V kontrolní diabetické skupině došlo od 14 dne k nárůstu genové exprese Il1b z 0,762 (0,582 - 0,774) na 1,328 (1,116 - 2,437) v den ukončení pokusu, $P < 0,05$ (Obr. 37). I přes tento nárůst byla hodnota Il1b na konci pokusu v diabetické kontrolní skupině spolu se skupinou léčenou sitagliptinem nižší než v ostatních sledovaných skupinách.



Obr. 37: Relativní intenzita exprese II1b v diabetické kontrolní skupině klesla v průběhu pokusu na hodnotu 0,762 (0,582 - 0,774) v den 14. S následným vzestupem na hodnotu 1,328 (1,116 – 2,437) v den 28; $P < 0,05$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

IPGTT

Vzhledem k vysoké mortalitě myši po IPGTT jsme ve skupině s kombinovanou léčbou od tohoto testu ustoupili. V ostatních diabetických skupinách se hodnoty asimilace glukózy od sebe statisticky vzájemně nelišily, nicméně nejnižších hodnot bylo dosahováno ve skupině myši léčených sitagliptinem (Obr. 38).



Obr. 38: Hodnoty asimilace glukózy v průběhu IPGTT činily v diabetické kontrolní skupině 0,008 (0,000 - 0,026) mmol/l/min , v gusperimové 0,005 (0,000 - 0,034) mmol/l/min a v sitagliptinové 0,000 (0,000 - 0,021) mmol/l/min.

Experiment 4

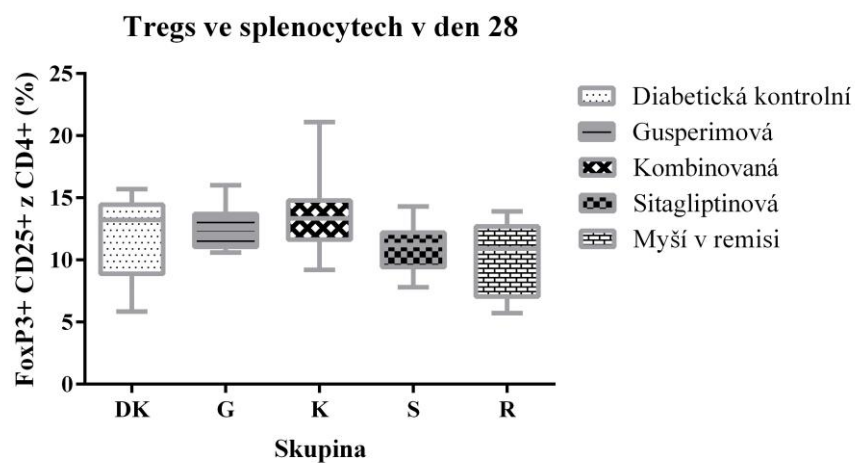
Úvod a metody

Při zpracování výsledků jsme u myší, jež dosáhly remise, pozorovali výrazné odchylky v hodnotách některých sledovaných parametrů. Proto jsme z předchozích výsledků na konci pokusu vyčlenili myši v remisi a porovnali je s diabetickými skupinami.

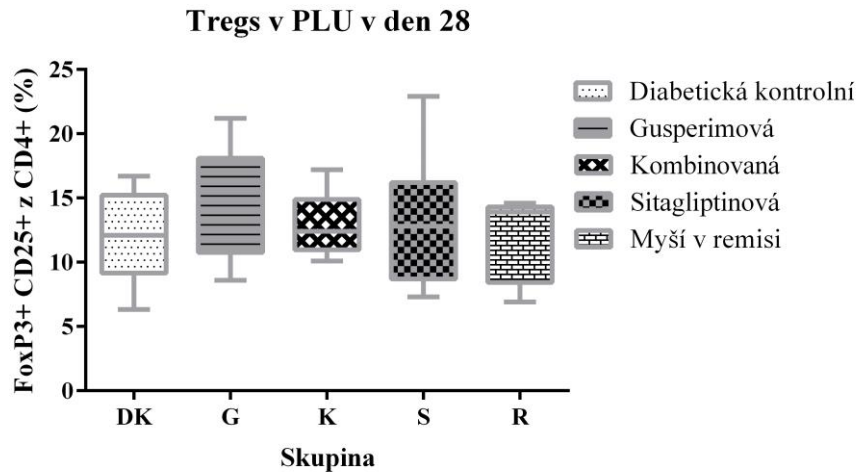
Výsledky

Populace regulačních, CD4+ a CD8+ T-lymfocytů

V den ukončení pokusu se populace regulačních, CD4+ ani CD8+ T-lymfocytů izolovaných ze splenocytů a pankreatických lymfatických uzlin v jednotlivých skupinách vzájemně nelišily (Obr. 39).



(A)

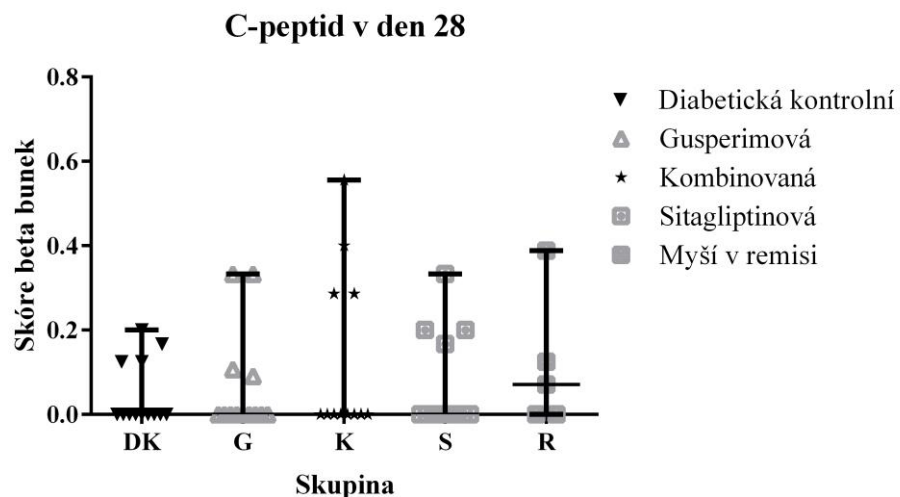


(B)

Obr. 39: Populace Tregs se na konci pokusu ve všech diabetických skupinách nijak zásadně nelišily a to ani ve slezině (A), ani v pankreatických lymfatických uzlinách (B).

Morfologie ostrůvků

Skóre alfa buněk ani beta buněk se mezi skupinami také nijak statisticky nelišilo. Nicméně i velmi malé množství beta buněk přeživších u myši v remisi, které se statisticky nelišilo od ostatních diabetických zvířat, postačilo k udržení normoglykémie (Obr. 40).



Obr. 40: Skóre beta buněk na konci pokusu se mezi skupinami statisticky nelišilo. Přesto u myši v remisi postačovala hodnota skóre 0,071 (0,000 - 0,388) k udržení normoglykémie. U diabetické kontrolní skupiny činilo skóre 0,000 (0,000 - 0,200), u gusperimové skupiny 0,000 (0,000 - 0,333),

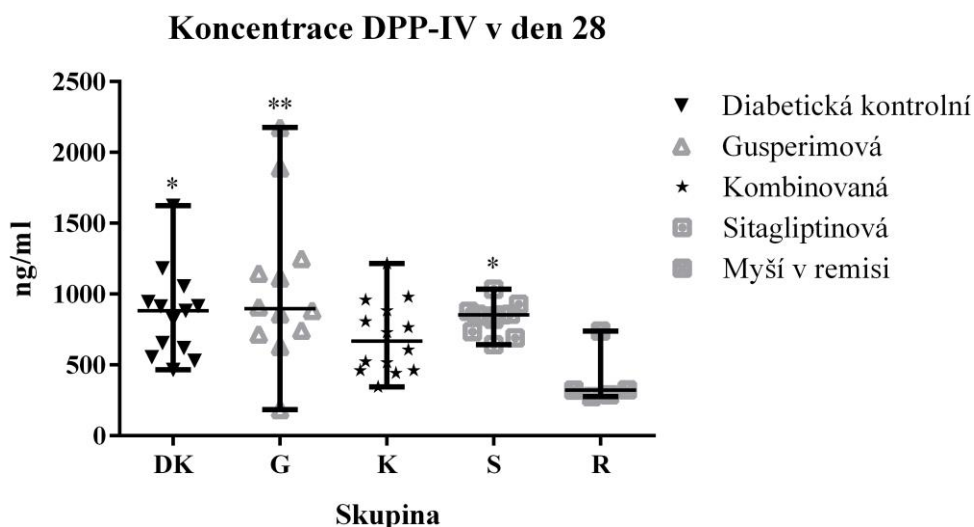
u kombinované skupiny 0,000 (0,000 - 0,556) a u skupiny léčené sitagliptinem 0,000 (0,000 - 0,333).

Infiltrace ostrůvků imunitními buňkami

Ve skóre infiltrace ani ve stupni infiltrace ostrůvků imunitními buňkami se jednotlivé skupiny v porovnání se skupinou myši v remisi nelišily.

Koncentrace DPP-IV v plazmě

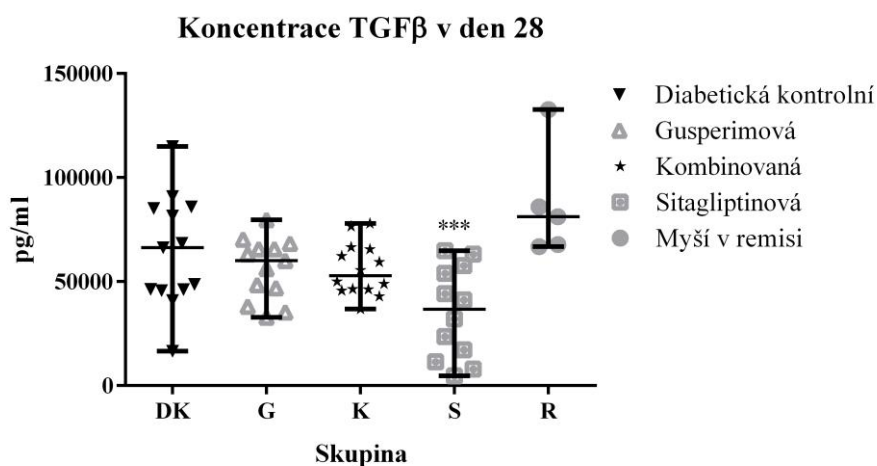
Zajímavé výsledky jsme zjistili při porovnání zvířat, která dosáhla remise v porovnání s ostatními diabetickými zvířaty v hodnotách koncentrace DPP-IV. Ve skupině myši v remisi byly hodnoty DPP-IV výrazně nižší než v ostatních skupinách a jejich medián činil 321,8 (277 - 737,5) ng/ml. Další zajímavý fakt byl, že nejvyšší hodnotu DPP-IV v této skupině měla paradoxně myš spadající do skupiny léčené sitagliptinem. Bez tohoto ovlivnění předchozí léčbou by byl rozdíl mezi skupinami ještě výraznější. V diabetické kontrolní skupině činila hodnota koncentrace DPP-IV na konci pokusu 882,5 (289,2 – 1623,0) ng/ml); $P < 0,05$, v sitagliptinem léčené 853,2 (642,6 – 1033,6) ng/ml); $P < 0,05$ a v gusperimové skupině 885,3 (183,4 - 2175,4) ng/ml); $P < 0,01$ (Obr. 41).



Obr. 41: Koncentrace DPP-IV v plazmě byla na konci pokusu u myší, které dosáhly remise nejnižší a činila 321,8 (277 - 737,5) ng/ml. Tím se tato skupina lišila od diabetické kontrolní skupiny, kde hodnota DPP-IV činila 882,5 (289,2 – 1623,0) ng/ml; $P < 0,05$, od guserimové skupiny, kde činila 885,3 (183,4 - 2175,4) ng/ml; $P < 0,01$ a od sitagliptinové skupiny, kde byla hodnota 853,2 (642,6 – 1033,6) ng/ml; $P < 0,05$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

Koncentrace TGFβ v séru

Koncentrace TGFβ byla nejvyšší ve skupině myší v remisi, kde činila 81172,0 (66779,9 - 132703,9) pg/ml, čímž se výrazně lišila od hodnoty ve skupině myší léčených sitagliptinem, kde byla hodnota nejnižší a činila 36670,2 (4627,5 - 64787,5) pg/ml; $P < 0,001$ (Obr. 42).

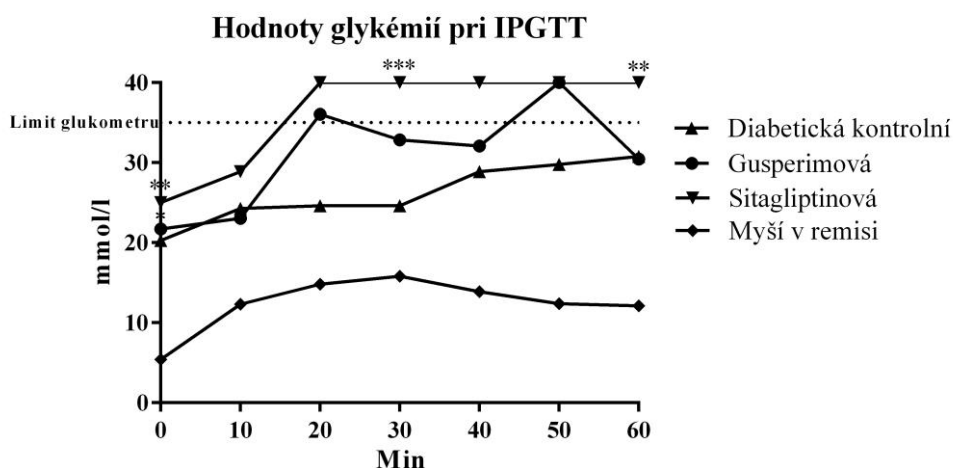


Obr. 42: Koncentrace TGFβ byla na konci pokusu nejnižší ve skupině léčené sitagliptinem a činila 36670,2 (4627,5 - 64787,5) pg/ml, čímž se výrazně lišila od hodnoty zjištěné u myší v remisi, kde činila 81172,0 (66779,9 - 132703,9) pg/ml; $P < 0,001$. *znázorňuje $P < 0,05$, **znázorňují $P < 0,01$, ***znázorňují $P < 0,001$.

IPGTT

Při porovnání asimilace glukózy se jednotlivé skupiny mezi sebou opět nelišily. Ale při porovnání hodnot glykemií naměřených v 0., 30. a 60. minutě IPGTT se skupina léčená sitagliptinem výrazně odlišovala od skupiny myší v remisi. Ve 30. minutě testu se hodnota

glykémie naměřená u myši léčených sitagliptinem pohybovala nad 35 mmol/l a tím se odlišovala i od diabetické kontrolní skupiny, kde činila 24,6 mmol/l; $P < 0,01$. U myši s kombinovanou léčbou bylo od tohoto testu ustoupeno pro vysokou úmrtnost myši v průběhu vyšetření (Obr. 43).



Obr. 43: Hodnoty glykemií v průběhu IPGTT. Tečkovaná linie vyznačuje maximální detekční limit glukometru. Hodnota glykémie myši léčených sitagliptinem byla v 0. minutě 25 mmol/l, od 10. minuty dále se pohybovala nad detekčním limitem glukometru a tím se lišila v 0., 30. a 60. minutě od hodnot naměřených u myši v remisi, kde tyto hodnoty činily 5,6; 14,6 a 11,8 mmol/l. * znázorňuje $P < 0,05$, ** znázorňují $P < 0,01$, *** znázorňují $P < 0,001$.

Diskuze

V našem pokusu prováděném na zvířecím modelu diabetu mellitu 1. typu jsme se zaměřili na účinky imunomodulačních a beta buňky stimulujících látek v závislosti na čase. Na základě výsledků dříve uveřejněných studií jsme očekávali pokles glykemií, ochranu pankreatických beta buněk a stimulaci regulačních T-lymfocytů, které mohou utlumit autoimunitní destrukci beta buněk.

