

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Imunologie



MUDr. Anna Grohová

Imunoterapie diabetu 1. typu pomocí tolerogenních dendritických buněk
*Role a možnost terapeutického využití tolerogenních dendritických buněk a dalších
imunopresivních buněk u autoimunitních onemocnění se zaměřením na
diabetes 1. typu*

Tolerogenic dendritic cells in immunotherapy of type 1 diabetes
*The role and therapeutic application of tolerogenic dendritic cells and other
immunosuppressive cells in autoimmune diseases focusing on type 1 diabetes*

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Radek Špíšek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Lenka Palová Jelínková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

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

V Praze, 10.9.2022

ANNA GROHOVÁ

Podpis

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala všem, kteří mi v průběhu mého doktorského studia poskytli podporu a pomoc. V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Radkovi Špiškovi, Ph.D. za možnost práce v jeho týmu a za jeho odborné vedení. Stejný dík patří mé školitelce – konzultantce RNDr. Lence Palové Jelínkové, již vděčím za praktické vedení a za cenné odborné rady při psaní publikací a této dizertační práce. Rovněž bych jí chtěla poděkovat za laskavost a vlídnost v průběhu celého svého studia. Speciálně bych zde chtěla poděkovat své kolegyni Mgr. Kláře Dánové, Ph.D. za její ochotu a milou spolupráci, zejména v oblasti metodologie. Dále bych velmi ráda poděkovala svým rodičům a zejména svému manželovi za jeho pochopení a podporu.

Abstrakt

Diabetes 1. typu (T1D) je charakterizován hyperglykemií vedoucí k život ohrožujícím komplikacím. Na jeho patogenezi má významný podíl nežádoucí imunitní reakce způsobující destrukci β -buněk pankreatu. Současná jediná terapie je subkutánní podávání inzulínu, která však nezabrání tranzientním hyperglykemiím. To negativně ovlivňuje metabolické a buněčné procesy v organismu. Buněčná terapie nabízí strategii zaměřenou přímo na modulaci škodlivé autoimunitní reakce, a tedy více cílenou léčbu s nižším výskytem nežádoucích účinků. Tato práce pojednává o dvou supresivních buněčných typech, které mají potenciál tuto autoimunitní reakci utlumit. První část práce se týká přípravy tolerogenních dendritických buněk (tDC) a testování jejich stabilního supresivního fenotypu v prozánětlivém prostředí. tDC si udržují v prozánětlivém prostředí stabilní inhibiční fenotyp, schopnost tlumit antigenně-specifickou T buněčnou odpověď a indukovat T regulační lymfocyty, což je klíčové pro případnou klinickou aplikaci. Práce zároveň ukazuje, že stav metabolické kompenzace diabetických pacientů ovlivňuje supresivní funkci tDC. Druhá část práce je zaměřena na skupinu myeloidních supresivních buněk (MDSC), které vykazují vyšší zastoupení u pacientů s T1D i jejich prvostupňových příbuzných. MDSC jsou schopné tlumit proliferaci T-lymfocytů, a to díky mezibuněčnému kontaktu a produkci TGF- β . V práci je diskutována i problematika hyperglykémie, která moduluje imunitní systém ve smyslu prozánětlivého nastavení a srovnání buněčné terapie v kontextu současných léčebných imunointervenčních strategií.

Klíčová slova: buněčná terapie, diabetes 1. typu, hyperglykémie, MDSC, tolerogenní dendritické buňky, supresivní fenotyp

Abstract

Type 1 diabetes is characterized by chronic hyperglycaemia leading to life-threatening complication. The pathogenetic mechanism of T1D is the abnormal immune reaction destroying β -cell mass in pancreas. The current therapy is based on the administration of subcutaneous insulin. However, this therapy can not prevent the episodes of transient hyperglycaemia. Thus, the high blood glucose influences negatively cellular metabolism and progressively leads to tissue damage. The cellular therapy brings the new strategy allowing the direct modulation of the abnormal autoimmune reaction. This strategy promises more targeting therapy with less adverse effects. In this thesis we discuss two types of immune-suppressive cells which are candidates for cellular therapy in autoimmune diseases. The first part describes the tolerogenic dendritic cells (tDC) and their stable suppressive phenotype in proinflammatory condition. tDC maintain their stable inhibitory phenotype and are able to suppress antigen-specific T-cell proliferation together with the induction of T-regulatory cells. These properties of tDC are very important for potential clinical application. The thesis also reveals the relation between laboratory parameters of T1D patients and suppressive properties of tDC. The second part of the thesis is focused on myeloid-derived suppressive cells (MDSC). These cells are expanded in T1D patients and their first-degree relatives. MDSC likewise exhibit the suppressive phenotype and are able to inhibit the proliferation of T-lymphocytes due to cell-cell contact and production of TGF- β . Last but not least we discuss the problem of hyperglycaemia-induced proinflammatory changes in immune system and the role of cellular therapy in the context of current immune-interventional strategies.

Key words: cellular therapy, type 1 diabetes, hyperglycaemia, MDSC, tolerogenic dendritic cells, suppressive phenotype

Seznam zkratek

AGE	advanced glycation end product; produkty pokročilé glykace
AHST	autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation; autologní nemyeloablativní transplantace hematopoetických kmenových buněk
APC	antigen-presenting cell; antigen-prezentující buňky
BCL-2	B-cell lymphoma 2
CAR-T	cell chimeric-antigen receptor T cell
CAAR	receptor chimeric autoantibody receptor
CCL 5	C-C Motif chemokinový ligand 5
CCL 3	C-C Motif chemokinový ligand 3
CCR7	C-C chemokinový receptor type 7
CFSE	carboxyfluorescein sukcinimidyl ester
CGMS	continual Glucose Monitoring systém; systém kontinuálního měření glykémie
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
CTLA-4	cytotoxický T lymfocytární asociovaný protein 4
CXCL10	C-X-C motif chemokinový ligand 10
CXCR3	C-X-C motif chemokinový receptor typ 3
DAMP	danger-associated molecular pattern; molekulární vzory asociované s poškozením
DC	dendritické buňky
Dex	dexamethason
DPP-4	dipeptidylpeptidáza 4
Dsg3	desmoglein 3
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis; experimentální autoimunitní encefalomyelitida
ERK1/2	extracel signal-regulated kináza 1/2
GAD65	glutamát dekarboxyláza 65
G-CSF	granulocytární kolony-stimulující faktor
GLP-1	glukagonu-podobný peptid 1
GM-CSF	granulocytární-makrofágový kolony-stimulující faktor

GMP	good manufacturing practice; dobrý výrobní praxe
GSK-3 β	glycogen synthase kináza 3 β
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HLA	human leukocyte antigen; humánní leukocytární antigen
HSC	hematopoietic stem cell; hematopoetické kmenové buňky
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation; transplantace hematopoetických kmenových buněk
ChA	chromogranin A
IA-2	islet cell antigen
IAPP	islet amyloid polypeptid
IBD	inflammatory Bowel Disease; idiopatické střevní záněty
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenáza
IGRP	islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein
IFN	interferon
IL	interleukin
IL-T	immunoglobulin-like transcript
JAK	Janus kináza
LPS	lipopolysacharid
MHC	major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex
MIP-1	makrofágový inflammatorní protein 1
MOG	myelin oligodendrocytární protein
MPLA	monophosphoryl lipid A
MS	multiple sclerosis; roztroušená skleróza
MSC	mesenchymal stem cell; mesenchymální kmenové buňky
MDSC	myeloid derived suppressor cell; myeloidní supresorové buňky
mTOR	mammalian target of rapamycin
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF- κ B	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
NK	natural killer buňky
NOX	NO-syntháza
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kináza

PAMP	pathogen-associated molecular patterns; molekulové vzory asociované s patogeny
PBMC	peripheral blood mononuclear cell; periferní krevní mononukleární buňky
pDC	plasmacytoidní dendritické buňky
PD-L1/2	programmed death-ligand 1/2
PI3K	phosphoinositide 3-kináza
PKC	proteinkináza C
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetát
poly(I:C)	polyinosinic:polycytidylic acid
RA	rheumatoid arthritis; revmatoidní artritida
RAGE	receptor for advanced glycation end products; receptor pro produkty koncové glykace
ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
SC	stem cell; kmenové buňky
SCFAs	short-chain fatty acids; mastné kyseliny s krátkým řetězcem
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
T1D	type 1 diabetes mellitus, diabetes 1. typu
TGF	transforming growth factor; transformující růstový factor
Th	T- helper lymfocyt
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNFR1-RIP1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
Tr1	T-regulační lymfocyt 1
Treg	T- regulační lymfocyty
VDR	vitamin D receptor
ZnT8	zinkový transporter 8

Obsah

1. Úvod.....	12
1.1. Diabetes 1. typu, jeho patogeneze a vliv na funkci imunitního systému.....	13
1.1.1. Epidemiologie diabetu 1. typu.....	14
1.1.2. Etiologie	14
1.1.3. Patogeneze	15
1.1.4. Progrese T1D a vliv hyperglykemie na imunitní systém	17
1.1.5. Stádia diabetu	19
1.1.6. Hyperglykémie a její molekulární mechanismus ovlivňující funkci imunitních buněk.....	22
1.1.7. Možnost predikace diabetu 1. typu.....	24
1.1.8. Terapie	26
1.2. Principy buněčné terapie a současný stav.....	26
1.3. Tolerogenní dendritické buňky.....	33
1.3.1. Fenotypická a funkční charakteristika tolerogenních DC	34
1.3.2. Způsob přípravy DC a tDC in vitro	36
1.3.3. Terapeutické využití tDC.....	38
1.4. MDSC.....	40
1.4.1. Indukce a diferenciací MDSC.....	43
1.4.2. Terapeutické využití MDSC.....	44
1.5. Současné možnosti imunointervence u T1D	45
2. Cíle práce.....	48
2.1. Tolerogenní DC	48
2.2. MDSC.....	48
3. Metody.....	49
3.1. Dendritické buňky	49
3.1.1. Příprava DC a tDC.....	49
3.1.2. Průtoková cytometrie a reagentia.....	50
3.1.3. Detekce cytokinů	50
3.1.4. Detekce schopnosti cDC/ tDC stimulovat T-lymfocyty.....	50

3.1.5.	Meření metabolických parametrů DC a signalizačních drah, které využívají k zajištění tolerogenního fenotypu	51
3.1.6.	Subjekty hodnocení a příprava DC.....	51
3.1.7.	Detekce indukce autologní neodpovídavosti T-lymfocytů po kultivaci s tDC.....	53
3.1.8.	Statistická analýza	54
3.2.	MDSC.....	54
3.2.1.	Subjekty hodnocení pro analýzu MDSC	54
3.2.2.	Izolace MDSC	55
3.2.3.	Průtoková cytometrie a reagentia.....	56
3.2.4.	Imunosupresivní esej s MDSC a T-lymfocyty, detekce cytokinů.....	57
3.2.5.	Transwell chamber esej	57
3.2.6.	Statistická analýza	58
4.	Výsledky.....	58
4.1.	Tolerogenní DC	58
4.1.1.	Tolerogenní fenotyp a testy stability	58
4.1.1.1.	tDC vykazují tolerogenní fenotyp a sníženou schopnost stimulovat T lymfocyty	59
4.1.1.2.	Metabolismus tDC a signalizační dráhy, které využívají k zajištění tolerogenního fenotypu	62
4.1.1.3.	mTOR-dependentní glykolýza přispívá k udržení stabilního tolerogenního fenotypu tDC po restimulaci	66
4.1.1.4.	TOR a STAT3 regulují u tDC produkci IL-10 a expresi ILT-3, PD-L1 a CD86 po restimulaci prozánětlivými faktory	70
4.1.2.	Tolerogenní DC u pacientů s T1D.....	72
4.1.2.1.	tDC od pacientů s T1D vykazují inhibiční fenotyp a indukují antigen-specifickou autologní neodpovídavost T-lymfocytů v závislosti na stavu dlouhodobé kompenzace glykémie.....	72
4.1.2.2.	Schopnost tDC navodit stabilní antigeně-specifickou neodpovídavost T-lymfocytů závisí na metabolickém stavu pacienta.....	77
4.2.	MDSC	81
4.2.1.	Charakteristika MDSC a jejich frekvence u pacientů s diabetem, jejich příbuzných a u zdravých dárců	81
4.2.2.	Frekvence M-MDSC pozitivně koreluje s frekvencí Th17- a IFN- γ -T-lymfocytů u diabetických pacientů a jejich příbuzných.....	83

4.2.3. M-MDSC tlumí proliferaci T-lymfocytů ve vysokém poměru MDSC : T lymfocytům	86
4.2.4. M-MDSC potřebují k supresi T-lymfocytů mezibuněčný kontakt a také produkci TGF-β.....	90
4.2.5. Frekvence M-MDSC negativně koreluje s expresí CD3ζ řetězce na T-lymfocytech u diabetických pacientů a jejich příbuzných	92
4.2.6. M-MDSC izolované od pacientů s T1D vykazovaly sníženou schopnost tlumit proliferaci T-lymfocytů než M-MDSC izolované od pacientů s nádorovým onemocněním	94
5. Diskuze	97
5.1. Tolerogenní DC	98
5.1.1. Stabilita tDC	98
5.1.2. Schopnost tDC potlačit antigenně specifickou proliferaci T-lymfocytů u diabetických pacientů.....	101
5.2. MDSC.....	104
6. Závěr.....	109
7. Seznam použité literatury	110
8. Přílohy	133

1. Úvod

Diabetes 1. typu (T1D) je komplexní metabolická porucha zapříčiněná destrukcí β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Rozsáhlá patologická interakce mezi β -buňkami a četnými složkami jak neadaptivní, tak adaptivní imunity vede k postupnému zničení inzulin produkujících buněk a následné hyperglykemii. To s sebou přináší život ohrožující komplikace plynoucí z dlouhodobého působení vysoké hladiny glukózy na různé typy buněk a tkání. Klinický obraz odráží mikro- a makrovaskulární komplikace a dochází i k alteraci imunitního systému u těchto pacientů.

Díky objevení inzulinu v roce 1922 se ze dříve smrtelného onemocnění stalo onemocnění léčitelné, nicméně vyžadující celoživotní terapii ve formě subkutánně podávaného inzulinu. Cílem terapie u všech typů diabetu je dlouhodobé udržení optimální glykemie, což snižuje riziko chronických komplikací (1). Standardní terapie je založena na kombinaci různých inzulinových přípravků ve zvolených inzulinových režimech, což vede ke zlepšení metabolické kompenzace. Nicméně i přes intenzifikované inzulinové režimy a dobrou compliance pacienta je obtížné respektovat fyziologické zákonitosti a zajistit tak optimální dlouhodobou hladinu glykemie bez jejich výkyvů.

V posledních letech je velká snaha najít terapeutické možnosti na potlačení nežádoucí imunitní odpovědi, která je příčinou zničení β -buněk. Bylo zahájeno několik klinických studií a *in vitro* prací s cílem přímo modulovat proces autoimunitní destrukce β -buněk v pankreatu. Zajímavou imunointervenční strategií je možnost buněčné terapie, která by mohla přímo potlačit patologický proces v pankreatu a zabránit tak inzulinové depleci. Nicméně přes dílčí úspěchy buněčné terapie ve smyslu zlepšení určitých laboratorních či klinických parametrů nebylo zatím dosaženo účinné dlouhodobé imunologické suprese (2).

Ve své práci se zabývám možnostmi využití buněčné terapie tolerogenními dendritickými buňkami (tDC) a myeloidními-supresivními buňkami (MDSC), jakožto terapeutickou strategií u pacientů s T1D a jejich příbuzných, kteří jsou v riziku rozvoje diabetu. Tolerogenní DC i MDSC inhibují prozánětlivou odpověď a jsou schopny navodit imunologickou toleranci, a to několika mechanismy zahrnující navození anergie a/nebo apoptózy autoreaktivních T-lymfocytů, snížení produkce prozánětlivých cytokinů a v neposlední řadě indukci T- i B-regulačních lymfocytů (2, 3).

Dále jsem se zabývala definováním vhodné skupiny pacientů, u kterých by případná buněčná terapie přinesla největší benefit. Aplikace cílené imunosupresivní terapie u příbuzných v riziku by byla vhodná zejména proto, že je u nich ještě částečně zachovalá funkce β -buněk, jejichž schopnost regenerace je omezená (2, 4). Zároveň je známo, že chronická hyperglykemie je asociovaná s četnými změnami imunitního systému, které se odehrávají na molekulární úrovni, což vytváří výrazné prozánětlivé prostředí vedoucí dále ke zhoršení průběhu diabetu (2). V takto nastaveném imunitním systému může být pak autoimunitní reakce hůře potlačitelná. Proto je nutné pečlivě zvážit a definovat skupiny pacientů, u kterých by suprese autoimunitní reakce pomocí buněčné terapie mohla být perspektivní.

Výsledky a diskuze této práce bude rozdělena do dvou částí, kde budou samostatně diskutovány vybrané regulační buňky.

1.1. Diabetes 1. typu, jeho patogeneze a vliv na funkci imunitního systému

Diabetes 1. typu je autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k porušení imunologické tolerance, což vede k selektivní destrukci β -buněk pankreatu v Langerhansových ostrůvcích a následné inzulínové deficienci (5). T1D je považován za důsledek neadekvátní buněčné autoimunitní reakce proti některým antigenům β -buněk, kde hlavní úlohu hrají autoreaktivní CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty. Následná hyperglykemie vede dále k porušení periferní tolerance a ke zhoršení autoimunitní inzulitidy. Narušení funkce dalších imunitních buněk včetně antigen prezentujících buněk (APC) posunuje imunitní systém směrem k prozánětlivému prostředí s diferenciací Th1/Th17 lymfocytů a k potlačení indukce T-regulačních lymfocytů (6).

Role autoprotilátek proti antigenům β -buněk je stále předmětem zkoumání. Z dosud publikovaných studií se nezdá, že by autoprotilátky měly roli v destrukci β -buněk (7). Zajímavé je, že v poslední době byly publikovány práce dokazující roli samotných β -buněk v patogenezi tohoto onemocnění, jakožto vyvolávajícího spouštěče inzulitidy (8).

1.1.1. Epidemiologie diabetu 1. typu

T1D je doposud nevléčitelná choroba, jejíž incidence má stále vzestupnou tendenci (9, 10). V České republice je incidence přibližně 22 na 100 000 obyvatel na rok (11).

