

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra buněčné biologie



Diplomová práce

**Vliv diabetogenních autoantigenů na cytokinovou odpověď mononukleárních buněk
periferní krve pacientů s diabetem 1. typu**

Effect of diabetogenic autoantigens on the cytokine production of peripheral blood
mononuclear cells from type 1 diabetic patients

Bc. Jana Labiková

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24.8.2012

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Doc. MUDr. Kateřině Štechové, Ph.D. za odborné vedení práce, Mgr. Janě Včelákové a MUDr. Tereze Ulmannové za podporu a konzultace a MUDr. Stanislavě Kolouškové, CSc. za spolupráci při odběru vzorků. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za podporu během studia.

Abstrakt

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je závažné orgánově specifické autoimunitní onemocnění charakteristické nevratnou destrukcí β buněk pankreatu imunitním systémem, což vede k absolutnímu nedostatku insulínu. K rozvoji onemocnění dochází u geneticky predisponovaných jedinců a jeho vznik je významně ovlivněn i faktory vnějšího prostředí. Na zničení β buněk se podílí spíše buněčná složka imunity. Za patologickou je považována hlavně prozánětlivá Th1 odpověď. Autoimunitní zánět v β buňkách je možné určit dlouhou dobu před samotnou manifestací DM1 pomocí detekce specifických autoprotilátek ze séra pacientů. V současné době ale nemůžeme těmto jedincům, kteří jsou ohroženi vznikem DM1, nabídnout žádnou úspěšnou léčbu, která by insulitidu zastavila, či alespoň oddálila manifestaci DM1.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem syntetických diabetogenních autoantigenů GAD65 a IA2 na cytokinovou odpověď mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) diabetiků s ohledem na protilátkový profil pacientů. Studii jsme prováděli na pacientech s potvrzenou diagnózou DM1 pozitivních na anti-GAD65 a/nebo anti-IA2 autoprotilátky. Pomocí průtokové cytometrie jsme měřili zastoupení jednotlivých buněčných populací ve vzorcích PBMC. Buňky jsme stimulovali třemi různými koncentracemi antigenů a pomocí ELISPOTU jsme detekovali produkci $\text{IFN}\gamma$ a IL-17.

U obou cytokinů jsme našli signifikantní interakce mezi způsobem stimulace (druh a koncentrace antigenu) a protilátkovým profilem pacientů. Mezi skupinami pacientů byly také nalezeny rozdíly v zastoupení NK buněk, T lymfocytů, Th buněk, Tc buněk a T regulačních buněk. Rozdělení pacientů podle autoprotilátkového profilu tedy odráží i jejich odlišnou buněčnou reaktivitu. Tento přístup by mohl být přínosný při navrhování imunointervenčních postupů u DM1. Je zřejmé, že pro jejich úspěšnost je nutný individuální přístup a patrně nebude možné používat jednu imunointervenci pro všechny pacienty s DM1, protože pacienti se mezi sebou svými molekulárními reakcemi významně liší.

Klíčová slova: Diabetes mellitus 1. typu, PBMC, GAD65, IA2

Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is a serious organ-specific autoimmune disease characterised by irreversible destruction of pancreatic β -cells by immune system. This process results in an absolute insulin deficiency. Both genetical predisposition and environmental factors influence the development of the disease. β -cell destruction is mediated by cellular components of an immune system. Proinflammatory Th1 response is considered as most pathological. Autoimmune destruction of β -cells can be identified by the detection of specific serum autoantibodies a long time before the T1D clinical onset. Currently, there is no efficient cure available to prevent or at least to delay the destructive insulinitis.

This diploma thesis describes the influence of synthetic diabetogenic autoantigens GAD65 and IA2 on the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from T1D patients with regards to their antibody profile. The study has been carried out on patients with confirmed T1D diagnosis who tested positive for anti-GAD65 and/or anti-IA2 autoantibodies. By using flow cytometry we measured the cell type ratio in PBMC samples. The cells have been stimulated by three different concentrations of antigens and their IFN γ and IL-17 production has been detected by ELISPOT assay.

In the case of both cytokines we have found a significant interaction between the way of stimulation (type and antigen concentration) and the patient's antibody profile. Differences in terms of NK cells, T lymphocyte, Th, Tc and T regulatory cells representation have also been identified in different groups of patients. Our results show that patient's autoantibody profile reflects the type of his/her cellular responses as well. This approach can be useful for designing immunointervention strategies aimed at preventing or at least delaying the onset of type 1 diabetes. It seems to be clear that such immunointervention should be individualised and subtyping of T1D according to molecular reactivity could be very helpful to succeed in this effort.

Keywords: Type 1 diabetes, PBMC, GAD65, IA2

Seznam zkratek:

AIRE	autoimmune regulator
BB	bio breeding rat
CBV4	coxackie virus B4
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4
DC	dendritic cell
DM	diabetes mellitus
DPT-1	Diabetes Prevention Trial – 1
EBV	Epstein-Barr virus
GABA	γ -aminobutyric acid
GAD	glutamic acid decarboxylase
GCK	glucokinase
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HLA	human leukocyte antigen
HNF-1 α	hepatocyte nuclear factor
HSP	heat shock proteins
IA2	insulinoma antigen 2
IDDM	insulin-dependent diabetes mellitus
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
LYP	lymphoid protein tyrosine phosphatase
mTECS	medullary thymic epithelial cells
MODY	maturity onset diabetes of the young
NK	natural killer cell
NOD	non-obese diabetic mouse
OR	odds ratio
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PHA	phytohemagglutinin
RA	revmatoidní artritida
SCID	severe combined immunodeficiency
SPS	stiff person syndrome
T1D	type 1 diabetes
TCR	T cell receptor

TNF	tumor necrosis factor
Tregs	T regulační buňky
VNTR	variable number of tandem repeats
ZnT8	zinc transporter 8

Obsah:

Úvod	10
1 Diabetes mellitus	11
1.1 Dělení	11
1.2 Charakteristika DM1	11
1.3 Incidence DM1	12
1.4 Genetika	12
1.5 Vlivy prostředí.....	16
2.1 Insulitida.....	19
2.2 T lymfocyty	20
2.2.1 Th1/Th2	20
2.2.2 Th17	21
2.2.3 Tregs.....	22
2.3 B lymfocyty.....	23
2.4 Makrofágy	23
2.5 NK buňky	23
2.6 iNKT buňky.....	24
2.7 Autoantigeny	24
2.7.1 GAD65	24
2.7.2 Insulin.....	25
2.7.3 IA-2	26
2.7.4 ZnT8	27
3 Intervence	28
3.1 Preventivní intervence.....	28
3.1.1 Identifikace prediabetu	28
3.1.2 Antigenně specifické navození orální tolerance.....	28
3.2 Intervenční studie těsně po manifestaci diabetu.....	28
3.2.1 Nespecifické intervence	29
3.2.2 Antigen-specifické intervenční studie	30
4 Metodika.....	32
4.1 Materiál	32
4.2 Chemikálie	32
4.3 Přístroje a programy	33

4.4 Charakteristika souboru.....	33
4.5 Metody	34
4.5.1 Gradientová centrifugace	34
4.5.2 Zamražení a rozmražení	35
4.5.3 Stimulace antigeny	35
4.5.4 ELISPOT	36
4.5.5 Průtoková cytometrie	37
4.5.6 Statistická analýza	39
5 Výsledky.....	40
5.1 ELISPOT	40
5.2 Průtoková cytometrie	44
6 Diskuze.....	50
Závěr.....	54
Seznam použité literatury	55
Přílohy	69

Úvod

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k nevratnému zničení β buněk pankreatu produkujících insulin. K iniciaci autoimunitního procesu dochází u geneticky predisponovaných jedinců a na vzniku choroby se významně podílí i faktory vnějšího prostředí. Preklinické období je charakteristické autoimunitním zánětem bez klinických projevů diabetu, který může být detekován přítomností autoprotilátek v séru. K manifestaci onemocnění dochází v době, kdy je většina β buněk již nevratně zničena a zbývající buňky nejsou schopné pokrýt potřebu organismu na produkci insulinu. V současnosti není dostupná žádná kauzální léčba a pacienti jsou doživotně závislí na substitučním podávání insulinu v injekční formě. I přes exogenní aplikaci insulinu nelze dosáhnout zcela fyziologické glykémie, což se projeví akutními a časem i chronickými komplikacemi. Insulinoterapie i komplikace diabetu snižují kvalitu života postiženého jedince a vzhledem k finanční náročnosti léčby diabetu představují také nezanedbatelnou socioekonomickou zátěž pro celou společnost. Incidence diabetu v posledních desetiletích celosvětově stoupá, nejvíce v nejnižších věkových kategoriích. Tento trend se projevuje i v české populaci. Ve věkové kategorii 0 až 14 let vzrostla incidence DM1 od roku 1989 do roku 2009 z 6,8/100 000 dětí/rok na 18,5/100 000. Největší podíl nárůstu nových případů byl přitom zaznamenán u dětí předškolního věku. V České republice trpí aktuálně DM1 56 tisíc pacientů (všech věkových kategorií) (1, 2, 3). V současné době je možná poměrně dobrá predikce DM1 na základě genetického vyšetření a vyšetření přítomnosti autoprotilátek, zatím ale neexistuje žádný účinný způsob prevence této choroby. Jednou ze zkoumaných imunointervencí je podávání s diabetem asociovaných autoantigenů a snaha o specifické navození tolerance bez nutnosti celkové suprese imunitního systému, které s sebou přináší nežádoucí zdravotní rizika. Tento princip se osvědčil na zvířecím modelu DM1, snahy o klinickou aplikaci však zatím nepřinesly očekávaný úspěch.

Tato diplomová práce se zabývá cytokinovou odpovědí mononukleárních buněk periferní krve diabetiků na syntetické diabetogenní autoantigeny v souvislosti s protilátkovým profilem pacientů. Výzkum této tematiky by v budoucnosti mohl přispět k optimalizaci antigen-specifických intervencí a lepšímu přizpůsobení imunoterapie „na míru“ jednotlivým pacientům.

1 Diabetes mellitus

1.1 Dělení

Existuje několik druhů diabetu mellitu (DM). Mají podobné příznaky, ale rozdílné příčiny vzniku. Společným příznakem je hyperglykémie způsobená absolutním nebo relativním nedostatkem insulinu. Diabetes mellitus se dělí podle způsobu vzniku:

- DM 1. typu
 - Imunitně podmíněný
 - Idiopatický (insulin-dependentní bez přítomnosti autoantilátok)
 - DM 2. typu
 - Ostatní specifické formy diabetu (např. MODY)
 - Gestační DM
- (4).

Při diabetu prvního typu jsou β buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu vyrábějící insulin zničeny imunitním systémem, což vede k absolutnímu nedostatku insulinu. U diabetu druhého typu, který je většinou asociovaný s obezitou a vyšším věkem, slinivka produkuje insulinu zpočátku dostatek, ale tkáně ho nejsou schopné využít (relativní nedostatek insulinu způsobený insulinovou rezistencí). Později může docházet i k poruše sekrece insulinu. Gestační diabetes vzniká během těhotenství a po porodu zmizí. Termín MODY (maturity onset diabetes of the young) diabetes zahrnuje několik klinicky odlišných typů dědičného monogenního diabetu, odlišného od diabetu 1. a 2. typu. MODY diabetes vzniká mutací v různých genech, nejčastější je mutace v GCK (glukokináza) a HNF-1 α (hepatocyte nuclear factor). Tyto mutace se navenek projeví poruchou sekrece insulinu. MODY diabetes je charakteristický autozomálně dominantní dědičností a manifestací v mladém věku (většinou do 25 let) (5).

1.2 Charakteristika DM1

DM1 je většinou diagnostikován u lidí do 30 let, ale může se objevit kdykoliv během života. V současné době je jedinou možností léčby denní injekční podávání insulinu. Navzdory snaze o co nejlepší kontrolu hladiny glukózy v krvi většina pacientů trpí akutními a pozdními komplikacemi. Mezi akutní komplikace patří hypoglykémie, hyperglykémie a diabetická ketoacidóza. Ketoacidóza je charakterizována vysokou glykemií, acidózou a

vysokou hladinou ketoláték (meziprodukty metabolismu tuků). Bez insulinu nejsou některé tkáně schopné využívat jako zdroj energie glukózu, proto na nedostatek insulinu reagují játra částečným štěpením tuků a tvoří tak ketolátky, které se hromadí v krvi. β -hydroxybutyrát a acetoacetát přecházejí do krve a slouží jako zdroj energie pro některé orgány. Velké množství ketoláték v oběhu snižuje pH krve a vede k acidóze. Pozdní komplikace diabetu jsou způsobené dlouhodobou hyperglykemií. Vysoká hladina glukózy vede k neenzymatické glykaci proteinů, čímž narušuje jejich funkci a také podporuje oxidační stres organismu. To vede k poškození povrchu malých cév a jejich větší náchylnosti k ruptuře. Změny těchto cév v určitých orgánech vedou k vlastním projevům pozdních komplikací diabetu. Nejčastěji se projevuje postižení ledvin (diabetická nefropatie), sítnice oka (diabetická retinopatie) a nervů (diabetická neuropatie).

Ukazatelem dlouhodobé kompenzace diabetu je množství glykovaného hemoglobinu (HbA1c). Intenzita glykace bílkovinné části hemoglobinu je úměrná množství a době expozice glukóze, hodnota glykovaného hemoglobinu v % odpovídá kompenzaci v časovém období 3 měsíce před stanovením (erytrocyty se obměňují každé 3 měsíce).

Jako modelový organismus pro výzkum DM1 se nejčastěji používá NOD (non-obese diabetic) myš a BB (bio breeding) krysa.

1.3 Incidence DM1

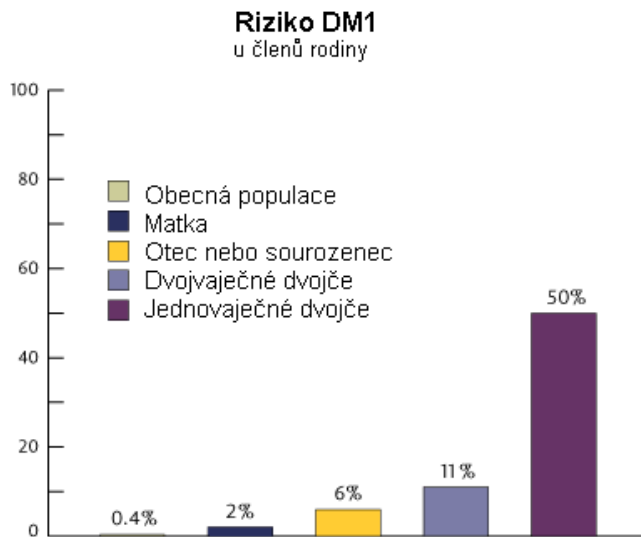
Incidence DM1 se v posledních desetiletích zvyšuje, zejména v rozvinutých zemích (Evropa, S. Amerika) a zároveň se snižuje věk manifestace choroby (6). Pokud budou současné trendy pokračovat, mezi lety 2005 – 2020 se v Evropě předpokládá zdvojnásobení počtu nových případů u dětí do 5 let a zvýšení prevalence u dětí do 15 let o 70% (7).

1.4 Genetika

Rozvoj diabetu 1. typu je do určité míry podmíněn geneticky. 10-13% nově diagnostikovaných pacientů má prvostupňového příbuzného s DM1 (8, 9). Riziko rozvoje DM1 také závisí na tom, o jakého příbuzného se jedná (Obrázek 1). Riziko vzniku diabetu v obecné populaci je 0,4%, u dětí diabetických matek jsou to 2%, u dětí otců diabetiků a sourozenců diabetiků je to 6% (10).

Původně se předpokládalo, že konkordance u jednovaječných dvojčat je 50% a u dvojvaječných pouze 10% (11). Při delším sledování se však u druhého z identických dvojčat

většinou objeví autoprotilátky proti ostrůvkovým antigenům a následuje progresse směrem ke klinické manifestaci diabetu. To ale může nastat až po velmi dlouhé době od propuknutí diabetu prvního z dvojčat (až 30 let) (12, 13). Konkordance u jednovaječných dvojčat je tedy vyšší než se myslelo dříve, ale není 100%, což naznačuje, že k vývoji DM1 silně přispívají i vnější faktory.



Obrázek 1. Riziko DM1 u členů rodiny. Upraveno dle (10).

DM1 je způsoben mutací v jednom genu zcela raritně. Tyto monogenní formy jsou většinou doprovázeny dalšími autoimunitními onemocněními. Např. IPEX syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) způsobený mutací v transkripčním faktoru FoxP3 vede k poruše funkce T regulačních buněk (Tregs) a závažné multiorgánové autoimunitě. U 80% postižených se objevuje autoimunitní diabetes (14).

Klasicky je DM1 polygenní onemocnění – ke vzniku přispívá mnoho různých genů, které ovlivňují imunitní funkce a jsou označovány jako IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) geny. V současnosti je identifikována řada genetických markerů s pozitivní asociací s DM1 (IDDM1 až IDDM18 geny) (Obrázek 2). Nejsilnější asociace se vznikem DM1 byla nalezena u HLA regionu (odds ratio 6,8). Odds ratio (OR) je statistický výraz používaný k určení, zda je daná alela asociována s určitým onemocněním. OR = 1 znamená, že daná alela nebo SNP (single nukleotid polymorphism) je se stejnou pravděpodobností ve skupině pacientů i kontrolní. OR alel rizikových pro vznik komplexních onemocnění je nízký – většinou v rozsahu 1,2 – 1,3. HLA oblast na chromosomu 6p21 je považována za velmi důležitou pro vznik mnoha autoimunitních chorob včetně DM1 a je označována jako IDDM1 lokus. Některé HLA alely II. třídy jsou pro vznik DM1 rizikové, jiné naopak protektivní. Haplotypy HLA-DR-DQ se dají seřadit dle rizika vzniku DM1 od rizikových přes neutrální až

k protektivním. Haplotypy jsou kombinace alel, které se dědí ve vazbě na stejném chromozomu (15). DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotyp se nachází u 20% populace ale pouze u 1% pacientů a tedy uděluje svým nositelům silnou ochranu před vznikem DM1. Na druhé straně spektra je heterozygotní haplotyp DR3/4-DQ8 (DR3 je DRB1*03-DQB1*0201, DR4 je DRB1*04-DQB1*0302, DQ8 je DQA1*0301, DQB1*0302). Tento haplotyp má asi 30-50% pacientů (14).