Většina publikovaných úspěšných pokusů byla nicméně prováděna na myších ještě před rozvojem diabetu. Ze 463 látek použitých v diabetických intervenčních studiích bylo pouze 23 studií zahájeno u diabetických NOD myší a pouze 16 z nich lze považovat za úspěšné (Shoda L.K. et al., 2005). Nejúčinnějším prostředkem se zdá být léčba mATG, neboť prokázala alespoň částečné metabolické zlepšení již hyperglykemických NOD myší. Účinek mATG byl patrný z vyššího výskytu remise diabetu. K remisi došlo zejména u myší, jejichž vstupní glykémie nepřesáhly hodnotu 15,6 mmol/l. Žádná z terapií však nevedla k jasnému vyléčení myší s již manifestním diabetem 1. typu. Podobně neúspěšné byly studie s GLP-1 analogem exendinem-4, jehož samotné podávání bylo zahájeno také až v době rozvinutého diabetu, tak jako tomu bylo v našem pokusu (Tian B. et al., 2009; Xue S. et al., 2008). V případě gusperimu žádná z publikovaných studií nebyla provedena na NOD myších s již manifestním diabetem. Bohužel ani kombinovaná léčba nevedla k lepším výsledkům. Důležitý prvek rozhodující o účinnosti léčby je čas mezi manifestací diabetu a zahájením léčby (Maki T. et al., 1992; Mottram P.L. et al., 2002), hodnoty glykemií v době zahájení pokusu (Suarez-Pinzon W.L. et al., 2008) či podávání exogenního inzulínu v průběhu studie (Ogawa N. et al., 2004; Tian B. et al., 2009; Tian L. et al., 2010). V úspěšných studiích, kde byl DPP-IV inhibitor či analog GLP-1 u NOD myší podáván společně s dalším imunomodulačním přípravkem (Ogawa N. et al., 2004;

Tian B. et al., 2009) nebo s inhibitorem protonové pumpy (Suarez-Pinzon W.L. et al., 2009) mohly právě tyto aspekty hrát zásadní roli.

Inzulínová léčba může sama o sobě přispět k nižší aktivaci autoimunitní reakce uvedením stávajících beta buněk do klidu, čímž nedochází k vystavování autoantigenů na povrchu beta buněk (Skowera A. et al., 2008). Navíc umožňuje stávajícím beta buňkám zregenerovat a obnovit inzulínová granula (Sherry N.A. et al., 2006). Při podávání inzulínu je také možné delší sledování diabetických myší, neboť nedochází k jejich úmrtí na ketoacidózu, jak je tomu v případě neléčeného diabetu. Z prací publikovaných v nedávné době je patrné, že terapeutický účinek sitagliptinu v podobě remise diabetu je patrný až po více než měsíčním sledování myší (Ansarullah et al., 2013; Tsuji T. et al., 2012). V případě podávání anti-lymfocytárního séra, ať už samotného či v kombinaci s exendinem-4, se účinek projevil také až po více než dvou měsících léčby (Maki T. et al., 1992; Ogawa N. et al., 2004). Z našeho pozorování NOD myší dále vyplývá, že myši mající glykémie kolem 10 mmol/l nelze považovat za plně diabetické a vhodné k zařazení do pokusu, neboť u nich dochází ve vysokém procentu ke spontánní remisi diabetu a nelze tak plně zhodnotit efekt léčby na manifestní diabetes. To by mohlo vysvětlovat výrazně lepší výsledky dosažené v pracích publikovaných Suarez-Pinzon (Suarez-Pinzon W.L. et al., 2009; Suarez-Pinzon W.L. et al., 2008), kde byly myši zařazovány do studie při glykemiích 10 – 16 mmol/l.

K navození remise je potřebné potlačení autoimunity a obnovení tolerance k vlastním autoantigenům. Za udržení periferní tolerance jsou zodpovědné regulační T-lymfocyty, které jsou podskupinou CD4⁺ T-lymfocytů. Tregs mají schopnost tlumit imunitní a zánětlivou odpověď a destrukci tkání útlumem funkce širokého spektra buněk včetně pomocných T-lymfocytů, produkce protilátek B-lymfocyty, uvolňování granul z cytotoxických T-lymfocytů a antigen prezentujících buněk (ElEssawy B., Li X.C., 2015). Inhibiční účinek Tregs po jejich aktivaci je dán buď přímým buněčným kontaktem

prostřednictvím inhibičních molekul jako je CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), nebo prostřednictvím sekrece IL-10 a TGF β (Broere F. et al., 2011).

Po terapii mATG došlo v našem experimentu k vzestupu populace Tregs, a to jak ve splenocytech, tak i pankreatických lymfatických uzlinách. Vliv podávání anti T-lymfocytární léčby na populaci regulačních T-lymfocytů, který byl prokázán v klinických a experimentálních studiích in vitro i in vivo (Feng X. et al., 2008; Lopez M. et al., 2006). Ve shodě s daty publikovanými jinou skupinou (Simon G. et al., 2008), jsme zaznamenali signifikantní nárůst v populaci Tregs v buňkách pankreatických lymfatických uzlin i splenocytů. Tento vzestup byl nejvýraznější do 3 dnů po podání mATG. Dle Xia (Xia C.Q. et al., 2012) je to dáno nižší citlivostí Tregs na jejich odstranění při léčbě mATG zejména v podskupině paměťových buněk. Lepších výsledků by mohlo být dosaženo delším podáváním mATG (Vergani A. et al., 2010). Ve stejné době jsme po podání mATG zaznamenali i vzestup v hodnotách TGF β , který je důležitý pro vznik a zachování Tregs. Přímé dodání TGF β a IL-2 v podobě nanopartikulí je schopné navodit diferenciaci naivních FoxP3 negativních CD4+ T-lymfocytů (McHugh M.D. et al., 2015). U gusperimu nebyl zatím jeho vliv na Tregs publikován. V naší práci došlo v průběhu pokusu ve skupině léčené gusperimem k nárůstu Tregs ve splenocytech i pankreatických lymfatických uzlinách. Ke stejnému efektu došlo i v případě zkombinování gusperimu se sitagliptinem. Ve skupině léčené sitagliptinem samotným došlo naopak sedmý den pokusu dokonce k mírnému poklesu Tregs. Ten by mohl být dán schopností sitagliptinu tlumit efektorovou Th1 odpověď a tím i nižší následnou aktivaci regulačních T-lymfocytů. Molekula CD26/DPP-IV se totiž vyskytuje v hojném množství právě na povrchu aktivovaných Th1 lymfocytů (Salgado F.J. et al., 2012). Sedmý den léčby sitagliptinem byla současně i nejnižší hodnota koncentrace DPP-IV v plazmě. Při porovnání diabetických myši s nediabetickými či s myši, které dosáhly remise, se populace Tregs

na konci pokusu ve splenocytech ani v pankreatických lymfatických uzlinách nijak zásadně neodlišovaly, ačkoliv u všech diabetických zvířat došlo k menšímu či výraznějšimu nárůstu v jejich populaci. Také Mellanby (Mellanby R.J. et al., 2007) nezaznamenal rozdíl v množství Tregs mezi diabetickými a nediabetickými NOD myšmi. Z těchto výsledků se zdá, že jediný pozitivní vliv na populaci Tregs mělo podávání mATG. Tento efekt byl ale patrný pouze v době jeho podávání. Vyšší hodnoty Tregs na konci pokusu byly ve skupině s mATG a v ostatních diabetických skupinách dány nejspíše změnami v imunitním systému při diabetu samotném a snahou imunitního systému o útlum autoimunitní zánětlivé reakce. Ta se zdá být podáváním gusperimu spíše udržována než tlumena, jak je patrné dále z profilu genové exprese a z hodnot DPP-IV. Schopnost Tregs ochránit daný orgán proti autoimunitnímu poškození také vyžaduje jejich schopnost do něj vcestovat a usídlit se v něm (Feuerer M. et al., 2009).

Pomocné CD4⁺ T-lymfocyty hrají hlavní roli ve vzniku a regulaci autoimunitních onemocnění. Ve všech diabetických skupinách došlo k mírnému poklesu počtu CD4⁺ T-lymfocytů, ale nejvýraznější pokles jsme zaznamenali jak ve splenocytech, tak v PLU u diabetické kontrolní skupiny. Tento pokles zrcadlil navýšení počtu CD8⁺ T-lymfocytů se zvýšenou expresí IL-1 β . Na konci pokusu se proto odlišovala diabetická kontrolní skupina od skupiny s kombinovanou léčbou, kde zůstala hodnota CD4⁺ T-lymfocytů ve splenocytech beze změny. V zastoupení CD4⁺ T-lymfocytů v PLU se tyto dvě skupiny nelišily. A nelišily se ani při porovnání s nediabetickými myšmi či myšmi v remisi. Léčba mATG vedla jako jediná k nárůstu CD4⁺ T-lymfocytů jak ve splenocytech tak pankreatických lymfatických uzlinách.

Efektorové CD8⁺ T-lymfocyty představují hlavní buněčnou komponentu při autoimunitní destrukci beta buněk v pozdější fázi onemocnění. Z tohoto důvodu mohou změny v četnosti CD8⁺ T-lymfocytů odrážet sílu autoimunitní odpovědi. Ve všech diabetických

skupinách, kromě skupiny myší, které jsme podávali mATG, jsme zaznamenali na konci pokusu v pankreatických lymfatických uzlinách mírný nárůst CD8⁺ T-lymfocytů. Tento nárůst byl nejvýraznější v diabetické kontrolní skupině a nejspíš byl dán zvýšenou expresí IL-1 β . Velmi dramatický pokles CD8⁺ T-lymfocytů zaznamenaný po podání mATG může ukazovat kýžený útlum cytotoxické aktivity u léčených myší. Při podávání gusperimu jsme nezaznamenali žádné změny v počtu CD4⁺ či CD8⁺ T-lymfocytů. Z práce Wanga (Wang B. et al., 1996) vyplývá, že gusperimus je schopen blokovat diferenciaci T-lymfocytů na počáteční úrovni (jejich prekursorů v thymu), ale nemá žádný měřitelný účinek na pozdní vývojová stádia T-lymfocytů a že plně dozrálé periferní T-lymfocyty jsou jeho vlivu ušetřeny. To je ve shodě s nálezem, že gusperimus je schopen utlumit dozrávání efektorových cytotoxických T-lymfocytů, ale ne už jejich rozpoznávání antigenů nebo projevy cytotoxické aktivity (Mochida-Nishimura K., Tokunaga T., 1996). Pozitivní efekty gusperimu popisující jeho vliv na snížení počtu cytotoxických T-lymfocytů navíc vycházejí z prací prováděných in vitro (Fujii H. et al., 1992) Beze změn v zastoupení CD4⁺ či CD8⁺ T-lymfocytů ve splenocytech bylo i podávání gusperimu ještě před rozvojem diabetu (Strandell E., Sandler S., 1992). Při sledování vlivu gusperimu na autoimunitní diabetes v podobě rekurence autoimunity po transplantaci ostrůvků diabetickým NOD příjemcům se ukázalo, že gusperimus nevede k lepšímu přežívání štěpu, zatímco podávání anti-CD4 protilátky jeho přežívání výrazně prodloužilo (Stegall M.D. et al., 1996). Taktéž podávání sitagliptinu nemělo vliv na množství CD4⁺ či CD8⁺ T-lymfocytů. Ve studii provedené na zdravých dobrovolnících, kterým byl podáván sitagliptin po dobu 28 dnů, také nebyly zaznamenány změny v množství CD4⁺, CD8⁺ či Tregs. V průběhu prvních 3dnů podávání došlo k nárůstu paměťových CD8⁺ (spolu se vzestupem hodnot CD26) buněk, ale tento efekt nebyl trvalý (Price J.D. et al., 2013). Hodnoty CD8⁺ T-lymfocytů společně s Tregs byly sice u všech diabetických myší lehce

zvýšeny v porovnání s nediabetickými, ale bez signifikance. Žádný signifikantní rozdíl jsme v hodnotách CD4+, CD8+ či Tregs nezaznamenali ani v porovnání s myši v remisi.

V čem se ale myši v remisi odlišovaly od ostatních diabetických myši byly koncentrace TGF β a DPP-IV v krvi. Stěžejní funkcí TGF β je udržování tolerance pomocí regulace proliferace, diferenciací a přežívání efektorových T-lymfocytů, zachování Tregs a dále také ovlivnění chemotaxe (Sherry N.A. et al., 2007). U myši i u lidí byla pozorována trvale klesající hodnota aktivního TGF β v souvislosti s progresí diabetu (Olivieri A. et al., 2010). Toto je velmi důležité, neboť jsme zjistili, že u myši, které dosáhly remise, byly hodnoty TGF β nejvyšší a vysoce převyšovaly hodnoty, které jsme naměřili u myši léčených sitagliptinem samotným. DPP-IV inhibitory v experimentech vykazují silný supresivní účinek na produkci většiny prozánětlivých cytokinů a zvyšují produkci a sekreci TGF β (Biton A. et al., 2006). Takovéto výsledky byly dosaženy při časně léčbě autoimunitní encefalitidy (Steinbrecher A. et al., 2001) nebo při pozorování in vitro (Reinhold D. et al., 1997). V naší práci ale naopak došlo k velmi výraznému snížení hodnot TGF β při podávání sitagliptinu. Nižší byly také plazmatické hodnoty TGF β u zdravých dobrovolníků léčených po dobu 28 dnů sitagliptinem oproti pacientům s placebem, i když nesignifikantně. Jak sám autor poznamenává, u pacientů s chronickou imunitní aktivací mohou být imunitní účinky sitagliptinu více patrné (Price J.D. et al., 2013). Také Tian nezaznamenal při podávání inhibitoru DPP-IV NOD myším, u kterých nebylo dosaženo remise, nárůst v hodnotách TGF β (Tian B. et al., 2009; Tian L. et al., 2010). Nižší hodnoty TGF β měla skupina léčená sitagliptinem i v porovnání s diabetickou kontrolní skupinou. Pozitivní vliv na koncentraci TGF β , ve smyslu jejího zvýšení, mělo podání mATG, což je v souladu se změnami v imunitním systému a metabolickými efekty. Tento efekt byl však patrný jen 7. den pokusu. Hodnoty TGF β se zdají být nezávislé na množství Tregs a zdají se mít nejlepší vypovídající hodnotu o nastavení imunitní reakce či o úspěšnosti léčby.

Chen (Chen G. et al., 2008) ze svých dat také vyvozuje, že TGF β má hlavní roli v anti-CD3 zprostředkovaném zvrácení diabetu a opětovném navození tolerance nezávislém na Tregs. Také genová terapie TGF β diabetických NOD myší zatahuje autoimunitní destrukci ostrůvků, usnadňuje obnovení funkce beta buněk a léčí manifestní diabetes. Tento ochranný účinek je spojen s nálezem Tregs mezi buňkami tvořícími infiltrát obklopující ostrůvku (Luo X. et al., 2005). Z výsledků a dostupné literatury se zdá, že zvýšené hodnoty TGF β mohou vést ke zvýšení počtu Tregs s jejich imunoregulačním působením přímo v pankreatu, ale že zvýšené hodnoty Tregs ve splenocytech či PLU nevedou ke zvýšení plazmatických hodnot TGF β a navození remise. Zdrojem TGF β může být virtuálně kterákoliv buňka. V době odeznívajícího zánětu jsou jedním z možných zdrojů makrofágy fagocytující apoptotické buňky, což vede k útlumu sekrece prozánětlivých cytokinů (Fadok V.A. et al., 1998; McDonald P.P. et al., 1999) v tomto případě autokrinní či parakrinní cestou, neboť tento pokus byl prováděn in vitro. Velmi důležitý je ale fakt, že in vivo se exprese TGF β a jeho uvolnění leukocyty v době odeznívajícího zánětu snižuje při podání NF-kB inhibitorů (Lawrence T. et al., 2001).