1.1.2. Etiologie

T1D je polygenní multifaktoriální onemocnění, kde se udává podíl genetického rizika přibližně 50 %. Konkordance mezi jednovaječnými dvojčaty se udává od 23 % do 53 %, naproti tomu u dizygotních dvojčat je to od 2,5 % do 11 % (12, 13). Mezi kandidátní geny se řadí HLA-II. třídy, kde je pravděpodobně zasažena selektivní prezentace specifických antigenů (8). Díky celogenomovým asociačním studiím bylo objeveno několik dalších non-HLA rizikových genů (inzulinový gen, geny CTLA4, PTPN22, IFIH1, FUT2), které mají vliv na imunologickou toleranci (14-19). Spojení s možnými vlivy infekčních agens na rozvoj diabetu naznačuje asociace s geny IFIH1 a FUT2 (20, 21). IFIH1 je gen kódující protein zapojený do detekce virové infekce buněk a gen FUT2 má patrně vliv na bakteriální osídlení a propustnost střevní stěny (22, 23). To poukazuje na komplexní patogenezi T1D a značnou heterogenitu genetické asociace.

Z negenetických příčin bylo identifikováno několik suspektních faktorů, jejichž asociace s onemocněním je však podstatně nižší než u faktorů genetických. Velice zajímavé výsledky přinesly 2 studie, které porovnávaly výskyt genetických rizikových faktorů (HLA-II) mezi pacienty s T1D, kteří byli diagnostikováni mezi lety (1939-1965) a mladšími pacienty diagnostikovanými v letech (1999-2001). Výskyt rizikových alel byl vždy vyšší u “starší” skupiny pacientů, z čehož lze předpokládat, že podíl negenetických vlivů asociovaných s diabetem pravděpodobně zesílil (24, 25). Toto podporuje obecně známou “hygienickou” hypotézu, kdy expozice určitými patogeny v dětství pomáhá příznivému vývoji imunitního systému. Nicméně obtížnost získat data pro kvalitní retrospektivní studie je hlavní příčinnou pro nejednoznačné asociace negenetických vlivů na patogenezi T1D.

Pravděpodobně některé enviromentální faktory, které ovlivňují složení mikrobiomu mohou také přispívat k rozvoji T1D. Diskutované téma je zavádění výživy v kojeneckém věku (zavádění bílkoviny kravského mléka, glutenu (26-29) či expozice virovým či mykobakteriálním patogenům (30, 31). Byl například zjištěn vyšší výskyt butyrátu jakožto metabolitu střevního

mikrobiomu ve střevě zdravých kontrol oproti dětem s T1D (32, 33). Butyrát má imunomodulační efekt na střevní sliznici. Řadí se mezi mastné kyseliny s krátkým řetězcem (řetězcem fatty acids – SCFAs), jež mají přímý vliv na T-lymfocyty (34, 35). SCFAs inhibují histon-deacetylázy a aktivují mTOR a STAT3 signalizační dráhu, což vede ke zvýšené diferenciaci T-regulačních lymfocytů a následné IL-10 sekreci (36). Tento proti-zánětlivý efekt SCFAs byl popsán i u dalších imunitních buněk, konkrétně neutrofilů, makrofágů a pDC (37).

Jako možnost imunomodulace pomocí exogenních faktorů byl zvažován i vitamin D. Menší observační studie s podáváním vitaminu D v kojeneckém věku přinesly výsledky prokazující jeho protektivní vliv na výskyt T1D (38).

Do jaké míry však nutriční faktory ovlivňují složení mikrobiomu ve střevě a tím případně riziko vzniku T1D není zatím zcela zřejmé a doposud neexistuje možnost prevence tohoto onemocnění.

1.1.3. Patogeneze

Jako patogeneze autoimunitních chorob se uvádí prolomení imunologické tolerance. Imunologická tolerance je soubor různých procesů v organismu, které zabraňují potenciálně škodlivé imunitní odpovědi na autoantigeny. Z principů imunologické tolerance vycházejí možnosti terapeutického reprogramování imunitního systému s cílem znovunastolit tuto toleranci u autoimunitních chorob, alergií či jiných imunopatologických stavů.

U diabetu 1. typu jsou hlavními aktéry autoreaktivní CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty, které rozeznávají autoantigeny β -buněk. Je známo několik kandidátních autoantigenů na β -buňkách jako jsou pro-inzulin, IA-2 (insulinoma-asociovaný protein 2), GAD65 (dekarboxyláza kyseliny glutamové) a ZnT8 (zinkový transportér 8) (39, 40). V posledních letech byly objevené i nové autoantigeny, jako jsou např. IAPP (islet amyloid polypeptide), IGRP (islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein), chromogranin A (ChgA), peipherin a další (41). Odkrytí těchto antigenů na β -buňkách umožní jejich ingesci antigen prezentujícími buňkami (APC – antigen presentin cells), jako jsou makrofágy a dendritické buňky a jejich transport do spádových lymfatických uzlin. Tam dochází ke stimulaci autoreaktivních T-lymfocytů, zejména CD4⁺Th1-lymfocytů, díky sekreci IL-12, IL-18 a IL-1 antigen prezentujícími buňkami. CD4⁺ T-lymfocyty dále přispívají k stimulaci B-lymfocytů a sekreci autoprotilátek, aktivaci

tkáňových makrofágů, které následně produkují prozánětlivé cytokiny a v neposlední řadě CD4⁺ T-lymfocyty podporují CD8⁺ T-lymfocytární (CTL) odpověď, díky které dochází k přímému poškození β -buněk (42). Na poškození β -buněk mají vliv i různé populace NK buněk, které hrají roli jak v iniciaci, tak ve zprostředkování autoimunitní reakce na β -buňky (43).

Při tomto porušení imunologické rovnováhy nedochází k dominantní stimulaci Th2-lymfocytů a regulačních T-lymfocytů, k jejichž diferenciaci je zapotřebí sekrece odlišných imunoregulačních cytokinů, zejména IL-10, IFN- γ , IL-4 (6, 44).

Nicméně autoreaktivní T-lymfocyty byly identifikovány i u nediabetických jedinců (45, 46). Autoreaktivní T-lymfocyty jsou pravděpodobně normální součástí T-buněčného repertoáru, z čehož vyplývá, že právě porucha imunologické tolerance se uplatňuje v patogenezi T1D (47). U pacientů s T1D může docházet k odlišné periferní aktivaci T-lymfocytů a/nebo narušení jejich regulace (48). Několik studií rovněž ukázalo, že jedinci s T1D mají stejnou frekvenci T-regulačních lymfocytů jako zdraví jedinci, ale jejich funkce může být snížena (49, 50).

Přestože CD8⁺ T-lymfocyty tvoří hlavní součást infiltrátu v ostrůvcích pankreatu (51), během progresu onemocnění dochází dále k infiltraci ostrůvků dalšími imunitními buňkami (Th17-lymfocyty, CD20⁺ B lymfocyty, NK buňky, CD45⁺ buňky, makrofágy) a k potencování prozánětlivého prostředí, které vede k dalšímu zničení β -buněk díky zvýšené expresi antigenů prezentovaných na HLA-I molekulách (40, 52, 53).

Během rozvoje T1D dochází k sérokonverzi specifických protilátek proti inzulinu, GAD65, IA-2, ZnT8 (54, 55). Role protilátek v přímé destrukci β -buněk se však zdá být marginální (56). Pro tento fakt svědčí i studie zahrnující děti matek, které trpěly T1D. Tyto děti byly *in utero* exponovány diabetickým autoprotilátkám a nerozvinuly klinický obraz diabetu (57, 58). Protilátky mají však důležitý diagnostický význam a jejich detekce se používá v predikci manifestace T1D (59).

V neposlední řadě se poukazuje na možnost vlivu samotných β -buněk v patogenezi diabetu (60). Různé vyvolávající faktory mohou ovlivnit vnímavost β -buněk např. k virové infekci či metablickému stresu, a tím učinit β -buňky náchylnější k poškození autoimunitními lymfocyty (60). Campbell-Thompson et al. poukázali ve své studii na menší velikost pankreatu u pacientů s T1D (61), což naznačuje, že při glykemické zátěži může nastat u těchto jedinců větší

metabolický stres β -buněk, a to vytvořit pro-zánětlivé prostředí v Langerhansových ostrůvcích. Rovněž β -buňky exprimují specifické receptory pro enteroviry a adenoviry, a tudíž mohou být zranitelnější při těchto virových nákazách (62).

Celková kapacita β -buněk vyrovnat se stresovými faktory, ať už se jedná o virový infekci, metabolický stres či střevní expozici nutričním faktorům, je pravděpodobně omezena (63). β -buňky vykazují nižší produkci superoxid-dismutázy a antiapoptického faktoru BCL-2 (64). Také vykazují vyšší míru indukce apoptózy díky aktivaci IRF-STAT1 a nekroptózy přes zapojení TNFR1-RIP1 signalizační dráhy a následné aktivaci stresových sensorů v endoplazmatickém retikulu β -buněk (65, 66). Navíc β -buňky produkují CXCL10 chemokin, který dále atrahuje leukocyty a tím přispívá k imunitnímu poškození inzulín produkujících buněk (67).

Na rozvoj imunitního poškození buněk mají nepochybně vliv i další buňky nespecifické imunity. Tkáňové makrofágy a dendritické buňky v Langerhansových ostrůvcích rozpoznávají DAMPs na poškozených β -buňkách díky svým Toll-like receptorům (TLR) a jsou hlavním zdrojem pro-zánětlivých cytokinů (IL-1, TNF, IL-6, IL-12, IL-23) při zahájení imunitní reakce proti β -buňkám (68-70).

Vliv imunitní reakce na patogenezi T1D je tedy nesporný a imunomodulační postupy založené na znovunastolení imunitní rovnováhy v ostrůvcích pankreatu se zdají být slibnou intervenční terapeutickou metodou. Novější poznatky ukazují na zajímavou možnost kombinovat tuto strategii s terapií zaměřenou na zlepšení přežití a odolnosti β -buněk samotných.

1.1.4. Progrese T1D a vliv hyperglykemie na imunitní systém

Průvodní znak diabetu je hyperglykémie a diagnostika se opírá o tato kritéria (71):

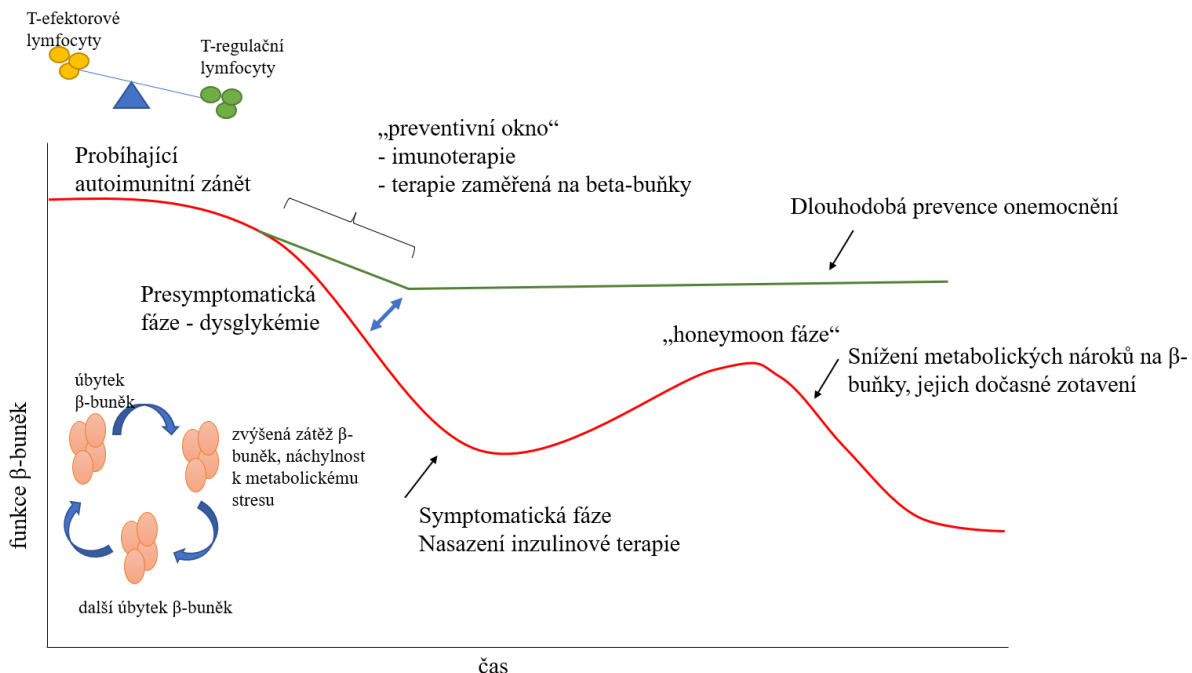
- Koncentrace glukózy v plazmě žilní krve kdykoliv během dne $\geq 11,1$ mmol/l
- Koncentrace glukózy v plazmě žilní krve na lačno $\geq 7,0$ mmol/l
- Koncentrace glukózy v plazmě při orálním glukózovém tolerančním testu $\geq 11,1$ mmol/l.

Klasický model patogeneze předpokládá, že mezi začátkem imunitního poškození a klinickou manifestací, která z hyperglykémie plyne, je určité okno a k příznakům dochází až při zničení

přibližně 80-90% inzulin produkující tkáň. Nicméně v průběhu posledních let byl tento model značně modifikován a poslední studie ukazují na to, že míra poškození β -buněk potřebná pro rozvoj klinických příznaků se může mezi jedinci značně lišit a zároveň záviset na věku, BMI, fyzické kondici pacienta apod. (72). Jedná se o souvislou řadu událostí, které postupně progredují až do klinického obrazu diabetu.

Klinické manifestaci hyperglykemie u pacientů s T1D předchází asymptomatická fáze, kdy je však již narušena imunologická tolerance. Pokles β -buněk pravděpodobně není zcela lineární, jak dokazuje studie von Harrat et al. (73). Díky zpětnovazebnému mechanismu dochází ke zvyšování počtu T-efektorových lymfocytů a T-regulačních lymfocytů. Tento mechanismus je však postupně vychýlen a dojde k nerovnováze ve prospěch autoreaktivních T-lymfocytů, které přesáhnou kapacitu T-regulačních lymfocytů (Tregs) (74). T-regulační lymfocyty již nejsou schopny tuto reakci potlačit a dochází k poškození pankreatické tkáň. Tento proces je potencován zvýšenou proliferací β -buněk a jejich zvýšenou metabolickou zátěží na produkci inzulinu. Díky jejich zvýšené náchylnosti k metabolickému stresu (60) dochází k jejich dalšímu poškození a k akceleraci prozánětlivého prostředí. Tímto fenoménem se také vysvětluje tzv. „honeymoon fáze“, kdy dochází k přechodnému zlepšení funkce β -buněk (stanovené na základě měření plazmatického C-peptidu) po nasazení inzulinové terapie, a tedy snížením metabolické zátěže na β -buňky (75-77). Schematizováno na Obr. 1.

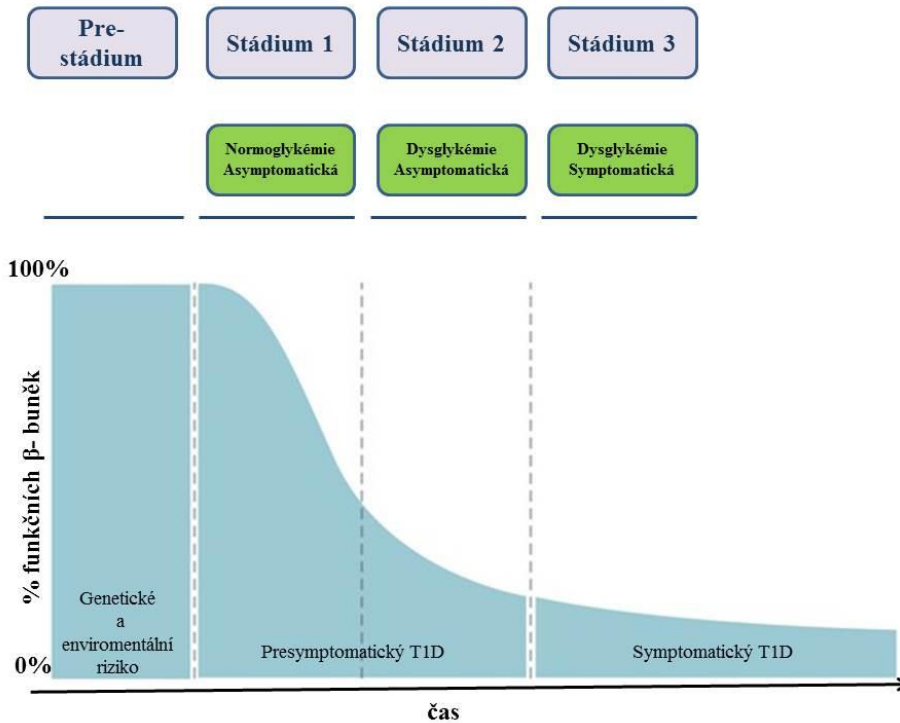
Detailnější znalosti o této pre-diabetické fázi jsou velmi důležité pro studie zaměřující se na prevenci/ terapii T1D.



Obr. 1 Progrese T1D a vliv metabolických nároků na β -buňky

1.1.5. Stádia diabetu

Vývoj T1D lze kategorizovat do 3 stádií. Jako pre-stádium se označuje genetické riziko určující vnímavost jednice k rozvoji T1D. Stádium 1 lze definovat jako již probíhající inzulitidu, tj. infiltraci Langerhanosvých ostrůvků imunitními buňkami, což odráží přítomnost 2 nebo více autoantilátok, klinicky se zatím nemanifestuje a zůstává normoglykémie. Stádium 2 je rovněž asymptomatické, ale již došlo k narušení glukózové tolerance. Stádium 3 je již definováno jako klinická manifestace diabetu (54), schematizováno na Obr. 2. Díky této klasifikaci je snazší plánovat standardní terapii a zejména klinické studie se zaváděním nových terapeutických postupů zaměřených na prevenci T1D. Rychlost progrese T1D se značně liší mezi jednotlivci od několika měsíců až po několik let (5, 52, 78)



Obr. 2 Stádia T1D

Během další fáze rozvoje diabetu nastává u některých jedinců období parciální remise, tzv. „honeymoon period“. Během této fáze dochází k poklesu potřeby exogenního inzulínu, což se přisuzuje dočasnému zlepšení funkce β-buněk (76, 77). Toto období je v poslední době velmi intenzivně studováno s ohledem na možnost terapeutické intervence v rámci prevence T1D. Patofyziologický mechanismus dočasného zotavení β-buněk není zcela vyjasněn, ale předpokládá se, jak již bylo uvedeno, snížení metabolického nároku na β-buňky, a tím snížení jejich „metabolického stresu“ (75, 79-81).