V naší populaci jsou s DM1 asociovány alely:

Pozitivní asociace (rizikové)	DQB1*0302
	DQB1*0201
	DQA1*03
Negativní asociace (protektivní)	DQB1*0602
	DQB1*0301
	DQB1*0603
	DQB1*0503 + DQA1*01
	DQA1*02

(16).

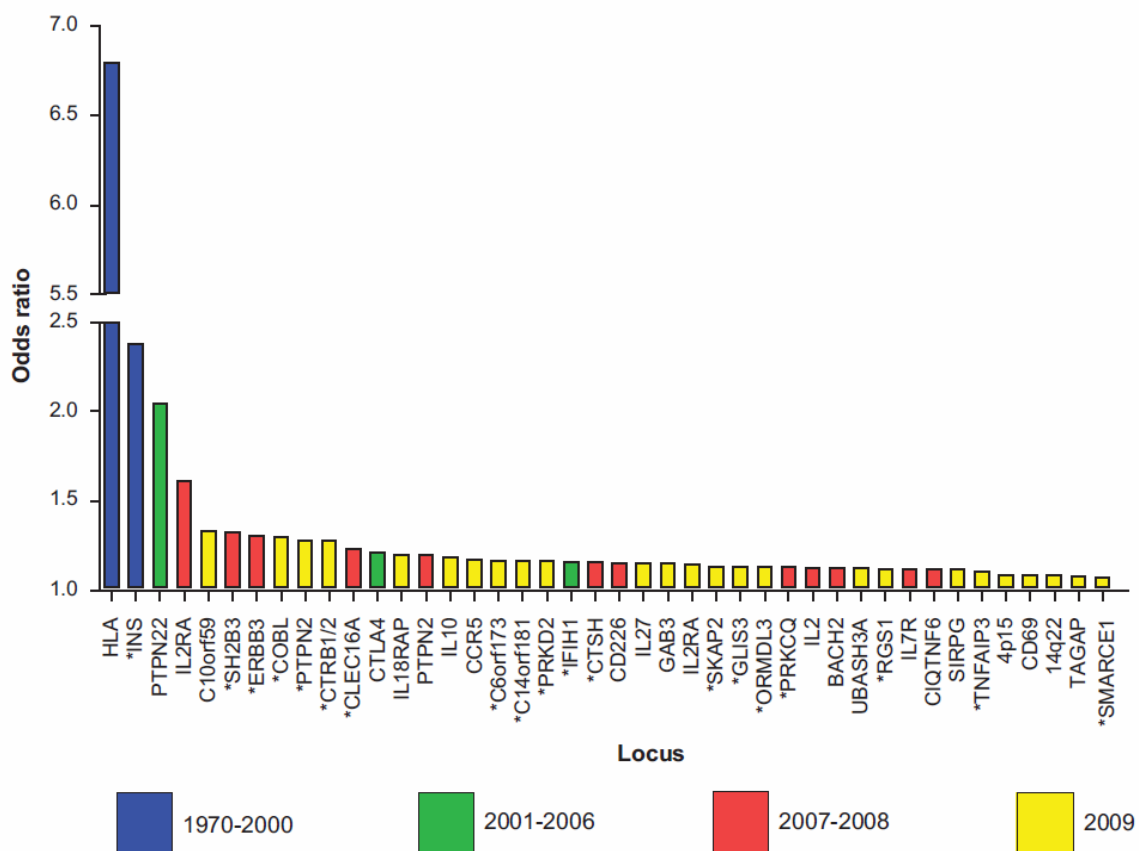
Slabší asociace s DM1 byla nalezena u HLA genů I. třídy (14).

Další genetická predispozice k DM1 je spojena s IDDM2 lokusem na chromosomu 11 obsahujícím gen pro insulin. Detailní mapování ukázalo, že náchylnost je způsobena polymorfismem VNTR (variable number of tandem repeats – variabilní počet tandemových opakování) promotorové oblasti genu. Riziko vzniku diabetu souvisí s počtem tandemových opakování. VNTR typu I (kratší opakování) je asociován vyšším rizikem DM1, VNTR typu III (delší opakování) naopak chrání před vznikem DM1 (17). Převažuje hypotéza, že VNTR reguluje míru exprese insulinu v thymu tím, že ovlivňuje vazbu AIRE proteinu (autoimmune regulator) na promotor. AIRE protein hraje důležitou roli v navození centrální tolerance tím, že spouští expresi antigenů periferních tkání v thymu během negativní selekce T lymfocytů. Význam exprese insulinu medulárními epiteliálními buňkami thymu (mTECs) byl ukázán v experimentu, kde specifická delece insulinu v mTECs vedla ke vzniku diabetu (18). VNTR typu I indukuje nižší expresi insulinu v thymu, což vede ke snížené toleranci a naopak insulin reaktivní T buňky jsou efektivněji eliminovány negativní selekcí v thymu při vyšší expresi insulinu mTECs u jedinců s protektivní VNTR III alelou.

Dalším faktorem, který může hrát roli v iniciaci DM1 je gen PTPN22 kódující protein LYP (lymphoid protein tyrosine phosphatase). Stejná alelická varianta způsobuje náchylnost k několika autoimunitním onemocněním (19). LYP protein je negativní regulátor TCR signalizace, který defosforyluje kinázy z rodiny Src (Lck a Fyn), ITAM motivy TCR ζ /CD3 komplexu, ZAP-70, Vav, valosin-containing protein a další molekuly (20).

Alelická varianta genu pro IL-2 receptor- α představuje další genetické riziko spojené s DM1 (21). Alfa řetězec IL-2 receptorového komplexu (IL-2R α , CD25) výrazně zvyšuje afinitu receptoru a je exprimován na přirozených T regulačních buňkách (nTregs) a na všech aktivovaných T buňkách. Tregs potřebují IL-2 pro růst a přežívání. Genetická variabilita IL2RA genu je spojena i s dalšími autoimunitními chorobami, mechanismus je zatím nejasný (14).

Další riziková alela kóduje CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4). CTLA-4 je molekula důležitá pro negativní regulaci imunitní odpovědi. Riziková alela je kromě DM1 asociována i s dalšími onemocněními (roztřesená skleróza, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses). A49G SNP vede k odlišnému zpracování v endoplasmatickém retikulu a snížené povrchové expresi CTLA-4 (22).



Obrázek 2. Většina genů asociovaných s DM1 hraje roli v imunitní odpovědi. Geny označené * jsou exprimovány v Langerhansových ostrůvcích pankreatu (23).

1.5 Vlivy prostředí

Propuknutí diabetu je důsledek komplexního autoimunitního procesu. Mezi iniciací a klinickým propuknutím choroby mohou uplynout měsíce i roky. Výrazně kratší je tato doba u malých dětí. Tato skutečnost znesnadňuje identifikaci environmentálních příčin onemocnění.

Jedním z faktorů, o kterých se soudí, že by mohly iniciovat DM1, jsou virové infekce. Navzdory intenzivnímu výzkumu ale zatím chybí přímé důkazy, které by označily některý virus jako příčinu DM1. Nejvíce nepřímých indicií směřuje k enterovirům, konkrétně ke coxsackie virům. U pacientů těsně po diagnóze bylo nalezeno větší množství neutralizujících protilátek proti coxsackie virům než u zdravých kontrol (24). CVB4 (coxsackievirus B4) může infikovat β buňky a způsobovat insulitidu u myší (25). U dětí krátce po diagnóze byla prokázána zvýšená reaktivita T buněk k CVB4 proteinům. Mezi T buňkami převažuje efektorový/paměťový fenotyp (26, 27). 2C protein coxsackievirů je sekvenčně podobný GADu (glutamát dekarboxyláza) – hlavnímu autoantigenu u DM1, což naznačuje mechanismus molekulárních mimikry (28). Studie na NOD myších také ukázaly, že k tomu, aby coxsackievirus vyvolal diabetes, je potřeba předchozí výskyt insulitidy (29).

Infekce enteroviry (virová RNA) byla nalezena ve vzorcích střešní biopsie u 75% diabetiků a 10% kontrol, což naznačuje chronickou infekci střeva, odkud by se viry mohly rozšířit i do pankreatu (30). Z dostupných dat se zdá, že enteroviry by za určitých podmínek mohly být spouštěcí příčinou DM1 alespoň u části pacientů. Z jiných studií ale vyplývá, že CBV může za určitých experimentálních podmínek chránit proti vzniku diabetu (31).

Potenciální asociace DM1 a infekcí rotaviry (nejčastější příčina dětské gastroenteritidy) je založena na možných molekulárních mimikry. Byla nalezena podobnost mezi autoantigeny typickými pro DM1 (GAD65, IA2) a virovým proteinem (32). Australská studie našla asociaci mezi infekcí rotaviry a přítomností protilátek proti ostrůvkovým antigenům u dětí s rizikem diabetu, ale další studie z Finska tuto souvislost nepotvrdila (33, 34).

Podle hygienické hypotézy je snižující se počet infekcí důvodem zvyšující se incidence autoimunitních a alergických onemocnění. Zlepšení hygieny a méně infekčních onemocnění vede k odlišné antigenní stimulaci během vývoje imunitního systému a zvýšené incidenci autoimunitních a alergických onemocnění. Tato hypotéza je podpořena poznatkem, že geografická distribuce alergických a autoimunitních onemocnění je inverzní k distribuci onemocnění infekčních (hepatitida A, gastrointestinální infekce, parazitické infekce) a zvýšenou incidencí alergických a autoimunitních chorob v posledních třech dekadách (35).

Také byla zaznamenána pozitivní korelace mezi socio-ekonomickým indexem a DM1 (36). Horší socioekonomické podmínky jsou spojené s vyšší expozicí infekčním chorobám v dětství, které mohou mít pozitivní vliv na vyvíjející se imunitní systém. DM1 je také v rizikových rodinách častější u prvorozených dětí, takže expozice infekcím od sourozenců by mohla mít protektivní vliv (37).

V této souvislosti se také uvažovalo o tom, zda nárůst incidence není způsoben plošným očkováním. Zavedení očkování a nárůst DM1 v rozvinutých zemích proběhl současně. Několik velkých studií nicméně nenalezlo kauzální vztah mezi očkováním a DM1 (38, 39).

Bakteriální složení střevní mikroflóry bylo uvažováno jako jedna z proměnných ovlivňujících DM1. U NOD myši a BB krys byl pozorován vyšší výskyt DM1 v podmínkách chovu bez specifických patogenů (SPF - specific pathogen free) a při podávání antibiotik (40). V jiných studiích ale naopak podávání antibiotik působilo na vznik DM1 preventivně (41). Zdá se, že střevo pacientů s diabetem má zhoršenou schopnost vytvářet souvislou bariéru a oddělovat tak střevní bakterie od imunitního systému (14). U DM1 pacientů je také častější subklinický zánět střeva. Podávání probiotik může u NOD myši zabraňovat vzniku DM1 (42). Zdá se tedy, že antibiotika a probiotika ovlivňují vznik DM1 tím, že zasahují do složení střevní mikroflóry. NOD myši s delecí v genu MyD88 (signální molekula TLR dráhy) jsou před vznikem diabetu chráněny a po přenosu do MyD88^{-/-} myši se diabetogenní klonu CD4⁺ T lymfocytů (nesoucí BDC2.5 TCR) v pankreatických lymfatických uzlinách nemnoží. Podávání antibiotik MyD88^{-/-} myším opět zvyšuje náchylnost k diabetu. Bezmikrobní MyD88^{-/-} myši mají vyšší výskyt DM1 oproti MyD88^{-/-} myším chovaným v SPF podmínkách. Abnormální reakce na některé střevní bakterie je zřejmě příčinou vzniku diabetu u tohoto modelu a tato dráha je u Myd88^{-/-} přerušena (43).

Albumin kravského mléka byl zkoumán z hlediska vyvolání autoimunity kvůli zkřížené reaktivitě sérových protilátek mezi albuminem a ICA-1 (povrchový protein β buněk). Vliv časného zavedení kravského mléka do stravy (na rozdíl od prodlouženého kojení) na výskyt diabetu ale nebyl prokázán a i ve studiích na NOD myších a BB krysách byly pozorovány protichůdné výsledky (14).

Pozornost byla věnována také glutenu. Dieta bez mléka založená na pšenici vede k vyššímu výskytu diabetu u NOD myši a k posunu cytokinové odpovědi ve střevě směrem k Th1 (44). Bylo navrženo, že načasování zavedení obilnin do stravy může u náchylných jedinců ovlivňovat vývin diabetu. Zvýšená reaktivita ke glutenu u diabetiků může být ale také

důsledek porušené slizniční imunity spíše než toho, že by gluten specificky spouštěl autoimunitu k Langerhansovým ostrůvkům (14).

Pouze malá část vitamínu D je přijímána v potravě, většina je syntetizována v kůži při expozici slunečnímu záření (UVB) ze 7-dehydrocholesterolu. Vitamin D ovlivňuje jak imunitní systém, tak přímo β buňky. Receptor vitamínu D je exprimován na většině buněk imunitního systému: monocytů, makrofágů, dendritických buňkách, neutrofilech, aktivovaných Th a Tc lymfocytech a aktivovaných B buňkách (45).

Vitamin D inhibuje maturaci dendritických buněk (DCs) a snižuje jejich schopnost prezentovat antigen a tedy aktivovat T buňky (46). Vitamin D působí také přímo na T lymfocyty a potlačuje produkci prozánětlivých Th1 a Th17 cytokinů (47). Na druhou stranu podporuje chemotaxi a fagocytózu monocytů a makrofágů a zvyšuje jejich schopnost zabíjet bakterie (45).

Propuknutí DM1 je ovlivněno ročním obdobím a negativně koreluje s množstvím světla (hodiny za měsíc) (48). Také byl pozorován severo-jihní gradient ve výskytu autoimunit v Severní Americe, Evropě a Číně (35, 124, 125). V několika studiích byla prokázána nižší hladina vitamínu D u pacientů s čerstvým záchytem diabetu než u zdravých kontrol (49, 50, 51). U NOD myši vede deficience vitamínu D k časnějšímu propuknutí a vyšší incidenci DM1 (80).

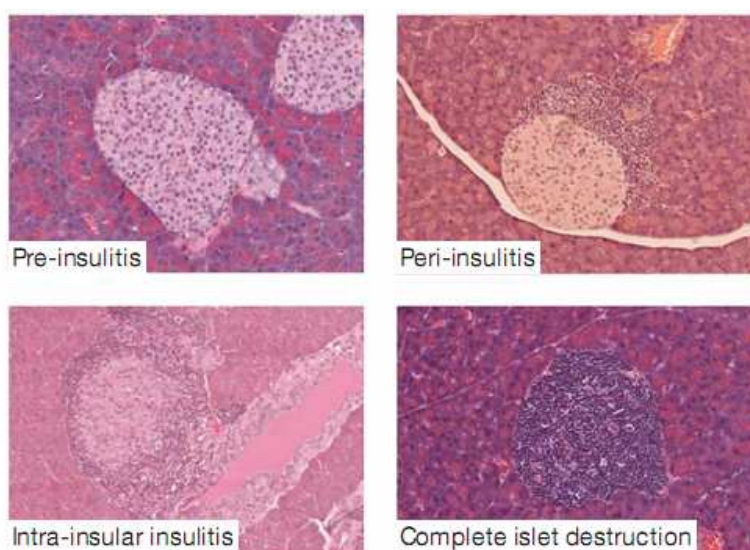
2 Imunopatologické mechanismy

DM1 je autoimunitní onemocnění způsobené specifickou destrukcí β buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu produkujících insulin. Za zničení β buněk je zodpovědná hlavně buněčná složka imunitního systému. Dochází k infiltraci Langerhansových ostrůvků makrofágy, DCs, T a B lymfocyty a NK (natural killer) buňkami.

2.1 Insulitida

Po iniciaci autoimunitního procesu následuje asymptomatická fáze, která je rozpoznatelná přítomností autoantilátěk v séru. Klinické propuknutí onemocnění může následovat až několik let po spouštěcí události. Po iniciaci autoimunity dochází k postupné infiltraci ostrůvků imunitními buňkami – insulitidě. Infiltrát je tvořen hlavně T a B lymfocyty, makrofágy a DCs. Když je zničeno více jak 80-90% β buněk, zbývající buňky nejsou schopné pokrýt potřebu insulinu a projeví se příznaky diabetu (53).

Insulitida je podrobněji popsána na myším modelu diabetu. K prvním buňkám infiltrujícím ostrůvky NOD myši přibližně ve třech týdnech věku patří DCs a makrofágy. Krátce poté mohou být detekovány T buňky obklopující ostrůvky (peri-insulitis) (54). Poškození ostrůvků vede k uvolnění dalších autoantigenů, jejich vystavení imunitnímu systému a aktivaci dalších T buněk (epitope spreading – rozšiřování epitopu) a amplifikaci zánětlivé reakce (Obrázek 3).



Obrázek 3: Infiltrace ostrůvků lymfocyty u NOD myši (55).

2.2 T lymfocyty

Klíčovou roli v autoimunitní destrukci β buněk hrají T lymfocyty. Důkazem toho je, že indukce diabetu virovou infekcí (EMC-M virus) je možná pouze u thymus-kompetentní normální myši, ale ne u nude myši (která nemá thymus tzn. ani funkční T buňky) (56). Athymické NOD myši a NOD.scid myši diabetes nerozvinou. Podávání anti-CD3 protilátek NOD myším s funkčním thymem zabraňuje vzniku diabetu. Klony T buněk specifické pro ostrůvkové antigeny byly izolovány ze zánětem zasažených ostrůvků a splenocytů prediabetických i diabetických NOD myší. Většina pokusů s přenosem T buněk ukázala, že pro přenos diabetu jsou potřeba CD4+ i CD8+ T lymfocyty. Cytotoxické CD8+ T buňky izolované z ostrůvků diabetických NOD myší zabíjí β buňky *in vitro* a s pomocí CD4+ buněk vyvolají diabetes po adoptivním transferu (57).

Cytotoxické CD8+ T buňky se podílí na destrukci β buněk mechanismem perforin/granzymy i Fas/FasL interakcí. NOD myši s defektní tvorbou perforinu vyvíjí insulitidu, ale ne diabetes. Fas deficientní NOD myši netrpí insulidou ani diabetem. Apoptóza β buněk může být dále zprostředkována TNF α (tumor necrosis factor) tvořeným CD4+ T buňkami (57).