Vedle TGF β je IL-10 dalším důležitým cytokinem s protizánětlivými, imunosupresivními a imunomodulačními účinky. Je schopen tlumit produkci prozánětlivých cytokinů a navozuje anergii u T-lymfocytů. IL-10 také zastavuje vývoj dendritických buněk a dozrávání makrofágů (Goudy K.S. et al., 2003). I exprese IL-10 byla u myší léčených sitagliptinem ze všech skupin nejnižší. Snížená exprese IL-10 i TGF β je velmi pravděpodobně dána útlumem NF-kB, který jsme při podávání sitagliptinu zaznamenali. Snížení exprese IL-10 po inhibici NF-kB publikovala ve své práci Ferreira (Ferreira V. et al., 1999). Naopak u skupiny léčené gusperimem byla exprese IL-10 signifikantně zvýšena v porovnání se skupinou léčenou sitagliptinem. Což bylo patrně dáno snahou o útlum dlouhotrvající zánětlivé reakce. Při zánětlivé reakci je pro organismus velmi důležité její včasné

ukončení, aby nedocházelo k nadměrnému poškození tkání. Negativní zpětnou vazbu při aktivaci NF- κ B zajišťuje zejména jeho inhibitor (I κ B). Členem skupiny I κ B je protein Bcl-3, který zprostředkovává útlum prozánětlivých genů a také usnadňuje expresi protizánětlivého genu IL-10 (Hayden M.S., Ghosh S., 2011). Utlumení NF- κ B v průběhu odeznívání zánětu může prodloužit zánětlivý proces a zabránit správné obnově tkáně (Lawrence T. et al., 2001). Snížená intenzita exprese NF- κ B1 v sitagliptinem léčené skupině, které byla signifikantní v porovnání se skupinou léčenou gusperimem, dává možné vysvětlení rozdílu v intenzitách exprese IL-10 u těchto dvou skupin.

Aktivace transkripčního faktoru NF- κ B je zásadní pro produkci cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a přežití aktivovaných buněk imunitního systému. NF- κ B blokuje buněčnou smrt navozením transkripce genů kódujících anti-apoptotické (Bcl2) a antioxidační proteiny (Baldwin A.S., 2012; Lawrence T. et al., 2001). Je to hlavní regulátor vrozené i získané imunity a zánětlivé odpovědi (Vallabhapurapu S., Karin M., 2009). Nukleární faktor kappa B (NF- κ B) je obecný termín pro transkripční faktor tvořený hetero- či homodimerizací proteinů skupiny rel. Skupina rel se skládá z pěti bílkovin: RelA, RelB a cRel, které obsahují transaktivační doménu, a z p50 a p52, které vznikají posttranslační úpravou prekurzorových proteinů p105 (NF- κ B1) a p100 (NF- κ B2). NF- κ B je obvykle držen v cytoplazmě v inaktivní formě prostřednictvím vazby s inhibičním proteinem skupiny I κ B. K uvolnění NF- κ B z vazby a jeho přesunu do jádra dochází v důsledku aktivace I κ B kinázy (IKK) působením prozánětlivých stimulů jako je TNF α či IL-1 β . Následná fosforylace molekul I κ B vede k jejich degradaci v proteozomu. IKK se skládá ze tří podjednotek: α , β a λ . IKK- β je zodpovědná za aktivaci NF- κ B v reakci na prozánětlivé stimuly (Brenner D. et al., 2015; Lawrence T. et al., 2001; Vallabhapurapu S., Karin M., 2009; Hayden M.S., Ghosh S., 2011). Zvýšená aktivace NF- κ B ve skupině léčené gusperimem byla patrná ze zvýšené intenzity genové exprese IKK- β (I κ bkb), což vedlo ke

zvýšení genové exprese Bcl2 při porovnání s diabetickou a zejména nediabetickou kontrolní skupinou.

Další známkou zvýšené prozánětlivé aktivace byla ve skupině léčené gusperimem zvýšená intenzita exprese TNF α oproti nediabetické kontrolní skupině. TNF α je cytokin s širokým spektrem účinků důležitých v rozvoji diabetu. Krátkodobé podávání protilátky proti TNF α u NOD myši s těsnou kontrolou diabetu vede k navození tolerance k vlastním antigenům, normoglykémii a k normální inzulinové signalizaci (Koulmanda M. et al., 2012). Je to silný mediátor zánětu, podněcuje buňky endotelu k tvorbě leukocytárních adhezivních molekul (E-selektin, VCAM, ICAM), zvyšuje vystavení molekul MHC I na povrchu velkého množství různých buněk (O'Garra A. et al., 1997). Navíc jako ukázkový člen rodiny tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) je jedním z nejúčinnějších aktivátorů klasické NF- κ B signalizace (Vallabhapurapu S., Karin M., 2009).

Při sledování infiltrace ostrůvku imunitními buňkami jsme v průběhu času pozorovali její pokles, což odpovídalo snižujícímu se množství beta buněk zbývajících v ostrůvcích. Z výsledků získaných v různých časových úsecích můžeme vyvodit, že pokles v infiltraci imunitními buňkami je pravděpodobně způsoben spíše nižším výskytem antigenů pocházejících z beta buněk než samotnou léčbou, jak se ve své práci domnívá Tian (Tian L. et al., 2010). Výrazný pokles ve skóre infiltrace ostrůvků ve skupině s kombinovanou léčbou se zdá být způsoben vyšší prozánětlivou aktivací již v úvodu studie s následným rychlým zánikem beta buněk. Tomu by odpovídal i nejvýraznější vzestup v množství alfa buněk. Díky poklesu ve skóre infiltrace ostrůvku ve všech diabetických skupinách nebyl na konci pokusu zaznamenán rozdíl při porovnání s nediabetickou kontrolní skupinou.

Mnohem citlivější ke sledování změn v infiltraci ostrůvků je sledování změn v jednotlivých stupních infiltrace. Při terapii mATG došlo 7. den k výraznému zesílení

infiltrace ostrůvků imunitními buňkami. Vzhledem k výraznému poklesu CD8⁺ T-lymfocytů a naopak nárůstu Tregs spolu se zvýšením hodnot TGFβ byl tento infiltrát nejspíše tvořen Tregs ve snaze ochránit beta buňky a utlumit místní zánětlivou reakci. Na konci studie už se skupina léčená mATG nelišila od ostatních. Při podávání samotného gusperimu nedošlo k poklesu ve stupních infiltrace. V pracích, kde byl podáván ještě před rozvojem diabetu, se ukázalo, že nezabraňuje usídlení autoreaktivních buněk v pankreatu, ale že spíše tlumí in situ jejich funkci (Strandell E., Sandler S., 1992; Di Marco R. et al., 1996). V případě manifestního diabetu, jak tomu bylo v našem pokusu, vedlo podávání gusperimu k udržování zánětlivé infiltrace i přes zánik beta buněk. Což bylo patrně dáno delším přežíváním aktivovaných T-lymfocytů v infiltrátu při zvýšené expresi antiapoptického proteinu Bcl2. Proto se gusperimová skupina na konci pokusu nelišila od nediabetické skupiny, kde byl také přítomen ve zvýšené míře 4. stupeň infiltrace, který byl v nediabetické skupině ale spojen s přítomností ještě funkčních beta buněk. U NOD myši je známo, že zánětlivá infiltrace ostrůvků stoupá s věkem zvířat (Makino S. et al., 1980). V diabetické kontrolní skupině došlo na konci pokusu k poklesu tíže postižení ve stupních infiltrace v porovnání s nediabetickou kontrolní skupinou a s hodnotami na počátku studie. Nejvýraznější byl pak tento pokles u skupiny léčené sitagliptinem a kombinovanou léčbou v porovnání s nediabetickou kontrolou. To bylo patrně dáno nejvýraznějším poškozením beta buněk podáváním sitagliptinu. U skupiny s kombinovanou léčbou byla výrazná zánětlivá infiltrace přítomna již na začátku studie, u skupiny léčené sitagliptinem byl nárůst infiltrace patrný 7. den následovaný poklesem do konce pokusu.

V době vytváření projektu pokusu jsme předpokládali, že změny v množství beta buněk v pankreatu by mohly být důležitým ukazatelem účinku léčby. Naše zjištění ovšem ukázala, že v době manifestace diabetu a zařazení myši do pokusu byla již většina beta buněk zničena a bylo téměř nemožné popsat změny v jejich množství. Ze všech studijních skupin

pouze léčba mATG se zdá být jedinou s účinkem na množství beta buněk. Nicméně vzestup v množství beta buněk nebyl nikterak výrazný a odpovídal nízkému výskytu remise diabetu. Tento nárůst mohl být způsoben pouze regranulací stávajících beta buněk, nikoli jejich novotvorbou, jak ve své práci poukazuje Sherry (Sherry N.A. et al., 2006). Tyto beta buňky jsou přítomny v pankreatu v době diagnózy diabetu, ale nejsou detekovatelné běžným barvením na inzulin, protože došlo k jejich degranulaci. Vhodnějším prostředkem k posouzení množství beta buněk se v tomto případě jeví barvení na GLUT2 (glukózový transportér 2). Ze současných poznatků, a je to i ve shodě s našimi nálezy, vyplývá, že léčba DPP-IV inhibitory nemá u starších hlodavců či u lidí vliv na zachování či zmnožení beta buněk, jak se původně předpokládalo z pokusů prováděných na mladých hlodavcích (Drucker D.J., 2013).

Nárůst v množství alfa buněk zaznamenaný ve všech skupinách je v souladu s předpokladem, že zničené beta buňky jsou nahrazovány narůstajícím množstvím alfa buněk (Li Z. et al., 2000; Takeda Y. et al., 2012). Replikace alfa buněk provázená zvýšením množství glukagonu má nejspíše zásadní roli v novotvorbě beta buněk parakrinní cestou, neboť pankreatický glukagon je potřebný k jejich tvorbě a diferenciaci (Prasadan K. et al., 2002). Ve skupině léčené sitagliptinem a ve skupině s kombinovanou léčbou byl tento nárůst nejvýznamnější. Možným vysvětlením je mechanismus působení sitagliptinu i na alfa buňky, ve kterých tlumí sekreci glukagonu s možným kontraregulačním mechanismem v podobě jejich zmnožení. Dalším vysvětlením může být, že exprese GLP-1 receptoru výrazně narůstá 15 den embryonálního vývoje a je ve zvýšené míře přítomna v dospělém pankreatu (Prasadan K. et al., 2002). To také mohlo vést k výraznějšímu zvětšení masy alfa buněk při podávání sitagliptinu. Vzestup v replikaci alfa buněk při podávání sitagliptinu publikoval také Ansarullah (Ansarullah et al., 2013). Alfa buňky mohou být i přímým zdrojem nových beta buněk jejich transdiferenciací. U dospělých

myši byla zaznamenána přeměna alfa buněk v beta buňky při jejich extrémní ztrátě (Thorel F. et al., 2010). I u lidí byl po roce podávání sitagliptinu zaznamenán nárůst v množství alfa buněk (Butler A.E. et al., 2013). Mechanismus zmnožení není přesně znám, protože se v alfa buňkách nepodařilo zachytit antigen Ki-67 (Drucker D.J., 2013). Ani nám se v našem pokusu nepodařilo zachytit pozitivitu Ki-67 společně s barvením na glukagon. Taktéž u beta buněk jsme nebyli schopni zachytit antigen Ki-67, dokonce ani ve skupinách léčených DPP-IV inhibítorem. Jedním z možných vysvětlení je, že barvení na Ki-67 nebo jen krátkodobé značení pomocí BrdU (bromodeoxyuridinu) není dostačující k označení beta buněk. U starších zvířat či u lidí je k účinnému značení replikujících beta buněk patrně nutné dlouhodobé podávání BrdU (Tian L. et al., 2010).

Neočekávaně nízký účinek léčby sitagliptinem může být, vedle negativního působení na NF- κ B, vysvětlen také jeho vlivem na koncentraci DPP-IV v myší plazmě. K našemu překvapení jsme zjistili, že tlumící účinek sitagliptinu byl pouze dočasný v průběhu prvního týdne, ačkoliv byl lék podáván v průběhu celé doby studie. Ve skupině s kombinovanou léčbou byl nárůst v koncentraci DPP-IV oproti hodnotám při podávání samotného sitagliptinu o něco opožděnější. V práci publikované Makdissim se výrazný a trvalý vzestup v koncentraci DPP-IV objevil druhý týden studie, kdy byl pacientům s diabetem mellitem 2. typu podáván sitagliptin. Tento nárůst není dán ztrátou inhibičního účinku sitagliptinu na enzymatickou aktivitu DPP-IV, která zůstává utlumena, ale nárůstem plasmatické koncentrace DPP-IV v podobě proteinu (Makdissi A. et al., 2012). Nicméně při diabetu dochází k vzestupu v aktivitě DPP-IV, jak již bylo popsáno u lidí (Mannucci E. et al., 2005). Stejný nález byl publikován také u NOD myši, kdy diabetické myši měly vyšší hodnoty v aktivitě DPP-IV oproti nediabetickým (Kim S.J. et al., 2010). Možným vysvětlením je opět kontraregulační mechanismus, kdy u diabetických myši byly nalezeny zvýšené hladiny plasmatického GLP-1 v porovnání s nediabetickými (Rydgren T. et al.,

2012), což patrně vede k zvýšené aktivitě DPP-IV. Při porovnání s nediabetickou kontrolní skupinou měla nejvyšší hodnoty koncentrace DPP-IV na konci pokusu skupina léčená gusperimem. Může to být dáno právě vyšší prozánětlivou aktivací při podávání gusperimu, neboť aktivované T-lymfocyty vykazují na svém povrchu zvýšené množství molekul CD26/DPP-IV (Salgado F.J. et al., 2012). Velmi zajímavý je poznatek, že u myší, u nichž bylo dosaženo remise, byly hodnoty DPP-IV oproti ostatním diabetickým skupinám sníženy. Nejvýraznější byl tento rozdíl opět v porovnání se skupinou léčenou gusperimem, naopak bez signifikance byl rozdíl vůči skupině s kombinovanou léčbou. U pacientů s DM1 v částečné klinické remisi byly nalezeny signifikantně nižší hodnoty GLP-1 a glukagonu v porovnání s pacienty bez remise (Kaas A. et al., 2012). Což by opět mohlo vysvětlovat změny v aktivitě DPP-IV a naznačovat, že u pacientů s DM1 možná není nárůst hodnot GLP-1 úplně žádoucí.

Z koeficientů asimilace glukózy se jednotlivé skupiny mezi sebou nelišily. Dle průběhu glykemických křivek v průběhu IPGTT lze vyvozovat, že nejhůře reagovaly beta buňky myší, jež dostávaly sitagliptin. Tento jev mohl být dán většími nároky na beta buňky při podávání sitagliptinu. Vyčerpané beta buňky pak již nejsou schopné reagovat na další zátěž. Ze studie REPAIR-T1D vyplývá, že podávání sitagliptinu s lansoprazolem pacientům s čerstvým záchytem diabetu vedlo k zvýšené potřebě inzulínu s možným rizikem, že podávání DPP-IV inhibitoru s inhibitorem protonové pumpy může spíše zhoršit než snížit poškození beta buněk (Griffin K.J. et al., 2014).

Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Cíl práce

Zjistit, zda kombinováním látky s imunosupresivním účinkem (mATG, gusperimus), s látkou, která podporuje obnovu pankreatických beta buněk (sitagliptin), dojde ke zpomalení či zvrácení průběhu diabetu u myší. A jakým mechanismem dané látky působí.

Hypotéza č. 1

Podávání imunosupresivních látek (mATG a gusperimus) povede k zastavení či ovlivnění autoimunitního procesu. Dojde k patrným změnám v imunitním systému s ochranou beta buněk pankreatu a případné remisi již rozvinutého diabetu.

Ad hypotéza č. 1

Zjistili jsme, že navzdory jasnému imunomodulačnímu účinku, který se projevil nárůstem regulačních a CD4⁺ T-lymfocytů, poklesem CD8⁺ T-lymfocytů a vzestupem sérové hodnoty TGFβ, není podávání samotného mATG dostatečně účinné k potlačení plně rozvinutého diabetu. Imunomodulační účinky gusperimu byly odraženy ve změně profilu genové exprese splenocytů, kde se projeví zvýšenou intenzitou exprese genů komplexu nukleárního faktoru kappa B, Bcl2, Tnf a Il10, ale další průběh pokročilého autoimunitně podmíněného diabetu ovlivnily spíše negativně. Tím se tato léčba neodrazila v námi požadovaných a očekávaných metabolických efektech.