Při nápravě hyperglykémie pravděpodobně dochází i k imunomodulaci, a tím k utlumení autoimunitní inzulitidy v pankreatu (79). Hyperglykémie má vliv na specifickou i nespecifickou imunitní odpověď a podněcuje prozánětlivé prostředí (82). Poslední studie ukázaly, že ve fázi remise dochází ke výraznému zvýšení T-regulačních lymfocytů $CD4+CD25^+CD127^{low}$ (83). Jiná studie prokázala, že frekvence aktivovaných T-regulačních buněk (aTregs), $CD45RO^+$ paměťových T-buněk, a $CD25^+CD127^{hi}$ paměťových buněk pozitivně korelovala s délkou fáze remise u T1D pacientů, pouze však při udržení normoglykémie (84). Fitas et al. ukázali ve své

studii, že ke konci fázi remise došlo ke snížení počtu Treg, a zvýšení Th1- a Tc17- lymfocytů (cytotoxické Th17 lymfocyty) (83).

Zajímavá studie ukázala pozitivní korelaci mezi mT-regs (memory T regulační lymfocyty) a hladinou C-peptidu u diabetických pacientů (85), což podporuje hypotézu o vlivu hyperglykémie na imunologický proces v Langerhansových ostrůvcích a uplatnění role T-regulačních lymfocytů při navození klinické remise diabetu. Hyperglykémie zřejmě způsobuje dysfunkci T-regulačních lymfocytů a její korekce vede k obnovení funkce T-regs a zvýšení frekvence těchto buněk. CD4⁺CD25⁺CD127^{hi} paměťové T lymfocyty elevované během fáze remise vedou k indukci Tr1 regulačních buněk (Type 1 regulatory cells) (76, 86). Ačkoliv vliv Tr1 buněk a paměťových T-lymfocytů v období remise T1D nebyl zatím popsán, tyto buňky mají schopnost potlačit autoimunitní odpověď (86, 87).

Byly publikovány práce zaměřené i na roli B-lymfocytů během fáze remise a přinesly zajímavé poznatky o jejich vlivu na patogenezi diabetu. Villalba et al. ukázali, že během fáze remise došlo k navýšení frekvence B-regulačních lymfocytů (88). Zároveň celková frekvence B-lymfocytů vykazovala nejnižší úroveň během fáze remise (83) a terapie pomocí Rituximabu, monoklonální protilátky namířené proti CD20, prodloužila fázi klinické remise (89). Souhlasně s těmito výsledky Deng et al. ukázal ve své studii, že subpopulace regulačních B-lymfocytů produkujících IL-10 (B10) pozitivně korelovala s hladinou C-peptidu a negativně korelovala s hladinou HbA1c u T1D pacientů (90). Pravděpodobně během rozvoje diabetu dochází také ke zvýšené expresi antigenů B-lymfocyty, což se zdá být zapříčiněno hyperglykemií. Po nastavení inzulinové terapie došlo totiž k poklesu antigenní prezentace na B-buňkách (91, 92).

Vliv vysoké koncentrace glukózy na cytokinovou a chemokinovou produkci u T1D pacientů byl také hodnocen v několika nedávných studiích. Publikovaná práce ukázala snížení Th1-chemokinu CCL5 během fáze remise a jeho pozitivní korelaci s hladinou HbA1c a negativní korelaci mezi chemokinem CCL3 a hladinou C-peptidu (93). Chemokiny CCL5 a CCL3 jsou důležité k zahájení aktivace Th1-lymfocytární odpovědi. Dále u pacientů v remisi byla zjištěna snížená hladina IFN- γ , TGF- β a zvýšená hladina IL-10 (94).

Z uvedeného vyplývá, že glukotoxicita umocňuje patologickou imunitní reakci poškozující β -buňky. Tato destruktivní reakce je snížena během fáze remise, kdy dochází nejen k snížení metabolických nároků na β -buňky a jejich nižšímu metabolickému stresu, ale zároveň také k

utlumení autoimunitního zánětu díky nápravě hladiny glykémie. Z těchto faktů vycházíme v naší hypotéze, že nejlepší doba na imunologickou intervenci u T1D pacientů by byla v období dlouhodobé dobré kompenzace diabetu. Zároveň by bylo vhodné zahájit tuto intervenci co nejdříve, kdy je alespoň částečně zachována funkce β -buněk. Navzdory dobré compliance některých pacientů a přesné léčbě intenzifikovaným inzulínovým režimem nemohou být zcela eliminovány přechodné epizody hyperglykemií. Hyperglykémie tak dále zhoršuje vývoj T1D a vede k jeho progresi až do úplného vyčerpání β -buněk.

1.1.6. Hyperglykémie a její molekulární mechanismus ovlivňující funkci imunitních buněk

Průvodní znak diabetu je hyperglykémie vycházející z nedostatečné produkce inzulínu. Tato hyperglykémie nemusí být konstantně přítomna po celou dobu trvání choroby, nicméně i její transientní epizody vytváří abnormální metabolické prostředí u většiny buněk s následným poškozením tkání. Hyperglykémie dále způsobuje kumulativní změny na makromolekulách, které zůstávají i po návratu hladiny glykémie do normy. Tento fenomén byl popsán jako metabolická paměť. Proto i krátkodobá vysoká hladiny glykémie, která se následně upraví, může mít dlouhodobý negativní efekt (95).

Co se týče imunitního systému, hyperglykémie je asociovaná se snížením funkce jak neadaptivní, tak i adaptivní složky imunity. Bylo popsáno snížení hladiny komplementu, snížená chemotaxe, fagocytóza a diapedéza polymorfonukleárů a monocytů/ makrofágů (96, 97). Zároveň je patrné, že hyperglykémie přispívá k částečnému prolomení imunologické tolerance, ovlivňuje funkci APC ve smyslu maturace DC, napomáhá diferenciaci prozánětlivých Th1/Th17 lymfocytů a tlumí T-regulační lymfocyty (98, 99).

Hyperglykémie je asociovaná se zvýšeným oxidativním stresem díky nadprodukcí nikotinamid-adenin dinukleotidu (NADH) a mitochondriálními reaktivními formami kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Ty poté inhibují glukózový metabolismus skrze glykolýzu a cyklus trikarboxylových kyselin s následnou aktivací alternativních metabolických drah glukózy zahrnující polyolovou dráhu a hexosaminovou dráhu. Obě tyto alternativní cesty dále zvyšují produkci ROS, a tak napomáhají vzniku circulus viciosus buněčného oxidativního stresu (100,

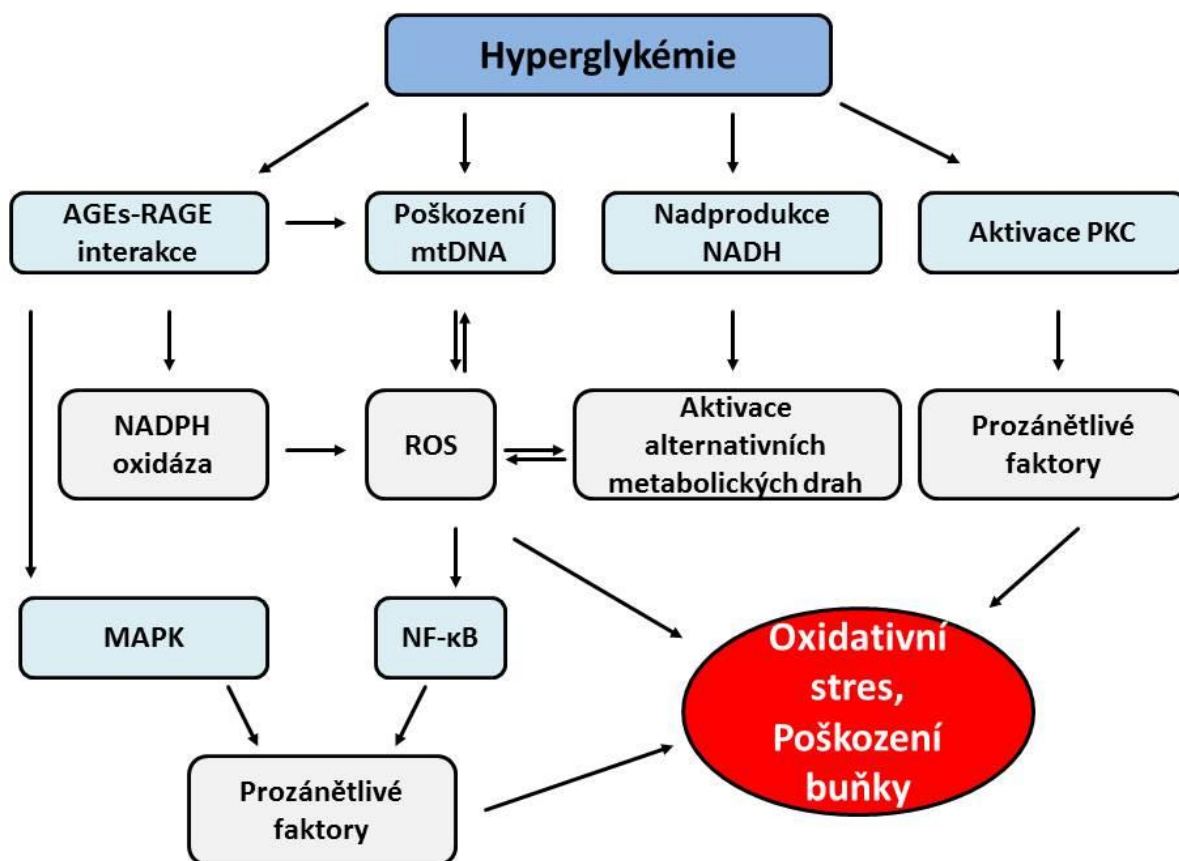
101). Hyperglykemií indukovaná protein-kináza C (PKC) dále zvyšuje poškození buněk díky aktivaci prozánětlivých genů včetně NF- κ B a dalšímu zvýšení ROS (1, 102-105).

V neposlední řadě je škodlivý efekt hyperglykémie zprostředkován formováním koncových produktů pokročilé glykace (advanced glycation end products – AGEs). AGEs jsou heterogenní molekuly vznikající několikastupňovým procesem neenzymové glykace proteinů, nukleových kyselin i lipidů. Jedním z významných produktů je glykovaný hemoglobin HbA1c, který se využívá jako diagnostický marker.

Formování AGEs významně narušuje integritu buněk a jejich škodlivý efekt je také zprostředkován díky RAGE receptorům (receptor for advanced glycation end-product), které následně indukují prozánětlivé reakce (106). Signalizace přes RAGE receptory vede k aktivaci NADPH oxidázového systému, další produkci ROS, a tím k dalšímu poškození mitochondriálních proteinů a DNA změnám (107). RAGE se skládá z 5 domén (3 extracelulární, 1 transmembránová a 1 intercelulární). Intercelulární doména vede k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, což vede k expresi růstových a prozánětlivých faktorů, cytokinů i k samotné expresi RAGE receptorů (108, 109). Nadprodukce AGEs vede i k dalšímu selhání β -buněk díky aktivaci NADPH-oxidázy, produkci ROS a následné apoptóze β -buněk cestou PKC β 2 (110).

RAGE receptory byly identifikovány na povrchové membráně i v cytosolu různých buněk, včetně buněk imunitního systému (111). Vzájemná interakce AGEs-RAGE indukuje maturaci dendritických buněk (DC), polarizaci Th1/Th17 – lymfocytů z naivních CD4⁺ T- buněk a aktivaci a maturaci B-lymfocytů. V neposlední řadě snižuje supresorovou funkci T- regulačních lymfocytů (99, 112-114). Zároveň hyperglykémie cestou formování AGEs ovlivňuje vazebnou schopnost receptoru pro vitamin D (VDR) na DNA *in vitro* a může takto snižovat tolerogenní efekt vitaminu D (115, 116). Nadto přímá glykace molekul významně ovlivňuje i jejich strukturu a funkci. Např. glykace povrchového receptoru CD127 na T-lymfocytech zabraňuje navázání IL-7, a tak nedochází k IL-7 navozené T-lymfocytární proliferaci (117).

Tyto jednotlivé mechanismy se tak společně podílí na navození prozánětlivého prostředí u pacientů s chronickou hyperglykemií (104), schematizováno na Obr. 3.



Obr. 3 Mechanismus působení vysoké koncentrace glukózy v buňce

AGEs – advance glycation end-products; RAGE – receptor for AGEs; NADH – nikotinamid-adenindinukleotid; PKC –protein kináza C; NADPH –nikotinamid-adenindinukleotidfosfát; ROS –reactive oxygen species; MAPK - mitogen-activated protein kináza; NF-κB - nukleární faktor kappa B

1.1.7. Možnost predikace diabetu 1. typu

Dle klinického aspektu lze rozdělit T1D do 3 stádií, během kterých již dochází k imunitnímu poškození β -buněk, jak bylo popsáno výše. Jako pre-stádium se někdy označuje genetické riziko určující vnímavost jedince k rozvoji T1D (78). Kombinací genetického vyšetření, vyšetření autoprotilátek a funkčních testů lze riziko vzniku T1D do jisté míry přesněji kvantifikovat (81, 118). To přináší nejen nové možnosti cílit přesněji léčbu na toto období, ale v neposlední řadě u jedinců, kteří jsou již v tomto období sledování, se může omezit vznik závažných klinických komplikací při manifestaci T1D (ketoacidóze). Lze u nich dříve nasadit optimální terapii a lépe

navodit remisi, která pak trvá déle (81). U jedinců sledovaných pro riziko rozvoje diabetu se snížil počet hospitalizací a redukoval počet těžkých ketoacidóz (119). Tyto děti mívají i lepší metabolickou kompenzaci nejen při manifestaci onemocnění, ale i v dlouhodobém hledisku (120).

V České republice funguje program k predikci T1D, který se zaměřuje na prvostupňové příbuzné pacientů s již diagnostikovaným T1D. V rámci tohoto programu lze určit genetické riziko, a u jedinců nesoucí rizikový genotyp se stanoví hladina protilátek. V případě positivity 2 a více protilátek se provádí funkční vyšetření β -buněk *i.v.* glukózovým tolerančním testem. Kombinací těchto faktorů lze stanovit míru rizika rozvoje onemocnění.

Výskyt autoproti látek se dynamicky mění v průběhu onemocnění (121). Význam v predikci diabetu má kombinovaná detekce více protilátek včetně autoproti látky ZnT8, která zvyšuje senzitivitu záchytu až na 98 % (122-124). Jako menší kritéria ve stanovení rizika T1D se posuzují i afinity jednotlivých protilátek (125, 126).

Současné studie se zaměřují také na nové biomarkery zpřesňující diagnostiku presymptomatického období. Mohly by přinést zpřesnění jednotlivých stádií a lepší stanovení rizika progresu onemocnění. Relevantní biomarkery časně insulitidy by mohly být demetylovaná inzulinová DNA a zvýšení Th1-asociovaných cytokinů (IFN- γ a TNF- α) (127).

Zajímavou práci publikovala Kayserova et. al., ve které se zaměřovali na prediktivní význam sekrece IFN- α plazmacytoidními DC (pDC) indukovanou pomocí TLR-9. U jedinců nesoucí rizikový genotyp produkovaly pDC po stimulaci TLR-9 ligandem více IFN- α oproti nerizikovým jedincům (128). IFN- α je důležitý při iniciaci T1D (129). Rovněž terapeutické podávání exogenního IFN- α bylo asociováno s rozvojem tohoto onemocnění (130).

Díky možnostem predikce rozvoje T1D se nabízí i možnost časně intervence. V rámci studií zaměřených na prevenci T1D bych zde ráda zmínila zajímavou klinickou studii DPT-1, ve které byl rizikovým příbuzným podáván orálně inzulin. V primární analýze dat orální podání inzulinu nezpomalilo rozvoj T1D, ale při podrobnější analýze došlo ke zpomalení onemocnění u kohorty pacientů s vysokým titrem autoproti látek proti inzulinu (131). Tyto dílčí výsledky naznačují, že cílená terapie u osob v riziku by mohla být v budoucnu velmi perspektivní.

1.1.8. Terapie

Jedinou terapeutickou variantou T1D je celoživotní podávání inzulínu s cílem optimálního udržení glykémie. Důležitá je edukace a selfmonitoring pacientů, díky kterému lze alespoň částečně zabránit či oddálit výskyt chronických komplikací spojených s T1D a eliminovat akutní diabetické komplikace. U T1D pacientů je nejčastější intenzifikovaný inzulínový režim, kde je hrazen jak bazální, tak post-prandiální inzulín. Nicméně tyto režimy mají svá úskalí a velmi záleží na dobré compliance pacientů. Častý selfmonitoring lze za daných podmínek nahradit pomocí kontinuálního subkutánního senzoru (CGMS – Continual Glucose Monitoring system). Toto zařízení pomáhá částečně eliminovat hypoglykémie a je vhodné zejména u dětských pacientů (71, 132, 133).

Současný vývoj se zaměřuje na vylepšení technologií monitoringu glykémie a aplikaci inzulínu. Inzulínové pumpy s možností bolusového kalkulátoru, kontinuální subkutánní monitoring či terapeutické snahy o jejich propojení zajistí fyziologičtější dávkování inzulínu,lepší kontrolu glykémie a v neposlední řadě by mohly zlepšit kvalitu života pacientů. Četné studie hodnotící kvalitu života u pacientů s T1D vykazují vyšší incidenci určitých psychiatrických onemocnění u T1D, což nepochybně souvisí se zátěží pacienta spojenou s T1D (134-136).

Proto je v poslední době vkládáno velké úsilí do nových metod, které by mohly zajistit kauzální léčbu T1D a tím zlepšit kvalitu života jednotlivých pacientů, snížit jejich morbiditu a mortalitu. Jak již bylo uvedeno výše, imunomodulační strategie vedoucí k nastolení tolerance jsou jednou z výhledových možností. Nicméně vzhledem ke komplexní patogenezi T1D je možno chápat tyto strategie v současné době jako podpůrné či ideálně v kombinaci s dalšími léčebnými postupy.

1.2.Principy buněčné terapie a současný stav

U zdravého organismu existuje stav dynamické imunologické rovnováhy s vyrovnanou pro-zánětlivou a proti-zánětlivou imunologickou odpovědí tak, aby se dosáhlo homeostázy. Za ideálních podmínek si organismus udržuje neodpovídavost na vlastní antigeny a neškodné environmentální antigeny (alergeny, mikrobiota) díky komplexním mechanismům centrální a periferní imunologické tolerance (74). V případě invaze patogenu či např. maligní proliferaci vlastních buněk je schopen organismus cíleně nasměrovat efektivní imunologickou odpověď,

kteřá by měla mít schopnost autoregulace a po eliminování patologického procesu se vrátit zpět do stavu homeostázy. Její vychýlení však může vést k excesivní aktivaci a výskytu autoimunit nebo nedostatečné obraně a větší náchylnosti k infekcím či maligním proliferacím (137).