Autoreaktivní T buňky často rozeznávají stejné autoantigeny jako autoproti látky (insulin, GAD, ZnT8). T buňky mohou rozeznávat i další antigeny jako IGRP (islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein) a chromogranin A a to u NOD myší a lidí nesoucích určité alely asociované s diabetem (55).

2.2.1 Th1/Th2

Naivní CD4+ T lymfocyty mohou diferencovat na několik typů efektorových Th buněk (Obrázek 4). Pro autoimunitní destrukci β buněk jsou zásadní Th1 lymfocyty charakteristické produkcí interferonu (IFN) γ a IL-2 (58). Th1 cytokiny (IL-2, IFN γ) se podílí na vzniku diabetu zatímco Th2 cytokiny (IL-4) proti vzniku diabetu spíše chrání.

Studie na NOD myších ukázaly, že destrukce β buněk Langerhansových ostrůvků je doprovázena infiltrací IFN γ produkujících Th1 lymfocytů (59). Experimentálně indukovaná insulitida charakteristická IL-4 produkujícími Th2 lymfocyty je většinou benigní, nebo dokonce chrání před destrukcí ostrůvků (60).

Podávání anti-IFN γ protilátek zabrání vzniku diabetu u NOD myší. Naopak nucená exprese IFN γ v β buňkách normálních myší vede k vývinu diabetu. Genetická absence IFN γ u NOD myší zpomalí průběh onemocnění, ale nezabrání mu. Systémové podávání IL-4 a IL-10

NOD myším a nucená exprese IL-4 v β buňkách zabrání vzniku onemocnění. Lokální exprese IL-10 v ostrůvkách vznik diabetu naopak akceleruje (57).

Infiltrace Th1 lymfocyty dominuje i u DM1 pacientů (61, 62). T lymfocyty DM1 pacientů po expozici ostrůvkovým antigenům (proinsulin, IA2) prezentovaným diabetogenní alelou HLA-DR4 polarizují silně směrem k Th1 odpovědi, zatímco nediabetické HLA-identické kontroly spíše k Th2/Treg odpovědi (58).

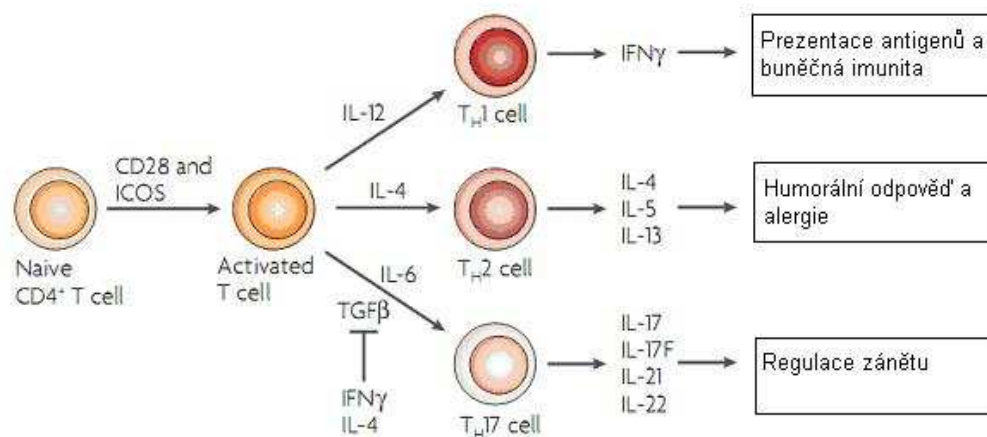
2.2.2 Th17

Studie na zvířecích modelech naznačují, že hlavní roli v patogenezi DM1 hrají IFN γ sekretující Th1 buňky, které aktivují makrofágy a cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty.

S objevem dalších podskupin pomocných Th buněk se do centra pozornosti dostaly Th17 lymfocyty, které se ukázaly jako významné pro vznik některých autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, rotrošená skleróza, chronická zánětlivá střevní onemocnění) (63). Podávání neutralizačních anti-IL-17 protilátek NOD myším snížilo incidenci diabetu a infiltraci ostrůvků oproti kontrolní skupině, ale pouze pokud byly protilátky podávány v efektorové fázi onemocnění. Inhibice IL-17 během počáteční fáze rozvoje autoimunity neměla na progresi diabetu vliv. Relativně malé množství Th17 buněk v infiltrátu ostrůvků naznačuje, že Th17 se podílejí spíše na regulaci zánětu v sekundárních lymfoidních orgánech než na přímé destrukci ostrůvků (64).

Th17 buňky z BDC2.5 myši exprimující transgenní TCR rozpoznávající antigen ostrůvkových buněk vyvolávají diabetes po adoptivním transferu do NOD.scid recipientů. Přenesené buňky ale mění fenotyp na Th1-like a exprimují IFN γ . Podávání anti-IFN γ protilátek po přenosu zeslabilo průběh diabetu zatímco podávání anti-IL-17 nemělo na vývoj diabetu vliv (65).

Monocyty z periferní krve pacientů s DM1 po izolaci spontánně sekretují prozánětlivé cytokiny IL-1 β a IL-6, které indukují expresi IL-17 u paměťových CD4⁺ T lymfocytů. Tyto *in vivo* aktivované monocyty indukují více IL-17 sekretujících buněk z paměťových buněk v porovnání s monocytami od zdravých kontrol (66).



Obrázek 4: Vývoj naivních CD4⁺ T lymfocytů. Po aktivaci mohou pod vlivem cytokinového prostředí vznikat různé druhy efektorových T lymfocytů, které mají různé funkce v imunitní odpovědi. V přítomnosti IL-12 dochází k diferenciaci na Th1 buňky typické produkcí IFN γ . Th1 buňky jsou důležité pro buněčnou odpověď proti intracelulárním patogenům. Pod vlivem IL-4 diferencují naivní T buňky na Th2 lymfocyty, které aktivují humorální odpověď a mohou hrát roli i v alergických stavech. Th2 buňky jsou charakteristické produkcí IL-4, IL-5 a IL-13. Kombinace cytokinů IL-6 a TGF β vede ke vzniku Th17 buněk exprimujících IL-17, IL-21 a IL-22. Tyto buňky hrají důležitou roli v regulaci zánětu. (Upraveno dle 67).

2.2.3 Tregs

Soudí se, že patogeneze autoimunitních onemocnění je způsobena selháním mechanismů centrální a periferní tolerance. FoxP3⁺ regulační T lymfocyty jsou důležité pro udržení tolerance k vlastním tkáním. Podílejí se na tlumení autoimunitních reakcí jednak přímým mezibuněčným kontaktem, jednak tvorbou tlumivých cytokinů (TGF β , IL-10). Mutace v hlavním transkripčním faktoru Tregs – FoxP3 – vede k multiorgánovému autoimunitnímu onemocnění (IPEX syndromu) (55). V době propuknutí diabetu u NOD myší je počet a funkce Tregs v pankreatu snížen (68). Deplece Tregs zhoršuje průběh diabetu u NOD myší, zatímco adoptivní transfer Tregs zabrání propuknutí onemocnění (69). U lidí nebyla nalezena změněná frekvence Tregs v periferní krvi diabetiků (70, 71). Některé studie ale našly změny ve funkčních vlastnostech Tregs izolovaných z krve DM1 pacientů. Byla zjištěna snížená schopnost suprese proliferace T buněk regulačními buňkami diabetiků a nižší koncentrace IL-10 v těchto kulturách (72).

2.3 B lymfocyty

DM1 je charakteristický přítomností autoprotilátek proti ostrůvkovým autoantigenům. Nicméně byl popsán případ DM1 u pacienta s těžkou deficiencí B lymfocytů, takže protilátky nejsou pro destrukci ostrůvků zásadní (73).

Hlavní autoprotilátky u DM1 rozpoznávají 4 autoantigeny: IA2, insulin, GAD65 a ZnT8 (74). Časná přítomnost autoprotilátek ukazuje na roli B buněk v počátečních imunologických procesech. U NOD myši infiltrují B buňky pankreas během raných stádií onemocnění a genetický knock-out nebo odstranění B buněk pomocí protilátek má protektivní účinek. B buňky zřejmě přispívají k patogenezi DM1 tím, že prezentují antigen diabetogenním CD4+ a CD8+ buňkám (14). U dětí se většinou první objevují protilátky proti insulinu, u adolescentů a dospělých jsou častější anti-GAD protilátky. Anti-IA2 a ZnT8 lze detekovat s progresí onemocnění (56).

2.4 Makrofágy

V časně fázi insulitidy tvoří většinu buněk infiltrujících ostrůvky makrofágy a DCs. Infiltrace těchto buněk předchází napadení ostrůvků T buňkami, NK buňkami a B lymfocyty (u NOD myši, BB krys). Inaktivace makrofágů oxidem křemičitým vede k prevenci insulitidy a diabetu. Splenocyty z NOD myši po depleci makrofágů a po transferu do NOD.scid (severe combined immunodeficiency) recipienta nevyvolávají diabetes, na rozdíl od kontrolních NOD myši s makrofágy, což naznačuje, že makrofágy jsou nezbytné pro vznik efektorových T buněk cytotoxických pro β buňky. U NOD myši s depletovanými makrofágy nedochází k destrukci transplantovaných ostrůvků T buňkami. V prostředí bez makrofágů byla snižená Th1 odpověď vlivem nedostatku IL-12, cytokinu produkovaném hlavně makrofágy. Podání IL-12 zvrátilo preventivní účinky odstranění makrofágů na vývoj diabetu (75). Makrofágy tedy přispívají k vývoji diabetu také polarizací imunitní odpovědi směrem k Th1.

Oproti kontrolním myším kmenům makrofágy z NOD myši produkují vyšší množství prozánětlivých cytokinů IL-12, IL-1 β , TNF α po stimulaci CD40L, LPS nebo po pohlcení apoptotické buňky. Makrofágy NOD myši jsou také méně účinné v odstraňování apoptotických buněk (76).

2.5 NK buňky

NK buňky byly detekovány v pankreatu NOD myši i diabetických pacientů. Deplece T regulačních buněk u NOD myši vede k projevům diabetu způsobených zesílenou aktivací NK

buněk v pankreatu (77). Na druhou stranu byla popsána i protektivní role NK buněk na myším modelu DM1. U diabetiků byla pozorována zhoršená funkce NK buněk. Role NK buněk zřejmě závisí na infekčním kontextu a stupni insulitidy (74).

2.6 iNKT buňky

iNKT buňky jsou $\alpha\beta$ T lymfocyty rozpoznávající nepolymorfní CD1d molekulu prezentující glykolipidy. Tyto buňky exprimují nepolymorfní α řetězec asociovaný s omezeným repertoárem β řetězců. Po aktivaci TCR produkují velké množství různých cytokinů a podílí se na regulaci imunity. Byl popsán jejich preventivní vliv na autoimunitní onemocnění. Myši se zvýšenou frekvencí iNKT buněk (adoptivním transferem nebo genovou manipulací) mají nižší incidenci diabetu. Aktivace iNKT buněk specifickým agonistou (α -galaktosylceramid) inhibuje vývoj diabetu u NOD myši. NOD myši mají snížený počet a zhoršenou funkci iNKT buněk a tento defekt by mohl přispívat k náchylnosti k DM1 (74).

2.7 Autoantigeny

Mezi hlavní autoantigeny identifikované u člověka patří GAD65, IA2, insulin a ZnT8. Proti těmto autoantigenům lze detekovat jak T buněčnou odpověď, tak přítomnost autoprotilátek. U dětí se většinou první objevují anti-insulinové protilátky, u adolescentů a dospělých jsou častější anti-GAD protilátky. Anti-IA2 a anti-ZnT8 lze detekovat s progresí onemocnění. Přesná role těchto autoantigenů v patogenezi onemocnění není známa (56).

2.7.1 GAD65

GAD (glutamic acid decarboxylase) je enzym, který dekarboxyluje glutamát na kyselinu γ -amino butyrovou (GABA). Ta funguje jako inhibiční neurotransmitter v centrální nervové soustavě. Nedostatek GABA neurotransmiteru v mozku je asociován s onemocněním stiff person syndrome (SPS). Toto vzácné onemocnění se projevuje ztuhlostí svalů a křečemi. U pacientů s SPS jsou přítomné vysoké titry anti-GAD autoprotilátek. Od protilátek přítomných u DM1 se ale liší rozpoznávaným epitopem a izotypem.

Dekarboxyláza kyseliny glutamové je exprimována v pankreatu, její funkce je ale nejasná. Stimulace β buněk glukózou vede k uvolnění GADu. Autoprotilátky proti GAD

mohou být jedním z časných znaků probíhajícího autoimunitního zánětu. Anti-GAD protilátky jsou důležitým markerem pro predikci DM1 (78).

Kromě β buněk je GAD exprimován i v mozku, varlatech, vaječnících, thymu a žaludku savců, v lidských α , δ a pp buňkách pankreatu (polypeptide producing cells). Jsou známé dvě formy GADu: GAD65 a GAD67. Jsou kódované 2 různými geny, sekvenční homologie aminokyselin je přibližně 70%. Exprese těchto dvou forem ostrůvkovými buňkami se liší u různých živočišných druhů: u člověka a krysy převažuje exprese GAD65, u myši GAD67 (57).

GAD-reaktivní Th1 buňky z NOD myši po adoptivním přenosu vyvolají diabetes u NOD.scid (severe combined immunodeficiency) recipientů. Exprese GADu pod MHCII promotorem u NOD myši zrychlila propuknutí a zvýšila incidenci onemocnění. Selektivní suprese exprese GADu v β buňkách zabránila vzniku diabetu, což naznačuje, že u NOD myši by GAD mohl být spouštějícím autoantigenem ve vývoji DM1 (79).

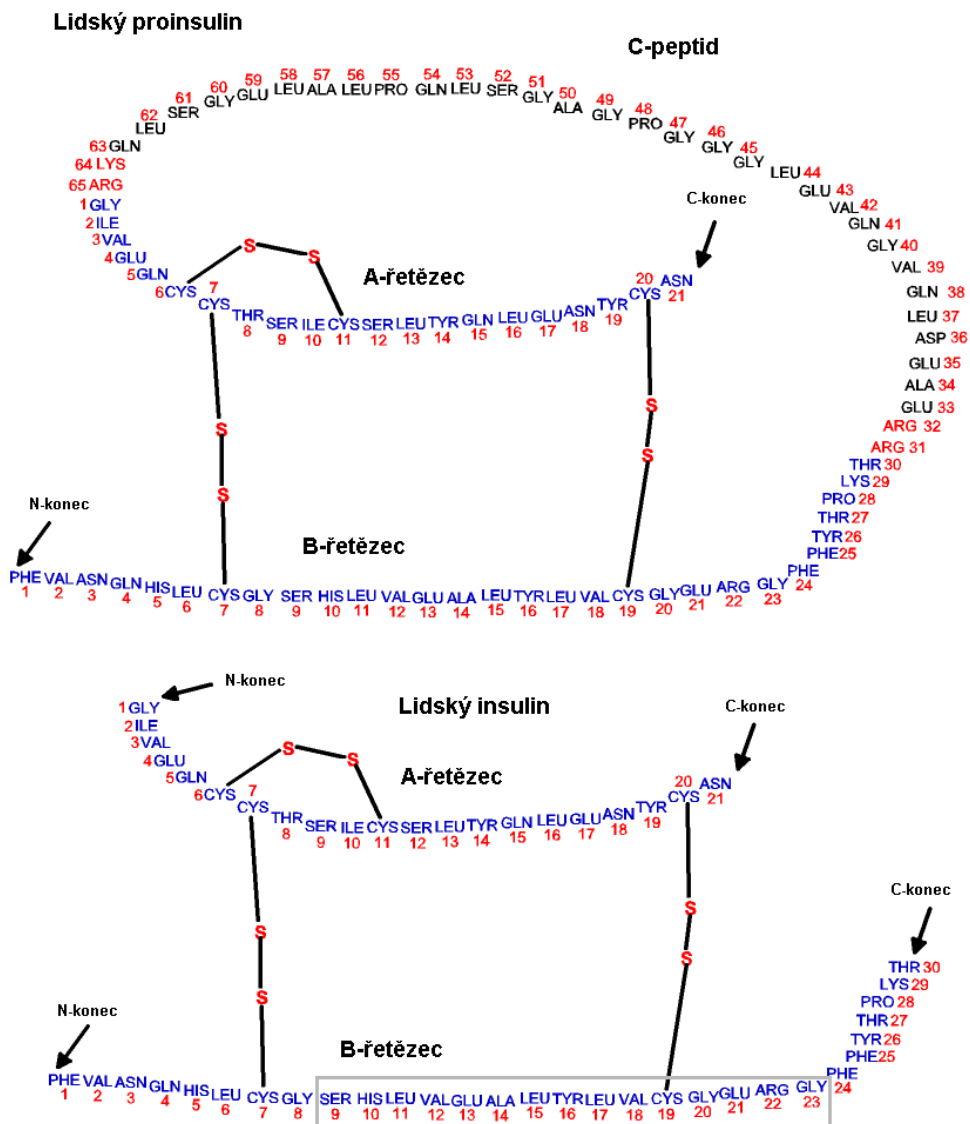
2.7.2 Insulin

Insulin je jediný autoantigen asociovaný s DM1 specifický pro β buňky (Obrázek 5). Autoprotilátky proti insulinu byly detekovány u 59% pacientů v pozdní preklinické fázi diabetu nebo těsně po diagnóze (57). Klony CD4+ T buněk specifické pro B řetězec insulinu zrychlují průběh diabetu u mladých NOD myši a vyvolávají diabetes po adoptivním transferu do NOD.scid recipientů. Orální podávání insulinu u NOD myši zpomaluje průběh onemocnění. Intrathymická injekce a subkutánní nebo intranasální podání potlačuje vznik diabetu u NOD myši (57).

Podávání insulinu co nejdříve po diagnóze diabetu vede k prodloužení fáze remise a zlepšení residuální sekrece insulinu. Tento efekt časného zahájení insulinoterapie se většinou vysvětluje hlavně ochranou β buněk snížením nároků na jejich produkci insulinu. Diazoxid (primárně antihypertenzivum) je látka blokuující endogenní sekreci insulinu a indukuje tak klidový stav β buněk. Podávání diazoxidu vedlo k prodloužení residuální funkce β buněk u dospělých diabetických pacientů. Podávání u dětí však mělo nežádoucí účinky a prodloužilo funkci β buněk pouze na limitovanou dobu (57).