Hypotéza č. 2

Podávání inhibitoru dipeptidyl peptidázy IV (DPP-IV) (sitagliptinu) povede k morfologickým změnám endokrinního pankreatu s možnou regenerací či proliferací beta buněk. Zaznamenané také změny v imunitním systému.

Ad hypotéza č. 2

Inhibice aktivity DPP-IV sitagliptinem nevedla k podpoře regenerace pankreatických beta buněk, ale došlo ke zmnožení alfa buněk pankreatu, které mohou za určitých okolností sloužit jako jejich prekurzor. Bez současného podávání inzulínu dochází při podávání sitagliptinu k nadměrné zátěži zbývajících beta buněk, což naopak vede k jejich rychlejšímu zániku. Dále jsme zjistili, že sitagliptin sice působí protizánětlivě snížením intensity exprese genu pro Nfkb1, ale současně tlumí tvorbu důležitých imunoregulačních cytokinů (IL-10 a TGFβ), které jsou důležité pro navození remise.

Hypotéza č. 3

Účinek kombinované léčby povede k lepším výsledkům než podávání vybraných látek samostatně. V případě úspěšného potlačení autoimunity imunopresivními látkami dojde vlivem podávání sitagliptinu k podpoře proliferace beta buněk s obnovením jejich masy.

Ad hypotéza č. 3

Zkombinováním léčby jsme nedosáhli lepších výsledků než při podávání vybraných látek samostatně, neboť gusperimus nevedl k potlačení autoimunitního procesu, jak jsme původně očekávali. Gusperimus v našem experimentu nebyl schopen zvrátit již rozběhlou zánětlivou reakci a z výsledků se zdá, že ji spíše udržuje. Sitagliptin sice tlumí

prozánětlivou aktivaci, ale vede k zániku beta buněk jejich nadměrným zatížením. Navíc také tlumí navození možné regulační odpovědi poklesem plazmatických hodnot TGF β .

Závěr a zhodnocení práce

V případě již manifestního diabetu se žádná z testovaných terapií nejeví dostatečně účinná k jeho zpomalení či dokonce zvrácení průběhu choroby a ani zkombinováním dvou odlišně působících látek se nepodařilo dosáhnout lepších výsledků. Výskyt remise diabetu byl pouze ojedinělý a byl spojen se sníženou koncentrací DPP-IV a zvýšenou koncentrací TGF β v krvi. Podávání sitagliptinu vedlo naopak ke snížení hodnot TGF β . Pozitivní vliv na hodnotu TGF β a žádoucí změnu v subpopulacích T-lymfocytů jsme zaznamenali pouze při podávání mATG. Gusperimus naopak udržoval zánětlivý proces v aktivní fázi se zvýšenou hodnotou DPP-IV.

Souhrn v českém jazyce

Nejvýraznější imunomodulační efekt na již manifestní autoimunitní diabetes měl mATG. Jeho podávání vedlo k výraznému poklesu CD8⁺ a nárůstu CD4⁺ T-lymfocytů a regulačních T-lymfocytů ve splenocytech a buňkách pankreatických lymfatických uzlin a vzestupu koncentrace TGFβ. Tyto imunomodulační efekty ale nebyly trvalé. Krátkodobé podávání samotného mATG nebylo tedy dostatečně účinné v období již plně rozvinutého diabetu.

Naproti tomu gusperimus podávaný v době již manifestního diabetu zánětlivou reakci spíše podporoval a udržoval, jak je patrné z profilu genové exprese splenocytů.

Inhibitor DPP-IV (sitagliptin) podávaný u plně rozvinutého autoimunitního diabetu vykazoval protizánětlivé účinky, ale současně bránil rozvoji regulační odpovědi útlumem sekrece TGFβ a exprese IL-10. Jeho podávání také nevedlo ke znatelné stimulaci regenerace beta buněk pankreatu a naopak se zdálo být pro beta buňky spíše škodlivé. Navíc koncentrace DPP-IV po úvodním poklesu následně kontinuálně stoupala.

Ani ve skupině s kombinovanou terapií jsme nepozorovali zlepšení měřených parametrů v porovnání s ostatními skupinami.

Vzhledem k tomu, že hodnoty regulačních T-lymfocytů se u myší v remisi nelišily od hodnot naměřených u ostatních diabetických zvířat, nemůžeme tento parametr považovat za důležitý pro dosažení remise. Vhodnější laboratorní ukazatele korelující s nastolenou remisí byly zvýšená koncentrace TGFβ a nízká koncentrace DPP-IV v krvi. Zejména hodnoty koncentrace DPP-IV se zdají být na základě výsledků našeho experimentu dobrým ukazatelem míry aktivace diabetogenních T-lymfocytů a mohly by tak sloužit k monitoraci úspěšnosti terapie, či jako mákr aktivovaných T-lymfocytů.

Souhrn v anglickém jazyce

The most pronounced immunomodulatory effect on overt type 1 diabetes had mATG. Its administration led to a marked decrease of CD8⁺, increase of CD4⁺ T-lymphocytes and Tregs in splenocytes and pancreatic lymph node cells and increased concentration of TGFβ in blood. However, these immunomodulatory effects were not durable. Therefore, the short term administration of mATG alone was not efficient in treatment of overt diabetes.

On the other hand, gusperimus administered in terms of fully developed diabetes facilitated and maintained the inflammatory reaction as can be concluded from the gene expression profile in splenocytes.

Inhibitor of DPP-IV (sitagliptin) displayed anti-inflammatory effects but concomitantly hampered the regulatory response by the decreased secretion of TGFβ and expression of IL-10. Its administration also did not cause an apparent stimulation of beta cell regeneration and conversely was seemed to be harmful for beta cells. Moreover, the concentration of DPP-IV kept rising after preliminary decrease.

In the combined group we did not observe any improvement in tested parameters when compared to the other groups.

The values of regulatory T-lymphocytes in mice with remission were almost the same as in other diabetic animals. With regard to that, we cannot consider this parameter important for remission achievement. More suitable laboratory parameters correlating with remission were increased concentration of TGFβ and low concentration of DPP-IV in blood. According to the results of our experiment, the DPP-IV concentration values seem to be a suitable marker of diabetogenic T-lymphocytes activation and the DPP-IV concentration in blood could be potentially used for monitoring of the therapeutic effect or as a marker of activated T-lymphocytes.

Literatura

Anderson M.S., Bluestone J.A., 2005, The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*, 23: 447-85.

Ansarullah et al., 2013, Stimulating beta-cell regeneration by combining a GPR119 agonist with a DPP-IV inhibitor. *PLoS One*, 8 (1): e53345.

Baldwin A.S., 2012, Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF-kappaB: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol Rev*, 246 (1): 327-45.

Biton A. et al., 2006, Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) and aminopeptidase N (APN, CD13) as regulators of T cell function and targets of immunotherapy in CNS inflammation. *Adv Exp Med Biol*, 575: 177-86.

Bluestone J.A. et al., 2010, Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464 (7293): 1293-300.

Brenner D. et al., 2015, Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature Reviews. Immunology* 15(6):362-74.

Broere F. et al., 2011, T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology: 3rd revised and extended edition*, A2:15-27.

Butler A.E. et al., 2013, Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors. *Diabetes*, 62 (7): 2595-604.

Chatenoud L. et al., 1997, CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J. Immunol.*, 158: 2947-2954.

Chen G. et al., 2008, Essential roles of TGF-beta in anti-CD3 antibody therapy: reversal of diabetes in nonobese diabetic mice independent of Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 83 (2): 280-7.

Chentoufi A.A. et al., 2008, Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms. *Scand J Immunol*, 68 (1): 1-11.

Cinek O. et al., 2012, The incidence of type 1 diabetes in young Czech children stopped rising. *Pediatr Diabetes*, 13 (7): 559-63.

Di Marco R. et al., 1996, Synergistic effect of deoxyspergualin (DSP) and cyclosporin A (CsA) in the prevention of spontaneous autoimmune diabetes in BB rats. *Clin Exp Immunol*, 105 (2): 338-43.

Diegel M.L. et al., 2002, In vivo administration of 15-deoxyspergulin inhibits antigen-presenting cell stimulation of T cells and NF-kappaB activation. *Int Immunopharmacol*, 2 (10): 1451-64. v

- Driver J.P. et al., 2011, Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol*, 33 (1): 67-87.
- Drucker D.J., 2003, Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, 144 (12): 5145-8.
- Drucker D.J., 2013, Incretin action in the pancreas: potential promise, possible perils, and pathological pitfalls. *Diabetes*, 62 (10): 3316-23.
- ElEssawy B., Li X.C., 2015, Type 1 diabetes and T regulatory cells. *Pharmacol Res*, 98: 22-30.
- Ellis S.L. et al., 2011, Effect of sitagliptin on glucose control in adult patients with Type 1 diabetes: a pilot, double-blind, randomized, crossover trial. *Diabet Med*, 28 (10): 1176-81.
- Fadok V.A. et al., 1998, Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101 (4): 890-8.
- Feng X. et al., 2008, Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. *Blood*, 111 (7): 3675-83.
- Ferreira V. et al., 1999, In vivo inhibition of NF-kappa B in T-lineage cells leads to a dramatic decrease in cell proliferation and cytokine production and to increased cell apoptosis in response to mitogenic stimuli, but not to abnormal thymopoiesis. *J Immunol*, 162 (11): 6442-50.
- Feurerer M. et al., 2009, Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol*, 10 (7): 689-95.
- Flossmann O., Jayne D.R., 2010, Long-term treatment of relapsing Wegener's granulomatosis with 15-deoxyspergualin. *Rheumatology (Oxford)*, 49 (3): 556-62.
- Fujii H. et al., 1992, Deoxyspergualin, a novel immunosuppressant, markedly inhibits human mixed lymphocyte reaction and cytotoxic T-lymphocyte activity in vitro. *Int J Immunopharmacol*, 14 (4): 731-7.
- Goudy K.S. et al., 2003, Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *J Immunol*, 171 (5): 2270-8.
- Griffin K.J. et al., 2014, Combination therapy with sitagliptin and lansoprazole in patients with recent-onset type 1 diabetes (REPAIR-T1D): 12-month results of a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2 (9): 710-8.
- Haberstroh J. et al., 1995, Prevention of type I diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse with 15-deoxyspergualin (15-DS) or 15-DS + cyclosporin A (CyA). *Immunol Lett*, 48 (2): 117-21.

- Hadjiyanni I. et al., 2008, Exendin-4 modulates diabetes onset in nonobese diabetic mice. *Endocrinology*, 149 (3): 1338-49.
- Hayden M.S., Ghosh S., 2011, NF- κ B in immunobiology. *Cell Research* 21(2):223-44.
- Herold K.C. et al., 2005, A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3 γ 1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes*, 54 (6): 1763-9.
- Herold K.C. et al., 2002, Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 346 (22): 1692-8.
- Kaas A. et al., 2012, Proinsulin, GLP-1, and glucagon are associated with partial remission in children and adolescents with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*, 13 (1): 51-8.
- Keenan H.A. et al., 2010, Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes*, 59 (11): 2846-53.
- Keymeulen B. et al., 2005, Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*, 352 (25): 2598-608.
- Kielgast U. et al., 2011, Antidiabetic actions of endogenous and exogenous GLP-1 in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. *Diabetes*, 60 (5): 1599-607.
- Kim S.J. et al., 2010, Sitagliptin (MK0431) inhibition of dipeptidyl peptidase IV decreases nonobese diabetic mouse CD4⁺ T-cell migration through incretin-dependent and -independent pathways. *Diabetes*, 59 (7): 1739-50.
- Knip M., Siljander H., 2008, Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev*, 7 (7): 550-7.
- Koulmanda M. et al., 2012, The role of TNF- α in mice with type 1- and 2- diabetes. *PLoS One*, 7 (5): e33254.
- Kutoh E., 2011, Sitagliptin is effective and safe as add-on to insulin in patients with absolute insulin deficiency: a case series. *J Med Case Rep*, 5: 117.
- Lawrence T. et al., 2001, Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nat Med*, 7 (12): 1291-7.
- Lehuen A. et al., 2010, Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*, 10 (7): 501-13.
- Li Y. et al., 2003, Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem*, 278 (1): 471-8.
- Li Z. et al., 2000, Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *J Endocrinol*, 165 (1): 93-9.

Lopez M. et al., 2006, A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol*, 17 (10): 2844-53.

Lorenz H.M. et al., 2011, Treatment of active lupus nephritis with the novel immunosuppressant 15-deoxyspergualin: an open-label dose escalation study. *Arthritis Res Ther*, 13 (2): R36.

Ludvigsson J. et al., 2008, GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*, 359 (18): 1909-20.

Luo X. et al., 2005, Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation*, 79 (9): 1091-6.

Makdissi A. et al., 2012, Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab*, 97 (9): 3333-41.

Maki T. et al., 1992, Long-term abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice by immunotherapy with anti-lymphocyte serum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (8): 3434-8.

Makino S. et al., 1980, Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*, 29 (1): 1-13.

Mannucci E. et al., 2005, Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 48 (6): 1168-72.

McDonald P.P. et al., 1999, Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol*, 163 (11): 6164-72.

McHugh M.D. et al., 2015, Paracrine co-delivery of TGF-beta and IL-2 using CD4-targeted nanoparticles for induction and maintenance of regulatory T cells. *Biomaterials*, 59: 172-81.

Mellanby R.J. et al., 2007, Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunology*, 121 (1): 15-28.

Mochida-Nishimura K., Tokunaga T., 1996, Treatment with 15-deoxyspergualin induces temporal suppression of hemopoiesis and changes thymocyte populations in mice. *Immunopharmacology*, 35 (1): 65-70.

Mottram P.L. et al., 2002, Remission and pancreas isograft survival in recent onset diabetic NOD mice after treatment with low-dose anti-CD3 monoclonal antibodies. *Transpl Immunol*, 10 (1): 63-72.

Nadler S.G. et al., 1995, Elucidating the mechanism of action of the immunosuppressant 15-deoxyspergualin. *Ther Drug Monit*, 17 (6): 700-3.

Nathan D.M., 2015, Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. JAMA 314(10):1052-62.

Nicoletti F. et al., 1993, Prevention of cyclophosphamide-induced diabetes in the NOD/WEHI mouse with deoxyspergualin. Clin Exp Immunol, 91 (2): 232-6.

O'Garra A. et al., 1997, CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. Current Opinion in Immunology 9(6):872-83.

Ogawa N. et al., 2004, Cure of overt diabetes in NOD mice by transient treatment with anti-lymphocyte serum and exendin-4. Diabetes, 53 (7): 1700-5.

Olivieri A. et al., 2010, Serum transforming growth factor beta1 during diabetes development in non-obese diabetic mice and humans. Clin Exp Immunol, 162 (3): 407-14.

Pelikánová T. et al., 2012, Praktická diabetologie. 5. vydání. Maxdorf Jessenius.

Pospisilik J.A. et al., 2003, Dipeptidyl peptidase IV inhibition in animal models of diabetes. Adv Exp Med Biol, 524: 281-91.

Prasadan K. et al., 2002, Glucagon is required for early insulin-positive differentiation in the developing mouse pancreas. Diabetes, 51 (11): 3229-36.

Price J.D. et al., 2013, Effects of short-term sitagliptin treatment on immune parameters in healthy individuals, a randomized placebo-controlled study. Clin Exp Immunol, 174 (1): 120-8.

Reinhold D. et al., 1997, Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) induces secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes. Immunol Lett, 58 (1): 29-35.

Rydgren T. et al., 2012, Elevated glucagon-like peptide-1 plasma levels, as a possible adaptive response, in diabetic NOD mice. Biochem Biophys Res Commun, 423 (3): 583-7.

Sakaguchi S. et al., 2010, FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol, 10 (7): 490-500.

Salgado F.J. et al., 2012, CD26: a negative selection marker for human Treg cells. Cytometry A, 81 (10): 843-55.

Saudek F. et al., 2004, Polyclonal anti-T-cell therapy for type 1 diabetes mellitus of recent onset. Rev Diabet Stud, 1 (2): 80-8.

Schorlemmer H.U., Seiler F.R., 1991, 15-Deoxyspergualin (15-DOS) for therapy in an animal model of multiple sclerosis (MS): disease modifying activity on acute and chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Agents Actions, 34 (1-2): 156-60.