Autoimunitní procesy vycházejí z tohoto vychýlení mezi efektorovými a inhibičními buňkami. U některých autoimunit se toto klinicky projevuje jako období exacerbací a remisí u jiných dochází k trvalému poškození např. hormon-produkující tkáně (138).

Současná možnost terapie autoimunitních chorob spočívá v podávání imunosupresivních léků s cílem potlačit nežádoucí imunitní reakci anebo v suplementaci chybějících hormonů. Tato terapie je však pouze symptomatická a nese s sebou celou řadu nežádoucích účinků. Jak již bylo uvedeno, vzhledem ke známé patogenezi autoimunitních onemocnění by bylo ideální léčebnou modalitou znovu nastolení imunologické toleranci či specifické potlačení nežádoucí imunitní reakce, a to ještě před zničením vlastní tkáně.

Během posledního desetiletí byla zahájena řada *in vitro* i *in vivo* studií využívající buňky s tolerogenním či regulačním účinkem. Dosud se jeví jako nejslibnější rozličné kmenové buňky včetně mesenchymálních stromálních buněk, (mesenchymal stromal cells – MSC), tolerogenní dendritické buňky (tDC) a T-regulační lymfocyty (T-regs) a MDSC (139, 140).

Jednotlivé principy buněčné terapie se dají obecně rozdělit do několika strategií (141, 142). Nejstarší strategií buněčné terapie autoimunitních chorob je transplantace hematopoetických kmenových buněk, která vede k znovu dosažení imunitní rovnováhy (Hematopoietic Stem Cell Transplantation - HSCT). Pro těžké autoimmunity refrakterní na konvenční terapii přichází v úvahu myeloablace s autologní HSCT (143). Několik klinických studií provedených zejména u systémových autoimunit vykazovaly slibné výsledky, co se týče dlouhodobé remise, nicméně tato strategie má řadu rizik spojených se selháním transplantace, infekcí a v neposlední řadě rekurence daného onemocnění díky inkompletní eradikaci autoreaktivních paměťových lymfocytů (144, 145).

Další strategií je princip využívající T-buněčné vakcíny s cílem eliminovat autoreaktivní imunitní buňky (146-148). Tato personalizovaná terapie využívá atenuovaných autoreaktivních T lymfocytů jako imunogenního agens a navození imunologické odpovědi proti těmto autoreaktivním T-lymfocytům. Pacient tak odpoví na vlastní T-buněčnou vakcínu aktivací

regulační sítě T-lymfocytů. Dvě hlavní skupiny T lymfocytů jsou anti-idiotypické T-lymfocyty, které rozpoznávají klonálně-specifické determinanty, jako CD3 oblast na TCR receptoru a anti-ergotypické lymfocyty rozpoznávající antigenní determinantu vycházející z aktivačních znaků T-lymfocytů, jako např. CD25 (149). Anti-ergotypické T-lymfocyty nereagují na neaktivované T-lymfocyty. Tato komplexní imunitní odpověď vede k eliminaci škodlivých autoreaktivních T-lymfocytárních klonů. T-buněčná vakcína vykazovala dobrou bezpečnost a účinnost v několika klinických studiích zaměřených na roztroušenou sklerózu (MS), systémový lupus (SLE), revmatoidní artritidu (RA) a amyotrofickou laterální sklerózu (ALS) (142, 150-153).

U autoimunit vykazující hlavní patogenetický rys přítomnost škodlivých autoprotilátek se využívají strategie k eliminaci B-lymfocytů. Z klasických farmak se jedná např. o rituximab k terapii RA. Nicméně je třeba opakovaná aplikace a i tato léčba má závažné nežádoucí účinky (154). Jako průlomová terapie k eliminaci B-lymfocytárních malignit se ukázalo využití CAR-T cell (chimeric-antigen receptor T cell), které jsou díky svému receptoru schopny cílit na specifický protein (155, 156). Receptor je chimerický, protože kombinuje jak antigen-vázající funkci, tak funkci aktivovat T-lymfocyty na jednom receptoru. Na myším modelu SLE bylo prokázáno prodloužení doby přežití a snížení produkce autoprotilátek při použití CD19-CAR T cells (157). Nicméně při této terapii dochází i k eliminaci normálních B-lymfocytů, což přináší zjevné nežádoucí účinky. K překonání tohoto problému byl navrhnout CAAR receptor (chimeric autoantibody receptor), který je schopen se specificky vázat na BCR auto-reaktivních B-lymfocytů a tak je cíleně eliminovat. CAAR T-cells technologie se jeví jako účinná terapie k eliminaci autoreaktivních B lymfocytů u autoimunit zprostředkovanými protilátkami, bez nežádoucího účinku poklesu imunoglobulinů a eliminace všech B-lymfocytů (158).

V preklinické studii zaměřené na terapii autoprotilátkami zprostředkovaného onemocnění pemphigus vulgaris byly vyrobené CAAR T-cells využívající jako autoantigen Desmoglein 3 (Dsg3). Tyto Dsg3-CAAR T-cells vykazovaly specifickou cytotoxicitu proti anti-Dsg3 B-lymfocytům jak *in vitro*, tak *in vivo* (142, 156). Následně byla zahájena I. fáze klinické studie zkoumající maximální tolerovatelnou dávku těchto Dsg3-CAAR-Tcells, která může být podávána pacientům (NCT04422912) (156, 159).

Odlisný princip od výše uvedených strategií je snaha o znovunastolení imunologické tolerance pomocí rozličných regulačních buněk. Mezi buňky s velkým klinickým potenciálem se řadí

tolerogenní DC, heterogenní skupina DC s imunoregulačním potenciálem. tDC jsou schopny modulovat imunitní odpověď a nastolit toleranci několika mechanismy zahrnující indukci regulačních T- a B-lymfocytů, navozením anergie či apoptózy u autoreaktivních T-lymfocytů (160-164). Bylo popsáno několik protokolů na přípravu tDC izolovaných z monocytů z periferní krve a dokončeny dvě klinické studie u T1D. Obě vykazaly dobrý bezpečnostní profil a v jedné z nich došlo ke zlepšení laboratorních parametrů včetně zvýšení počtu regulačních B-lymfocytů (B220+CD11c- B cells) (165, 166). Podrobněji budou tDC diskutovány v následující kapitole.

Dalšími buňkami, které jsou schopny navodit toleranci jsou T-regulační lymfocyty. V četných studiích bylo prokázáno, že T-regs dokážou utlumit T-buněčnou proliferaci a potlačit produkci prozánětlivých cytokinů a hrají důležitou roli v navození imunitní homeostázy a prevenci autoimunit (167, 168). Existuje několik různých druhů T-regulačních lymfocytů, nejčastěji bývají charakterizované intracelulárním znakem FoxP3 a povrchovou expresí CD25^{high}, CD127^{low} (169, 170). Dysregulace v jejich frekvenci či funkci může způsobit rozvoj autoimunitního onemocnění. Několik prací ukázalo, že frekvence T-regs byla u pacientů s autoimunitou zvýšena/ snížena nebo zůstala nezměněna (171). Předpokládá se, že spíše změna jejich funkce, než přímo jejich početní zastoupení může mít vliv na patogenezi autoimunitních chorob.

Z provedených klinických studií vyplývá, že terapie s využitím *in vitro* expandovaných T-regs je bezpečná a dobře tolerovaná. Ve studii Marek-Trzonkowska et al., kde byla aplikována infuze autologních expandovaných T-regulačních lymfocytů dětem s T1D došlo ke zlepšení laboratorních parametrů a u většiny pacientů došlo k poklesu nároků na inzulin a u 2 pacientů došlo ke kompletní remisi po dobu 1 roku (172).

Jako potenciální riziko u této terapie s podáním velkého množství polyklonálních T-regs, je možnost suprese protektivní složky imunity a možnost rozvinutí nádorových onemocnění či snížená obrana proti infekčním agens. Proto bylo vynaloženo úsilí do technologií využívající CAR receptor se vznikem CAR-Tregs (173). Ze studií provedených na zvířecích modelech vyplývá, že vhodnější je použití antigenně-specifických Tregs, kterých stačilo menší množství k navození terapeutického efektu bez rizika nescifické suprese imunitního systému. Obecně se ukazuje se, že CAR-Tregs jsou schopny specificky potlačit imunitní odpověď a vykazují dobrou účinnost a dlouhotrvající efekt bez závažných nežádoucích účinků (142, 174).

CAR-Tregs byly použity pro terapii kolitidy a experimentální autoimunitní encefalitidy u myši (EAE) a v transplantační imunologii na myších modelech (174, 175). Fransson et al. popsali ve své práci zajímavý přístup k terapii EAE na myším modelu pomocí CAR-Tregs. CD4⁺ T lymfocyty byly upraveny tak, že exprimovaly CAR specifický receptor proti myelinu na oligodendroglích (MOG - myelin oligodendrocyte glycoprotein) a zároveň myši FoxP3 gen, který je důležitý pro diferenciaci T regulačních lymfocytů. Intranazální podání těchto CAR-Tregs vedlo k jejich úspěšné distribuci do CNS a úspěšnému potlačení probíhajícího zánětu až k úplné remisi onemocnění (176). Studie zaměřené na orgánové transplantace využily např. HLA-A2 specifické CAR-Tregs, které byly izolované od příjemce, opět se slibným výsledkem (177, 178). Práce od Hansen et al. dále podpořila koncept, že CAR-Tregs jsou nadějný nástroje k terapii různých imunopatologických stavů. Autoři vyrobili CAR-Tregs proti karcinoembryonálnímu antigenu (carcinoembryonic antigen - CEA), glykoproteinu přítomného na plicním epitelu. Poté provedli adoptivní transfer těchto CAR-Tregs do myši s indukovaným alergickým astmatem. CAR-Tregs se nahromadily v plicní tkáni a regionálních uzlinách a snížily bronchiální reaktivitu (179).

CAR-Tregs by mohly být potenciálně využity i k terapii T1D. Tregulační lymfocyty vybavené specifickým CAR receptorem pro β -buňky by mohly vylepšit svoji migraci do pankreatických ostrůvků a regionálních lymfatických uzlin, a tím zabránit destrukci β -buněk.

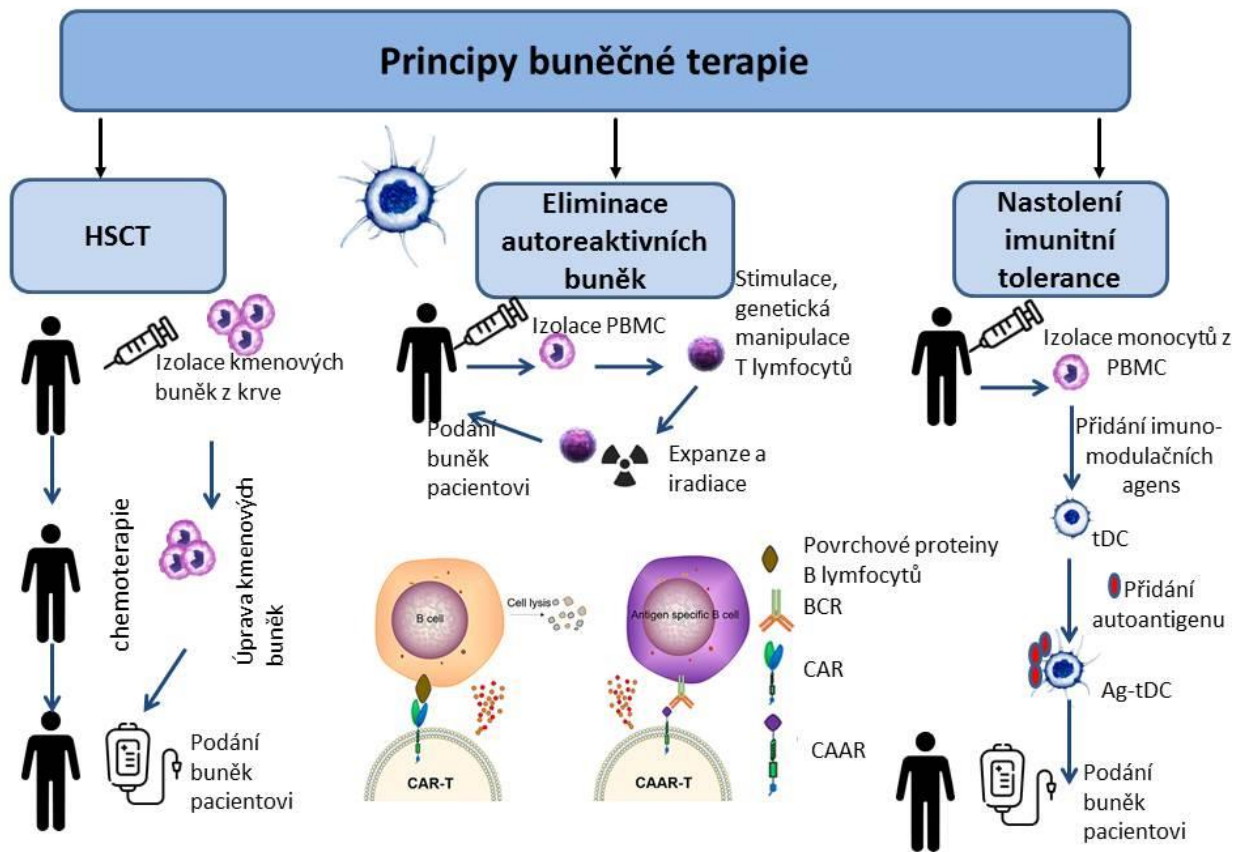
Mezi další nadějný buňky patří specifická populace mesenchymálních stromálních buněk (MSC) vykazující slibné imunoregulační vlastnosti. Fenotypově jsou charakterizovány expresí CD105, CD90 a CD73 a absencí hematopoetických markerů, jako jsou CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, a HLA-DR (180). Vyskytují se hojně v pojivových tkáních, kde zastávají regulační a reparační funkci zprostředkovanou různorodými mechanismy. Z provedených preklinických a klinických studií zaměřených na autoimunitu vyplývá, že jejich prospěšný efekt nezávisí jen na buněčném kontaktu, ale zejména na četné sekreci zaměřených látek, jako jsou růstové faktory, cytokiny a *extracelulární vehikly* (EC) nesoucí proteiny či mRNA nebo mRNA (181, 182). MSC mají potenciál diferencovat se do různých typů buněk a lze je tak využít i při náhradě tkání zničených autoimunitním procesem. Jako zdroj MSC se využívá kostní dřeň, tuk či perinatální tkáň (183, 184).

Studie zaměřené na terapii T1D pomocí MSC vykazaly zlepšení jak klinických, tak laboratorních parametrů, konkrétně zvýšení hladiny C-peptidu, nižší nároky na inzulin a zlepšení dalších metabolických parametrů (NCT04061746).

V neposlední řadě zmíním heterogenní populaci nezralých myeloidních buněk – MDSC, které mají rovněž imunosupresivní a regulační vlastnosti. MDSC vycházejí z hematopoetické linie a reprezentují časně progenitory/prekurzory granulocytů, makrofágů a DC (185). Za normálního stavu se MDSC vyskytují převážně v kostní dřeni, ale během patologických procesů (zánět, autoimunita, maligní proces apod.) se jejich frekvence zvyšuje a lze je najít i v ostatních tkáních. Jejich podrobnější charakteristice se budu věnovat v samostatné kapitole.

Mezi další imunoregulační buňky studované v poslední době patří dále např. regulační makrofágy (Mregs), které se využívají při navození alogenní tolerance u orgánových transplantací jako donor-derived transplant acceptance-inducing cells (TAICs) (186).

Jednotlivé principy buněčné terapie schematizuje Obr. 4.



Obr. 4 Principy buněčné terapie

HSCT - Hematopoietic Stem Cell Transplantation; PBMC - Peripheral blood mononuclear cell; BCR- Bcell receptor, CAR-T - chimeric-antigen receptor T cell; CAAR-T - chimeric-autoantigen receptor T cell; tDC – tolerogenní dendritické buňky; Ag-tDC – antigenně specifické tolerogenní DC

1.3. Tolerogenní DC

Dendritické buňky (DC) byly poprvé popsány v roce 1973 Steinmanem a Cohnem jako profesionální antigen prezentující buňky (APC – antigen-presenting cells), které jsou důležité v propojení specifické a nespecifické imunity (187). Jejich hlavní role je prezentace antigenů T-lymfocytům. V závislosti na signálech z okolí a také na stupni jejich vyžrávání mohou buď zahájit imunitní odpověď, nebo ji naopak utlumit a navodit tak antigeně specifickou toleranci. Proto jsou DC považovány za klíčové hráče v regulaci imunity (188).

DC jsou velice heterogenní populací vznikající z progenitorových buněk kostní dřeně, které mohou vycházet jak z myeloidní, tak z lymfoidní linie (189, 190). Problematice DC a tolerogenních DC jsem se věnovala ve svém review (191), které bych zde ráda uvedla s doplněním aktuálních údajů.

Na základě funkce a fenotypu DC mohou být rozděleny na konvenční neboli klasické DC (cDC), které mají zásadní postavení v zahájení T-buněčné specifické odpovědi a plazmacytoidní DC (pDC), které charakterizuje vysoká produkce IFN- α a uplatňují se zejména v obraně proti virovým infekcím (192). Další specializované typy DC jsou např. Langerhansovy buňky v kůži či mikroglie v centrálním nervovém systému, kde zastávají významnou regulační funkci v extracelulární signalizaci (193), při vývoji synapsí (194) a v neposlední řadě při jejich aktivaci vykonávají funkci APC (195, 196).

Dále na základě stupně jejich maturace mohou být DC rozděleny na nezralé DC (imDC - immature DC) a zralé DC (mDC - mature DC). Skupina buněk, která je schopna tlumit imunitní odpověď, se označuje jako tolerogenní nebo regulační DC (tDC) (190, 197, 198).

V organismu jsou nezralé DC rozmístěné téměř ve všech tkáních a kontinuálně pohlcují antigeny ze svého okolí a vystavují je na svém povrchu v komplexu s MHC molekulami I. i II. třídy. Při absenci zánětlivého prostředí nedochází k jejich aktivaci na zralé DC. V tomto stavu tedy nejsou imunogenní, jelikož vystavují na povrchu pouze malé množství kostimulačních molekul, které jsou důležité pro aktivaci T-lymfocytů (199). V případě vzniku zánětlivého prostředí vlivem přítomnosti patogenu či poškození tkáně dojde k jejich aktivaci přes specifické receptory rozeznávající molekulové vzory (pattern recognition receptors - PPR, jako jsou např. Toll-like receptors - TLR nebo NOD-like receptors - NLR). Tyto receptory rozpoznávají

specifické molekuly asociované s patogeny (pathogen-associated molecular patterns - PAMP) nebo s poškozením tkáně (damage-associated molecular patterns - DAMP) (200). Po aktivaci DC ztrácí schopnost fagocytózy a migrují do spádových lymfatických uzlin a dalších sekundárních lymfatických orgánů, kde se diferencují v plně maturované DC. Zralé DC se vyznačují expresí velkého množství MHC molekul I. a II. třídy a zvýšenou expresí kostimulačních molekul a C-C chemokinového receptoru typu 7 (CCR7), který jim umožňuje migraci do lymfatických tkání (201). Zralé DC dále produkují cytokiny důležité pro diferenciaci a stimulaci antigenně specifických efektorových T-lymfocytů (zejména IL-12 a IL-6) (202, 203). Nezralé DC mají tedy nižší schopnost zahájit imunitní reakci oproti zralým DC, nelze je však považovat za totožné s tolerogenními DC (204).