Schopnost β buněk tvořit insulin se zjišťuje měřením C-peptidu. C-peptid je 31 aminokyselin dlouhý peptid spojující A a B řetězec proinsulinu, který je během maturace insulinu odštěpován a uvolňován do krevního oběhu, kde cirkuluje nezávisle na insulinu. U DM1 lze sledovat progresivní pokles hladiny C-peptidu až pod hladinu detekovatelnosti. C-

peptid má zřejmě fyziologickou funkci sám o sobě: ovlivňuje permeabilitu cév, snižuje propustnost cév v retině a má pozitivní efekt na funkci nervů (78).



Obrázek 5: Sekvence lidského proinsulinu a insulinu. Sekvence B řetězce aa 9-23 je rozpoznávána imunitním systémem u DM1 pacientů těsně po manifestaci a jedinců s vysokým rizikem vzniku DM1, ale ne u HLA identických zdravých kontrol (80). Upraveno dle (81).

2.7.3 IA-2

Tento protein patřící do protein tyrosin fosfatázové (PTP) rodiny je považován za jeden z hlavních autoantigenů DM1. Autoprotilátky proti IA2 byly nalezeny u 70% pacientů s DM1, ale ne u NOD myši ani BB krysy (57). Protilátky nalezené u DM1 pacientů při manifestaci rozpoznávají převážně cytoplasmatickou doménu. IA-2-specifické IFN γ -sekretující PBMC byly detekovány u DM1 pacientů, ale ne u zdravých kontrol (80).

2.7.4 ZnT8

Protilátky proti ZnT8 jsou přítomné u 60-80% pacientů při manifestaci DM1 a u 30% pacientů s jinými autoimunitními onemocněními. Tyto protilátky byly detekovány u 26% DM1 pacientů negativních na ostatní autoprotiilátky asociované s diabetem (82). Protilátky proti ZnT8 se objevují především v pozdní fázi insulitidy a jejich přítomnost je charakteristická spíše pro starší jedince (83).

3 Intervence

3.1 Preventivní intervence

3.1.1 Identifikace prediabetu

Prediabetes je období, během kterého probíhá destrukce β buněk, ale zbývá ještě dostatečné množství buněk pro udržení glukózové homeostáze. Jedinci s rizikem vzniku DM1 mohou být rozpoznáni na základě genetického vyšetření. Ačkoli 70% diabetiků nese rizikový genotyp (v HLA lokusu), pouze 3-7% nositelů těchto genetických markerů onemocní diabetem (84). Dalším markerem probíhajícího autoimunitního zánětu je přítomnost autoprotilátek. Přítomnost dvou a více autoprotilátek je spojená s vyšším rizikem progresu do diabetu než přítomnost pouze jedné autoprotilátky (84, 85, 86). Množství a druh protilátek se v průběhu onemocnění mění a protilátky mohou i úplně vymizet (84).

3.1.2 Antigenně specifické navození orální tolerance

Během autoimunitního procesu se rozšiřuje repertoár rozpoznávaných autoantigenů. Pro navození tolerance se zatím zkoušely pouze postupy používající jeden autoantigen. Ideálně by mělo docházet k „bystander“ supresi T regulačními buňkami. Tento postup nicméně při aplikaci na pacienty nepřinesl jednoznačně pozitivní výsledky.

V „DPT-1“ (Diabetes Prevention Trial-1) studii nebyl prokázán pozitivní efekt orálního nebo subkutánního podávání insulínu. Při pozdější analýze se ukázalo, že orální podávání insulínu oddálí propuknutí DM1 pouze u podskupiny s vysokými titry autoprotilátek proti insulínu (87, 88).

V „DM1 Prediction and Prevention Study“ nebyl prokázán pozitivní vliv denního intranasálního podávání insulínu (89), naopak „Intranasal Insulin Trial“ ukázal, že podávání insulínu jedincům s vysokým rizikem vzniku DM1 vedlo ke zvýšení tvorby protilátek a snížení T buněčné odpovědi k insulínu (14).

3.2 Intervenční studie těsně po manifestaci diabetu

Cílem intervenčních studií u nově diagnostikovaných pacientů je co nejdříve zachování residuální sekrece insulínu. V době diagnózy diabetu mají někteří pacienti zachovanou

zbytkovou funkci β buněk. U předškolních dětí většinou dochází ke ztrátě residuální funkce do jednoho roku od diagnózy. Starší děti a adolescenti mohou mít zachovanou zbytkovou sekreci insulinu i po několika letech. Ve vzácných případech dochází ke kompletní remisi – funkce β buněk se krátce po diagnóze výrazně zlepšuje, metabolismus glukózy se normalizuje a nějaký čas není třeba podávat insulin. Častější je částečná remise (tzv. „honeymoon period“), charakterizovaná stabilní hladinou krevní glukózy, bez epizod hypoglykémie a ketoacidózy. Tato fáze se objevuje u většiny pacientů alespoň na několik měsíců. V tomto období stačí podávání relativně malých dávek insulinu. I malá reziduální sekrece insulinu zlepšuje kvalitu života pacientů – umožňuje lepší kontrolu glykémie a snižuje riziko akutních i pozdních komplikací (78).

3.2.1 Nespecifické intervence

Antigeně nespecifické intervence se zatím nejvíce zaměřovaly na T lymfocyty, které se podílí na efektorové fázi destrukce ostrůvků (Obrázek 6).

Cyklosporin inhibuje tvorbu IL-2 a tudíž funkci T lymfocytů, bohužel také protektivních T regulačních buněk. Léčba cyklosporinem vyvolala krátkodobou remisi onemocnění, dlouhodobé užívání ale není možné kvůli závažným vedlejším účinkům (90, 91, 92).

Anti-CD3 monoklonální protilátky způsobují krátkodobou internalizaci TCR-CD3 komplexu, což zabrání rozpoznávání antigenu. Ovlivňují také přenos signálu z TCR a indukují anergii nebo apoptózu preferenčně u aktivovaných Th1 buněk (93). Apoptóza je částečně způsobena CD95/CD95L interakcí se sousedními T buňkami, což vysvětluje největší účinek v místech s vysokou hustotou efektorových T buněk tzn. v místě zánětu. Podání anti-CD3 protilátek také indukuje vývoj Tregs (94). Používají se plně humanizované IgG1 protilátky Tepluzimab a TRX4/Otelixizumab. Tepluzimab oddálil u většiny pacientů progresi DM1 o více než rok. Po třech letech od léčby měli pacienti lepší vyšší hladinu C-peptidu a nižší dávky insulinu oproti kontrolní skupině. TRX/Otelixizumab také zachoval funkci β buněk a snížil potřebu insulinu ještě 18 měsíců po léčbě (95). Nicméně se nepodařilo dosáhnout normoglykémie a objevily se i vedlejší účinky – anti-idiotypové protilátky a reaktivace EBV (Epstein-Barr virus) (96).

Další přístup využíval anti-CD20 monoklonální protilátky (Rituximab) pro odstranění B buněk, které se na patologii DM1 podílejí zřejmě hlavně jako antigen prezentující buňky.

Druhá fáze klinické studie prokázala prezervaci C-peptidu po dobu 3 – 6 měsíců. Oproti anti-CD3 protilátkám je ale účinnost nízká (97).

Dalším možným cílem pro terapii je kostimulační molekula CTLA-4. Fúzní molekula CTLA-4 a Ig řetězce (Abatacept) zabraňuje CD28/B7 kostimulaci T buněk a tím tlumí jejich aktivitu. Monoterapie je zatím ve druhé fázi klinických testů (14).

V současnosti probíhají klinické studie testující IL1RA (antagonista IL-1 receptoru) na pacientech krátce po diagnóze. IL-1 je cytotoxický pro β buňky *in vitro* a anti-IL-1 terapie byla úspěšná u myšího modelu (14).

Antagonisté TNF α Etanercept (solubilní TNF receptor) a Infliximab (monoklonální protilátka) se používají při léčbě revmatoidní artritidy. V druhé fázi klinické studie Etanercept snížil HbA1c a zlepšil tvorbu insulinu (98). Role TNF α u diabetu je ale komplikovanější. Agonisté TNF α a TNF receptoru mohou selektivně zabíjet autoreaktivní CD8+ T buňky (99). U myší TNF α v časně fázi autoimunitní záněť spíše akceleruje, později ho naopak tlumí (100, 101). Byly popsány případy vývoje diabetu u pacientů s artritidou (revmatoidní artritida, juvenilní idiopatická artritida) po léčbě Etanerceptem, ale i opačný případ ústupu DM1 u pacientů s revmatoidní artritidou po anti-TNF α terapii (102, 103, 104).

3.2.2 Antigen-specifické intervenční studie

Cílem je navodit specifickou toleranci bez nutnosti celkové imunosuprese. Vystavení specifickému množství autoantigenů může vést k modulaci imunitní odpovědi – např. léčba alergií. U zvířecích modelů se prokázalo, že podávání autoantigenů může oddálit nebo i zabránit propuknutí diabetu. Domnělý mechanismus působení tohoto přístupu je posunutí rovnováhy v populaci CD4+ T buněk od Th1 k Th2. Tento posun by měl vést ke k potlačení prozánětlivých cytokinů a indukci regulačních T buněk (78).

HSP

Syntetický peptid Diapep 277 (část HSP60) byl podáván dospělým pacientům po diagnóze DM1 a léčba vedla k zlepšení zbytkové sekrece insulinu bez nežádoucích účinků (105). U dětí a adolescentů ale tato léčba nepřinesla žádný signifikantní efekt (106), zřejmě kvůli intenzivnější autoimunitě typické při manifestaci v nižším věku.

Insulin

V první fázi klinické studie vedla vakcinace B řetězcem insulinu spolu s IFA (incomplete Freund's adjuvans) ke zvýšenému množství insulin-specifických T regulačních buněk až do dvou let po vakcinaci (107).

4 Metodika

4.1 Materiál

Materiálem byla periferní žilní krev odebíraná do 2 zkumavek obsahujících Li-heparin (Vacuette, objem 9 ml).

4.2 Chemikálie

- Pracovní médium: Earle´s Balanced Salt Solution (EBSS) (Sigma, USA)
- Kultivační médium: RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma, USA)
- Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Švédsko)
- Směs antibiotik a glutaminu: penicilin (1µl/ml), streptomycin (1 µg/ml), L-glutamin (200 mM) (Sigma, USA)
- Syntetické diabetogenní antigeny: GAD65 celá molekula , IA2 sekvence a.a. 853-872 (ProImmune, UK)
- Phytohemagglutinin (PHA) (Sigma, USA)
- Kryoprezervant: dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, USA)
- Protilátky na průtokovou cytometrii:

CD3 FITC	Miltenyi Biotec
CD3 APC H7	BD Biosciences
CD4 Alexa Fluor 700	EXBIO Praha a.s.
CD8 APC	EXBIO Praha a.s.
CD14 PE	Miltenyi Biotec
CD19 FITC	Invitrogen
CD25 PE	Miltenyi Biotec
CD45 PerCp	Miltenyi Biotec
CD 127APC	Miltenyi Biotec
Směs CD3 FITC a CD(16+56) PE	Beckman Coulter

- Human IFN γ ELISpot Plus Kit (Mabtech, Švédsko)

- Human Interleukin-17A ELISpot Plus Kit (Mabtech, Švédsko)

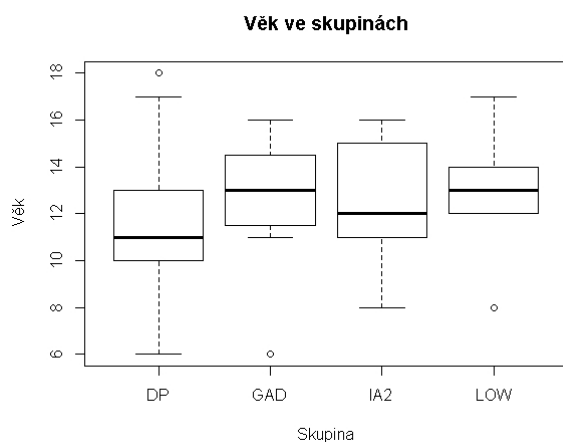
4.3 Pístroje a programy

- Centrifuga: Hettich Universal 32 R
- Mikroskop: Olympus CX31
- Průtokový cytometr: BD LSR II (BD Biosciences, USA)
- Summit v4.3 (USA)
- R Studio 2.14.1 (Rakousko)

4.4 Charakteristika souboru

Byly shromážděny vzorky od 76 dětí s potvrzenou diagnózou DM1, ze vzorků byly separovány PBMC, které byly zamrazeny. Při náběru byla metodou RIA (radio immunoassay) vyšetřena hladina anti-GAD65 a anti-IA2 protilátek (Obrázek 8) a HbA1c. Po vyšetření protilátek bylo do souboru zařazeno 30 protilátkově pozitivních pacientů (cut off GAD65: 0,8 U/ml; IA2: 0,6 U/ml): 15 s převahou anti-GAD65 protilátek a 15 s převahou anti-IA2. Ve skupině bylo 18 dívek a 12 chlapců. Rozdělení věku ve skupinách viz Obrázek 7.

	minimum	median	průměr	maximum
věk (roky)	6	12	12,3	18
trvání DM1 (roky)	0,3	4,5	4,5	10,5

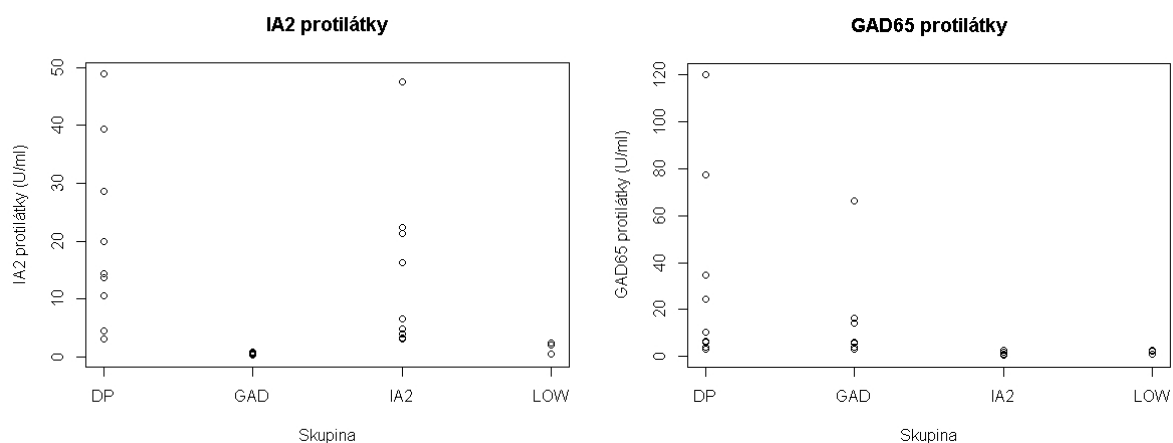


Obrázek 7: Graf rozdělení věku ve skupinách.

Pacienty jsme rozdělili do 4 skupin:

- DP – vysoká hladina GAD65 i IA2 protilátek (GAD65 i IA2 > 3 U/ml)
- GAD – vysoká hladina GAD65 protilátek (GAD65 > 3 U/ml)
- IA2 – vysoká hladina IA2 protilátek (IA2 > 3 U/ml)
- LOW – nízká hladina GAD65 i IA2 protilátek (GAD65 i IA2 < 3 U/ml)

DP	9 pacientů
GAD	7 pacientů
IA2	9 pacientů
LOW	5 pacientů

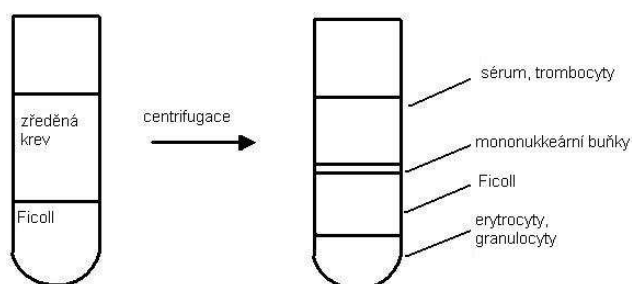


Obrázek 8: Graf zastoupení anti-GAD65 a anti-IA2 protilátek ve skupinách.

4.5 Metody

4.5.1 Gradientová centrifugace

PBMC byly izolovány pomocí hustotní gradientové centrifugace na ficollu (Obrázek 9). Tato metoda využívá rozdílnou hustotu jednotlivých buněk. Krev se naředí médiem (EBSS) 1:1 a navrství na ficoll, poté se centrifuguje 30 minut při 400g. Na dně se vytvoří vrstva erytrocytů, nad nimi ve vrstvě ficollu se nachází granulocyty. Mononukleární buňky (monocyty, lymfocyty, makrofágy) mají nižší hustotu a vytvoří prstenec na povrchu ficollu (112). Odebrané PBMC se dále promývaly a po izolaci zamrazily.



Obrázek 9: Schéma separace PBMC pomocí gradientové centrifugace.

4.5.2 Zamražení a rozmražení

PBMC jsme zamrazili v médiu RPMI s 20% FBS. Jako kryoprotektivum jsme použili DMSO (dimethyl sulfoxid), který zabraňuje tomu, aby se při zamrznutí vytvořily velké krystaly vody, které by poškodily buňky. DMSO je potřeba přidávat po kapkách (na konečnou koncentraci 10%). Buňky jsme zamrazili v nádobě s izopropanolem (Mr. Frosty – Nalgene) a skladovali v -80°C . Izopropanol zpomaluje zamrznutí, takže teplota klesá o cca $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Po rozmražení jsme buňky naředili RPMI, promyli médiem se sérem a nechali přes noc v inkubátoru, abychom odstranili buňky poškozené mražením a na ELISPOT nanесли pouze buňky schopné další kultivace.

4.5.3 Stimulace antigeny

Buňky (v koncentraci 1 mil buněk/ml) byly stimulovány syntetickými diabetogenními antigeny GAD65 a IA2 ve třech různých koncentracích.