Sherry N.A. et al., 2007, Exendin-4 improves reversal of diabetes in NOD mice treated with anti-CD3 monoclonal antibody by enhancing recovery of beta-cells. Endocrinology, 148 (11): 5136-44.

- Sherry N.A. et al., 2006, Effects of autoimmunity and immune therapy on beta-cell turnover in type 1 diabetes. *Diabetes*, 55 (12): 3238-45.
- Shoda L.K. et al., 2005, A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity*, 23 (2): 115-26.
- Simon G. et al., 2008, Murine antithymocyte globulin therapy alters disease progression in NOD mice by a time-dependent induction of immunoregulation. *Diabetes*, 57 (2): 405-14.
- Skowera A. et al., 2008, CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J Clin Invest*, 118 (10): 3390-402.
- Stegall M.D. et al., 1996, Autoimmune destruction of islet grafts in the NOD mouse is resistant to 15-deoxyspergualin but sensitive to anti-CD4 antibody. *J Surg Res*, 64 (2): 156-60.
- Steinbrecher A. et al., 2001, Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and up-regulates TGF-beta 1 secretion in vivo. *J Immunol*, 166 (3): 2041-8.
- Strandell E., Sandler S., 1992, Protection against hyperglycemia in female nonobese diabetic mice treated with 15-deoxyspergualin. *Autoimmunity*, 14 (2): 159-65.
- Suarez-Pinzon W.L. et al., 2009, Combination therapy with a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and a proton pump inhibitor restores normoglycaemia in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*, 52 (8): 1680-2.
- Suarez-Pinzon W.L. et al., 2008, Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin induces beta-cell neogenesis from pancreatic duct cells in human islets transplanted in immunodeficient diabetic mice. *Cell Transplant*, 17 (6): 631-40.
- Suarez-Pinzon W.L. et al., 2008, Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin restores normoglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes*, 57 (12): 3281-8.
- Suen C.S., Burn P., 2012, The potential of incretin-based therapies in type 1 diabetes. *Drug Discov Today*, 17 (1-2): 89-95.
- Takagishi K. et al., 1990, Effects of deoxyspergualin on collagen arthritis in mice. *Clin Immunol Immunopathol*, 56 (1): 81-7.
- Takeda Y. et al., 2012, Reduction of both beta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice. *Diabetologia*, 55 (2): 404-12.
- Thomas J.M. et al., 1999, Peritransplant tolerance induction in macaques: early events reflecting the unique synergy between immunotoxin and deoxyspergualin. *Transplantation*, 68 (11): 1660-73.

- Thorel F. et al., 2010, Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464(7292):1149-54.
- Tian B. et al., 2009, Upregulating CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in pancreatic lymph nodes in diabetic NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Transplantation*, 87 (2): 198-206.
- Tian L. et al., 2010, Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating beta-cell replication in nonobese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Endocrinology*, 151 (7): 3049-60.
- Tsuji T. et al., 2012, Oral therapy for type 1 diabetes mellitus using a novel immunomodulator, FTY720 (fingolimod), in combination with sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, examined in non-obese diabetic mice. *J Diabetes Investig*, 3 (5): 441-8.
- Vallabhapurapu S., Karin M., 2009, Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 27: 693-733.
- van Belle T.L. et al., 2011, Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*, 91 (1): 79-118.
- Vergani A. et al., 2010, A novel clinically relevant strategy to abrogate autoimmunity and regulate alloimmunity in NOD mice. *Diabetes*, 59 (9): 2253-64.
- Wang B. et al., 1996, The immunosuppressant 15-deoxyspergualin [correction of 1,5-deoxyspergualin] reveals commonality between preT and preB cell differentiation. *J Exp Med*, 183 (6): 2427-36.
- Whalen B.J. et al., 2001, The BB rat as a model of human insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15, Unit 15, 3.
- Xia C.Q. et al., 2012, Anti-thymocyte globulin (ATG) differentially depletes naive and memory T cells and permits memory-type regulatory T cells in nonobese diabetic mice. *BMC Immunol*, 13: 70.
- Xu G. et al., 2006, GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes Res Clin Pract*, 73 (1): 107-10.
- Xue S. et al., 2008, Exendin-4 therapy in NOD mice with new-onset diabetes increases regulatory T cell frequency. *Ann N Y Acad Sci*, 1150: 152-6.
- Zhang J. et al., 2007, Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia*, 50 (9): 1900-9.

Seznam publikací

1. Publikace, které jsou podkladem disertace

a) s impakt faktorem

L. Vargova, K. Zacharovova, E. Dovolilova, L. Vojtova, F. Saudek: Immunoregulatory effect of anti-thymocyte globulin monotherapy for peripheral lymphoid tissues of non-obese diabetic (NOD) mice. *Transplantation Proc.* 2011 Nov;43(9):3277-80, **IF 1,005**

L. Vargova, K. Zacharovova, E. Dovolilova, L. Vojtova, Z. Cimburek, F. Saudek: The Effects of DPP-IV Inhibition in NOD Mice with Overt Diabetes. *Folia Biologica (Praha)* 59, 116-122 (2013), **IF 0,778**

2. Publikace bez vztahu k tématu disertace

a) s impakt faktorem

T. Koblas, **L. Pektorova**, K. Zacharovova, Z. Berkova, P. Girman, E. Dovolilova, L. Karasova, F. Saudek: Differentiation of CD133-Positive Pancreatic Cells Into Insulin-Producing Islet-Like Cell Clusters. *Transplantation Proc.* 2008;40(2):415 – 418, **IF 1,055**

Leontovyc I, Koblas T, **Pektorova L**, Zacharovova K, Berkova Z, Saudek F.: The effect of epigenetic factors on differentiation of pancreatic progenitor cells into insulin-producing cells. *Transplant Proc.* 2011 Nov;43(9):3212-6, **IF 1,005**

M. Varga, M. Kudla, **L. Vargova**, J. Fronek: Cholecystectomy for Acute Cholecystitis after Renal Transplantation. *Transplant Proc.* 2016 přijato k publikaci, TransProc1988R1, **IF 0,982**

b) bez impakt faktoru

Balamurugan, A.N.; Green, M.L.; Breite, A.G.; Loganathan, G.; Wilhelm, J.J.; Tweed, B.; **Vargova, L.**; Lockridge, A.; Kuriti, M.; Hughes, M.G.; Williams, S.K.; Hering, B.J.; Dwulet, F.E.; McCarthy, R.C.: Identifying Effective Enzyme Activity Targets for Recombinant Class I and Class II Collagenase for Successful Human Islet Isolation. *Transplantation Direct*, January 2016, Volume 2, Issue 1, p e54

Saudek F, Girman P, Kříž J, Berková Z, Zacharovová K, Koblas T, **Pektorová L**, Vávrová E, Mindlová M, Habart D, Peregrin J, Lipár K, Oliverius M, Dovolilová E, Číhalová E, Bobek V.: Islet transplantation for treatment of type-1 diabetes mellitus. *Cas Lek Cesk.* 2011; 150(1): 49-55.

prof. MUDr. František Saudek, DrSc., MUDr. **Lenka Pektorová**: Rapamycin a diabetes: přítel, či nepřítel? *Remedia.* 2009; 2/2009: Rubrika PND.

Seznam příloh

Příloha 1

L. Vargova, K. Zacharovova, E. Dovolilova, L. Vojtova, F. Saudek: Immunoregulatory effect of anti-thymocyte globulin monotherapy for peripheral lymphoid tissues of non-obese diabetic (NOD) mice. Transplantation Proceedings, 2011 Nov;43(9):3277-80, IF 1,005

Příloha 2

L. Vargova, K. Zacharovova, E. Dovolilova, L. Vojtova, Z. Cimburek, F. Saudek: The Effects of DPP-IV Inhibition in NOD Mice with Overt Diabetes. Folia Biologica (Praha) 59, 116-122 (2013), IF 0,778

Příloha 1

Immunoregulatory Effect of Anti-thymocyte Globulin Monotherapy of Peripheral Lymphoid Tissue of Non-obese Diabetic Mice

*L. Vargova, K. Zacharovova, E. Dovolilova, L. Vojtova, Z. Cimburek, F.
Saudek*

Transplantation Proceedings

2011, 43(9):3277-80, ISSN: 0041-1345



Immunoregulatory Effect of Anti-thymocyte Globulin Monotherapy on Peripheral Lymphoid Tissues of Non-obese Diabetic Mice

L. Vargova, K. Zacharovova, E. Dovolilova, L. Vojtova, and F. Saudek

ABSTRACT

Objective. Experimental and clinical studies have shown that autoimmunity-causing diabetes may be abrogated by immune intervention. Several anti-T-lymphocyte antibodies focus on distinct T-cell targets. We tested the effect of murine anti-thymocyte globulin (ATG; Genzyme, Framingham, MA) in peripheral lymphoid organs of non-obese diabetic (NOD) mice after the onset of hyperglycemia.

Methods. Diabetic NOD mice were treated with two doses of ATG (1 mg totally) or maintained without treatment as controls. Blood glucose levels were monitored twice a week. The mice were terminated at day 0, 7, 14, or 28 after the initiation of the study. Subpopulations of T-lymphocytes and FoxP3+ (forkhead box P3 positive) regulatory T-cells were analyzed among elements isolated from the spleen and pancreatic lymph nodes.

Results. Mice with blood glucose levels greater than 13 mmol/L were included in the study. Diabetes remission occurred in 16% (3/19) of mice treated with ATG. Only one case of remission was observed in the control group (6%; 1/16). ATG therapy significantly decreased the CD8+/CD4+ T-lymphocyte ratio. Among splenocytes, a significant difference was detected only on day 7 (0.069 versus 0.198 T-lymphocyte ratio); in lymph nodes, a decrease was observed on day 28 (0.21 versus 0.51 T-lymphocytes ratio). The regulatory T-cells population increased after ATG administration compared with the control group at day 7 (16.2% versus 10.8% in CD4+ splenocytes; 20.7% versus 10.3% in CD4+ lymph node cells). However, the increased FoxP3+ cell population was not durable.

Conclusions. ATG treatment of diabetic NOD mice showed an immunoregulatory effect in peripheral lymphoid tissue with a significantly decreased CD8+/CD4+ ratio, which, however, did not normalize the metabolic parameters in a short period after the onset of overt diabetes.

SEVERAL groups have reported positive effects of anti-thymocyte globulin (ATG),¹ anti-lymphocyte serum,² or anti-CD3 antibody³ therapies to treat newly established autoimmune diabetes in experimental models as well as in humans.^{4,5} Anti-lymphocyte therapy has been shown to retard the progression of β -cell loss maintaining or improving insulin production. Responses were also associated with a change in the ratio of CD4+ T cells to CD8+ T cells.⁶ Recently this treatment has been reported to rapidly expand CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells.⁷ According to ClinicalTrials.gov, several randomized prospective studies with the use of humanized anti-CD3 antibodies or ATG in type 1 diabetes of recent onset are currently in progress.⁸ At present, our group has performed a random-

ized prospective clinical study using polyclonal anti-T-cell globulin.⁹ Only a few experimental studies have been performed in diabetic mouse models. As they are more relevant to clinical studies in humans with recent onset of

From the Diabetes Department (L.V., F.S.), and the Department of Experimental Medicine (K.Z., E.D., L.V.), Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Supported by Grant number GA P304/10/0762 from the Czech Science Foundation.

Address reprint requests to Lenka Vargova, Diabetes Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic. E-mail: lept@medicon.cz

diabetes, we sought to examine the efficacy to cure diabetes of murine anti-thymocyte globulin (mATG) in diabetic non-obese diabetic (NOD) mice. In contrast to previous studies, we investigated the effects of therapy on peripheral lymphoid tissues, which may be important to re-establish immune tolerance in diabetes.

METHODS

Mice and Monitoring for Diabetes

Female NOD mice (strain NOD/ShiLtJ) were housed in specialized ventilated breeding boxes equipped with air filtration, and provided with autoclaved water and food ad libitum. Blood glucose levels were measured from the tip of the tail. Mice with glycemia levels greater than 13 mmol/L after two consecutive measurements were included in the study groups. Treatment was initiated within 1 week from the diabetic manifestations (blood glucose level > 13 mmol/L). The age of the mice included in the study was 12 to 30 weeks. Diabetic mice were randomized into four groups with termination at days 0, 7, 14, and 28 after the initiation of the study. Blood glucose levels were monitored twice a week throughout the study period. No exogenous insulin was administered. This study was approved by the local Committee for the Protection of Animals Against Cruelty.

ATG Administration

Diabetic NOD mice were treated with two doses of intraperitoneally administered mATG (Genzyme, Framingham, MA) at days 0 and 4 (1 mg totally) or maintained without treatment as controls.

Intraperitoneal Glucose Tolerance Test

Intraperitoneal glucose tolerance testing (IPGTT) was performed on day 24. After overnight fasting, glucose (1 mg/g body weight) was provided by intraperitoneal injection of 10% glucose solution. Blood glucose values were obtained at 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 minutes using a Performa Nano (Roche, Basel, Switzerland) meter. We determined the coefficient of glucose assimilation.

Flow Cytometry

On the day of termination, the mice were sacrificed to remove the spleen and pancreatic lymph nodes. Splenocytes isolated by mild dissociation in Iscove's modified Dulbecco's medium were separated by gradient centrifugation in Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Lymph node cells were isolated by dissociation of nodes through 60- μ m mesh. Isolated cells were labelled for flow

cytometric analysis. We used fluorescent antibodies against surface antigens CD3, CD4, CD8, CD25 (A488 anti-CD3, eBioscience, San Diego, USA; Qdot605 anti-CD4, Invitrogen, Eugene, USA; PerCP-Cy5.5 anti-CD8, eBioscience; APC anti-CD25, produced in Institute of Microbiology ASCR, Prague, Czech Republic). Subsequently, the fixed cells were permeabilized (FoxP3 Staining Buffer Set, eBioscience) with the intracellular antigen FoxP3 labelled using a PE-conjugated antibody (eBioscience) for comparison with staining using appropriate PE-conjugated isotype controls (eBioscience). The labelled cells were analyzed using the flow cytometer LSR II with FACSDiva software (BD, San Jose, USA).

Subpopulations and CD4+ and CD8+ T-lymphocyte ratios were determined as well as FoxP3+ regulatory T-cells analyzed among the CD3+ CD4+ CD25+ cell population.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Student *t* test. All data are presented as mean values \pm standard deviation. *P* values < .05 were deemed significant.

RESULTS

Mice with blood glucose levels higher than 13 mmol/L after two consecutive measurements were included in the study. Diabetes remission (sustained glycemia at levels less than 13 mmol/L) occurred in 16% (3/19) of mice treated with ATG. In all of them, the pre-treatment blood glucose was 15.6 mmol/L and less. Only one case of remission was observed in the control group (6%; 1/16; Fig 1). Mice were maintained without exogenous insulin administration. Although the IPGTT was out of normal range in all diabetic animals, the coefficient of glucose assimilation was significantly higher among the ATG group (0.36 versus 0.12 mmol/L/min; *P* < .05).

We observed the effect of polyclonal anti-lymphocyte antibodies on the ratio of cytotoxic and helper T-cells populations. ATG therapy lead to a significant decrease in CD8+/CD4+ T-lymphocyte ratio compared with the control group. Among splenocytes, a significant difference was detected only on day 7 (0.069 in mATG group versus 0.198 in control group, *P* = .001); whereas lymph node cells showed a decrease even on day 28 (0.21 in mATG group versus 0.51 in control group, *P* = .003) Similarly, the

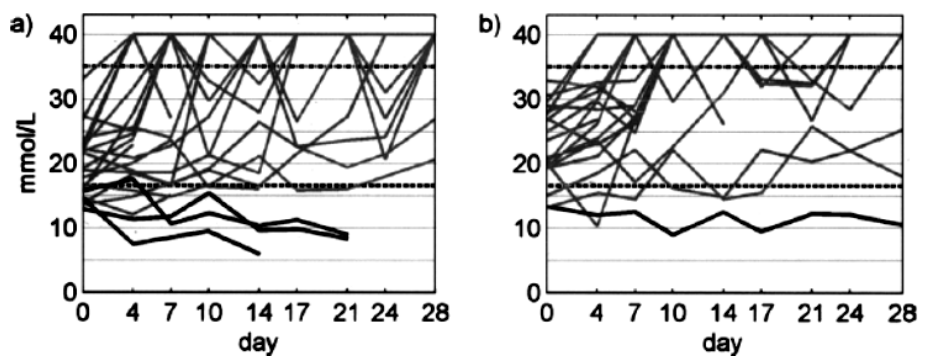


Fig 1. Glycemia (A) after mATG administration, (B) control group. Data represent blood glucose values from individual animals. Bottom line represents our threshold of initial glucose level crucial for remission. Upper line represents glucose levels up to 35 mmol/L. All the animals did not receive any exogenous insulin.