Ačkoliv některé studie považují již nezralé DC nebo *semi-maturované* DC (částečně vyžralé DC) za regulační (205, 206), vyčleňuje se samostatná skupina tolerogenních DC, která se významně podílí na aktivním navození a udržování imunologické tolerance. Jejich odlišnost od nezralých DC byla prokázána i na podkladě rozdílné exprese micro-RNA, která se může podílet na postrankripční modifikaci genové exprese (207). Několik studií prokázalo, že tDC jsou schopny navodit jak centrální, tak periferní toleranci, a to různými mechanismy, zahrnujícími klonální delecí autoreaktivních T-lymfocytů či jejich anergii (funkční útlum), indukci a expanzi T-regulačních lymfocytů nebo B-regulačních lymfocytů, které pak mohou dále aktivně potlačovat imunitní odpověď vyvolanou antigenem (208-210). Proto jsou tDC nadějným nástrojem v buněčné terapii nejen u autoimunitních chorob, ale i u jiných imunopatologických stavů, kde je zapotřebí navodit antigenně specifickou toleranci.

1.3.1. Fenotypická a funkční charakteristika tolerogenních DC

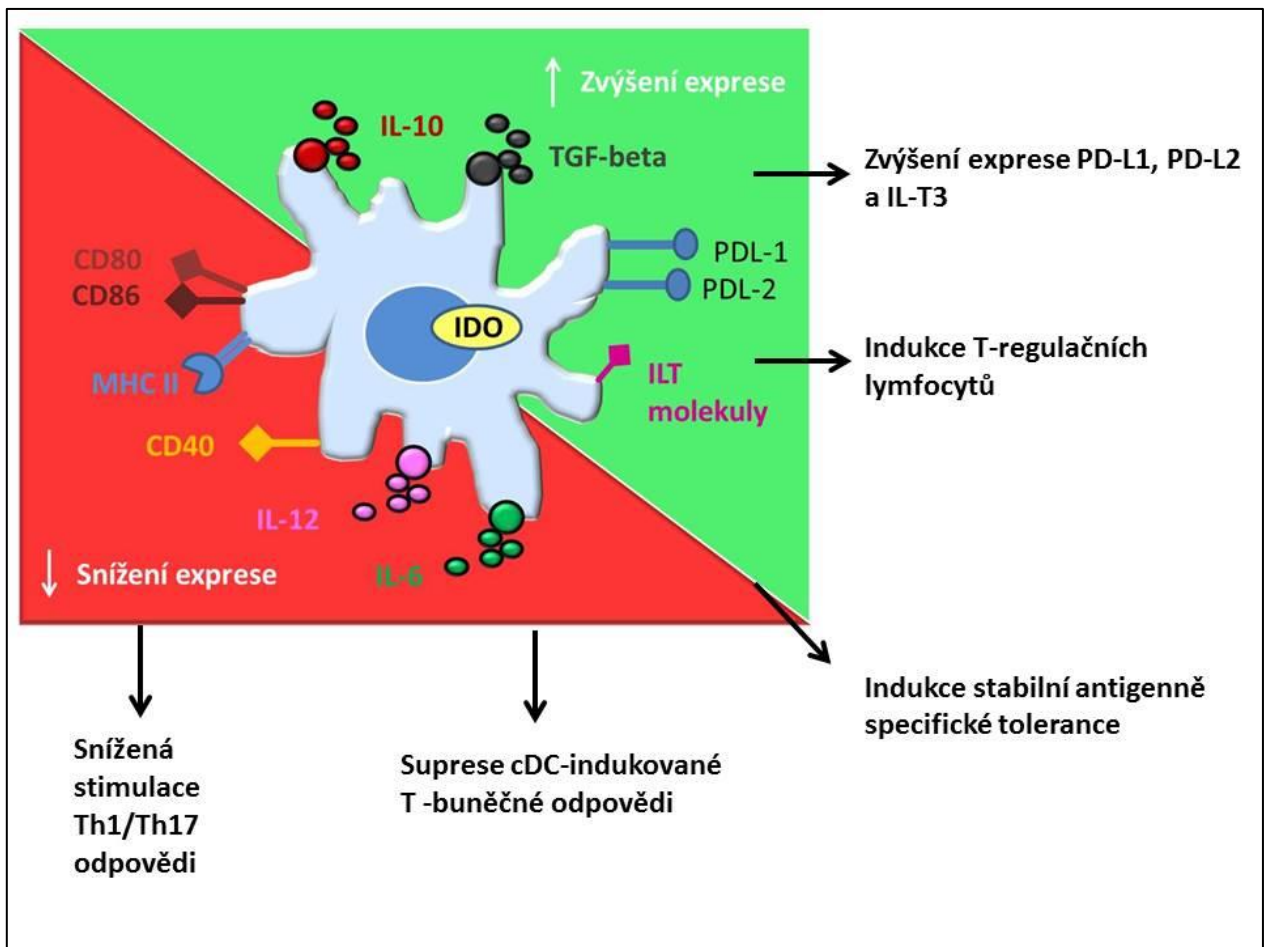
Tolerogenní DC vykazují nezralý nebo semi-maturovaný fenotyp s nízkou expresí MHC II a sníženou povrchovou expresí kostimulačních molekul (CD80, CD 83, CD86 a CD40), které jsou důležité pro aktivaci efektorových T-lymfocytů (211). Nedostatečná stimulace přes povrchové molekuly (zejména CD80 a CD86) na T efektorových lymfocytech přes jejich CD28 receptor vede k anergii T lymfocytů a zároveň napomáhá indukci FoxP3⁺ T regulačních lymfocytů (212). Nicméně různý stupeň exprese kostimulačních molekul na tDC má vliv i na další mechanismy, kterými tDC navozují toleranci. Silná exprese CD80/CD86 je důležitá k udržení T- regulačních lymfocytů vznikajících v thymu a také k indukci IL-10 produkujících

Tr1- regulačních lymfocytů (213). Sekrece IL-10 byla popsána i u dalších populací T lymfocytů díky vzájemné interakci T-buněčného CTLA-4 receptoru a kostimulačních molekul na tDC (214).

Na druhou stranu tDC vystavují na svém povrchu inhibiční a regulační molekuly, jako jsou ILT-2, 3, 4 (immunoglobulin-like-transcript - transkript podobný imunoglobulinům) a PDL-1, 2 (program-death-ligand - ligand programované buněčné smrti), které interagují s receptory na T-lymfocytech a přispívají k jejich apoptóze nebo anergii (215-217). PDL-1 na tDC je také významným faktorem přispívajícím k indukci u udržení FoxP3+ Tregs (218). Inhibiční molekuly ILT-3 a ILT-4 dále napomáhají k udržení neaktivovaného fenotypu DC, protože zabraňují jejich maturaci skrze ovlivnění NF- κ B signalizační dráhy. Ve studii na myších DC vedlo vyřazení ILT-3 ke zvýšené odpovědi na TLR stimulaci, což bylo doprovázeno zvýšením sekrece prozánětlivých cytokinů (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 a IFN I. typu) a zvýšením sekrece chemokinů CXCL-10 a CXCL-11, které jsou důležité pro migraci T-lymfocytů (219).

Tolerogenní DC mají navíc příznivý cytokinový profil, který přispívá k jejich regulačnímu potenciálu. Tolerogenní DC produkují malé nebo žádné množství zánětlivého cytokinu IL-12, který je hlavní stimulus pro aktivaci a proliferaci T-lymfocytů. Dále vykazují produkci protizánětlivých cytokinů jako IL-10 a TGF- β (transforming growth factor β – transformující růstový faktor beta), což vede k útlumu T-buněčné proliferace a indukci T-regulačních lymfocytů (220-222).

Mezi další důležité charakteristiky tDC patří produkce enzymu indolamin-2,3dioxigenázy (IDO). IDO reguluje expanzi efektorových T-lymfocytů katalýzou reakce degradující esenciální aminokyselinu tryptofan, která je základní živinou pro T lymfocyty (223, 224). Zobrazeno na Obr. 5.



Obr. 5 Mechanismus suprese pomocí tolerogenních DC

IDO - Indolamin 2,3-dioxygenáza, tDC/cDC – tolerogenní/ kontrolní dendritické buňky

1.3.2. Způsob přípravy DC a tDC in vitro

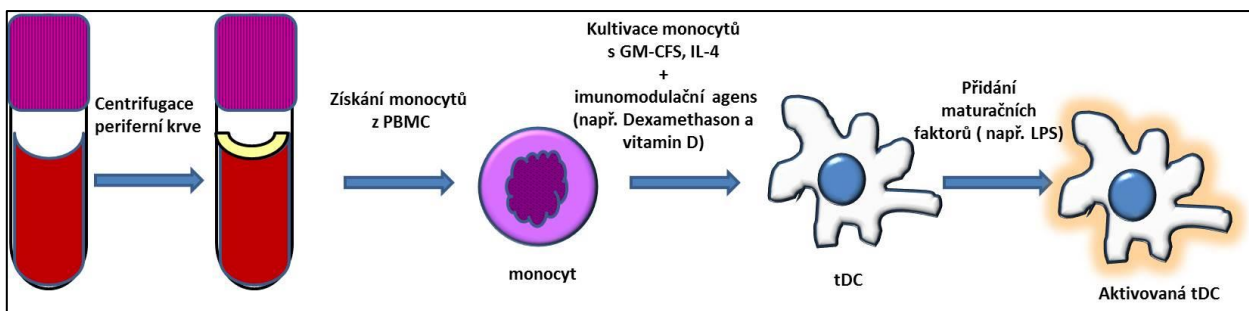
Na myším modelu se DC standardně získávají z kmenových buněk kostní dřeně (bone-marrow-derived dendritic cells - BMDC), které se kultivují za přítomnosti GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - růstový hormon pro granulocyty a makrofágy) a IL-4 (225, 226). Takto připravené nezralé DC se dále kultivují s maturačními faktory (látky schopné navodit vyžrání DC) jako např. lipopolysacharid (LPS), aby došlo ke vzniku plně maturovaných DC schopných účinně prezentovat antigen. Další metodou pro získávání DC, která se používá

zejména v humánním modelu, je diferencování DC z monocytů z periferní krve. Takto získané DC se označují mo-DC (monocyte-derived DC - dendritické buňky získané z monocytů periferní krve). Buňky se opět připravují za přítomnosti GM-CSF a IL-4 a pro jejich finální aktivaci je nutné přidat maturační signál (227, 228).

K přípravě tDC se používá řada imunomodulačních látek, které jsou schopny potlačit vyžrávání DC a indukují tak diferenciaci tDC. Ačkoliv bylo popsáno několik faktorů schopných indukovat tDC, zatím není standardizovaný protokol na přípravu univerzálních tDC (229-231).

Mezi popsané faktory schopné navodit tolerogenicitu u DC patří např. protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF- β (232). Zajímavou metodou je příprava tDC za pomoci přidání primárně zánětlivého cytokinu IFN- γ k mo-DC. Tolerogenní DC připravené za přítomnosti IFN- γ nejsou schopné účinně prezentovat antigeny T-lymfocytům a při kultivaci s naivními lymfocyty vykazují schopnost navodit expresi transkripčního faktoru FoxP3 u CD4⁺ T-lymfocytů, který je důležitý pro regulaci vývoje a funkce T-regulačních lymfocytů (233). Schopnost IFN- γ indukovat tolerogenní vlastnosti u DC je závislá na jeho koncentraci v kultivačním mediu a na době jeho přidání (234, 235).

Další dobře známé tolerogenní látky jsou kortikosteroid Dexamethason a vitamin D a jeho analogy (236, 237). Tolerogenní DC připravené pomocí Dexamethasonu a vitaminu D vykazují snížení exprese povrchových kostimulačních molekul, zvýšenou expresi imunoregulačních molekul a vykazují nízkou stimulační schopnost T-lymfocytů. V naší práci jsme připravovali tDC za pomoci těchto tolerogenních agens v GMP protokolu (good manufacturing practices – správná výrobní praxe), zobrazeno na Obr. 6. Naše práce ukázala, že takto připravené tDC jsou také stabilní vůči prozánětlivým a maturačním signálům, což je velmi důležité pro klinickou aplikaci (238). Vlivem vystavení tDC zánětlivým faktorům v organismu by mohlo dojít k jejich přeměně v plně maturované imunogenní DC, a tedy naopak k posílení imunitní odpovědi vůči autoantigenu/ transplantátu (239).



Obr. 6 Příprava Tolerogenních dendritických buněk

PBMC - peripheral blood mononuclear cells, GM-CSF – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL-4 – interleukin 4, tDC – tolerogenní dendritické buňky, LPS - lipopolysacharid

Tolerogenní DC lze připravit i za použití dalších molekul, jako jsou tkáňové faktory (thymový stromální lymfopoetin- TSLP nebo růstový faktor hepatocytů- HGF) (240, 241), salicyláty (242), mykofenylátmofetil (243), rapamycin (244) nebo prostaglandin E2 (245). Svě zastoupení zde má i genetické inženýrství. V klinických studiích byly úspěšně otestovány tDC připravené pomocí antisenseoligonukleotidů cílených proti maturačním a kostimulačním molekulám u pacientů s diabetem 1. typu (T1DM). Tyto buňky byly nejen dobře tolerovány, ale zároveň došlo k detekci C-peptidu v krvi u některých pacientů, u kterých byl před podáním tDC negativní (246, NCT02354911).

Zajímavá studie publikována Jiang et al. ukázala inhibiční efekt tolerogenních DC na T-lymfocyty při alogenní transplantaci srdce na myším modelu. K indukci tDC zde byly použity mesenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells - MSC) (247). MSC mají totiž také schopnost u DC navodit tolerogenní vlastnost (248).

1.3.3. Terapeutické využití tDC

S rozvojem buněčné terapie je zajímavou terapeutickou strategií aplikace tolerogenních DC, které se podílejí na udržení imunitní homeostázy. Tyto buňky by mohly znamenat terapeutický nástroj pro svoji nízkou toxicitu a schopnost antigeně specificky potlačit nežádoucí imunitní reakci (198, 249, 250).

Účinnost tDC u autoimunit a orgánových transplantací je stále hodnocena. V současné době probíhá nebo již bylo dokončeno několik klinických studií ve fázi 1 zaměřených na regulační buňky, a to pro léčbu pacientů s T1D, revmatoidní artritidou, roztroušenou sklerózou, astmatem,

morbus Crohn a u pacientů po orgánových transplantacích (160, 165, 251-253). Doposud většina těchto studií vykazala dobrý bezpečnostní profil, tDC byly pacienty dobře tolerovány a nedošlo ke zhoršení základního onemocnění.

U T1D byly dokončeny 2 klinické studie s podáním tDC. Fáze 1 studie NCT04590872 používá autologní tDC pulzované proinzulinovým peptidem "C19-A3" (PIpepToIDC). Tato studie hodnotí i viabilitu tDC, která je rovněž důležitá pro dosažení klinického efektu buněčné terapie (166). Tyto tDC byly intradermálně podány 9 pacientům s dlouhotrvajícím T1D. Nebyly zaznamenány žádné závažné nežádoucí reakce, po dobu sledování (6 měsíců) si všichni pacienti udrželi dobrou kompenzaci glykémie, nezměnily se jejich nároky na inzulín. Při této studii nebyly zaznamenány žádné známky systémové imunosuprese, alergie na inzulín, žádná interference s inzulínovou terapií ani zvýšený úbytek C-peptidu. V další studii Giannoukakis et al. připravili tDC *ex vivo* z monocytů a tDC byly následně modifikovány pomocí antisense oligonukleotidů (cílicí na kostimulační molekuly CD40, CD80 a CD86). Pacienti obdrželi 4 dávky injekčního podání tDC co 2 týdny. Nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky, žádné známky systémové imunosuprese. Zajímavé bylo, že u některých pacientů (4 ze 7) byl následně detekován C-peptid, který nebyl detekován před podáním tDC. C-peptid dosáhl svých fyziologických hranic, ačkoliv studie byla provedena u pacientů s dlouhodobým trváním T1D (5-26 let). V laboratorní analýze bylo také zjištěno zvýšení B220+CD11c- B lymfocytů, které vykazovaly supresivní účinek (165).

Nicméně pro humánní užití je třeba vyřešit několik otázek, které vycházejí z patogeneze a progresu autoimunitních stavů. V první řadě je pro humánní užití nutné tDC buňky připravit pomocí protokolu, který splňuje požadavky GMP. Velmi důležité je také správně načasovat dobu aplikace, např. u T1D by bylo vhodnější aplikovat buněčnou vakcínu v době, kdy ještě nedošlo k převážnému zničení β -buněk pankreatu. Zároveň i stupeň metabolické kompenzace T1D se zdá být rozhodující pro zajištění optimálního efektu tDC, což se ukázalo v naší práci u pediatrických pacientů s T1D (254). Určení způsobu aplikace tDC, určení dávky tDC a frekvence aplikace jsou další faktory ovlivňující efektivní navození tolerance. Jednou z klíčových otázek pro zavedení imunoterapie tolerogenními dendritickými buňkami je výběr vhodného autoantigeny, neboť u autoimunit je obvykle přítomno větší množství autoantigenů, což je dáno fenoménem zvaným „antigen spreading“ (rozšiřování antigenů), kdy místní zánět odkrývá další lokální antigeny (53). Ve studiích s diabetickými pacienty se ukazují být vhodné

antigeny insulin či GAD65, probíhají i *in vitro* studie s proinsulinem. Zároveň i autoreaktivita mezi jednotlivými pacienty je rozdílná, a proto by bylo ideální vytvořit personalizovanou vakcínu jednotlivě pro každého pacienta.