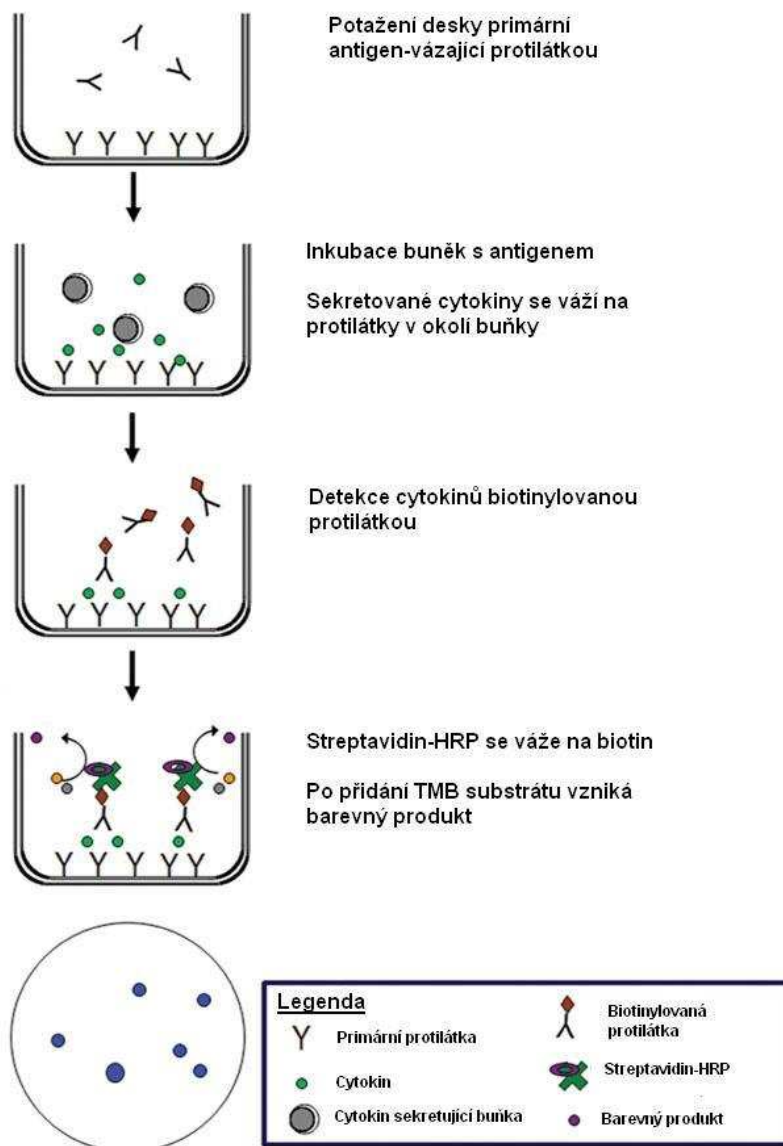
GAD65-1	2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bb
GAD65-2	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bb
GAD65-3	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bb
IA2-1	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bb
IA2-2	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bb
IA2-3	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bb
PHA	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bb

Jako pozitivní kontrolu jsme použili PHA. Negativní kontrola byly pouze buňky v médiu s antibiotiky. K buňkám jsme přidali antibiotika s L-glutaminem (10 μ l/ml) a kultivovali celkem 72 hodin.

4.5.4 ELISPOT

ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot) je metoda umožňující vizualizaci jednotlivých buněk produkujících daný cytokin (nebo jiný produkt). Díky vysoké citlivosti (1 buňka ve 100 000) umožňuje detekci antigen-specifické odpovědi. PVDF (polyvinylidenfluorid) deska je potažená protilátkou specifickou k hledanému produktu. Do jamek se za aseptických podmínek napipetují buňky spolu s antigeny. Jejich sekreční produkty se naváží na protilátky v okolí buňky. Po odmytí buněk se produkty vizualizují značenými protilátkami, na desce se tak vytvoří tečky (spoty). Každá tečka odpovídá jedné antigen-specifické buňce (Obrázek 10).

Pomocí ELISPOTU jsme měřili produkci $IFN\gamma$ a IL-17. Buňky jsme na desce nechali kultivovat 48 hodin. Cytokiny jsme detekovali biotinylovanými protilátkami a streptavidin-HRP (molekula streptavidinu konjugovaná s křenovou peroxidázou), substrát pro peroxidázu byl TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin). Streptavidin se silně specificky váže na biotin a umožňuje zesílení signálu. Oxidací TMB peroxidázou vzniká barevný produkt.

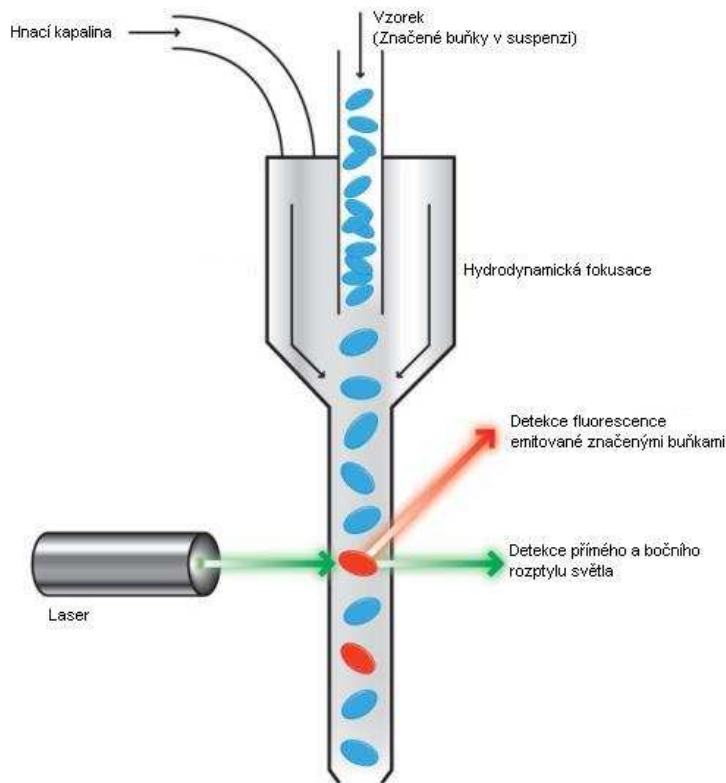


Obrázek 10: Princip ELISPOTu. Upraveno dle (113).

4.5.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie umožňuje měření fyzikálně-chemických vlastností buněk (nebo jiných biologických částic) během jejich průchodu laserovým paprskem (Obrázek 11). Při průchodu buňky paprskem dochází k rozptylu a lomu světla. Přímý rozptyl (FSC – forward scatter) je úměrný velikosti buňky, boční rozptyl (SSC – side scatter) vyjadřuje granularitu. Kromě toho může být detekována rovněž fluorescence procházejících částic. Fluorochromy navázané na buňky absorbují světlo vyzářené laserem a část takto pohlceného světla (o rozdílné vlnové délce) následně emitují. Průtokové cytometry se skládají ze systému fluidního,

optického a elektronického. Nejčastějším zobrazením takto získaných dat je dot plot – dvourozměrný graf, ve kterém je každá buňka zobrazena jako tečka.



Obrázek 11: Princip průtokové cytometrie. Upraveno dle (114).

Pomocí průtokové cytometrie jsme měřili zastoupení těchto buněčných populací:

Populace	Povrchové znaky
NK buňky	$CD3^-CD16^+CD56^+$
NKT buňky	$CD3^+CD16^+CD56^+$
monocyty	$CD3^-CD14^+$
B lymfocyty	$CD3^-CD19^+$
T lymfocyty	$CD3^+$
Tc	$CD3^+CD8^+$
Th	$CD3^+CD4^+$
Tregs	$CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$

Buňky druhý den po rozmražení jsme promyli PBS a naznačili protilátkami ve třech zkumavkách:

- 1) CD3 FITC, CD4 Alexa Fluor 700, CD25 PE, CD45PerCp, CD127 APC
- 2) CD3 APC H7, CD4 Alexa Fluor 700, CD8 APC, CD14 PE, CD19 FITC
- 3) CD3 FITC, CD(16+56) PE

Buňky jsme měřili na cytometru BD LSR II. Data jsme analyzovali v programu Summit v4.3.

4.5.6 Statistická analýza

K naměřeným veličinám jsme doplnili základní popisné statistiky a otestovali jsme normalitu dat (viz Tabulka 1 v příloze). Normalitu jsme ověřovali pomocí Shapiro-Wilkova testu (nulová hypotéza: data mají normální rozdělení). Jako hladinu významnosti jsme u všech testů zvolili $p \leq 0,05$. Statistickou analýzu jsme provedli v programu R Studio 2.14.1.

5 Výsledky

5.1 ELISPOT

Pro analýzu dat získaných pomocí ELISPOTu jsme použili zobecněný lineární smíšený model (GLMM generalized linear mixed model) očištěný od vlivu pacientů. Pro použití klasického lineárního regresního modelu musí data splňovat předpoklad normality a nezávislosti. V našem případě data nemají normální rozdělení, proto je nutné použít zobecněný model. Jedná se o celá nezáporná čísla (počet spotů), reziduální variabilitu by tedy nejlépe popisovalo Poissonovo rozdělení. Výběry navíc nejsou nezávislé (u jednoho pacienta jsme prováděli více druhů stimulace), proto jsme použili smíšený model. Reakce na stimulaci u jednotlivých pacientů je velice individuální, proto jsme přidali náhodnou proměnnou popisující vliv pacientů. Přítomnost interakcí jsme testovali pomocí chí kvadrát testu porovnávacího podmodel bez interakcí s původním modelem.

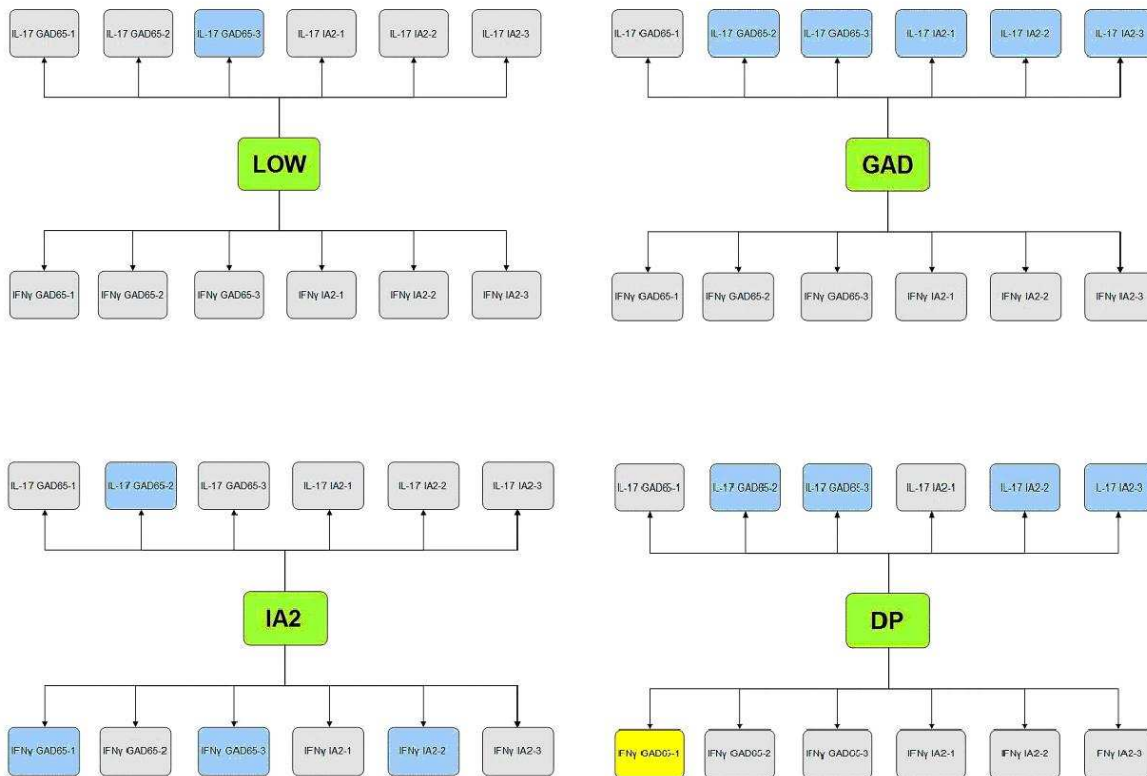
Testovali jsme závislost produkce $\text{IFN}\gamma$ (resp. IL-17) na způsobu stimulace (GAD65-1, GAD65-2, GAD65-3, IA2-1, IA2-2, IA2-3) (Obrázek 15) a skupině (rozdělení do skupin dle hladiny protilátek: DP, GAD, IA2, LOW) (Obrázek 16). Také nás zajímala případná interakce mezi vysvětlujícími proměnnými tzn. jestli stimulace působí na různé skupiny rozdílně. Jako referenční hodnotu jsme brali nestimulované buňky – negativní kontrolu (NK). Transformované koeficienty udávají kolikrát daná stimulace snižuje/zvyšuje tvorbu cytokinu oproti negativní kontrole (Tabulka 2 a 3 v příloze).

IFN γ :

U skupiny LOW a GAD žádný druh stimulace nemění signifikantně produkci $\text{IFN}\gamma$. U skupiny IA2 stimulace GAD1, GAD3 a IA2 snižuje tvorbu $\text{IFN}\gamma$. U skupiny DP stimulace GAD1 zvyšuje tvorbu $\text{IFN}\gamma$ (Obrázek 12). Jsou přítomné signifikantní interakce skupiny s typem stimulace: $p=6,956 \cdot 10^{-05}$ (Obrázek 13).

IL-17:

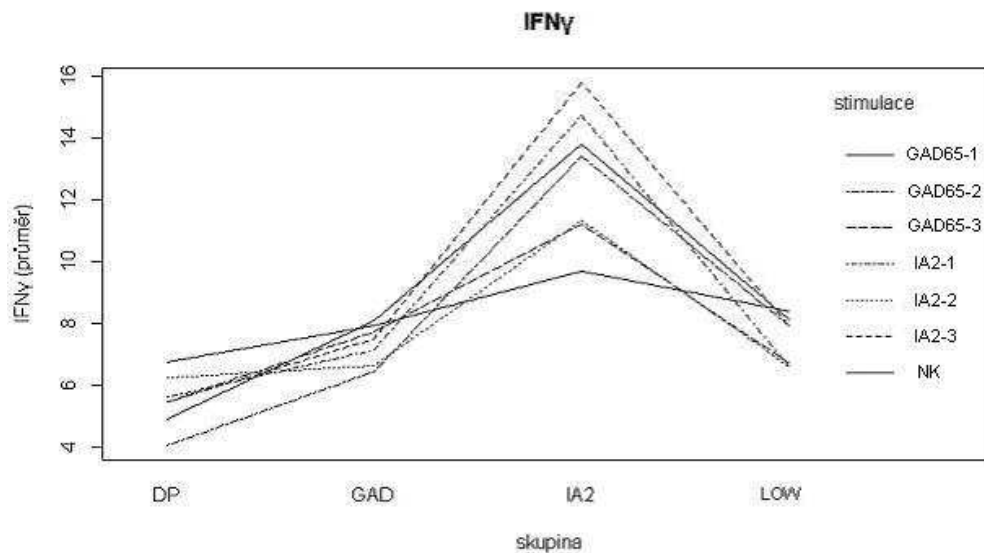
U skupiny LOW stimulace GAD3 snižuje tvorbu IL-17. U skupiny GAD stimulace GAD2, GAD3, IA1, IA2, IA3 snižuje tvorbu IL-17. U skupiny IA2 stimulace GAD2 snižuje produkci IL-17. U skupiny DP stimulace GAD2, GAD3, IA2 a IA3 snižuje tvorbu IL-17. Interakce skupiny s typem stimulace je signifikantní: $p=6,168 \cdot 10^{-06}$ (Obrázek 14).



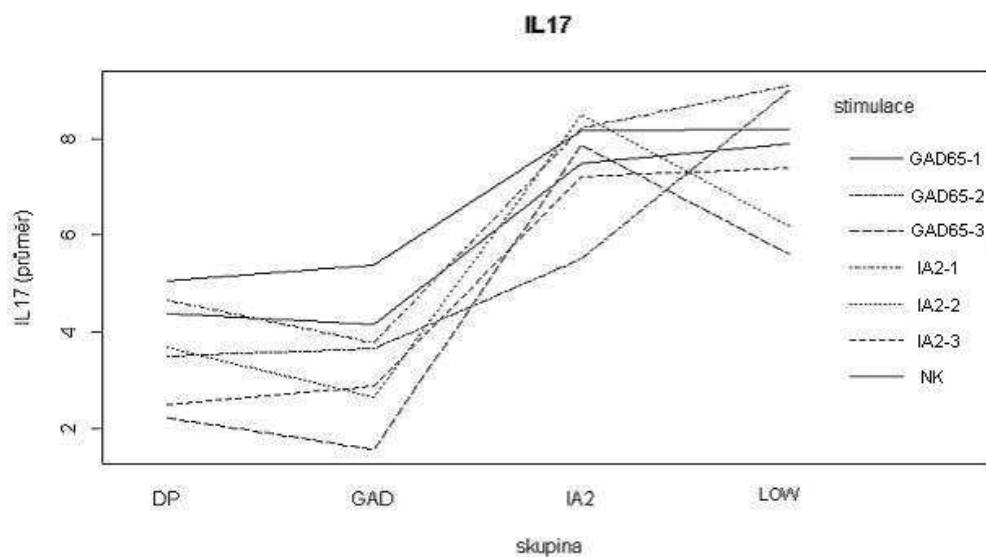
Obrázek 12. Diagram produkce cytokinů ve skupinách při různých způsobech stimulace:

Modře – signifikantní snížení oproti nestimulovaným buňkám

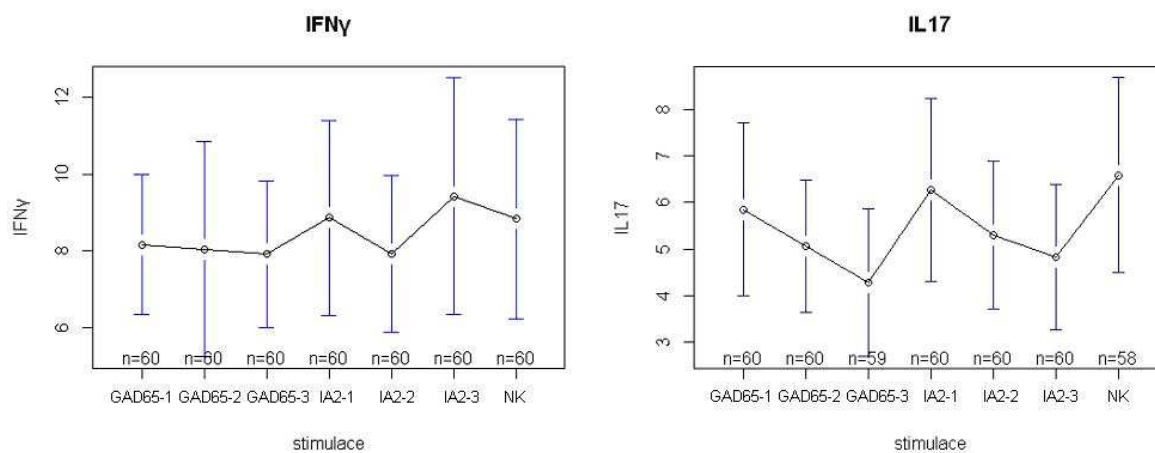
Žlutě – signifikantní zvýšení oproti nestimulovaným buňkám.