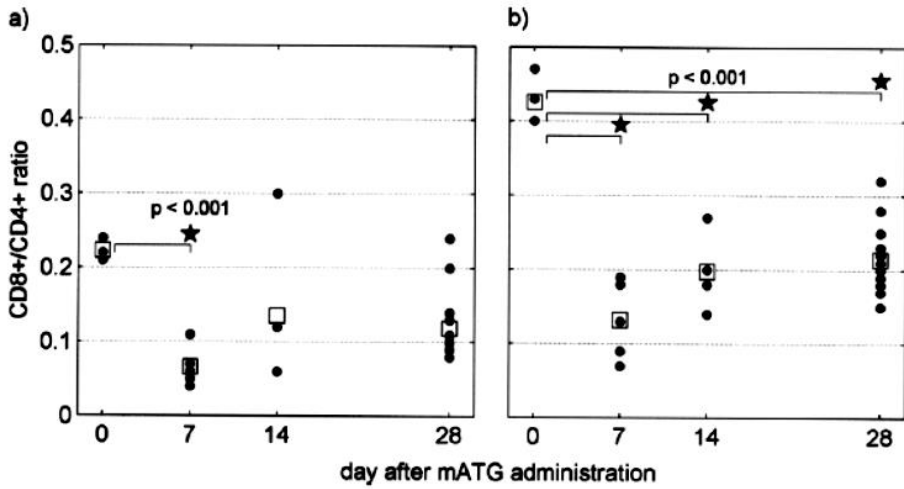


Fig 2. CD8+/CD4+ T-lymphocyte ratio after mATG administration. ATG therapy lead to a significant decrease of CD8+/CD4+ T-lymphocyte ratio within the mATG group in comparison to pre-administration values. **(A)** In splenocytes, a significant difference was detected only on day 7 (0.22 at day 0 versus 0.069 at day 7; $P < .001$) **(B)** In lymph nodes, a decrease was found even on day 28 (0.43 at day 0 versus 0.21 at day 28; $P < .001$). □ represents mean value, ★ represents P value < .05.

differences were detected within the mATG group compared with pre-administration values (Fig 2).

The regulatory T-cell population (Treg, % of FoxP3+ cells among the CD4+ cells) was significantly increased after ATG administration among splenocytes, namely, from 9.1% at day 0 to 16.2% at day 7 ($P = .03$). On day 14, the FoxP3+ population was still increased (15.8%, $P = .02$) but at day 28 they had decreased to 12.2%. Among control group the Treg population among splenocytes was constant; namely, 9.6% at day 0, 10.8% at day 7, 9.7% at day 14, and 10.3% at day 28. However, the difference between the mATG and the control group was significant only on day 14 ($P = .02$). Among lymph node cells, the Treg population was also increased after mATG administration from 8.1% to 20.7% at day 7 ($P = .0008$). The gradual decrease in the

Treg population during this time was lower than among splenocytes and Treg population kept higher from day 0 to day 28; 14.6% at day 14 ($P = .008$), and 13.5% at day 28 ($P = .03$; Fig 3). However, because the mild increase in the Treg population among the control group, a significant difference between groups was only detected at day 7 ($P = .001$) The Treg population in controls was 8.2% at day 0, 10.3% at day 7, 11.2% at day 14, and 12.1% at day 28.

DISCUSSION

ATG treatment of diabetic NOD mice showed only partial metabolic improvement among already hyperglycemic NOD mice. Most of the successful studies were performed previously on pre-diabetic mice. Of the 463 agents evalu-

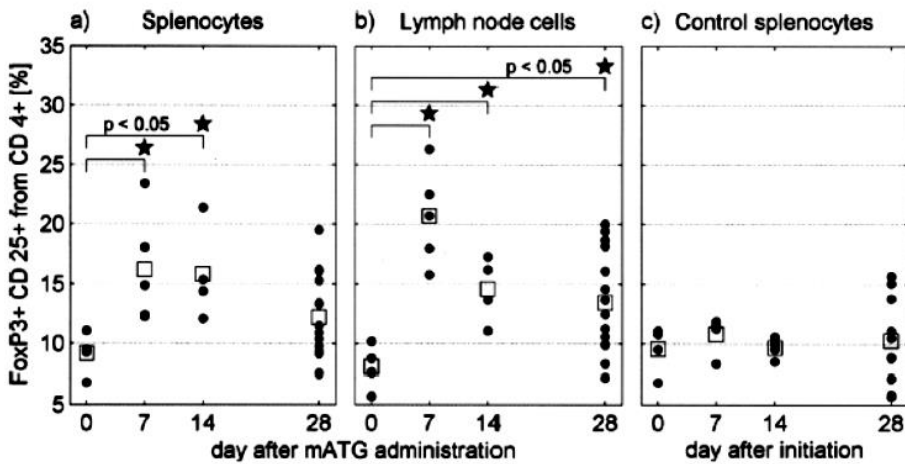


Fig 3. Regulatory T-cell population after mATG administration in splenocytes **(A)**, in lymph node cells **(B)** and in splenocytes **(C)** of control group. Population of the regulatory T-cells was increased after mATG administration in comparison to the control group and within the mATG group in comparison to pre-administration values as well. In splenocytes, the increase of regulatory T-cells was significant only 2 weeks after mATG administration (9.1% at day 0 versus 15.8% at day 14; $P = .02$). In lymph node cells, the increase was significant until the end of the experiment (8.1% at day 0 versus 13.5% at day 28; $P = .03$). In the control group, the FoxP3+ population did not change. □ represents mean value, ★ represents P value < .05.

ated in the intervention diabetic studies, only 23 protocols were initiated in diabetic NOD mice with 16 considered successful.¹⁰ Also, a failure of ATG treatment to reverse overt diabetes was recently published. Our results are consistent with recently published data using ATG treatment of acutely induced rat insulin promoter-lymphocytic choriomeningitis virus (RIP-LCMV). In this study, mATG did not reverse diabetes among newly diabetic RIP-LCMV mice.¹¹ Although ATG treatment alone did not cure diabetes, there were metabolic effects.

We have experience with a clinical immunointervention study using polyclonal rabbit anti-T-cell globulin administered to new onset type 1 diabetes patients. The pilot study comprised 25 subjects followed for 2 years who showed considerable preservation of residual C-peptide production and lower insulin requirements compared with a control group. In addition, a sustained conversion of CD4+/CD8+ cell ratio in peripheral blood cells suggested an immunoregulatory effect. The effect seemed to be comparable to that reported with the use of humanized monoclonal anti-CD3 antibodies. Recently, we observed a significant increase in FoxP3+ population for 9 months after ATG administration (data not published). The Treg population was assessed by flow cytometry on frozen samples of lymphocytes obtained during the study. In clinical terms, this was a unique result.⁹

In the NOD mouse model, an effect of mATG was shown by a greater rate of diabetes remission which was dependent on the blood glucose levels at the time of the mATG administration namely initial glycemia less than 15.6 mmol/L. mATG produced a significant difference in glucose assimilation rates. The efficiency of treatment depended on the level of initial glycemia. A further relevant aspect for treatment efficiency is the time between manifestation of diabetes and treatment initiation.^{2,12}

The main effect of mATG treatment was evident in T-lymphocyte subpopulations. We observed that mATG administration decreased the CD8+/CD4+ T-lymphocyte ratio in splenocytes and pancreatic lymph node cells, favoring Tregs. We confirmed an increase in the regulatory T-cell population after mATG administration in splenocytes as well as in lymph node cells. The influence of anti T-cell therapy on the regulatory T-cell population has been shown in clinical and experimental studies in vitro and in vivo.^{7,13} Compared with data published by another group,¹ we observed a significant increase in Tregs among pancreatic lymph node cells up to the end of our study (day 28). However, the regulatory T-cell increase was transient, and over time the population apparently decreased. Better

results may be obtained with more prolonged mATG treatment.¹⁴

To conclude, mATG treatment alone produced an immunoregulatory effect in peripheral lymphoid tissue, although it was not sufficient to cure NOD mice with established overt diabetes. Better results in NOD mice were achieved in studies using a pre-diabetic model or with a longer study period combined with insulin therapy.

REFERENCES

1. Simon G, Parker M, Ramiya V, et al: Murine antithymocyte globulin therapy alters disease progression in NOD mice by a time-dependent induction of immunoregulation. *Diabetes* 57:405, 2008
2. Maki T, Ichikawa T, Blanco R, et al: Long-term abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice by immunotherapy with anti-lymphocyte serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3434, 1992
3. Chatenoud L, Primo J, Bach JF: CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* 158:2947, 1997
4. Herold KC, Gitelman SE, Masharani U, et al: A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54:1763, 2005
5. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, et al: Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 352:2598, 2005
6. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, et al: Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346:1692, 2002
7. Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, et al: Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. *Blood* 111:3675, 2008
8. ClinicalTrials.gov [web site]. Available at: <http://clinicaltrials.gov>. Accessed: 2006, NCT00378508; 2007, NCT00515099
9. Saudek F, Havrdova T, Boucek P, et al: Polyclonal anti-T-cell therapy for type 1 diabetes mellitus of recent onset. *Rev Diabet Stud* 1:80, 2004
10. Shoda LK, Young DL, Ramanujan S, et al: A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 23:115, 2005
11. Bresson D, von Herrath MG: Anti-thymoglobulin (ATG) treatment does not reverse type 1 diabetes in the acute virally induced rat insulin promoter-lymphocytic choriomeningitis virus (RIP-LCMV) model. *Clin Exp Immunol* 163:375, 2011
12. Mottram PL, Murray-Segal LJ, Han W, et al: Remission and pancreas isograft survival in recent onset diabetic NOD mice after treatment with low-dose anti-CD3 monoclonal antibodies. *Transpl Immunol* 10:63, 2002
13. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, et al: A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 17:2844, 2006
14. Vergani A, D'Addio F, Jurewicz M, et al: A novel clinically relevant strategy to abrogate autoimmunity and regulate alloimmunity in NOD mice. *Diabetes* 59:2253, 2010

Příloha 2

The Effects of DPP-IV Inhibition in NOD Mice with Overt Diabetes

*L. Vargová, K. Zacharovová, E. Dovolilová, L. Vojtová, Z. Cimburek, F.
Saudek*

Folia Biologica

2013, 59(3):116-22, ISSN: 0015-5500

Original Article

The Effects of DPP-IV Inhibition in NOD Mice with Overt Diabetes

(type 1 diabetes / sitagliptin / NOD mice / regulatory T cells / DPP-IV)

L. VARGOVÁ¹, K. ZACHAROVÁ¹, E. DOVOLILOVÁ¹, L. VOJTOVÁ¹,
Z. CIMBUREK², F. SAUDEK¹

¹Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i., Prague, Czech Republic

Abstract. Sitagliptin is a dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitor that exerts an anti-hyperglycaemic effect by preventing degradation of glucagon-like peptide 1 with subsequent β -cell stimulation and potential regeneration. We tested whether sitagliptin therapy in symptomatic non-obese diabetic (NOD) mice would lead to changes in the immune cell profile, improve β -cell survival and induce diabetes remission. Flow cytometry analysis of immune cells in the spleen and peripheral lymph nodes, immunohistology of the pancreas and DPP-IV activity were investigated in diabetic NOD mice, either treated or non-treated with sitagliptin, at 0, 7, 14 and 28 days after hyperglycaemia onset, and in non-diabetic NOD controls. While compared to diabetic controls sitagliptin prevented increase of the CD8⁺/CD4⁺ ratio in pancreatic nodes after four weeks (0.443 ± 0.067 vs. 0.544 ± 0.131 ; $P < 0.05$), the population of Tregs in lymph nodes increased from day 0 to 28 in both treated and non-treated diabetic groups (8 ± 1.76 vs. 13.45 ± 5.07 % and 8 ± 1.76 vs. 13.19 ± 5.58 %, respectively). The severity of islet infiltration was similar in both diabetic groups and decreased in parallel with β -cell loss. Surprisingly, sitagliptin blocked the DPP-IV activity only temporarily (on day 7, 277.68 ± 89.2 vs. 547.40 ± 94.04 ng/ml in the diabetic control group) with no apparent effect later on. In conclu-

sion, sitagliptin administered after the onset of overt hyperglycaemia in NOD mice had only a marginal immunological effect and did not lead to diabetes remission. Failure to block DPP-IV over time represents an important finding that requires further explanation.

Introduction

Type 1 diabetes mellitus is a chronic disease caused by autoimmune destruction of pancreatic β cells. T-cell mediated destruction of β cells results in insulin deficiency and hyperglycaemia. It is becoming increasingly clear that β -cell-specific CD8⁺ cells play a pivotal role in the destruction process and constitute a significant portion of insulinitis (Roep and Peakman, 2012). To abrogate the autoimmune destructive process, many immunological approaches to restore immune tolerance were performed. However, it has been demonstrated that the mere suppression of autoimmunity is not sufficient to reverse the manifested diabetes as most of the insulin-producing cells have already been destructed at this stage (Ablamunits et al., 2007). Several immunointerventional studies showed that proliferation and/or regeneration of β cells were necessary to restore normoglycaemia in animal models (Ogawa et al., 2004; Shoda, 2005). In humans at least some of the β cells were detected as long as 50 years after the type 1 diabetes onset (Keenan et al., 2010). This finding suggests that sustained β -cell regeneration is possible in principle.

Recently, so-called incretin-based therapies started a new way of treatment for patients with type 2 diabetes. The incretin effect is mediated mainly by two gut hormones, glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Both hormones enhance insulin secretion from pancreatic β cells in a glucose-dependent way. In addition, GLP-1 is capable to suppress α -cell glucagon secretion, enhances β -cell proliferation and inhibits β -cell apoptosis (Suen and Burn, 2012). Above that, the therapies targeted to stimulate insulin secretion by incretins also exhibit considerable immunological effects. Regulation of lymphocyte

Received December 21, 2012. Accepted January 28, 2013.

This study was supported by Grant No. P304/10/0762 from the Czech Science Foundation, Czech Republic, and partially by Grant SVV-2012-264514 from Charles University in Prague, Czech Republic.

Corresponding author: Lenka Vargová, Department of Diabetes, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videňská 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic. Phone: (+420) 236 054 107; Fax: (+420) 236 052 820; email: lept@medicon.cz.

Abbreviations: DPP-IV – dipeptidyl peptidase IV, GIP – glucose-dependent insulinotropic peptide, GLP-1 – glucagon-like peptide 1, NOD – non-obese diabetic, Tregs – CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells among CD4⁺ lymphocytes.

proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells seems to be mediated through GLP-1 receptor, as its mRNA was found in T cells in the spleen, thymus and lymph nodes of NOD mice (Hadjiyanni et al., 2008). Therapy of NOD mice with GLP-1 analogue exendin 4 led to up-regulation of regulatory T cells and induction of IL-10 production (Xue et al., 2008). Incretin-mediated down-regulation of autoimmune response was also shown after syngeneic islet transplantation. This was evident from the change of prevailing pro-inflammatory (interferon- γ) to suppressive (TGF- β 1) cytokine expression (Suarez-Pinzon et al., 2008). The use of GLP-1 analogues or inhibitors of their degradation seemed to be attractive for human use in type 1 diabetes of recent onset. Although several authors demonstrated a positive effect (Ellis et al., 2011; Kielgast et al., 2011; Kutoh, 2011), the underlying mechanism remained unclear. No methods to prove possible β -cell regeneration and changes of immune profiles were used.