Atraktivní strategií se jeví možnost kombinované terapie pomocí tDC a jiných farmak ovlivňující imunitní homeostázu. Např. použitím farmak eliminující autoreaktivní lymfocyty, jako je alemtuzumab, by mohlo dojít ke snížení efektorových buněk na takové množství, které by bylo poté snáze ovlivněno tDC a byla by snadněji navozena tolerance (255). Kombinace autologních tDC s antiCD3 protilátkami vedlo ke zlepšení přijetí alogenního štěpu u transplantace pankreatu u myši (256). Díky pokročilým molekulárním technikám a novým poznatkům o regulaci imunitního systému se mohou možnosti kombinované terapie v budoucnu rozšiřovat, a poskytnout tak zajímavou možnost při léčbě imunopatologických stavů.

1.4. MDSC

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) jsou heterogenní skupina nezralých myeloidních buněk s imunoregulačními vlastnostmi. Za normálního stavu se MDSC vyskytují převážně v kostní dřeni a zahrnují nezralé makrofágy, DC, polymorfonukleární granulocyty a další buňky diferencované z hematopoetických kmenových buněk (257). Jejich počet se významně zvyšuje během patologických procesů jako je zánět, autoimunitní onemocnění, nádorová onemocnění apod. Během těchto procesů MDSC migrují do postižených tkání.

MDSC byly doposud nejvíce studovány u nádorů, kde se podílí na supresi efektorových buněk a APC v nádorovém mikroprostředí díky různým mechanismům jako je např. metabolický rozklad a nedostatek argininu a cysteinu, produkce NO a ROS, dále produkce inhibičních cytokinů IL-10 a TGF- β a v neposlední řadě se MDSC podílejí i na expanzi T- regulačních lymfocytů (258, 259). To vše přispívá k potlačení protinádorové imunity a některé studie ukazují, že zvýšená frekvence MDSC v periferní krvi u pacientů s nádorovým onemocněním negativně koreluje s odpovědí na léčbu a celkovým přežitím (257, 260).

Jako první byly MDSC identifikovány u myši s nádorovým onemocněním (261). Byly charakterizovány povrchovými markery CD11b and Gr-1 a vyčleněny 2 samostatné skupiny,

Ly6G⁺/Ly6C^{low} popsané jako granulocytární MDSC (G-MDSC) a Ly6G⁻/Ly6C^{high} popsané jako monocytární MDSC (M-MDSC) (262, 263).

U lidí MDSC postrádají výše popsané charakteristické markery, protože neexistuje Gr-1 analog. MDSC byly rozděleny na HLA-DR^{low/neg}CD11b⁺CD14⁺CD15⁻CD33^{high} monocytární MDSC (M-MDSC) a HLA-DR^{low/neg}CD11b⁺CD14⁺CD15⁺CD33^{low/mid} granulocytární MDSC (G-MDSC), někdy nazývané též polymorfonukleární MDSC (PMN-MDSC) (264-266). Zatímco M-MDSC exprimují myeloidní marker CD33, PMN-MDSC vykazují CD33^{dim} barvení (267). Lin⁻ (zahrnující CD3, CD14, CD15, CD19, CD56) HLA-DR⁻CD33⁺ buňky zahrnují početnou skupinu MDSC buněk složenou z více nezralých progenitorů nazývané též jako early-stage MDSC (eMDSC). Tyto buňky byly definovány jako nezralé MDSC a nemají popsany myši ekvivalent.

Obojí M-MDSC a G-MDSC vykazují inhibiční vlastnosti, ačkoliv používají jiné mechanismy k navození suprese a jsou fenotypicky a morfoloogicky odlišné. Četné práce popsaly inhibici proliferace T-lymfocytů a snížení produkce IFN- γ v autologních i alogenních esejích *in vitro* (268) a jejich tolerogenní aktivita byla prokázána i *in vivo* při adoptivním transferu na myších modelech (269, 270).

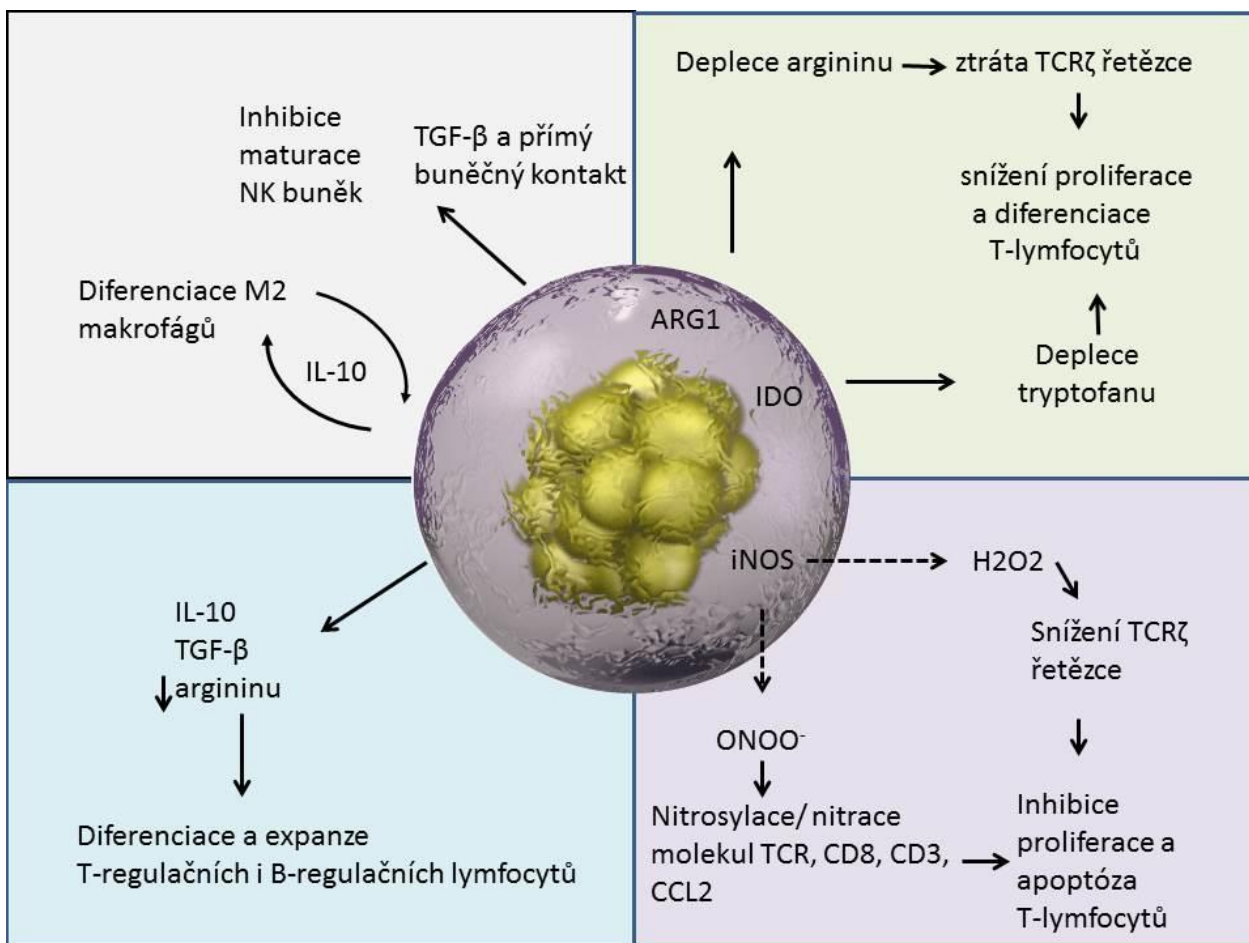
M-MDSC využívají různé mechanismy k navození imunologické tolerance/ suprese. Produkce arginázy-1, iNOS a ROS jsou jedny z nejčastěji popisovaných mechanismů vedoucích k inhibici proliferace T-lymfocytů a k jejich apoptóze (271-274). Inhibiční efekt je zároveň zprostředkován i mezibuněčným kontaktem (275). Odlišnost MDSC od klasicky aktivovaných neutrofilů a monocytů, které chrání organismus před patologickým agens (např. viry, bakterie atd.) je nízká schopnost fagocytózy, vysoká produkce ROS a NO a odlišný cytokinový profil s převahou protizánětlivých cytokinů (276). MDSC tedy nejsou schopny efektivně zastávat obranné funkce a získávají imuno-supresivní potenciál. Jejich přirozená role může být i v ochraně organismu před excesivní imunologickou reakcí při zánětu. Při vzniku maligního nádorového bujení může nádor využít tento potenciál MDSC ve svůj prospěch.

Jak bylo již uvedeno výše, regulační/supresivní efekt MDSC závisí na produkci arginázy-1, díky které dojde k metabolické deprivaci L-argininu a L-tryptofanu a také na iNOS, která katalyzuje produkci NO z L-argininu (277). MDSC také hojně produkují ROS (superoxid a H₂O₂) díky vysoké aktivitě NADPH oxidázy, konkrétně NOX2. U tumor-indukovaných MDSC na myším

modelu, MDSC ztrácely svou schopnost suprimovat T-lymfocyty a diferencovaly do zralých makrofágů a DC při absence NOX2 (273). Reaktivní formy dusíku (RNS - Reactive Nitrogen Species) jako např. peroxynitrit (ONOO^-) jsou pak vedlejším produktem aktivity iNOS, arginázy-1 a NOX a způsobují poškození proteinů díky neenzymové nitraci/nitrosylaci (278), schematizováno na Obr. 7.

V onkoimunologii byly popsány i další mechanismy, kterými MDSC inhibují T-lymfocyty a NK buňky. Kromě deprivace esenciálních aminokyselin, které jsou nezbytné pro aktivaci a proliferaci T-lymfocytů se jedná zejména o expresi inhibičních molekul jako je PD-L1 (279), expresi protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β (280, 281) a v neposlední řadě i zapojení T-regů díky expresi CD40 na MDSC (282).

Role MDSC v regulaci B-lymfocytů je méně objasněná, ačkoliv několik prací poukazuje na významnou interakci mezi MDSC a B-lymfocyty (283-285) a jejich inhibiční účinek na tuto populaci. Nicméně je třeba více dat k objasnění tohoto regulačního mechanismu.



Obr. 7 Mechanismus suprese pomocí MDSC

MDSC – myeloid derived suppressor cells; ARG1 – argináza 1; IDO - indolamin 2,3-dioxygenáza ; iNOS – inducibilní NO syntáza

1.4.1. Indukce a diferenciace MDSC

MDSC se diferencují v kostní dřeni při myelopoéze ovlivněné patologickým zánětem. Např. nádorové buňky produkují různé prozánětlivé faktory jako je G-CSF and GM-CSF, které potencují diferenciaci MDSC. Naše znalosti o jejich diferenciaci jsou vesměs získané z *in vitro* studií, kdy se kultivují monocyty s různými cytokiny a chemokiny, které napodobují chronické zánětlivé prostředí a poté se analyzuje jejich fenotyp a funkce.

GM-CSF, G-CSF a IL-6 se používají k *in vitro* indukci MDSC a tyto buňky si zachovávají svůj inhibiční potenciál *in vivo* (286). Dále bylo popsáno více cytokinů, které byly použity k indukci MDSC, jako M-CSF, VEGF, SCF, IL-6, IL-1 a IL-13 (287-289)

Protizánětlivé cytokiny jako je solubilní (s)TNF, IL-1 β , transforming growth factor β (TGF- β), a IL-10 mohou také vést k indukci MDSC a tím přispívat k navození tolerance či ztrátě imunitního dohledu při nádorovém bujení (290). Důležitost sTNF v diferenciaci MDSC byla potvrzena v několika studiích na myších modelech, kdy inhibice sTNF vedla k zábraně rozvoje karcinomu u myší. Tato indukce byla závislá na vazbě na STAT3 (291).

Krom výše uvedených, byly popsány i jiné faktory vedoucí k diferenciaci MDSC, které vykazovaly inhibiční vlastnosti. IL-18 vedl k diferenciaci CD11b⁻ progenitorových buněk v kostní dřeni do M-MDSC. Buňky indukované IL-18 vykazovaly zvýšené supresorové vlastnosti na CD4⁺ T-lymfocyty a snižovaly sekreci IFN- γ . Zároveň vykazovaly ve větší míře produkci faktorů důležitých pro jejich supresivní vlastnosti, jako jsou produkce iNO a argináza-1 (292).

Zdá se, že pro indukci MDSC v kostní dřeni je tedy za potřebí celá souhra jak solubilních, tak vázaných faktorů, a to dále ovlivňuje jejich funkci.

Zároveň MDSC exprimují na svém povrchu řadu receptorů pro chemokiny (např. CCL1, CCL2, a CCL5 (293)), díky kterým jsou poté atrahovány do místa zánětů, kde svou funkci vykonávají.

1.4.2. Terapeutické využití MDSC

Význam MDSC u nádorů byl již publikován v mnoha studiích a MDSC se jeví jako slibný terapeutický nástroj v kombinované terapii vycházejících z následujících principů:

- 1) deplece MDSC
- 2) zabránění proniknutí MDSC do nádoru
- 3) inhibice aktivace MDSC
- 4) diferenciaci MDSC ve zralé myeloidní buňky (293).

Co se týče autoimunitních chorob, je význam MDSC méně objasněný a jejich role u těchto stavů je více komplexní až kontroverzní. Potenciálně protektivní efekt MDSC byl popsán u různých

autoimunitních chorob jako je myšší model EAE, kde MDSC inhibovaly autoreaktivní Th1 a Th17 odpověď. (294). Supresivní efekt MDSC byl dále prokázán u idiopatických střevních zánětů (IBD) a u kontaktního ekzému (295, 296). Na druhou stranu některé studie poukazují na prozánětlivý efekt MDSC u jiných autoimunitních chorob jako je SLE nebo revmatoidní artritida (297-300).

U T1D, se MDSC jeví účinné v zabránění rozvoje diabetu u adoptivního transferu u NOD-SCID myši (301). Nicméně o roli MDSC u pacientů s T1D jsou dostupná jen velmi limitovaná data. Whitfield-Larry et al. ve své práci popsali zvýšenou frekvenci MDSC v periferní krvi pacientů s T1D, ale tyto MDSC nebyly plně supresivní ve srovnání s cytokiny-indukovanými MDSC, které byly generované *in vitro* z PBMC od těchto pacientů (302).

Další informace o mechanismu zapojení MDSC v patogenezi T1D přinesla naše práce o MDSC, která se zabývá nejen rolí MDSC u diabetiků, ale i u jejich prvostupňových příbuzných. Na podkladě našich výsledků předpokládáme důležité zapojení MDSC v patogenezi diabetu, kde MDSC vykazují spíše imunoregulační potenciál.

Jak již bylo uvedeno výše, buněčná terapie s využitím regulačních/ supresivních buněk by mohla být na základě dostupných výsledků velmi nadějná, přesto je však nutné provést další výzkum pro objasnění detailnějšího mechanismu působení regulačních buněk v organismu a přesněji určit jednotlivé podmínky klinické aplikace.

1.5. Současné možnosti imunointervence u T1D

Zatím neexistuje žádná cílená imunoterapie, která by nahradila standardní terapii s podáváním inzulínu. V současnosti je mnoho nových terapeutických strategií, které mají za cíl zachovat β -buněk a tím docílit normoglykemie. Obecně je lze rozdělit na antigen-nespecifické a antigen specifické strategie. Antigen specifické terapie modulují přímo autoimunitní odpověď u T1D při zachování normální imunitní homeostázy (303). Zároveň existují nové strategie zaměřující se na náhradu β -buněk či jejich regeneraci. V roce 2000 byla poprvé provedena transplantace pankreatických ostrůvků s úspěšným výsledkem, kdy došlo k nastolení normoglykemie (304). Tento protokol byl poté modifikován, kdy namísto kortikosteroidů, jsou aplikovány jiné imunosupresivní režimy jako např. anti-IL-2R (protilátka proti IL-2 receptoru) společně se sirolimem a tacrolimem (305). Přes zjevné benefity této terapie je její nevýhodou veliké

množství ostrůvků, které musí být transplantovány a nežádoucí účinky plynoucí z imunosuprese.

Zajímavá studie REPAIR-T1D analyzovala efekt ročního podávání sitagliptinu (DPP-4 inhibitoru, který zvyšuje hladinu GLP-1; DPP-4 - inhibitor dipeptidylpeptidázy 4; GLP-1 glucagon-like peptide 1) a lansoprazolu (inhibitoru protonové pumpy, který zvyšuje hladinu gastrinu) u pacientů s T1 diabetem. GLP-1 a gastrin mají synergistický efekt na regeneraci a indukci β -buněk. Nicméně nebyl prokázán žádný rozdíl ve změně hladiny C-peptidu oproti kontrolní skupině s placebem (306).

Nové strategie zaměřené na modulaci mikrobiomu vychází z prospektivních a observačních studií dokazující vliv střevního mikrobiomu na riziko vzniku T1D (303, 307). Postupy zaměřené na fekální mikrobiální transplantaci či na vliv pro/prebiotik jsou zatím ve fázi experimentálních studií (308, 309). Další alternativní možností je blokáce signalizačních drah, např. JAK-STAT, která je downstream pro receptor IFN I. typu. *In vitro* experimenty prokázaly snížení aktivace genů pro stresové markery v β -buňce (310).

Přestože jednotlivé terapeutické postupy vykazují slibné dílčí výsledky, mají svoje limity. Ty vychází z komplexní patogeneze T1D i značné heterogenity tohoto onemocnění mezi jednotlivými pacienty. Proto se jako nejvíce efektivní jeví kombinace více terapeutických strategií a eventuálně personifikovaná terapie. Souhrn současných imunostrategií je zobrazen v tabulce 1.

Tab. 1 Současné imunostrategie T1D.

Antigen nespecifické strategie	Antigen specifické strategie	Terapie zameraná na β-buňky	Nové prístupy
Terapie založená na protilátkách, např. proti kostimulačním či aktivačním molekulám	Vakcína autoantigeny β -buněk	Náhrada β -buněk	CAR-Tcell
Terapie založená na blokaci prozánětlivých cytokinů	Specifické T-buněčné strategie zaměřené na nastolení tolerance	Terapie zaměřené na regeneraci β -buněk	Modulace mikrobiomu
Terapie založená na T-regulačních lymfocytech	Specifické B-buněčné strategie zaměřené na odstranění autoantigenních B-buněk		Inhibice JAK signalizační dráhy
Odstranění autoreaktivních T-lymfocytů			
Terapie založená na eliminaci B-lymfocytů			

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo zaměřit se na přípravu, charakteristiku a funkci inhibičních buněk, které lze využít ke znovunarození imunitní tolerance u pacientů s T1D, jakožto autoimunitním onemocněním, které patří v pediatrické populaci mezi nejčastější. Nejprve byly studovány tDC, které jsme připravili za pomoci GMP protokolu z PBMC izolovaných od pacientů s T1D. Dále se práce zaměřuje na MDSC, jejichž frekvence a funkce byla studována nejen u pacientů s T1D, ale zároveň i u prvostupňových příbuzných těchto pacientů, kteří jsou registrovaní v rámci programu Predia pod Pediatrickou klinikou 2.LF a FN v Motole.