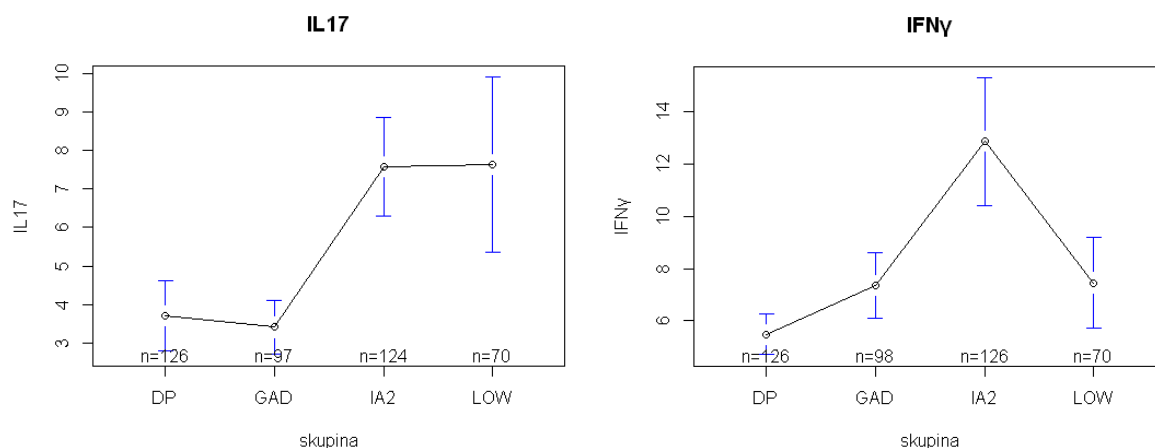
Obrázek 13: Grafické znázornění interakcí: průměrná produkce IFN γ ve skupinách při různém typu stimulace. Pokud přímky nejsou rovnoběžné, jsou přítomné interakce.



Obrázek 14. Grafické znázornění interakcí: průměrná produkce IL-17 ve skupinách při různém typu stimulace. Pokud přímký nejsou rovnoběžné, jsou přítomné interakce.



Obrázek 15: Grafy znázorňující průměrnou produkci IFN γ a IL-17 při různých způsobech stimulace pro všechny skupiny. Úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti pro odhadnuté průměry.



Obrázek 16: Grafy znázorňující průměrnou produkci IFN γ a IL-17 ve skupinách bez ohledu na způsob stimulace. Úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti pro odhadnuté průměry. Pokud se intervaly spolehlivosti nepřekrývají, je mezi výběry významný rozdíl.

Dále jsme testovali, jestli koreluje produkce IFN γ a IL-17 buňkami u jednotlivých vzorků. Protože ELISPOT data nemají normální rozložení, použili jsme neparametrický Spearmanův korelační test. Produkce IFN γ a IL-17 koreluje signifikantně:

p-hodnota	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$
korelační koeficient	0,450952

Také nás zajímalo, jestli je tvorba cytokinů PBMC ovlivněna hodnotou glykovaného hemoglobinu pacientů v době náběru. Závislost tvorby IFN γ a IL-17 na hladině HbA1c jsme testovali pomocí modelu lineární regrese. Předpokladem použití modelu je normální rozložení residuí modelu, které jsme testovali pomocí Shapiro-Wilkova testu. V případě nenormálního rozdělení jsme použili Spearmanův korelační test. Hodnota MRS (multiple R squared) udává kolik procent variability závislé proměnné se podařilo vysvětlit pomocí nezávislé proměnné.

Lineární regrese IFN γ ~ HbA1c

IFN γ	GAD3	IA1	IA2
p-hodnota	0,0183	0,00096	0,00126
MRS (%)	18	33	31
normalita residuí*	0,1695	0,2872	0,09863

* p-hodnota Shapiro-Wilkova testu

Závislost tvorby IFN γ na hladině HbA1c jsme prokázali u stimulace GAD3, IA1 a IA2. Pomocí Spearmanova korelačního testu jsme závislost nenalezli (NK, GAD1, GAD2, IA3).

Spearmanův korelační test

IFN γ	NK	GAD1	GAD2	IA3
p-hodnota	0,1329	0,5669	0,2017	0,1009
korelační koeficient	0,280737	0,1088558	0,239866	0,3052608

Závislost tvorby IL-17 na HbA1c není signifikantní u žádného způsobu stimulace.

Pomocí multivariačního permutačního testu korelací jsme hledali korelaci mezi produkcí IFN γ / IL-17 a klinickými údaji (věk manifestace, délka trvání DM1) a také zastoupením jednotlivých buněčných populací. Tento test obsahuje korekci na mnohočetné hypotézy. Produkce IFN γ a IL-17 nekoreluje s věkem manifestace ani délkou trvání DM1. Produkce IFN γ a IL-17 nekoreluje s množstvím NK, NKT, T, B buněk, monocytů ani Tregs.

Pomocí Spearmanova korelačního testu jsme zjistili, že hladina anti-GAD65 a anti-IA2 protilátek nekoreluje s dobou od manifestace ani s produkcí IFN γ a IL-17.

5.2 Průtoková cytometrie

Pomocí analýzy rozptylu (ANOVA - analysis of variance) jsme testovali, zda se jednotlivé skupiny mezi sebou liší v zastoupení buněčných populací. Předpokladem použití je nezávislost výběrů (skupiny NK, GAD, IA2, LOW), normalita dat a shoda rozptylu ve výběrech. Pomocí Shapiro-Wilkova testu jsme testovali normalitu residuí modelu, shodu rozptylu jsme testovali pomocí Bartlettova testu (nulová hypotéza: rozptyly ve výběrech se neliší). Při nenormální distribuci jsme použili neparametrický Kruskal-Wallisův test.

	normalita residuí*	shoda rozptylu**	p-hodnota	test
NK buňky	0,0879	0,1825	0,005948	ANOVA
NKT buňky	0,00575	0,331	0,4241	Kruskal-Wallis
T lymfocyty	0,6282	0,05268	0,0356	ANOVA
B lymfocyty	0,4046	0,4051	0,419	ANOVA

Th buňky	0,2039	0,9076	0,002526	ANOVA
Tc buňky	0,5359	0,1681	0,04855	ANOVA
Treg	0,5966	0,8158	0,01299	ANOVA
Monocyty	0,001185	0,02849	0,6342	Kruskal-Wallis

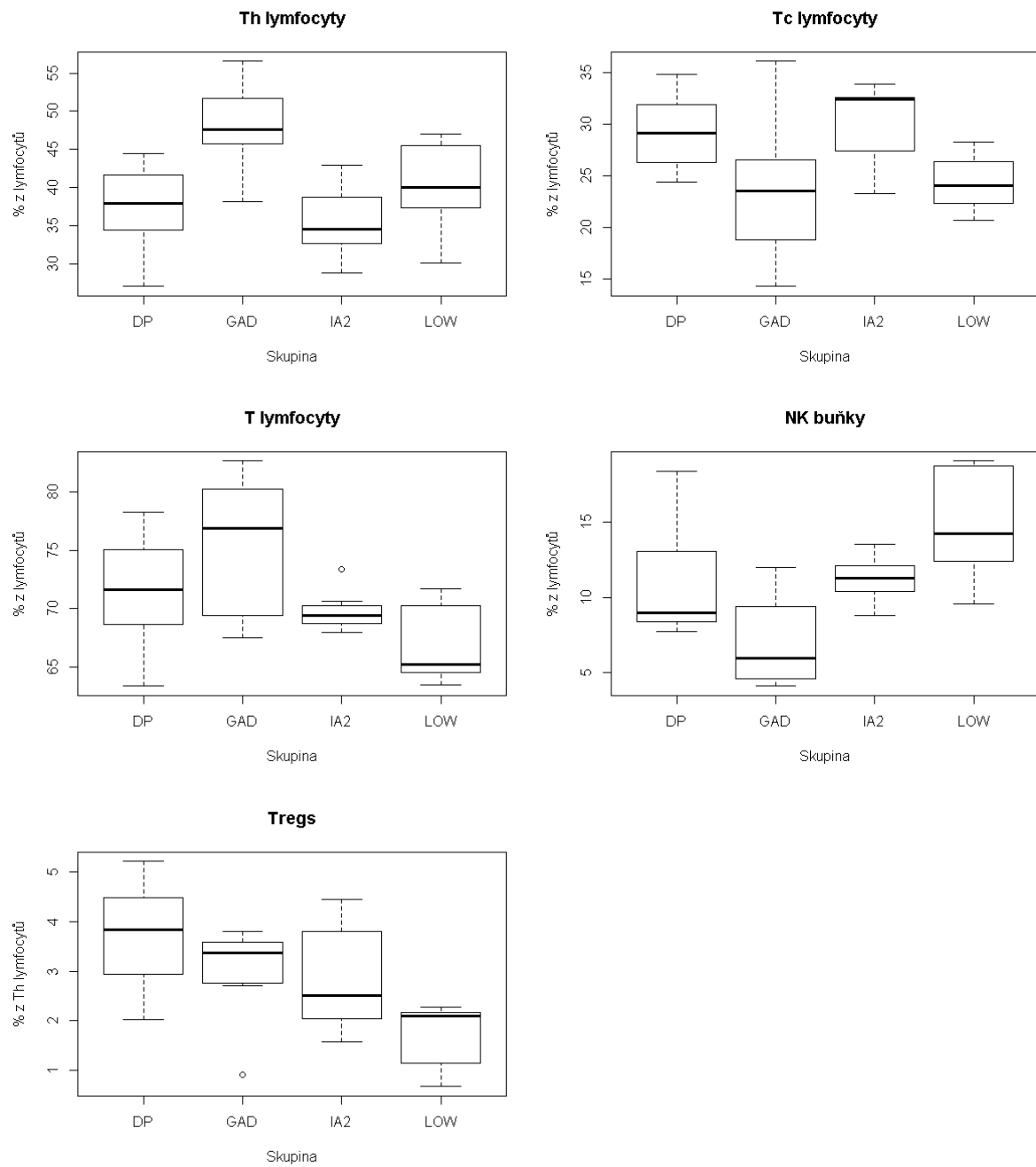
* p-hodnota Shapiro-Wilkova testu

** p-hodnota Bartlettova testu

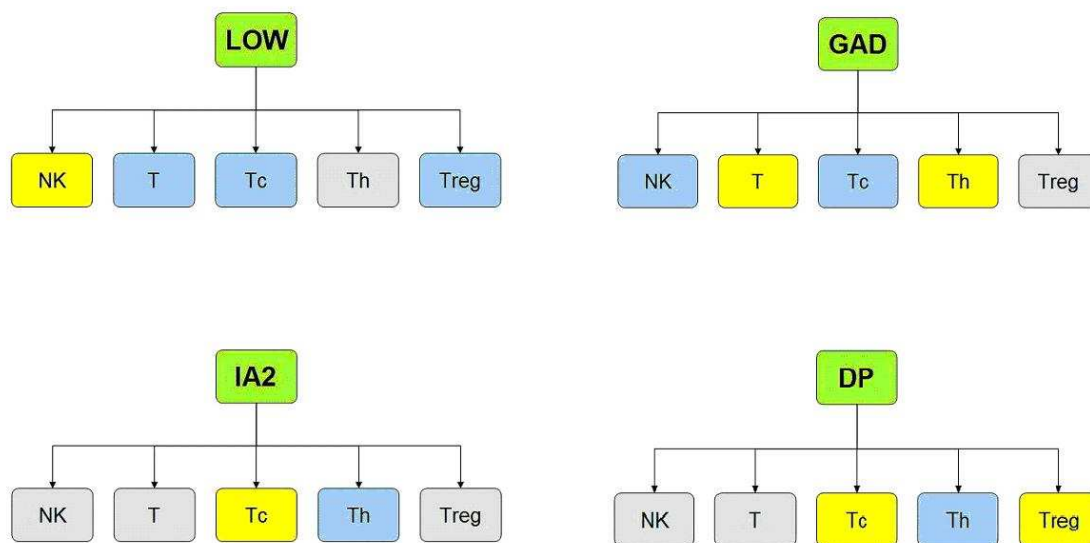
Mezi jednotlivými skupinami je významný rozdíl v zastoupení NK buněk, T lymfocytů, Th buněk, Tc buněk a T regulačních buněk (Obrázek 17).

U populací, kde se prokázal významný rozdíl mezi skupinami jsme dále provedli mnohonásobné porovnání (metodou Tukey HSD - honest significant differences), abychom zjistili, které konkrétní skupiny se mezi sebou signifikantně liší (Tabulka 4 v příloze).

Významný rozdíl v zastoupení NK buněk byl nalezen mezi skupinami LOW a GAD. Významný rozdíl v zastoupení T regulačních buněk byl nalezen mezi skupinami LOW a DP. Významný rozdíl v zastoupení Th buněk byl nalezen mezi skupinami GAD – DP a GAD – IA2. Významný rozdíl v zastoupení T buněk byl nalezen mezi skupinami LOW a GAD (Obrázek 18).



Obrázek 17: Boxploty znázorňující zastoupení buněčných populací ve skupinách.



Obrázek 18: Diagram zastoupení buněčných populací ve skupinách:

Modře – snížené množství

Žlutě – zvýšené množství.

Korelaci mezi zastoupením jednotlivých buněčných populací a věkem manifestace DM1 jsme testovali pomocí Pearsonova korelačního testu. Množství NK buněk a T lymfocytů koreluje s věkem manifestace DM1 (Obrázek 19):

NK buňky

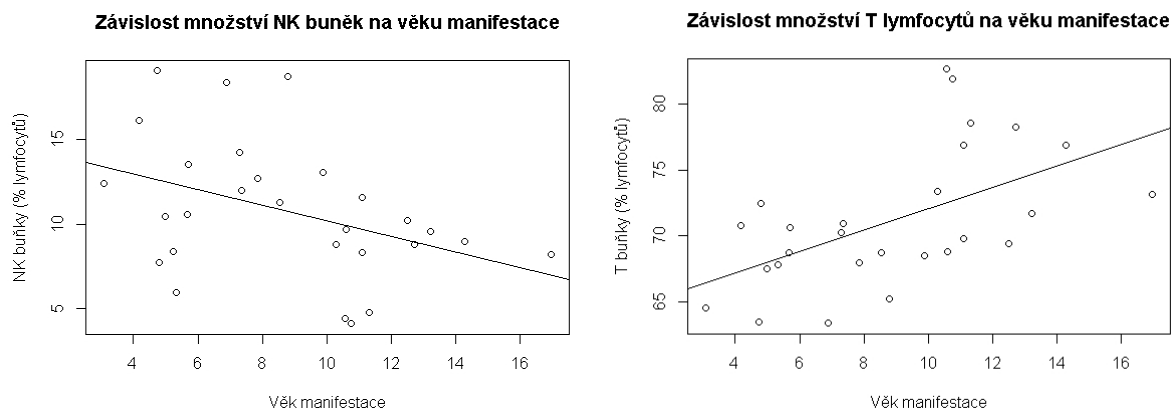
p-hodnota	0,03492
korelační koeficient	-0,4000471

T lymfocyty

p-hodnota	0,002955
korelační koeficient	0,5500366

U ostatních populací jsme korelaci neprokázali.

Zastoupení žádné buněčné populace také nekoreluje s délkou trvání DM1.



Obrázek 19: Graf závislosti množství NK buněk a T lymfocytů na věku manifestace DM1.

Dále nás zajímalo, zda je zastoupení buněčných populací ovlivněno množstvím autoprotilátek a HbA1c. Množství T regulačních buněk koreluje pozitivně s množstvím anti-GAD65 protilátek (Spearmanův korelační test):

p-hodnota	0,02051
korelační koeficient	0,4384236

Hladina anti-IA2 protilátek koreluje negativně s množstvím Th buněk a pozitivně s množstvím Tc buněk (Spearmanův korelační test):

Th

p-hodnota	0,004401
korelační koeficient	-0,530702

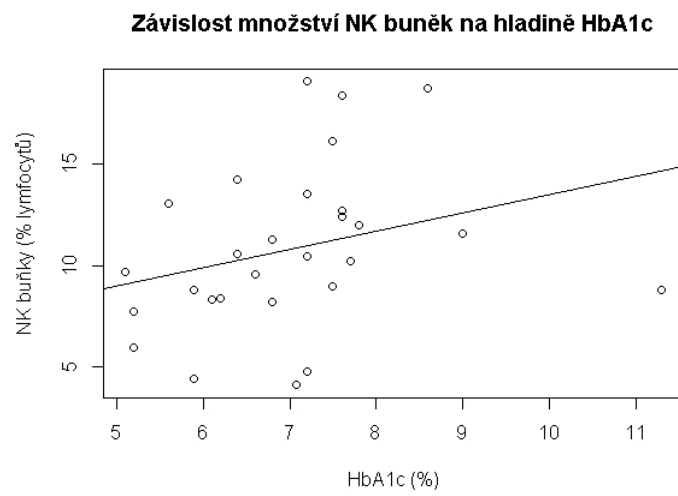
Tc

p-hodnota	0,001985
korelační koeficient	0,5682819

Množství NK buněk koreluje signifikantně s hladinou HbA1c (Obrázek 20):

p-hodnota	0,01672
korelační koeficient	0,4483483

U ostatních populací jsme korelaci neprokázali.