The aim of our study was to prove whether administration of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitor sitagliptin leads to relevant changes in the immune system in a rodent model of autoimmune type 1 diabetes and to morphological changes in the endocrine pancreas. In NOD mice, similar studies have already been performed, but the therapy was started well before hyperglycaemia onset and diabetes manifestation (Hadjiyanni, 2008). In contrast, in our study the intervention started in the stage of fully developed diabetes. This situation is closer to the clinical situation, where most of the β cells are already destroyed or impaired.

Material and Methods

Mice and monitoring for diabetes

Female mice of NOD/LtJ (H-2^{s7}) purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) were utilized in the study. Mice were housed in specialized ventilated breeding boxes equipped with air filtration, and provided with autoclaved water and food ad libitum. Diabetes was diagnosed when the non-fasting blood glucose level was > 13 mmol/l on two consecutive days. The blood glucose level was measured from the tip of the tail and was monitored twice a week throughout the whole study period using a Performa Nano (Roche, Basel, Switzerland) glucometer. The animals were terminated under general anaesthesia. This study was approved by the local Committee for the Protection of Animals against Cruelty in IKEM.

Study groups

Three groups of NOD mice were included in the study. In a sitagliptin group (N = 28) diabetic NOD mice were treated with 100 mg of sitagliptin (Januvia, MSD, Hoddesdon, UK) dissolved in 200 ml of drinking water. Mice were kept with free access to drinking water. In a diabetic control group (N = 28) diabetic NOD mice

were kept without treatment. As a non-diabetic control group, non-diabetic NOD mice with sustained normoglycaemia (non-fasting blood glucose up to 9 mmol/l) in 26th week of age were used (N = 5). As soon as sustained diabetes was diagnosed, the animals were included either into the sitagliptin or diabetic control group within three days (day 0). The animals were terminated on days 0, 7, 14 and 28. No exogenous insulin was administered.

Flow cytometry

After termination, the spleen and pancreatic lymph nodes were harvested. Splenocytes isolated by mild dissociation in Iscove's modified Dulbecco's medium were separated by gradient centrifugation in Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Lymph node cells were isolated by dissociation of nodes through 60- μ m mesh. Isolated cells were labelled for flow cytometric analysis. We used fluorescent antibodies against surface antigens CD3, CD4, CD8, CD25 (A488 anti-CD3, eBioscience, San Diego, CA; Qdot605 anti-CD4, Invitrogen, Eugene, OR; PerCP-Cy5.5 anti-CD8, eBioscience; APC anti-CD25, produced in the Institute of Microbiology ASCR, Prague, Czech Republic). Subsequently, the fixed cells were permeabilized (FoxP3 Staining Buffer Set, eBioscience) and the intracellular antigen FoxP3 was labelled using a PE-conjugated antibody (eBioscience). Appropriate PE-conjugated isotype control (eBioscience) was applied in control samples. The labelled cells were analysed using the flow cytometer LSR II with FACSDiva software (BD, San Jose, CA).

T-lymphocyte subpopulations and CD8⁺ and CD4⁺ T-lymphocyte ratios were determined as well as the population of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells among CD4⁺ lymphocytes (Tregs).

Immunofluorescence labelling of islet cells

Approximately half of each pancreas was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. The immunofluorescence staining was performed in 5- μ m sections. Prior to antigen detection, tissue sections were incubated in Target Retrieval Solution, Citrate pH 6, (Dako, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions, briefly incubated in the solution for 30 min at 97 °C in a water bath and allowed to cool for 15 min at room temperature. Subsequently, the non-specific binding sites were blocked by 5% donkey serum (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Specific antibodies against C-peptide, glucagon and Ki-67 were applied overnight at 4 °C (rabbit anti-C-peptide and rabbit anti-glucagon antibodies; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, rat anti-mouse Ki 67 antibody; Dako). Anti-rat secondary antibodies conjugated with AlexaFluor 555 and anti-rabbit antibodies conjugated with AlexaFluor 488 (both Invitrogen) were used. Nuclei were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The sections were mounted in the solution of

1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane and poly-vinyl alcohol (Sigma-Aldrich) in glycerol and examined under an Olympus BX41 fluorescence microscope equipped with an Olympus DP71 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).

Islet morphology

All detected islets on randomly selected pancreatic sections were examined in each animal. Separately, distribution of β and α cells was scored as follows: 0) no hormone-positive cell detected at the site of a former islet, 1) from one positive cell to 10 % of positive area in the residue of the islet, 2) 10–50 % of positive area in the islet, 3) 50–100 % of positive area in the islet. The grade of immune cell infiltration inside and around the islets was scored on sections counterstained with DAPI according to Zhang et al. (2007): 0) no apparent immune cell infiltration, 1) 1–10 % of the area occupied by infiltration, 2) 10–25 % of the area, 3) 25–50 % of the area and 4) more than 50 % of the islet residue area occupied with immune cell infiltration. The Ki-67-positive cells occurring in the sections were not quantified because co-localization of the C-peptide or glucagon with the Ki-67 marker was very rare.

Plasma DPP-IV activity

Blood samples were obtained by cardiac puncture on the day of study termination. Fifty μ l of blood was mixed with sodium citrate (Sigma-Aldrich) and centrifuged to obtain the plasma. To measure the DPP-IV activity in the plasma sample, the DPP-IV-Glo™ Protease Assay (Madison, WI) was used. The activity was determined in relation to the activity of recombinant DPP-IV enzyme (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical analysis

Data were analysed using the GraphPad InStat 3 (San Diego, CA). Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA) were used to assess the differences between data groups. All data are presented as mean values \pm standard deviation. *P* values < 0.05 were considered to be significant.

Results

Sitagliptin had no effect on diabetes remission rate

Fully developed diabetes with sustained hyperglycaemia was diagnosed in all mice at the time of inclusion into the sitagliptin or the diabetic control groups. The glycaemia control was not improved in the sitagliptin group compared to the diabetic control group. Treatment with sitagliptin did not increase the number of remissions (sustained glycaemia at levels lower than 13 mmol/l) as it is seen in the curves of glycaemia (Fig. 1). In both diabetic groups, one case of remission was observed out of 28 mice.

Pancreatic lymph node Tregs were up-regulated after diabetes manifestation

To investigate the effects of sitagliptin on regulatory immune cells, we analysed the population of Tregs in splenocytes and pancreatic lymph nodes. The changes in the Treg population in the diabetic mice groups were compared with those in non-diabetic NOD mice.

The course of Treg population development in the pancreatic lymph nodes is shown in Fig. 2A. The number of Tregs gradually increased in both diabetic groups from day 0 to day 28 with no difference between them. The average Treg rate in both groups tended to be higher than in the non-diabetic control group; however, the difference was not statistically significant.

We did not observe any significant changes in the populations of Tregs isolated from splenocytes of diabetic, sitagliptin-treated and non-diabetic NOD mice during the entire study period (Fig. 2B).

Sitagliptin prevented increase of CD8⁺/CD4⁺ ratio in pancreatic lymph nodes

As CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes represent the main cellular elements in autoimmune islet destruction, we evaluated changes in their population in relation to the CD4⁺ helper T-lymphocyte population. We expressed

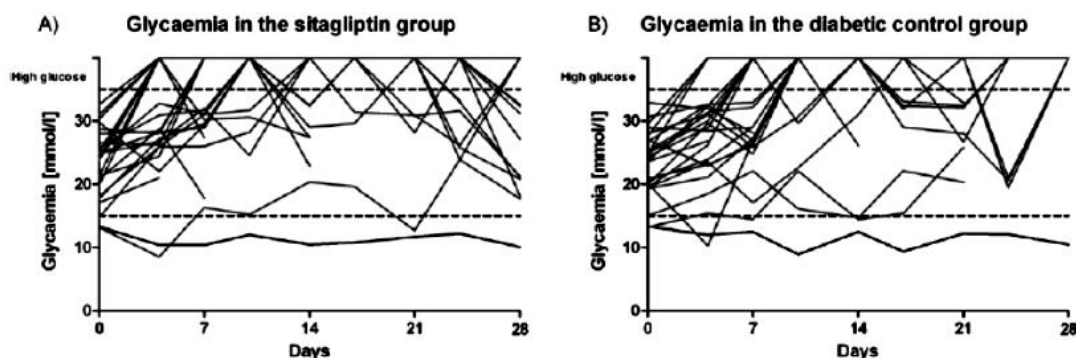


Fig. 1. Glycaemia: A) after sitagliptin administration, B) in the diabetic control group. Data represent blood glucose values from individual animals. The bottom line represents our threshold of initial glucose level crucial for remission. The upper line represents glucose levels up to 35 mmol/l. No animals received any exogenous insulin.

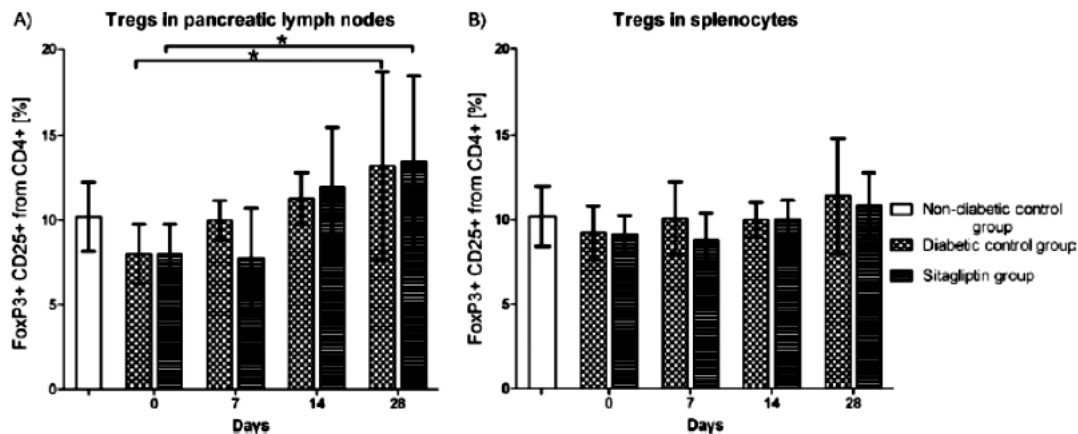


Fig. 2. Population of Tregs in pancreatic lymph nodes (A) and in splenocytes (B). A) In pancreatic lymph nodes the population of Tregs increased in the diabetic (13.19 ± 5.58 vs. 8 ± 1.76 %) and the sitagliptin (13.45 ± 5.07 vs. 8 ± 1.76 %) group on day 28 in comparison to day 0, $P < 0.05$. B) In the spleen we did not observe any difference between the diabetic (9.22 ± 1.9 %), the sitagliptin (9.13 ± 1.1 %) and the non-diabetic (10.18 ± 1.78 %) group on day 0 and neither on day 28 (11.39 ± 3.39 %; 10.86 ± 1.9 %; 10.18 ± 1.78 %).

The data are presented as means \pm SD, * represents $P < 0.05$.

the relation of these populations in the form of $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratio. The $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratio decreased in splenocytes in the diabetic control group within two weeks after the onset of diabetes (Fig. 3A). Sitagliptin therapy had no effect on the $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratio in splenocytes as compared with the diabetic as well as non-diabetic control groups.

In pancreatic lymph nodes, we observed pronounced changes in the $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratio in the diabetic control group. The ratio increased significantly at four weeks. In contrast to the situation in diabetic control mice, the $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratio in the sitagliptin group was not changed during the study period and was significantly lower at the end of the study in comparison with the diabetic control group. Moreover,

the ratio in the sitagliptin group did not differ from that in the non-diabetic control group (Fig. 3B).

Analysis of the $CD8^+$ and $CD4^+$ populations showed that the changes in $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratios were caused solely by changes in the population of $CD8^+$ T lymphocytes. The population of $CD4^+$ T lymphocytes did not change during the study period (data not shown).

Severity of immune cell infiltration in islets was not influenced by sitagliptin

Stimulation of β -cell regeneration and suppression of inflammation in pancreatic islets following sitagliptin treatment have been reported (Kim et al., 2010). There-

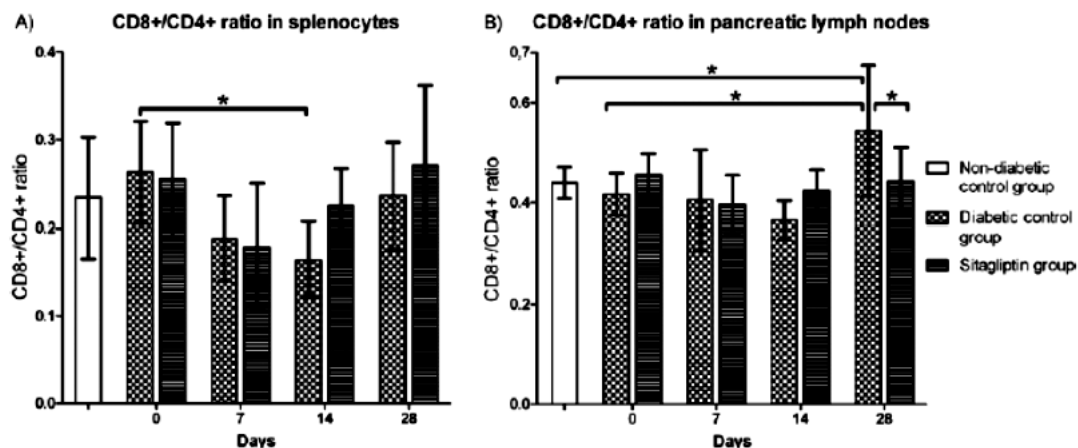


Fig. 3. $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratio in splenocytes (A) and pancreatic lymph nodes (B). A) $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratio decreased significantly in the diabetic control group on day 14 (0.164 ± 0.043) in comparison to day 0 (0.263 ± 0.058), $P < 0.05$. B) $CD8^+/CD4^+$ T-lymphocyte ratio increased significantly in the diabetic control group on day 28 (0.544 ± 0.131) in comparison to the sitagliptin (0.443 ± 0.067) and the non-diabetic group (0.44 ± 0.03), $P < 0.05$. In the diabetic control group the ratio increased from day 0 (0.417 ± 0.042) to day 28 (0.544 ± 0.131) $P < 0.05$.

The data are presented as means \pm SD, * represents $P < 0.05$.

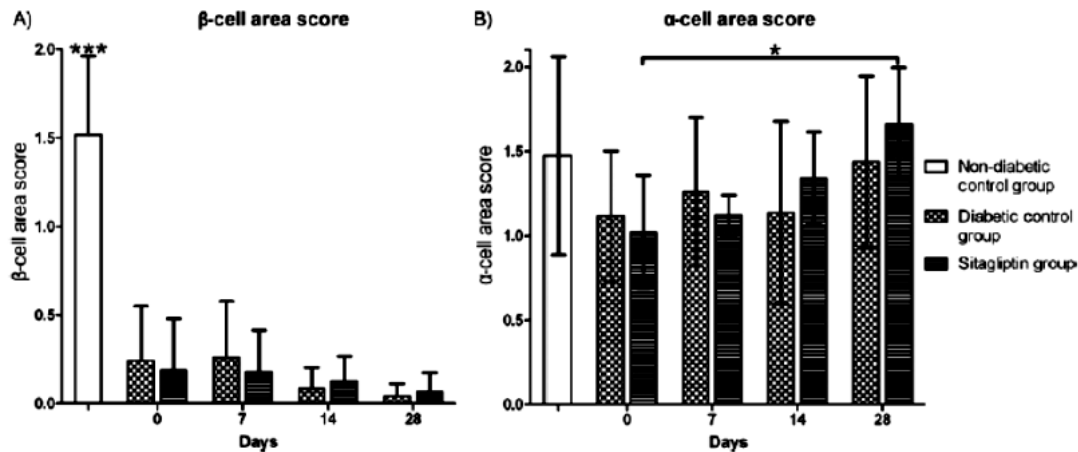


Fig. 4. Endocrine cell area scores: A) The area of C-peptide-positive cells in islets was apparently lower in both diabetic groups than in the non-diabetic control group on day 0 (0.19 ± 0.29 vs. 1.52 ± 0.45 in the sitagliptin group; 0.24 ± 0.31 vs. 1.52 ± 0.45 in the diabetic control group), $P < 0.001$. B) The area of glucagon-positive cells increased only in the sitagliptin group from day 0 to day 28 (1.02 ± 0.33 vs. 1.66 ± 0.33), $P < 0.05$, but it was not different from the diabetic and non-diabetic control groups.