2.1. Tolerogenní DC

Byla popsána příprava tDC z PBMC izolovaných z periferní krve pacientů, dále studován jejich metabolismus a funkční stabilita po vystavení různým prozánětlivým stimulům. Zejména funkční stabilita je velmi důležitá pro případnou klinickou aplikaci, protože vlivem prozánětlivých signálů v organismu by mohlo dojít k maturaci DC. Mohlo by tak dojít ke konverzi jejich benefičního účinku na škodlivý, a tím k akceleraci zánětu s dalším poškozením tkáně.

Funkce tDC byly nadále studovány u pacientů s T1D, kteří byli rozděleni do několika skupin podle klinických a laboratorních parametrů. Cílem bylo identifikovat metabolické faktory, které mohou mít vliv na funkci tDC a definovat skupinu pacientů, která by se jevila nejvhodnější k terapii za pomoci tDC.

2.2. MDSC

Neméně významné buňky vykazující inhibiční vlastnosti jsou MDSC, kterým se ve své práci budu věnovat nejvíce. Co se týče jejich role v patogenezi autoimunitních chorob zejména T1D jsou dostupné informace velmi omezené. Proto jsme se podívali detailněji na jejich zastoupení u těchto pacientů a jako jedni z prvních i na zastoupení MDSC u prvostupňových příbuzných diabetiků. Byly popsány supresivní vlastnosti MDSC u obou skupin *in vitro* a charakterizovány mechanismy, které MDSC využívají k navození suprese.

3. Metody

3.1. Dendritické buňky

3.1.1. Příprava DC a tDC

Pro prvotní přípravu tDC v GMP protokolu byly DC a tDC připraveny z „buffy coats“ od zdravých dárců. V následujících experimentech byly tDC a DC připraveny z periferní krve pacientů s T1D a z periferní krve zdravých kontrol. Z „buffy coats“ i z periferní krve byly izolovány PBMC za pomoci hustotního gradientu (Ficoll) a separovány monocyty za použití 2hodinové buněčné adheze v 75cm² lahvi (Nunc). DC byly následně generovány 6denní kultivací monocytů v GMP-grade Cell Gro mediu (CellGenix) obsahující penicilin a streptomycin (100U/ml a 100 µg/ml, Gibco) za přítomnosti GM-CSF (500IU/ml, Gentaur) a IL-4 (20ng/ml, CellGenix). Medium a cytokiny byly 3. den vyměněny. 6.den byly DC sebrány a nasazeny do 96 jamkové destičky (Nunc) v počtu 1x10⁶ buněk/jamku. 7.den byly nezralé DC aktivovány pomocí MPLA (2µg/ml, Cayla-InvivoGen) po dobu 24 hodin. Pro indukci tDC byl 3.den k DC přidán dexamethason (Dex), (1µM, Medochemie) a 6.den Dex a VitD2-paricalcitol (1,5 ng/ml, Zemplar, Abbott Laboratories). Bez tolerogenních faktorů byly vygenerovány kontrolní DC (cDC). Pro restimulační eseje byly cDC/ tDC promyty a resuspendovány v kompletním RPMI médiu (Gibco) obsahující 5% humánní AB sérum (Invitrogen). Pro restimulaci byl použit LPS (1µg/ml, Sigma-Aldrich); poly I:C (25µg/ml, Cayla-InvivoGen); megaCD40LTM (1000ng/ml, Enzo Life Sciences), nebo směs prozánětlivých cytokinů (IL-1β, TNF-α, IL-6 (vždy 10ng/ml) a IFN-γ (100ng/ml), RD systems).

Pro studium signálních drah byly 1 hodinu před stimulací přidány inhibitory signalizačních drah. Byly použity inhibitor p38 MAPK (SB203580, 10µM), inhibitor JNK/SAPK (SP600125, 20µM), inhibitor ERK1/2 (PD98059, 20µM), inhibitor NF-κB (Bay 11-7082, 10µM), inhibitor STAT3 (Stattic, 5µM) a inhibitor mTOR (rapamycin, 100nM), Calbiochem. Buňky a supernatanty byly použity pro další analýzy.

3.1.2. Průtoková cytometrie a reagentia

Pro analýzu povrchových a intracelulárních markerů byla použita analýza pomocí průtokového cytometru LSR Fortessa (BD Biosciences), data byla zpracována pomocí programu FlowJo software (Tree Star).

Buňky (2×10^5 /jamku) byly obarveny pomocí monoklonálních protilátek 30 minut při 4°C v PBS, poté promyty a analyzovány. Pro intracelulární barvení T-lymfocytů byly buňky stimulovány PMA (50ng/ml, Sigma-Aldrich) a ionomycinem (1 μg /ml, Sigma-Aldrich) po dobu 4-16 hodin, před analýzou byl přidán Brefeldin A (5 μg /ml, BioLegend). Poté byly buňky promyty a inkubovány ve fixačně-permeabilizačním pufru (eBioscience) po dobu 30 minut při 4°C , následně byly promyty v permeabilizačním pufru a obarveny monoklonální protilátkou.

Pro analýzy DC byly použity následující protilátky: anti-CD86-FITC (klon 2231 FUN-1), CD274 (PD-L1)-FITC (klon MIH1), CD273 (PD-L2)-PE (klon MIH-18), HLA-DR-PE-Cy7 (klon L243), IFN- γ -FITC (klon 4SB3), BD Biosciences; CD83-PerCP-Cy5.5 (klon HB15a), Beckman Coulter; CD80-FITC (klon MAB104), CD40-PerCP-eFluor710 (klon 5C3), CD1a-PE-Cy7 (klon HI149), CD4-PE-Cy7 (klon RPA-T4), FoxP3-AF488 (klon PCH101), eBioscience; TLR2-FITC (klon T2.5), CD25-PerCP-Cy5.5 (klon BC96), TIM-3-PE (klon F38-2E2), IL-10-PE (klon JES3-9D7), KI-67-PE (klon Ki-67), BioLegend; CD14-PE-DL594 (klon MEM-15), CD11c-APC (klon BU15), CD3-AF700 (klon MEM-57), CD8-PE-Dy590 (klon MEM-31), Exbio; CD85k (ILT-3)-PE (klon 293623), CD85d (IL-T4)-FITC (klon 287219), R&D Systems.

3.1.3. Detekce cytokinů

Koncentrace cytokinů v buněčném supernatantu byla měřena pomocí metody Luminex (MILLIPLEXTM Human Cytokine/ Chemokine Kit, Merck Millipore) a ELISA (DuoSet ELISA Kit, R&D systems). Buněčný supernatant byl odebrán 24 hodin po stimulaci DC a zamražen v -80°C do doby analýzy.

3.1.4. Detekce schopnosti cDC/ tDC stimulovat alogenní T-lymfocyty

T-lymfocyty byly izolovány z non-adherentní frakce PBMC zdravých dárců. tDC/ cDC (2×10^4) byly kultivovány s alogenními T-lymfocyty (2×10^5) v kompletním RPMI médiu (Gibco)

obsahující 5% humánní AB sérum (Invitrogen). IL-2 (20 U/ml, PeproTech) byl přidán ke kultuře v den 2, 5 a 7. Pro primární MLR esej, alogenní T-lymfocyty (2×10^5) označeny CFSE (5 μ M, Invitrogen) byly inkubovány s tDC/cDC (2×10^4). T lymfocytární proliferace byla následně měřena jako diluce CFSE na průtokové cytometrii v den 6. Produkce cytokinů (IL-10 a IFN- γ) byla detekována pomocí intracelulárního barvení na průtokové cytometrii. Koncentrace IL-17A v supernatantech byla měřena pomocí metody ELISA.

3.1.5. Měření metabolických paramterů DC a signalizačních drah, které využívají k zajištění tolerogenního fenotypu

Koncentrace laktátu a glukózy v supernatantu DC byla analyzována za pomoci Glycolysis Cell-based assay Kit (Cayman Chemicals) a Glucose colorimetric assay kit (BioVision). Inhibice glykolýzy byla provedena přidáním 2-deoxyglukózy (10mM, Sigma), a to 1 hodinu před resuspendováním DC v Cell Gro a přidáním LPS, směsi cytokinů, poly I:C nebo CD40L.

Aktivita laktát dehydrogenázy (LDH) v DC byla měřena pomocí Lactate dehydrogenase activity assay Kit (Sigma).

Analýza NF- κ B byla provedena z nukleárního extraktu DC. Tento nukleární extrakt byl připraven z cDC/tDC (2×10^6) za pomoci Nuclear extract Kit (Active motif). Vazebná aktivita NF- κ B na DNA byla měřena za pomoci TransAM® NF κ B Activation Assay Kit (Active motif).

Signalizační molekuly byly detekovány pomocí Western blotu z buněčného lyzátu (2×10^6) z tDC/cDC. Byly použity následující protilátky: anti-p-p38 MAPK, anti-p-ERK1/2, anti-p-STAT3, anti-p-JNK/SAPK, anti-p-I κ B- α , anti-IDO, anti-p-mTOR, anti-p-p70S6K, anti-p38 MAPK, anti ERK 1/2, anti JNK/SAPK a anti-STAT3 (Cell Signaling Technology) a anti-actin (BioLegend).

3.1.6. Subjekty hodnocení a příprava DC

Pro přípravu DC byla odebrána periferní krev od 91 pacientů s T1D a 11 zdravých dárců. V době odběru neměl žádný pacient rozvinutou diabetickou ketoacidózu, aktivní infekci či jinou komorbiditu, vyjma těch patřících k základní diagnóze T1D (autoimunitní thyroditis, celiakie). Pacienti byli rozděleni do dvou skupin na základě hladiny glykovaného hemoglobinu HbA1c. Jako cut-off byla zvolena hladina HbA1c $\leq 7.5\%$ (58 mmol/mol) podle Americké diabetické

asociace (American Diabetes Association, ADA) (311). Pacienti s hladinou HbA1c $\leq 7.5\%$ (58 mmol/mol) byli označeni jako skupina 1 s optimální metabolickou kompenzací a pacienti s hladinou HbA1c $\geq 7.5\%$ (58 mmol/mol) byli označeni jako skupina 2 se suboptimální metabolickou kompenzací. Demografická data jsou shrnuta v tabulce 2. Všechny osoby podepsaly informovaný souhlas schválený lokální Etickou komisí.

Tab. 2 Demografická charakteristika osob zahrnutých v této studii

	G1	G2	HD
Počet: (ženy/ muži)	31 (1:1.4)	60 (1.4:1)	11 (1.2:1)
Věk: průměr \pm SD; rozsah (roky)	15.1 \pm 2,5; 8-18	15.9 \pm 2; 10-19	16.6 \pm 3.1; 10-20
T1D trvání: průměr \pm SD; rozsah (roky)	4.6 \pm 4.1; 0-13	6.3 \pm 5; 0-17	
HbA1c: průměr \pm SD; rozsah (%)	6.9 \pm 0.5; 5.6 - 7.5	10.2 \pm 1.9; 7.9 - 16.3	

T1D - Diabetes 1. typu; G1 – skupina 1, G2 – skupina 2, HD – zdraví dárči (healthy donors)

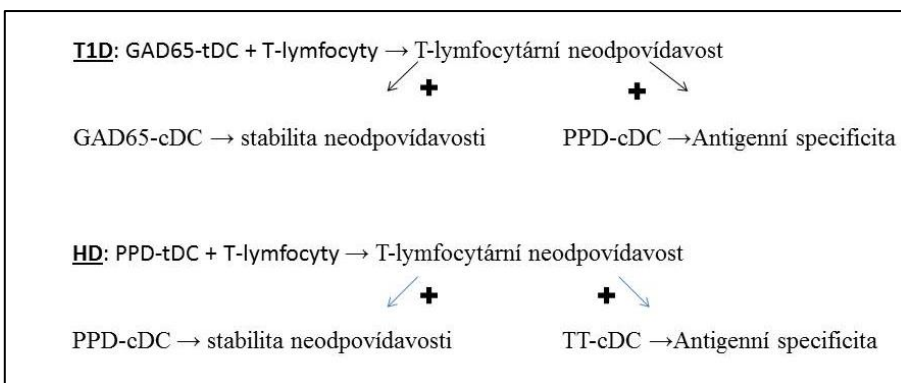
DC byly připraveny z monocytů získaných z periferní krve z PBMC podle protokolu popsáném výše. Pro indukci tDC byl 3.den k DC přidán dexamethason (Dex), (1 μ M, Medochemie) a 6.den Dex a VitD2-paricalcitol (1,5 ng/ml, Zemplar, Abbott Laboratories). Bez tolerogenních faktorů byly vygenerovány kontrolní DC (cDC). 7.den byly tDC/ cDC pulzovány buď T1D antigenem glutamát dekarboxylázou (GAD65, 5 μ g/ml, Diamyd Medical) nebo kontrolními antigeny Tuberculin purifikovaným proteinovým derivátem (PPD, 1 μ g/ml, Statens Serum Institut) nebo tetanovým toxinem (TT, 2 μ g/ml, Merck Millipore) nebo ponechány bez pulzace. Následně byly tDC/ cDC aktivovány pomocí Vaccigrade monophosphoryl lipid A (MPLA, 2 μ g/ml, Cayla-InvivoGen) po dobu 24 hodin.

3.1.7. Detekce indukce autologní neodpovídavosti T-lymfocytů po kultivaci s tDC

Analýza byla provedena v kompletním RPMI médiu obsahujícím 5% humánní AB sérum. U pacientů s T1D byly neoznačené T-lymfocyty (2×10^5) kultivovány po dobu 6 dní s autologními tDC nebo cDC (2×10^4), které buď byly pulzovány GAD65 nebo byly připraveny bez přidání antigenu. U zdravých dárců byly kultivovány neoznačené T-lymfocyty (2×10^5) po dobu 6 dní společně s autologními tDC nebo cDC (2×10^4), které buď byly pulzované PPD nebo byly připraveny bez přidání antigenu.

Tolerogenní supresní esej byla provedena následovně: další tDC-pulzované GAD-65 (u T1D pacientů) nebo tDC-pulzované PPD (u zdravých dárců) byly přidány do kultury obsahující T-lymfocyty a antigenem-pulzované cDC. tDC a cDC byly v následujících poměrech: 0,25:1; 0,5:1; 1:1). Schématicizováno na Obr. 8.

T-lymfocyty byly následně sebrány 6. den a obarveny CFSE ($3 \mu\text{M}$), restimulovány po dobu dalších 6 dní za pomoci cDC, a to cDC-pulzovanými GAD65 nebo cDC-pulzovanými PPD u pacientu s T1D a nebo cDC-pulzovanými PPD nebo cDC-pulzovanými TT u zdravých dárců. Poměr T-lymfocytů/cDC byl 10:1. Proliferace T-lymfocytů byla následně analyzována jako diluce CFSE na průtokovém cytometru, cytokiny pak detekovány metodou Luminex (MILLIPLEX™ Human Cytokine/ Chemokine Kit, Merck Millipore) a ELISA (DuoSet ELISA Kit, RaD systems).



Obr. 8 Schéma experimentu indukce T-lymfocytární neodpovídavosti

T1D – Diabetes 1. typu, HD – zdraví dárce; GAD65 – antigen dekarboxyláza kyseliny glutamové, PPD – purifikovaný proteinový derivát; TT- tetanus toxoid antigen, tDC – tolerogenní dendritické buňky, cDC – kontrolní dendritické buňky

3.1.8. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí vybraných standardních statistických testů. Výsledky byly analyzovány alespoň ze 3 nezávislých experimentů a uvedeny jako průměr ± SEM. Díky limitovanému množství krve nebyly všechny vzorky od všech pacientů zahrnuty do všech experimentů. Data byla analyzována pomocí párového/ nepárového t-testu v programu GraphPad Prism 6. Statistická závislost byla určena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Hodnota $p \leq 0.05$ byla stanovena jako statisticky signifikantní.

3.2. MDSC

3.2.1. Subjekty hodnocení pro analýzu MDSC

Za účelem analýzy MDSC byla odebrána krev od 65 pediatrických pacientů (do 18 let věku) s diagnostikovaným diabetem 1. typu a od 21 jejich prvostupňových příbuzných, kteří jsou vedeni v rámci programu Predia pro zvýšené genetické riziko a pozitivitu autoprotilátek (anti-GAD, anti-IAA a anti IA-2). Pro kontrolu byla odebrána periferní krev od 24 zdravých dárců v odpovídajícím věku. Demografická data jsou shrnuta v tabulce 3. Pro další analýzu byla

odebrána periferní krev od 4 dospělých pacientů s diagnostikovaným malobuněčným karcinomem plic.

V době odběru neměl žádný pacient s diabetem rozvinutou diabetickou ketoacidózu, ani žádné infekční onemocnění či jinou komorbiditu, krom komorbidit asociovaných s diabetem 1. typu (autoimunitní thyroditida, celiakie). Pacienti byli následně rozděleni do dvou skupin na podkladě jejich dlouhodobé metabolické kompenzace. Skupina A zahrnovala subjekty s vysokým glykovaným hemoglobinem (HbA1c) a Skupina B zahrnovala pacienty s nízkým glykovaným hemoglobinem. Jako cut-off byla zvolena hladina HbA1c $\leq 7.5\%$ (58 mmol/mol) podle Americké diabetické asociace (American Diabetes Association, ADA) (311). Všechny osoby podepsaly informovaný souhlas schválený lokální Etickou komisí.