Obrázek 20: Graf závislosti množství NK buněk na hodnotě glykovaného hemoglobinu.

6 Diskuze

V současné době již sice existují poměrně dobré možnosti predikce diabetu, zatím ale není dostupná účinná imunointervence/prevence této choroby. V ČR působí Program predikce diabetu 1. typu (Predia) zabývající se predikcí DM1 u prvostupňových příbuzných diabetiků. Riziko rozvoje DM1 v běžné populaci je 0,4 %, u dětí diabetických matek (které onemocněly před těhotenstvím) je toto riziko 2-3 % a u dětí otců s DM1 či sourozenců diabetiků je to dokonce 6-9 % (115). Do programu predikce jsou zařazovány děti, jejichž rodiče nebo sourozenci onemocněli DM1 do 18 let. Vyšetřuje se genetické riziko (HLA II. třídy DQA1, DQB1) a přítomnost autoprotilátek proti insulinu, GAD65 a IA2. V případě opakované positivity jedné protilátky nebo positivity dvou a více protilátek se dále zjišťuje funkční rezerva β buněk intravenózním glukózovým tolerančním testem (i.v.GTT) a glykovaný hemoglobin, který vypovídá o tom, zda je pacient schopen udržet svoje glykémie dlouhodobě v normě. Pozitivita autoprotilátek se objeví u většiny pacientů měsíce až roky před manifestací diabetu. Čím mladší je dítě, u kterého se protilátky objeví, tím rychlejší je obvykle nástup manifestních příznaků onemocnění. U malých dětí jsou navíc příznaky hůře identifikovatelné. Díky stanovení protilátkové positivity se otevírá časový interval pro případný imunointervenční zásah. Ten ale zatím bohužel není dostupný. Význam predikčních programů (v zahraničí například TrialNet a řada dalších) je v tom, že se u jedinců z rizikové populace zabrání manifestaci diabetu těžkou diabetickou ketoacidózou. Včasně nasazení insulinu navíc prodlouží tzv. „honeymoon“ období, ve kterém jsou pacienti dobře kompenzováni na malých dávkách insulinu. β buňky, které nejsou při podávání exogenního insulinu tak zatěžovány, jsou pomaleji ničeny insulitidou a pacient si tak déle udrží vlastní zbytkovou produkci insulinu. Další význam je pak ve výzkumu a přípravě imunointervenčních studií. Imunointervence se patrně i v budoucnu bude zaměřovat především na jedince z rizikové skupiny tj. na prvostupňové příbuzné pacientů, protože celopopulační screening by byl finančně i organizačně nereálný (116).

Případné intervence mohou být buď antigen-specifické nebo nespecifické. Nevýhodou nespecifických zásahů do imunitního systému je vždy jistá míra imunosuprese, která s sebou nese nežádoucí zdravotní rizika. Optimální by bylo antigeně-specifické navození tolerance bez celkové suprese imunitního systému. Různé způsoby podávání s diabetem asociovaných autoantigenů se ukázaly účinné na myším modelu (intravenózní, intranasální podání, DNA vakcíny) (117, 118, 119), ale při klinické aplikaci se zatím nepodařilo dosáhnout jednoznačně

pozitivních výsledků. Pro navození tolerance se zatím zkoušely postupy využívající pouze jeden antigen. Představa působení takovéto vakcíny je taková, že by mělo docházet k indukci T regulačních buněk, posunu od Th1 k Th2 odpovědi a k tzv. „bystander“ supresi imunitní reakce. Tyto postupy se ale zatím neukázaly jako příliš úspěšné. V preventivní DPT-1 studii se neprokázal pozitivní vliv orálního ani subkutánního podávání insulínu osobám s vysokým rizikem vzniku DM1. Avšak při pozdější analýze dat se ukázalo, že orální podávání insulínu přineslo pozitivní výsledky pouze u podskupiny pacientů s vysokými titry anti-insulinových autoprotilátek (87, 88).

Proto nás zajímalo, jestli se odlišný protilátkový profil u DM1 pacientů projeví také na buněčné odpovědi na diabetogenní autoantigeny. Rozdíly v reaktivitě PBMC na autoantigeny mezi DM1 pacienty a zdravými kontrolami se naše laboratoř zabývala již v dřívějších studiích (120, 121). Zaměřili jsme se proto na rozdíly v reaktivitě pouze u diabetiků. Materiálem byla periferní krev dětí s potvrzenou diagnózou DM1, nejednalo se však o pacienty těsně po manifestaci (průměrná délka trvání diabetu ve studované skupině byla 4,5 roku). Při odběru krve byla vyšetřena hladina anti-GAD65 a anti-IA2 protilátek. Tyto autoantigeny jsme zvolili proto, že anti-insulinové protilátky se mohou objevit u všech diabetiků v důsledku léčby exogenním insulínem a jejich přítomnost by nemusela vypovídat o původně probíhajících autoimunitních procesech. Autoprotilátky proti ZnT8 byly objeveny relativně nedávno a jejich vyšetření zatím není běžně dostupné. Do souboru jsme zařadili 30 protilátkově pozitivních pacientů: 15 s převahou anti-GAD65 protilátek a 15 s převahou anti-IA2 protilátek. Při výběru pacientů jsme se snažili zachovat podobnou věkovou strukturu v obou skupinách, protože imunitní reaktivita je také do jisté míry ovlivňována věkem. Podle hladiny protilátek jsme pak pacienty rozdělili do čtyř skupin: v jedné skupině byli pacienti s nízkými hladinami obou autoprotilátek (skupina LOW), v další pacienti s vysokou hladinou anti-GAD65 protilátek (GAD), dále pacienti s vysokou hladinou anti-IA2 protilátek (IA2) a v poslední skupině pacienti s vysokou hladinou obou protilátek (DP). PBMC jsme kultivovali se třemi různými koncentracemi GAD65 a IA2 a pomocí ELISPOTu jsme detekovali tvorbu IFN γ (cytokin charakteristický pro patologickou Th1 odpověď) a IL-17 (prozánětlivý cytokin, který může hrát roli v autoimunitních procesech). U produkce obou cytokinů jsme prokázali signifikantní interakce mezi skupinou a způsobem stimulace, tzn. to, jak daná stimulace (druh antigenu, koncentrace) na buňky působí, je ovlivněné protilátkovým profilem pacientů. Odpověď na stimulaci autoantigeny je tedy u jednotlivých skupin pacientů odlišná, je ovlivněna také protilátkovým profilem pacienta a liší se odpověď IFN γ a IL-17. V souladu s hypotézou, že protilátkový profil odráží také chování buněčné složky imunitního systému,

jsme mezi jednotlivými skupinami pacientů našli významný rozdíl v zastoupení NK buněk, T lymfocytů, Th buněk, Tc buněk a T regulačních buněk ve vzorcích PBMC před stimulací autoantigeny. Závislost tvorby IFN γ ani IL-17 na zastoupení některé buněčné populace jsme nicméně neprokázali. Také pomocí korelačního testu se prokázalo, že zastoupení některých populací koreluje s hladinou autoprotilátů. Množství Tregs koreluje pozitivně s hladinou anti-GAD protilátů. Množství anti-IA2 protilátů koreluje pozitivně se zastoupením Tc buněk a negativně se zastoupením Th buněk. To by mohlo odrážet dynamiku celého procesu destruktivní insulitidy. Anti-GAD protilátky totiž většinou přetrvávají nejdéle, často i řadu let. Naše současná představa je taková, že nejprve je přítomná převaha ve směru Th1, pak následuje dominance Tc buněk a dochází k destrukci β buněk (122). Následuje zapojení imunoregulačních mechanismů, které je neefektivní a navíc patrně špatně načasované (72). S časem pak dochází ke snižování titrů autoprotilátů a může dojít až ke konverzi do séronegativity. Celý proces je z buněčného pohledu variabilní a to časově i interindividuálně.

U několika druhů stimulace jsme prokázali závislost tvorby IFN γ na hodnotě glykovaného hemoglobinu. Jedná se o marker dlouhodobé kompenzace diabetu. Tyto výsledky naznačují, že regulace imunitní odpovědi by mohla být ovlivněna kompenzací diabetu. Dlouhodobá hyperglykémie je hlavní příčinou diabetických komplikací a poškozuje mnoho orgánů. Hyperglykémie ovlivňuje zdatně i imunitní systém. Bylo zjištěno, že pacienti se zvýšenou hodnotou HbA1c mají vyšší incidenci pooperačních infekcí a že hyperglykémie zhoršuje funkci neutrofilů (snížená chemotaxe, fagocytická aktivita a baktericidní kapacita) (123).

Vzhledem k tomu, že klinický průběh prediabetu a diabetu (množství a druh autoprotilátů, úbytek β buněk) je značně individuální, je pravděpodobné, že i imunopatologické procesy se u jednotlivých pacientů liší. To naznačují i rozporuplné výsledky snah o antigen-specifické navození tolerance. Zdá se nám možné, že selhání nadějně vypadajících studií by mohlo pocházet z příliš zjednodušujícího přístupu k diabetu 1. typu jako ke zcela homogennímu onemocnění. V tomto kontextu je zajímavá zkušenost s objevem MODY (maturity onset diabetes of the young) diabetu, který vedl k překlasičování diagnózy u některých pacientů původně zařazených jako DM1. Je tedy možné, že diagnóza DM1 zastřešuje více podtypů tohoto onemocnění.

Pokud se příčiny a molekulární mechanismy autoimunitní destrukce β buněk liší, nelze očekávat, že lze stejným postupem dosáhnout navození tolerance u všech pacientů. Insulitida je navíc dynamický proces během kterého dochází k rozšiřování rozpoznávaných epitopů. Protilátkový profil je jedna ze snáze uchopitelných a měřitelných charakteristik DM1,

kteřá by mohla pacienty pomoci rozdělit, a proto jsme jej vybrali do naší studie jako klíčovou charakteristiku skupin pacientů. Bylo by tedy potřeba lépe prozkoumat příčiny a mechanismy patologie diabetu a případné imunointervence personalizovat z hlediska dávky a druhu (případně kombinace) autoantigenu/ů. Zdá se, že pro další vývoj imunointervencí je nezbytné vrátit se na začátek a lépe poznat patofyziologii DM1 a také lépe charakterizovat příčiny patologických procesů u jednotlivých pacientů.

Závěr

V této práci jsme se zabývali otázkou, jak se odlišný protilátkový profil pacientů projeví na reaktivitě mononukleárních buněk při ovlivnění syntetickými s diabetem asociovanými autoantigeny. Do studie jsme zařadili děti s potvrzenou diagnózou DM1 pozitivní na anti-GAD65 a/nebo anti-IA2 protilátky. PBMC jsme stimulovali třemi různými koncentracemi GAD65 a IA2 a metodou ELISPOT jsme měřili produkci prozánětlivých cytokinů IFN γ a IL-17. Ve vzorcích PBMC jsme také pomocí průtokové cytometrie stanovovali zastoupení jednotlivých buněčných populací.

Zjistili jsme, že reakce na stimulaci autoantigeny je u jednotlivých skupin pacientů odlišná a to, jak buňky na daný antigen reagují, je ovlivněno protilátkovým profilem pacientů. V souladu s tím jsme u jednotlivých skupin našli rozdíly v zastoupení NK buněk, T lymfocytů, Th buněk, Tc buněk a T regulačních buněk v PBMC před stimulací. Také jsme u několika způsobů stimulace našli závislost mezi produkcí IFN γ a hodnotou glykovaného hemoglobinu tzn. kompenzací diabetu.

Lze tedy konstatovat, že reakce na diabetogenní autoantigeny je značně individuální. Tato tematika je zajímavá z hlediska možných antigen-specifických imunointervencí u DM1. Klinické studie snažící se o prevenci DM1 navozením antigen-specifické tolerance zatím nebyly úspěšné a jedním z možných vysvětlení jsou odlišné imunopatologické mechanismy u jednotlivých pacientů. Proto je potřeba další výzkum příčin a patologie DM1, který umožní detailnější charakterizaci a rozdělení této choroby právě z pohledu patofyziologických molekulárních mechanismů.

Seznam použité literatury

1. Cinek O, Sumnik Z, Vavrínek J. Continuing increase in incidence of childhood-onset type 1 diabetes in the Czech Republic 1990-2001. *Eur J Pediatr* 2003;162(6):428-9.
2. Cinek O. Molekulární epidemiologie dětského diabetu 1. typu, 2010. <http://www.img.cz/cteni/cteni15.pdf>
3. www.uzis.cz. Péče o nemocné cukrovkou 2010. <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/pece-nemocne-cukrovkou>
4. Pelikánová T, Bartoš V a kol. Praktická diabetologie, 4. vydání. Maxdorf 2010.
5. Frayling TM, Lindgren CM, Chevre JC, Menzel S, Wishart M, Benmezroua Y, Brown A, Evans JC, Rao PS, Dina C, Lecoeur C, Kanninen T, Almgren P, Bulman MP, Wang Y, Mills J, Wright-Pascoe R, Mahtani MM, Prisco F, Costa A, Cognet I, Hansen T, Pedersen O, Ellard S, Tuomi T, Groop LC, Froguel P, Hattersley AT, Vaxillaire M. A genome-wide scan in families with maturity-onset diabetes of the young: evidence for further genetic heterogeneity. *Diabetes* 2003; 52(3):872-81.
6. Harjutsalo V, Sjöberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet* 2008; 371:1777-82.
7. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009; 373:2027-33.
8. Redondo MJ, Eisenbarth GS. Genetic control of autoimmunity in type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia* 2002; 45:605-622.
9. Dahlquist G, Blom L, Holmgren G, Hagglöf B, Larsson Y, Sterky G, Wall S. The epidemiology of diabetes in Swedish children 0–14 years: a six-year prospective study. *Diabetologia* 1985; 28:802-808.

10. http://www.genetichhealth.com/dbts_what_is_type_1_diabetes.shtml
11. Kyvik KO, Green A, Beck-Nielsen H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ* 1995; 311:913-917.
12. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med* 2008; 359:2849-2850.
13. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 2001; 44:354-362.
14. Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011; 91:79-118.
15. Csorba TR, Lyon AW, Hollenberg MD. Autoimmunity and the pathogenesis of type one diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2010; 47:51-71.
16. Vavřinec J, Cinek O, Šumník Z. Genetické a imunologické aspekty diabetu I. typu v dětském věku. *Čes Slov Pediatr* 2000; 55:707-711.
17. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalcborg LJ, Bartlett RJ. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* 1997; 15:293-297.
18. Fan Y, Rudert WA, Grupillo M, He J, Sisino G, Trucco M. Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *EMBO J* 2009; 28:2812-2824.
19. Bottini N, Vang T, Cucca F, Mustelin T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin Immunol* 2006; 18:207-213.
20. Wu J, Katrekar A, Honigberg LA, Smith AM, Conn MT. Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. *J Biol Chem* 2006; 281:11002-11010.

21. Qu HQ, Montpetit A, Ge B, Hudson TJ, Polychronakos C. Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes. *Diabetes* 2007; 56:1174-1176.
22. Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier MC, Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* 2002; 277:46478-46486.
23. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nierras CR, Todd JA, Rich SS, Nerup J. Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes* 2010; 59(7):1561-71.
24. Gamble DR, Kinsley ML, FitzGerald MG, Bolton R, Tailor KW. Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J* 1969; 3:627-630.
25. Yoon JW, Onodera T, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus. XV. Beta cell damage and insulin-dependent hyperglycemia in mice infected with coxsackie virus B4. *J Exp Med* 1978; 148:1068-1080.
26. Juhela S, Hyoty H, Roivainen M, Harkonen T, Putto-Laurila A, Simell O, Ilonen J. T-cell responses to enterovirus antigens in children with type 1 diabetes. *Diabetes* 2000; 49:1308-1313.
27. Varela-Calvino R, Ellis R, Sgarbi G, Dayan CM, Peakman M. Characterization of the T-cell response to coxsackievirus B4: evidence that effector memory cells predominate in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:1745-1753.
28. Vreugdenhil GR, Geluk A, Ottenhoff TH, Melchers WJ, Roep BO, Galama JM. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia* 1998; 41:40-46.
29. Drescher KM, Kono K, Bopegamage S, Carson SD, Tracy S. Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection. *Virology* 2004; 329:381-394.

30. Oikarinen M, Tauriainen S, Honkanen T, Oikarinen S, Vuori K. Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. *Clin Exp Immunol* 2008; 151:71-75.
31. Tracy S, Drescher KM, Chapman NM, Kim KS, Carson SD. Toward testing the hypothesis that group B coxsackieviruses (CVB) trigger insulin-dependent diabetes: inoculating nonobese diabetic mice with CVB markedly lowers diabetes incidence. *J Virol* 2002; 76:12097-12111.
32. Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC. T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med* 1998; 4:231-239.
33. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, Gellert SA, Goldwater PN. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 2000; 49:1319-1324.
34. Blomqvist M, Juhela S, Erkkila S, Korhonen S, Simell T. Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:511-515.
35. Yang Z, Wang K, Li T, Sun W, Li Y, Chang YF, Dorman JS, LaPorte RE. Childhood diabetes in China. Enormous variation by place and ethnic group. *Diabetes Care* 1998; 21:525-9.
36. Patterson CC, Carson DJ, Hadden DR. Epidemiology of childhood IDDM in Northern Ireland 1989-1994: low incidence in areas with highest population density and most household crowding. Northern Ireland Diabetes Study Group. *Diabetologia* 1996; 39:1063-9.
37. Deschamps I, Lestradet H, Busson M, Hors J. Effects of HLA genotype, age, and birth order on empirical risk estimates for insulin dependent diabetes in siblings of diabetic children. An actuarial evaluation. *Diabetes Res* 1986; 3:391-6.