The data are presented as means \pm SD, * represents $P < 0.05$, *** represents $P < 0.001$.

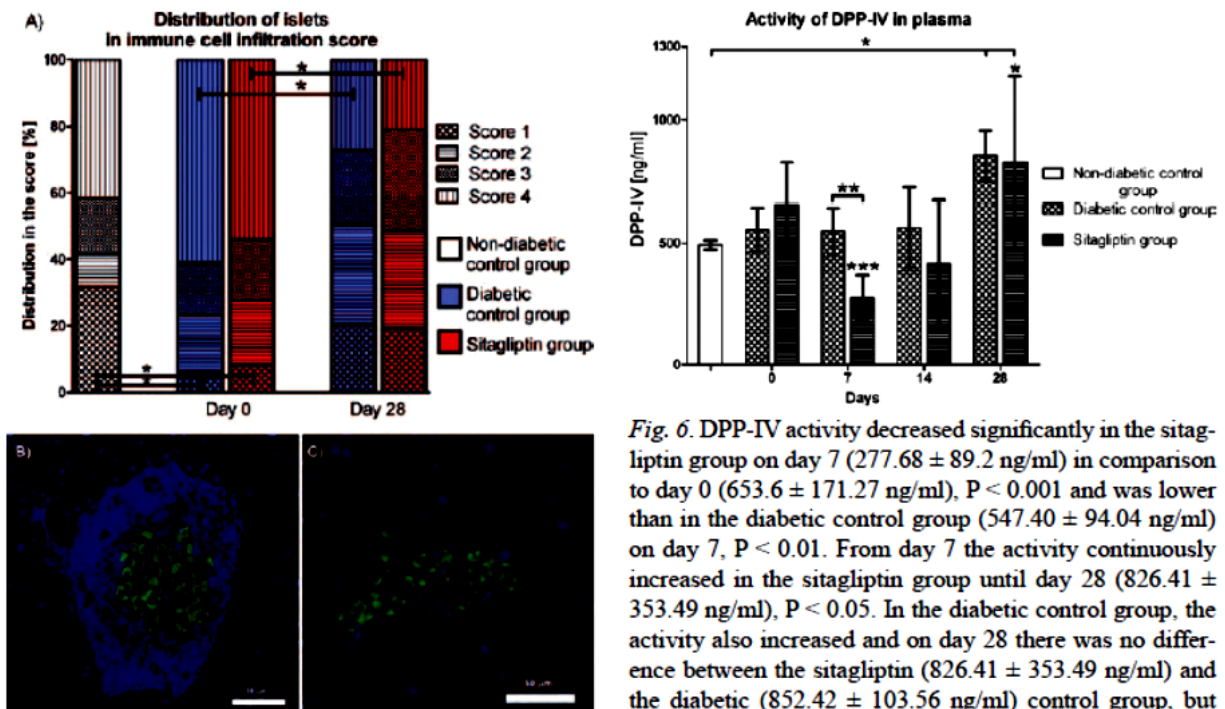


Fig. 5. Immune cell infiltration in islets: A) Percentage of islets in the pancreas of the non-diabetic, diabetic and sitagliptin control groups. In the non-diabetic control group the percentage of islets in score 1 was significantly higher than in both diabetic groups on day 0. At the end of the study the severity of immune cell infiltration decreased in the diabetic groups. The data are presented as means \pm SD, * represents $P < 0.05$. B) Severe immune cell infiltration inside and around an islet with persistent β cells in a non-diabetic mouse (green – C-peptide; blue – DAPI staining of nuclei). C) An islet with expanded α -cell area and very low immune cell infiltration in a diabetic mouse (green – glucagon, blue – DAPI staining of nuclei).

Fig. 6. DPP-IV activity decreased significantly in the sitagliptin group on day 7 (277.68 ± 89.2 ng/ml) in comparison to day 0 (653.6 ± 171.27 ng/ml), $P < 0.001$ and was lower than in the diabetic control group (547.40 ± 94.04 ng/ml) on day 7, $P < 0.01$. From day 7 the activity continuously increased in the sitagliptin group until day 28 (826.41 ± 353.49 ng/ml), $P < 0.05$. In the diabetic control group, the activity also increased and on day 28 there was no difference between the sitagliptin (826.41 ± 353.49 ng/ml) and the diabetic (852.42 ± 103.56 ng/ml) control group, but there was significant difference between these two groups and the non-diabetic group (491.93 ± 19.05 ng/ml). The data are presented as means \pm SD, * represents $P < 0.05$, ** represents $P < 0.01$, *** represents $P < 0.001$.

fore, our study was focused on changes of endocrine cell distribution and immune cell infiltration.

In both groups of diabetic NOD mice, the β -cell score was significantly lower on day 0 as compared to the non-diabetic control group. At the time of diabetes manifestation, most of the β cells had already been destroyed (Fig. 4A).

The α -cell score increased significantly from day 0 to day 28 only in the sitagliptin group. Despite this expansion, the score did not differ between all groups (Fig. 4B).

The severity of immune cell infiltration was apparently higher in diabetic animals than in the non-diabetic control group. The difference consisted mainly in higher frequency of islets with advanced infiltration (Fig. 5). In diabetic animals the severity of infiltration decreased over time, resulting in similar scores on day 28 to the non-diabetic controls.

Sitagliptin had only a transient effect on DPP-IV activity

To confirm the inhibitory effect of sitagliptin during the study, we measured the DPP-IV activity in the plasma. The expected drop in DPP-IV activity in the sitagliptin group was observed on day 7. Surprisingly, this decrease was not permanent and from day 14 the activity gradually increased. After two weeks, the difference between the sitagliptin and the diabetic control group was no more evident (Fig. 6). On day 28 the DPP-IV activity was significantly higher in both diabetic groups than in the non-diabetic group.

Discussion

In our study, we focused on the time-dependent effects of DPP-IV inhibitor sitagliptin in an animal model of type 1 diabetes. According to the results of previous studies, we expected improved glucose profiles, protection of pancreatic β cells and stimulation of regulatory T cells that might suppress the autoimmune β -cell destruction. However, in our setting in NOD mice, sitagliptin did not increase the rate of diabetes remission. In fact, the diabetes reversal rate was very low in both diabetic groups in the study. Similarly unsuccessful were also several studies using GLP-1 analogue exendin 4 which was started in the same stage of diabetes development as in our protocol (Xue et al., 2008; Tian et al., 2009). In successful studies, the DPP-IV inhibitor was used in NOD mice that were either still in the pre-diabetic stage, or the inhibitor was used together with exogenous insulin (Kim et al., 2010; Tian et al., 2010). Insulin therapy itself may contribute to lower activation of the autoimmune reaction by putting the persisting β cells into rest (Skowera et al., 2008). Other successful studies took advantage of combination therapy with a DPP-IV inhibitor or a GLP-1 analogue and another immunomodulatory agent (Ogawa et al., 2004; Tian et al., 2009) or with a proton pump inhibitor (Suarez-Pinzon et al., 2009).

Tian et al. (2010) demonstrated an association of diabetes remission with up-regulation of regulatory T cells. In our study, we did not find any difference between the Treg population in the sitagliptin and the diabetic control groups. This may explain the equal remission rate between these groups. Similar results were observed by Tian et al. (2009), who treated diabetic NOD mice with exendin 4. One week after the treatment, the population

of Tregs was not significantly different between control diabetic and exendin 4-treated NOD mice. Comparing diabetic and non-diabetic control groups we found less Tregs in pancreatic lymph nodes in the non-diabetic control group. Also Mellanby et al. (2007) found that the proportion of CD4⁺CD25⁺ cells in pancreatic lymph node cells of diabetic mice was higher than that in non-diabetic NOD mice. In contrast to our data, Xue et al. (2008) demonstrated that therapy with exendin 4 led to an increase in the number of Tregs in the spleen.

The effector CD8⁺ cells represent the crucial cellular component in the autoimmune destruction of β cells. The cytotoxic autoimmune process is driven especially by autoantigens originating from the β cells. Under hyperglycaemia, the remaining β cells in the pancreatic islets are stimulated to higher synthesis of preproinsulin, which is one of the main diabetogenic autoantigens. In consequence, the remaining β cells in hyperglycaemic conditions are subjected to a greater killing efficiency of cytotoxic T lymphocytes (Skowera et al., 2008). Therefore, the changes in the frequency of CD8⁺ cells could reflect the intensity of the autoimmune response. In our study we observed a significant increase in CD8⁺ T lymphocytes in pancreatic lymph nodes of diabetic NOD mice at the end of the study. Of note, in the sitagliptin group the frequency of CD8⁺ T lymphocytes was identical with that in the non-diabetic group and significantly lower than in the diabetic control group. This suggests a protective effect of sitagliptin treatment against expansion of cytotoxic T lymphocytes in the local lymph nodes. Contrary to that, the significant decrease of CD8⁺ T lymphocytes in splenocytes of the diabetic control NOD mice found in our study may be caused by their migration into the pancreatic islets during the first weeks after the diabetes onset.

In addition to the changes in CD8⁺ population, we evaluated the immune cell infiltration in the pancreatic islets. The time-dependent decrease of immune cell infiltration corresponded to the very low number of β cells remaining in the islets. From our results obtained at different time points we can conclude that the decrease of immune cell infiltration is probably caused by lower release of β -cell antigens rather than by treatment with sitagliptin, as it was assumed by Tian et al. (2010).

The gradual increase of the α -cell score observed in our study is in accordance with the replacement of destroyed β cells by an increased number of α cells that was described by Takeda et al. (2011). Contrary to this study group we did not observe any effect of sitagliptin treatment on the decrease of the α -cell proliferation. Nevertheless, rarely detected expression of Ki-67 antigen did not prove changes in α -cell proliferation. In β cells, we did not detect the Ki-67 antigen at all. Similarly, data of Tian et al. (2009) indicated that therapy with exendin 4 alone did not stimulate replication of residual β cells. The ideal window for using incretin-based agents is likely to be before or immediately after diagnosis, when a significant β -cell mass is still viable (Bosi, 2010).

In our study, the most interesting effect of sitagliptin treatment was observed in DPP-IV activity. To our knowledge, the DPP-IV activity was not monitored at different time points of the intervention in any other study. To our surprise, we demonstrated that the inhibitory effect of sitagliptin was only temporary within the first seven days, although the drug was being administered throughout the study. Why DPP-IV inhibition does not work later on needs further investigation. As the loss of the inhibitory effect was uniformly found in all sitagliptin-treated animals, we consider this finding as important and worth testing in human pharmacology. An increase of DPP-IV activity after diabetes onset (also present in our study) has already been reported in humans (Mannucci et al., 2005), but a failure of sitagliptin or another DPP-IV inhibitor to block this activity over time has not been tested yet.

References

- Ablamunits, V., Sherry, N. A., Kushner, J. A., Herold, K. C. (2007) Autoimmunity and β cell regeneration in mouse and human type 1 diabetes: the peace is not enough. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1103**, 19-32.
- Bosi, E. (2010) Time for testing incretin therapies in early type 1 diabetes? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 2607-2609.
- Ellis, S. L., Moser, E. G., Snell-Bergeon, J. K., Rodionova, A. S., Hazenfield, R. M., Garg, S. K. (2011) Effect of sitagliptin on glucose control in adult patients with Type 1 diabetes: a pilot, double-blind, randomized, crossover trial. *Diabet. Med.* **28**, 1176-1181.
- Hadjiyanni, I., Baggio, L. L., Poussier, P., Drucker, D. J. (2008) Exendin-4 modulates diabetes onset in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* **149**, 1338-1349.
- Keenan, H. A., Sun, J. K., Levine, J., Doria, A., Aiello, L. P., Eisenbarth, G., Bonner-Weir, S., King, G. L. (2010) Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes* **59**, 2846-2853.
- Kielgast, U., Holst, J. J., Madsbad, S. (2011) Antidiabetic actions of endogenous and exogenous GLP-1 in type 1 diabetic patients with and without residual β -cell function. *Diabetes* **60**, 1599-1607.
- Kim, S. J., Nian, C., McIntosh, C. H. (2010) Sitagliptin (MK0431) inhibition of dipeptidyl peptidase IV decreases nonobese diabetic mouse CD4⁺ T-cell migration through incretin-dependent and -independent pathways. *Diabetes* **59**, 1739-1750.
- Kutoh, E. (2011) Sitagliptin is effective and safe as add-on to insulin in patients with absolute insulin deficiency: a case series. *J. Med. Case Rep.* **5**, 117.
- Mannucci, E., Pala, L., Ciani, S., Bardini, G., Pezzatini, A., Sposato, I., Cremasco, F., Ognibene, A., Rotella, C. M. (2005) Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia* **48**, 1168-1172.
- Mellanby, R. J., Thomas, D., Phillips, J. M., Cooke, A. (2007) Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunology* **121**, 15-28.
- Ogawa, N., List, J. F., Habener, J. F., Maki, T. (2004) Cure of overt diabetes in NOD mice by transient treatment with anti-lymphocyte serum and exendin-4. *Diabetes* **53**, 1700-1705.
- Roep, B. O., Peakman, M. (2012) Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a007781.
- Shoda, L. K., Young, D. L., Ramanujan, S., Whiting, C. C., Atkinson, M. A., Bluestone, J. A., Eisenbarth, G. S., Mathis, D., Rossini, A. A., Campbell, S. E., Kahn, R., Kreuwel, H. T. (2005) A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* **23**, 115-126.
- Skowera, A., Ellis, R. J., Varela-Calvino, R., Arif, S., Huang, G. C., Van-Krinks, C., Zaremba, A., Rackham, C., Allen, J. S., Tree, T. I., Zhao, M., Dayan, C. M., Sewell, A. K., Unger, W. W., Drijfhout, J. W., Ossendorp, F., Roep, B. O., Peakman, M. (2008) CTLs are targeted to kill β cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J. Clin. Invest.* **118**, 3390-3402.
- Suarez-Pinzon, W. L., Lakey, J. R., Rabinovitch, A. (2008) Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin induces β -cell neogenesis from pancreatic duct cells in human islets transplanted in immunodeficient diabetic mice. *Cell Transplant.* **17**, 631-640.
- Suarez-Pinzon, W. L., Cembrowski, G. S., Rabinovitch, A. (2009) Combination therapy with a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and a proton pump inhibitor restores normoglycaemia in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* **52**, 1680-1682.
- Suen, C. S., Burn, P. (2012) The potential of incretin-based therapies in type 1 diabetes. *Drug Discov. Today* **17**, 89-95.
- Takeda, Y., Fujita, Y., Honjo, J., Yanagimachi, T., Sakagami, H., Takiyama, Y., Makino, Y., Abiko, A., Kieffer, T. J., Haneda, M. (2011) Reduction of both β cell death and α cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice. *Diabetologia* **55**, 404-412.
- Tian, B., Hao, J., Zhang, Y., Tian, L., Yi, H., O'Brien, T. D., Sutherland, D. E., Hering, B. J., Guo, Z. (2009) Upregulating CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in pancreatic lymph nodes in diabetic NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Transplantation* **87**, 198-206.
- Tian, L., Gao, J., Hao, J., Zhang, Y., Yi, H., O'Brien, T. D., Sorenson, R., Luo, J., Guo, Z. (2010) Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating β -cell replication in nonobese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Endocrinology* **151**, 3049-3060.
- Xue, S., Wasserfall, C. H., Parker, M., Brusko, T. M., McGrail, S., McGrail, K., Moore, M., Campbell-Thompson, M., Schatz, D. A., Atkinson, M. A., Haller, M. J. (2008) Exendin-4 therapy in NOD mice with new-onset diabetes increases regulatory T cell frequency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1150**, 152-156.
- Zhang, J., Tokui, Y., Yamagata, K., Kozawa, J., Sayama, K., Iwahashi, H., Okita, K., Miuchi, M., Konya, H., Hamaguchi, T., Namba, M., Shimomura, I., Miyagawa, J. I. (2007) Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia* **50**, 1900-1909.