38. Blom L, Nyström L, Dahlquist G. The Swedish childhood diabetes study. Vaccination and infections as risk determinants for diabetes in childhood. *Diabetologia* 1991; 34:176-81.
39. DeStefano F, Mullooly JP, Okoro CA, Chen RT, Marcy SM, Ward JI, Vadheim CM, Black SB, Shinefield HR, Davis RL, Bohlke K; Vaccine Safety Datalink Team. Childhood vaccination, vaccination timing, and risk of type 1 diabetes mellitus. *Pediatrics* 2001; 108(6):E112.
40. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347:911-920.
41. Brugman S, Klatter FA, Visser JT, Wildeboer-Veloo AC, Harmsen HJ, Rozing J, Bos NA. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* 2006; 49:2105-2108.
42. Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, Candeloro P, Bonato V. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 2005; 48:1565-1575.
43. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455:1109-1113.
44. Flohe SB, Wasmuth HE, Kerad JB, Beales PE, Pozzilli P. A wheat-based, diabetes-promoting diet induces a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine* 2003; 21:149-154.
45. Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: It's importance for beta cell and immune function. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 347:106-20.
46. Griffin MD, Lutz WH., Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270:701-708.

47. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009; 183:5458-5467.
48. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005; 48:1247-1257.
49. Borkar VV, Devidayal, Verma S, Bhalla AK. Low levels of vitamin D in North Indian children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2010; 11:345-350.
50. Pozzilli P, Manfrini S, Crino A, Picardi A, Leomanni C, Cherubini V, Valente L, Khazrai M, Visalli N. Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 2005; 37:680-683.
51. Littorin B, Blom P, Scholin A, Arnqvist HJ, Blohme G, Bolinder J, Ekbom- Schnell A, Eriksson JW, Gudbjornsdottir S, Nystrom L, Ostman J, Sundkvist G. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 2006; 49:2847-2852.
52. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, Van EE, Decallonne B, Overbergh L, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D deficiency in early life accelerates type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2004; 47:451-462.
53. Wang B, Tisch R. Parametres influencing antigen-specific immunotherapy for type 1 diabetes. *Immunol Res* 2008; 42:246-58.
54. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:447-85.
55. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010; 464:1293-300.

56. Burchard K. What causes type 1 diabetes? Lessons from animal models. *APMIS* 2011; 132:1-19.
57. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. Yoon JW, Jun HS. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 928:200-11.
58. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48:159-63.
59. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC, Power RF. IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1995; 154:4874-4882.
60. Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 1994; 44:859-862.
61. Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James RF, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA. Interferon expression in the pancreases of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1995; 44:658-664.
62. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 1991; 165:97-103.
63. Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Developmental plasticity Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 2009; 21:274-80.
64. Emamaullee et al, Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice, 2009, *Diabetes*)
65. Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* 2009; 119:565-72.

66. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, Hafler DA. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *Journal of Immunology* 2009; 183:4432-9.
67. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:337-348.
68. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA. Central role of a defective IL-2 production in triggering islet autoimmune destruction. *Immunity* 2008; 28:687-697.
69. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004; 199:1455-65.
70. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, Haller M, Rockell J, Gottlieb P, Clare-Salzler M, Atkinson M. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2007; 56:604-12.
71. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 2005; 24:55-62.
72. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:92-9.
73. Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N Engl J Med* 2001; 345:1036-40.
74. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104:17040-5.

75. Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW. Role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1999; 189:347-58.
76. Diana J, Gahzarian L, Simoni Y, Lehuen A. Innate immunity in type 1 diabetes. *Discov Med* 2011; 11:513-20.
77. Feuerer M, Shen Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity* 2009; 31:654-664.
78. Ludvigsson J; Linköping Diabetes Immune Intervention Study Group. The role of immunomodulation therapy in autoimmune diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3:320-30.
79. Yoon JW, Yoon CS, Lim HW, Huang QQ, Kang Y, Pyun KH, Hirasawa K, Sherwin RS, Jun HS. Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science* 1999; 284:1183-7.
80. Mallone R, Brezar V, Boitard C. T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. *Clin Dev Immunol.* 2011; 2011:513210.
81. <http://www.biosite.dk/leksikon/insulin.htm>
82. Csorba TR, Lyon AW, Hollenberg MD. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes, *Crit Rev Clin Lab Sci* 2010;47:51–71.
83. Petruzalkova L, Ananieva-Jordanova R , Vcelakova J, Stechova K, Lebl J, Dušátkova P, Sumnik Z, Coles R, Powell M, Furmaniak J, Rees Smith B, Kolouskova S. The prevalence of ZnT8 autoantibodies in Czech children at the onset of type 1 diabetes mellitus and dynamic changes of serum ZnT8 autoantibody concentrations over time. 2012 – ještě nepublikováno
84. Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54(Suppl 2): S25-31.

85. Schlosser M, Banga JP, Madec AM, Binder KA, Strebelow M. Dynamic changes of GAD65 autoantibody epitope specificities in individuals at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia* 2005; 48:922-930.
86. Redondo MJ, Babu S, Zeidler A, Orban T, Yu L. Specific human leukocyte antigen DQ influence on expression of antiislet autoantibodies and progression to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1705-1713.
87. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, Cuthbertson D, Rafkin-Mervis LE, Chase HP, Leschek E. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care* 2005; 28(5):1068-76.
88. Diabetes Prevention Trial --Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2002; 346(22):1685-91.
89. Näntö-Salonen K, Kupila A, Simell S, Siljander H, Salonsaari T, Hekkala A, Korhonen S, Erkkola R, Sipilä JI, Haavisto L, Siltala M, Tuominen J, Hakalax J, Hyöty H, Ilonen J, Veijola R, Simell T, Knip M, Simell O. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372(9651):1746-55
90. Assan R, Feutren G, Debray-Sachs M, Quiniou-Debrie MC, Laborie C. Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 1985; 1:67-71.
91. Bougneres PF, Landais P, Boisson C, Carel JC, Frament N. Limited duration of remission of insulin dependency in children with recent overt type I diabetes treated with low-dose cyclosporin. *Diabetes* 1990; 39:1264-1272.
92. Jenner M, Bradish G, Stiller C, Atkison P. Cyclosporin A treatment of young children with newly-diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. London Diabetes Study Group. *Diabetologia* 1992; 35:884-888.

93. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, Bach JF. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:123-127.
94. You S, Leforban B, Garcia C, Bach JF, Bluestone JA, Chatenoud L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:6335-6340.
95. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005; 352:2598-2608.
96. Keymeulen B, Candon S, Fafi-Kremer S, Ziegler A, Leruez-Ville M. Transient Epstein Barr virus reactivation in CD3 monoclonal antibody-treated patients. *Blood* 2010; 115:1145-1155.
97. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 2009; 361:2143-2152.
98. Mastrandrea L, Yu J, Behrens T, Buchlis J, Albini C, Fournier S, Quattrin T. Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Diabetes Care* 2009; 32:1244-9.
99. Ban L, Zhang J, Wang L, Kuhntreiber W, Burger D, Faustman DL. Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:13644-13649.
100. Christen U, Wolfe T, Mohrle U, Hughes AC, Rodrigo E. A dual role for TNF-alpha in type 1 diabetes: islet-specific expression abrogates the ongoing autoimmune process when induced late but not early during pathogenesis. *J Immunol* 2001; 166:7023-7032.
101. Yang XD, McDevitt HO. Role of TNF-alpha in the development of autoimmunity and the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. *Circ Shock* 1994; 43: 198-201.

102. Bloom BJ. Development of diabetes mellitus during etanercept therapy in a child with systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2606-2608.
103. Tack CJ, Kleijwegt FS, Van Riel PL, Roep BO. Development of type 1 diabetes in a patient treated with anti-TNF-alpha therapy for active rheumatoid arthritis. *Diabetologia* 2009; 52:1442-1444.
104. Arif S, Cox P, Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Peakman M, Mirenda V. Anti-TNFalpha therapy—killing two birds with one stone? *Lancet* 2010; 375(9733):2278.
105. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 2001; 358:1749-1753.
106. Schloot NC, Meierhoff G, Lengyel C, Vándorfi G, Takács J, Panczél P, Barkai L, Madácsy L, Oroszlán T, Kovács P, Sütő G, Battelino T, Hosszufalusi N, Jermendy G. Effect of heat shock protein peptide DiaPep277 on beta-cell function in paediatric and adult patients with recent-onset diabetes mellitus type 1: two prospective, randomized, double-blind phase II trials. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23:276-285.
107. Orban T, Farkas K, Jalahej H, Kis J, Treszl A. Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy. *J Autoimmun* 2010; 34:408-415.
108. Pleau JM, Fernandez-Saravia F, Esling A, Homo-Delarche F, Dardenne M. Prevention of autoimmune diabetes in nonobese diabetic female mice by treatment with recombinant glutamic acid decarboxylase (GAD 65) *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 76(1 Pt 1):90-95.
109. Agardh CD, Cilio CM, Lethagen A, Lynch K, Leslie RD. Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes. *J Diabetes Complications* 2005; 19:238-246.

110. Ludvigsson J, Faresjö M, Hjorth M, Axelsson S, Chéramy M, Pihl M, Vaarala O, Forsander G, Ivarsson S, Johansson C, Lindh A, Nilsson NO, Aman J, Ortqvist E, Zerhouni P, Casas R. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359:1909-1920.

111. Ludvigsson J, Krisky D, Casas R, Battelino T, Castaño L, Greening J, Kordonouri O, Otonkoski T, Pozzilli P, Robert JJ, Veeze HJ, Palmer J. GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2012; 366(5):433-42.

112. http://www.promix.ru/manuf/ge/cell/Ficoll-Percoll/Ficoll_instr.pdf

113. Streeck H, Frahm N, Walker BD. The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. *Nat Prot* 2009; 4:461–469.

114. <http://www.abcam.com>

115. Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR. Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N Engl J Med* 1984; 311:149-52.

116. <http://www.diabetestrialnet.org/PathwayToPrevention/>

117. Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Forsthuber T, Lehmann PV, Kaufman DL. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996; 183:1561-7.

118. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. *J Clin Invest* 1995; 95:628-34.

119. Tisch R, Liblau RS, Yang XD, Liblau P, McDevitt HO. Induction of GAD65-specific regulatory T-cells inhibits ongoing autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 1998; 47:894-9.

120. Vrabelova Z, Kolouskova S, Böhmova K, Faresjö MK, Sumnik Z, Pechova M, Kverka M, Chudoba D, Zacharovova K, Stadlerova G, Pithova P, Hladikova M, Stechova K. Protein microarray analysis as a tool for monitoring cellular autoreactivity in type 1 diabetes patients and their relatives. *Pediatr Diabetes* 2007; 8:252-60.
121. Stechova K, Kolouskova S, Sumnik Z, Cinek O, Kverka M, Faresjo MK, Chudoba D, Dovolilova E, Pechova M, Vrabelova Z, Böhmova K, Janecek L, Saudek F, Vavrinec J. Anti-GAD65 reactive peripheral blood mononuclear cells in the pathogenesis of cystic fibrosis related diabetes mellitus. *Autoimmunity* 2005; 38:319-23.
122. Roep BO, Peakman M. Diabetogenic T lymphocytes in human Type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol* 2011; 23(6):746-53.
123. Koh GC, Peacock SJ, van der Poll T, Wiersinga WJ. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:379-88.
124. Wallin MT, Page WF, Kurtzke JF. Multiple sclerosis in US veterans of the Vietnam era and later military service: race, sex, and geography. *Ann Neurol* 2004; 55:65-71.
125. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347:911-20.

Přílohy

Tabulka 1: Popisná statistika

Klinické údaje	min	median	průměr	max	směrodatná odchylka	p hodnota*	normální rozdělení
věk (roky)	6	12	12,33	18	3,198419	0,4876	ano
GAD protilátky (U/ml)	0,29	3,205	13,95	120	27,26968	$1,70 \cdot 10^{-8}$	ne
IA2 protilátky (U/ml)	0,25	3,565	10,72	48,85	14,17117	$7,85 \cdot 10^{-6}$	ne
doba od manifest. (roky)	0,3	4,479	4,444	10,51	3,043292	0,1615	ano
věk manifestace (roky)	3,083	8,189	8,578	16,98	3,46258	0,2099	ano
glykovaný hb (%)	5,1	7,09	7,003	11,3	1,244383	0,00916	ne
ELISPOT IFNγ	min	median	průměr	max	směrodatná odchylka	p hodnota*	normální rozdělení
NK	0	5	8,833	36	9,871007	$2,23 \cdot 10^{-5}$	ne
GAD65-1	0	6,5	8,167	22	6,738123	0,02245	ne
GAD65-2	0	4,75	8,05	50	10,76581	$7,04 \cdot 10^{-7}$	ne
GAD65-3	0	6	7,917	26	7,050414	0,005766	ne
IA2-1	0	8	8,867	41,5	9,442141	0,000184	ne
IA2-2	0,5	6	7,917	30,5	7,355602	0,000431	ne
IA2-3	0,5	6,5	9,433	50	11,7376	$4,91 \cdot 10^{-7}$	ne
ELSPOT IL-17	min	median	průměr	max	směrodatná odchylka	p hodnota*	normální rozdělení
NK	0	3	6,433	26	7,581435	$5,23 \cdot 10^{-6}$	ne
GAD65-1	0	3,5	5,85	29	6,902211	$3,39 \cdot 10^{-6}$	ne
GAD65-2	0	3,75	5,05	25,5	5,048643	$2,14 \cdot 10^{-5}$	ne
GAD65-3	0	2	4,2	24,5	5,806655	$3,63 \cdot 10^{-7}$	ne
IA2-1	0	3,25	6,267	30	7,404255	$3,88 \cdot 10^{-6}$	ne
IA2-2	0	2,5	5,3	22,5	5,992236	$1,66 \cdot 10^{-5}$	ne
IA2-3	0	3	4,817	24	5,92552	$4,32 \cdot 10^{-6}$	ne
FACS	min	median	průměr	max	směrodatná odchylka	p hodnota*	normální rozdělení
NK (% z lymf)	4,11	10,34	10,8	19,08	4,024169	0,262	ano

NKT (% z lymf)	0,42	3,2	4,12	11,8	2,94292	0,006591	ne
Th (% z lymf)	27,04	40,04	40,22	56,54	7,416176	0,917	ano
Tc (% z lymf)	14,31	27,2	27,04	36,07	5,432589	0,6145	ano
T bb (% z lymf)	63,38	70,28	71,19	82,61	5,150008	0,1165	ano
B bb (% z lymf)	1,85	5,28	5,491	10,26	1,806075	0,9038	ano
monocyty (% z PBMC)	2,28	5,05	6,049	18,05	3,572303	0,000675	ne
Tregs (% z Th)	0,67	2,885	2,957	5,21	1,18974	0,9178	ano

* p-hodnota Shapiro-Wilkova testu: nulová hypotéza – data mají normální rozdělení

Tabulka 2: ELISPOT IFN γ

Skupina LOW		
stimulace	p-hodnota	transformované koeficienty
GAD65-1	0,8154	1,0370256
GAD65-2	0,8744	0,9753055
GAD65-3	0,2506	0,8271577
IA2-1	0,2169	0,8148128
IA2-2	0,2169	0,8148127
IA2-3	0,8744	0,9753090
Skupina GAD		
stimulace	p-hodnota	transformované koeficienty
GAD65-1	0,8937	0,9822968
GAD65-2	0,1072	0,7964616
GAD65-3	0,7367	0,9557549
IA2-1	0,3734	0,8849560
IA2-2	0,1642	0,8230084
IA2-3	0,5880	0,9292025
Skupina IA2		
stimulace	p-hodnota	transformované koeficienty
GAD65-1	0,000339	0,7016134
GAD65-2	0,751589	0,9717731
GAD65-3	0,030418	0,8145167
IA2-1	0,452993	1,0685503

IA2-2	0,038804	0,8225803
IA2-3	0,118862	1,1451614
Skupina DP		
stimulace	p-hodnota	transformované koeficienty
GAD65-1	0,0230	1,3749978
GAD65-2	0,2379	0,8295469
GAD65-3	0,4637	1,1136367
IA2-1	0,3448	1,1477268
IA2-2	0,0905	1,2727258
IA2-3	0,4636	1,1136410

Tabulka 3: ELISPOT IL-17

Skupina LOW		
stimulace	p-hodnota	transformované koeficienty
GAD65-1	0,81313	0,9634163
GAD65-2	0,54206	1,0975591
GAD65-3	0,02783	0,6829253
IA2-1	0,49404	1,1097578
IA2-2	0,09669	0,7560962
IA2-3	0,52207	0,9024415
Skupina GAD		
stimulace	p-hodnota	transformované koeficienty
GAD65-1	0,118093	0,7571857
GAD65-2	0,027481	0,6657982
GAD65-3	$3,44 \cdot 10^{-7}$	0,2872087
IA2-1	0,043575	0,6919149
IA2-2	0,000352	0,4830345
IA2-3	0,001069	0,5221976
Skupina IA2		
stimulace	p-hodnota	transformované koeficienty
GAD65-1	0,693236	0,9534339

GAD65-2	0,006527	0,6991834
GAD65-3	0,720374	0,9575633
IA2-1	0,708047	1,0452433
IA2-2	0,508657	1,0805576
IA2-3	0,483998	0,9181205
Skupina DP		
stimulace	p-hodnota	transformované koeficienty
GAD65-1	0,357890	0,8681338
GAD65-2	0,024881	0,6923018
GAD65-3	1,48 · 10⁻⁵	0,4395617
IA2-1	0,596861	0,9230745
IA2-2	0,047012	0,7252840
IA2-3	0,000112	0,4945082

Tabulka 4: Tukey HSD

NK buňky	p-hodnota
GAD-DP	0,1193209
IA2-DP	0,9994003
LOW-DP	0,2038409
IA2-GAD	0,1244839
LOW-GAD	0,0031938
LOW-IA2	0,2816894
Tregs	p-hodnota
GAD-DP	0,4630388
IA2-DP	0,3765826
LOW-DP	0,0066996
IA2-GAD	0,9988151
LOW-GAD	0,1550300
LOW-IA2	0,1969271
Th buňky	p-hodnota
GAD-DP	0,0083097

IA2-DP	0,9295371
LOW-DP	0,8669462
IA2-GAD	0,0026868
LOW-GAD	0,1049835
LOW-IA2	0,5815689
Tc buňky	p-hodnota
GAD-DP	0,1397916
IA2-DP	0,9918379
LOW-DP	0,3236972
IA2-GAD	0,0949770
LOW-GAD	0,9914518
LOW-IA2	0,2353549
T buňky	p-hodnota
GAD-DP	0,4309324
IA2-DP	0,8844024
LOW-DP	0,3344808
IA2-GAD	0,1538293
LOW-GAD	0,0276709
LOW-IA2	0,7313663