Tab. 3 Demografická charakteristika osob zahrnutých v této studii

	T1D	subjects at-risk	HD
Počet: (ženy/ muži)	65 (36/ 29)	21 (11/ 10)	24 (8/ 16)
Věk: medián \pm SD; rozsha (roky)	14,6 \pm 2,3; 6-18	9,7 \pm 2,8; 4-18	16,2 \pm 2,9; 10-20
T1D trvání: medián \pm SD; rozsah (roky)	4,5 \pm 2,9; 0-12	-	-

T1D, Diabetes 1. typu; HD, zdraví dárči

3.2.2. Izolace MDSC

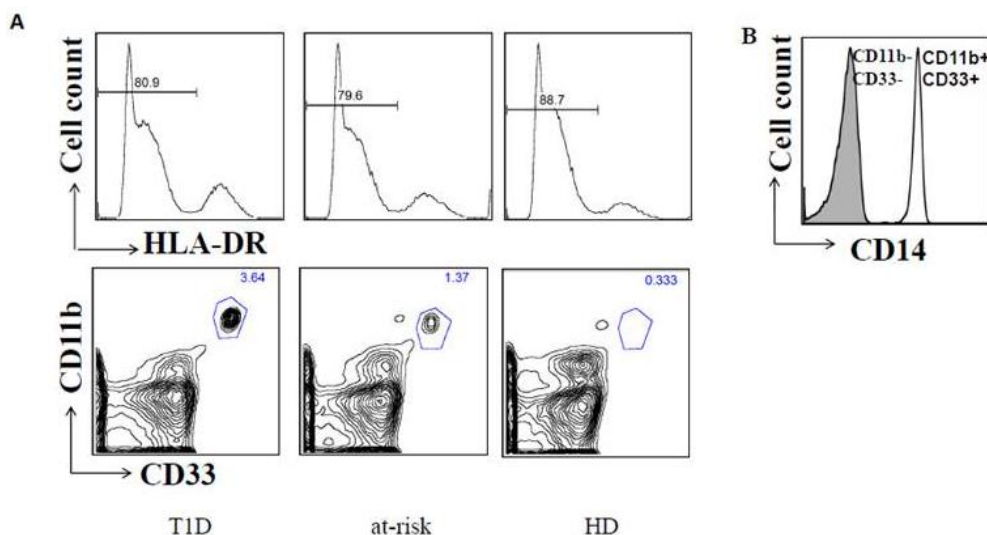
Z čerstvě odebrané periferní krve byly izolovány PBMC za použití centrifugace v hustotním gradientu (Ficoll-Paque; GE Healthcare). PBMC byly následně resuspendovány v MACS pufriu (Miltenyi Biotec) a 15 minut inkubovány na ledu s CD33 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Poté byly buňky promyty studeným MACS pufrem, aby se odstarnily nenavázané kuličky a následně

provedena pozitivní selekce na MACS column® (Miltenyi Biotec) podle instrukcí od výrobce. CD33 pozitivní frakce byla sebrána, promyta a obarvena anti-CD14 (Pacific Blue™ anti-human CD14 Ab, Biolegend) a anti-HLA-DR (Alexa Fluor® 700 anti-human HLA-DR Ab, Biolegend) protilátkami po dobu 20 minut při teplotě 4°C. Poté byly buňky promyty PBS a na sorteru vyizolována CD14⁺ HLA-DR^{low/neg} CD33⁺ MDSC za použití přístroje S3e sorter (Biorad).

3.2.3. Průtoková cytometrie a reagentia

Data byla měřena na průtokovém cytometru LSRFortessa a LSR II (B Biosciences) a následně analyzována za pomoci programu FlowJo software (Tree Star). Analýza MDSC byla provedena z PBMC, které byly izolovány z čerstvě odebrané periferní krve za pomoci centrifugace v hustotním gradientu (Ficoll-Paque; GE Healthcare).

PBMC byly označeny následujícími protilátkami: anti-CD14-BD Horizon V450 (BD Biosciences), anti-HLA-DR-Alexa Flour 700 (Biolegend), anti-CD11b-FITC (eBioscience), anti-CD33-PE-Cy7 (Biolegend), anti-CD15-APC (eBioscience). Gatovací strategie je zobrazena na Obr. 9.



Obr. 9 Gatovací strategie MDSC

(A) Schéma z průtokové cytometrie ukazující gatovací strategii MDSC CD11b⁺CD33⁺HLADR^{neg/low} buněk z PBMC u diabetických pacientů (T1D), jejich rizikových příbuzných (at risk) a zdravých dárců (HD). (B) Schéma z průtokové cytometrie exprese CD14 u CD11b⁺CD33⁺ buněk oproti CD11b⁻CD33⁻ buněk.

Expresí CD3 ζ u PBMC byla analyzována za pomoci intracelulárního barvení a použití fixačně/permeabilizujícího pufru (eBioscience) a označením patřičnými protilátkami anti-CD3 ζ -PE (Exbio).

Pro detekci IFN- γ a IL-17A-produkujících buněk byla využita také průtoková cytometrie, kdy PBMC byly stimulovány PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich) a ionomycinem (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) po dobu 4 hodin v přítomnosti brefeldinu A (5 mg/ml; Biolegend). Následně bylo provedeno intracelulární barvení za použití fixačně/ permeabilizujícího pufru (eBioscience) patřičnými protilátkami mAb IFN- γ -Pacific Blue (Biolegend) a anti-IL-17-A647 (Biolegend).

3.2.4. Imunosupresivní esej s MDSC a T-lymfocyty a detekce cytokinů

T-lymfocyty byly vyizolovány z PBMC jako CD3⁺ populace za pomoci kitu EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies). Autologní T-lymfocyty v počtu 5×10^4 buněk na jamku byly označeny CFSE (1 μ M) a aktivovány pomocí anti-CD3/CD28 kuliček (2.5×10^5 kuliček na jamku), (Thermofisher). 1 hodinu po aktivaci byly přidány MDSC vyizolované na sorteru, a to v různém poměru (1:1, 1:2, 1:4 MDSC/ T-lymfocyty). Proliferace T-lymfocytů byla poté měřena jako diluce CFSE na průtokovém cytometru v den 6.

Pro posouzení mechanismu, který využívají MDSC k navození suprese, byly použity specifické inhibitory. Tyto inhibitory byly v určeném množství přidány do kultury MDSC a T-lymfocytů. Následně byla analyzována proliferace T-lymfocytů na průtokovém cytometru. Byly použity následující inhibitory: L-NMMA – iNOS inhibitor (100 μ M, Sigma), anti-TGF- β mAb (20 μ g/ml) (LEAF™ Purified anti-humanTGF- β Ab, Biolegend) a Nor-NOHA – inhibitor arginázy-1 (300 μ M, CaymanChemical). Detekce cytokinů v supernatantu (IFN- γ , IL-17) byla provedena za pomoci metody ELISA (R&D Systems).

3.2.5. Transwell chamber esej

Pro posouzení, zda je schopnost MDSC inhibovat T-lymfocyty závislá na mezibuněčném kontaktu, jsme použili transwellovou esej s oddělenými komorami EMD Millipore (Billerica). T-lymfocyty byly nejprve vyizolovány z PBMC pomocí patřičného kitu jako CD3⁺ populace (EasySep™ Human T Cell Isolation Kit, StemCell Technologies), označeny CFSE (1nM) a aktivovány pomocí CD3/CD28 kuličkami 1 hodinu před provedením eseje. Poté byly přidány

do dolního kompartmentu transwellové destičky. M-MDSC, vyizolované z PBMC za pomoci S3e sorteru (Biorad) byly přidány do horního kompartmentu destičky v definovaném poměru (1:1, 1:2 a 1:4 T cell/MDSC). MDSC a T-lymfocyty byly od sebe odděleny membránou s póry o velikosti 8 μ m. 6. den pak byla měřena proliferace T-lymfocytů jako diluce CFSE na průtokovém cytometru.

3.2.6. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí vybraných standardních statistických testů. Nejprve byla data analyzována pomocí testu normality (Shapiro-Wilk) a následně analyzována za pomoci párového/ nepárového t-testu, Mann-Whitney testu v programu GraphPad Prism 6. Statistická závislost byla určena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Hodnota $p \leq 0.05$ byla stanovena jako statisticky signifikantní.

4. Výsledky

4.1. Tolerogenní DC

4.1.1. Tolerogenní fenotyp a testy stability

První část práce se zabývala charakterizací a funkcí tolerogenních DC vytvořených podle GMP protokolu za pomoci Dexamethasonu (Dex) a vitamínu D2 (VitD2) z monocytů izolovaných z krve zdravých dárců. Zaměřili jsme se na analýzu jejich tolerogenního fenotypu a funkce a především na stabilitu tolerogenních funkcí tDC v nepřítomnosti regulačních faktorů a po stimulaci různými prozánětlivými faktory, které mimikují chronický zánět v těle pacienta. tDC připravené pomocí Dex a VitD2 pomocí GMP protokolu vykazovaly stabilní tolerogenní fenotyp a stabilní inhibiční vlastnosti. Detailněji jsme se zaměřili na jejich metabolismus a signalizační dráhy, které využívají k regulaci a udržení svého stabilního tolerogenního fenotypu. **Výsledky práce byly publikovány v článku Danova et. al., Oncotarget 2015, IF 5,38 (238).**

4.1.1.1. tDC vykazují tolerogenní fenotyp a sníženou schopnost stimulovat T lymfocyty. Tolerogenní fenotyp a funkci si zachovávají i v nepřítomnosti Dex a VitD2 a po restimulaci prozánětlivými faktory (LPS, CC, polyI:C a CD40L)

Pro klinickou aplikaci tDC je velmi důležité jejich stabilní tolerogenní fenotyp. Při vpravení do organismu, kde probíhá chronický zánět, by mohlo dojít k jejich reaktivaci a namísto tlumivého účinku by mohlo dojít naopak k potencování škodlivé imunitní reakce proti danému antigenu. Proto jsme testovali, zda tolerogenní fenotyp tDC zůstane stabilní i po restimulaci tDC zánětlivými agens. DC vyizolovány z monocytů z periferní krve, připravené v Cell Gro mediu za pomoci GM-CSF a IL-4 byly kultivovány s tolerogenními faktory Dex a VitD2 (tDC) nebo bez nich (cDC) a aktivovány pomocí MPLA.

tDC vykazovaly v porovnání s cDC tolerogenní fenotyp se sníženou hladinou povrchových markerů CD86, CD83, CD 80 a CD40 a zvýšenou hladinou TLR-2, CD14 a inhibičních molekul TIM-3, ILT-3. Expresí CD1a, CD11c, HLA-DR a inhibičních molekul ILT-4 a PDL-1 a PDL-2 byla srovnatelná mezi tDC a cDC. Zobrazeno na Obr. 10a.

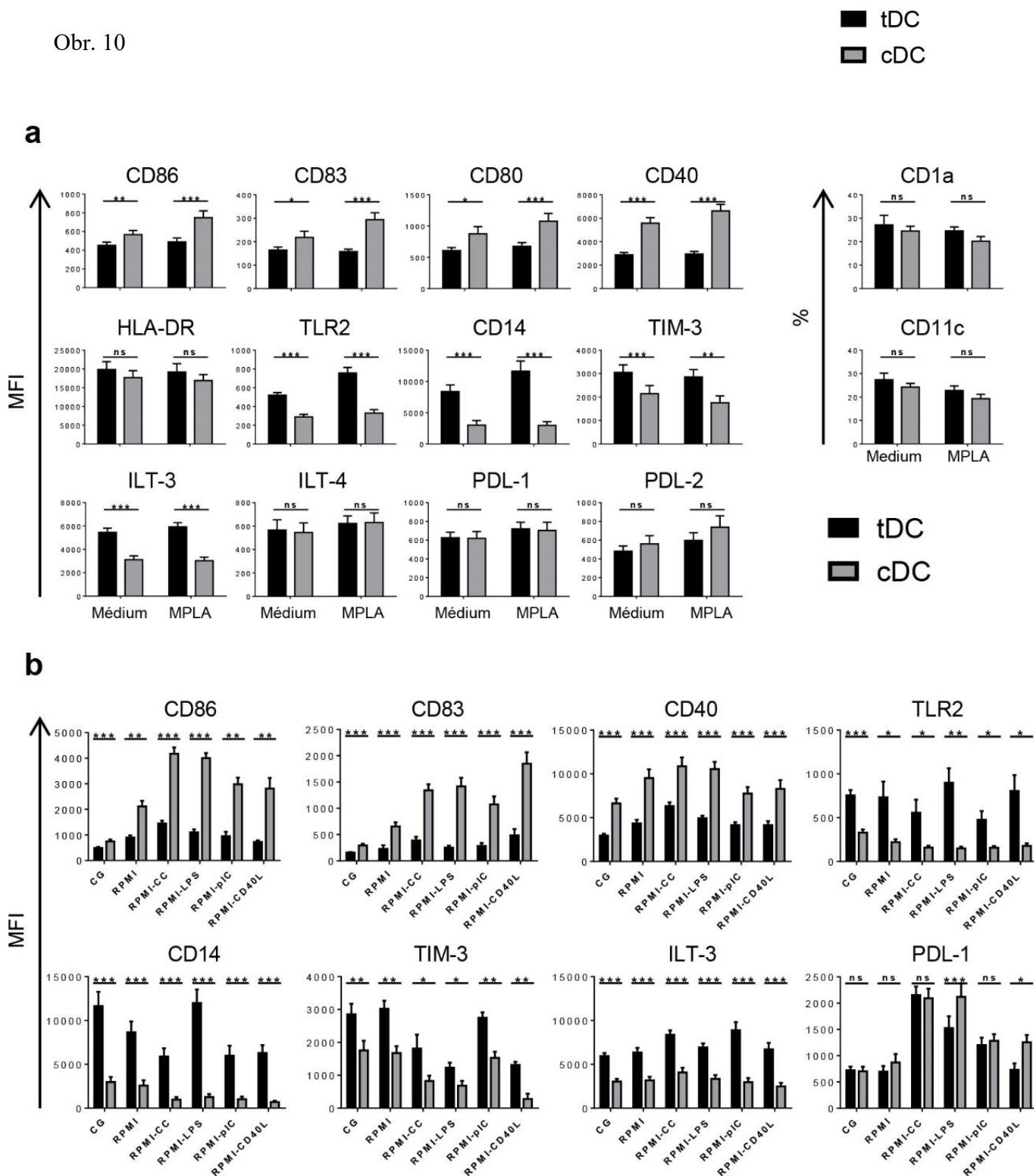
Pro imitaci prozánětlivého prostředí v organismu byly tDC a cDC rekultivovány v kompletním RPMI médiu, a to bez tolerogenním faktorů. Následně pak restimulovány LPS, CC, poly I:C a CD40L po dobu 24h. Tato restimulace vedla k mírné upregulaci CD 86, CD83 a CD40 na tDC, nicméně stále byla tato exprese signifikantně nižší než u cDC. Naopak exprese TLR-2, CD14 a ILT-3 významně vzrostla u tDC po restimulaci v porovnání s cDC. Povrchová exprese TIM-3 se snížila po restimulaci LPS, CC a CD40L, zůstala však vyšší než u cDC. Po restimulaci LPS a CC došlo u tDC také ke zvýšení exprese inhibiční molekuly PDL-1 oproti cDC. Zobrazeno na Obr. 10b.

Pro analýzu komplexního tolerogenního fenotypu byly měřeny i cytokiny produkované DC. tDC produkovaly vyšší množství IL-10, TGF- β a méně TNF- α , a minimální množství IL-12p70 v porovnání s cDC, Obr. 10c. Po restimulaci LPS, CC, poly I:C a CD40L byla detekována u tDC zvýšená produkce IL-10 a mírné zvýšení i TGF- β . Produkce zánětlivých cytokinů TNF- α a IL-12p70 zůstala nezměněna. Zobrazeno na Obr. 10d.

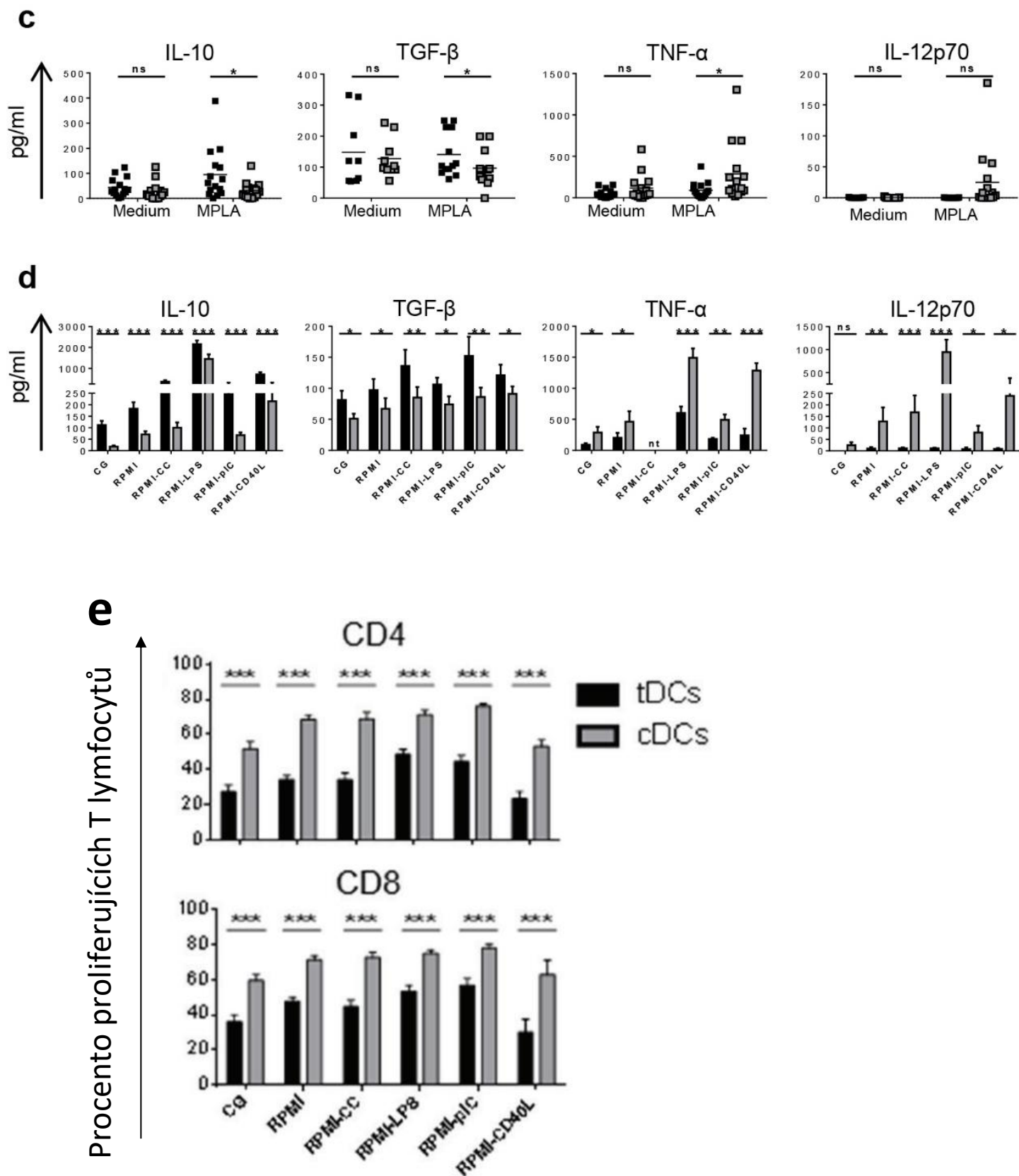
Tolerogenní efekt tDC byl prokázán i při kultivaci s alogenními T-lymfocyty. TDC nebo cDC byly kultivovány s T-lymfocyty v poměru 1:10. Tolerogenní DC signifikantně méně indukovaly proliferaci T-lymfocytů (CD4+ i CD8+), a to i po restimulaci prozánětlivými agens, Obr. 10e.

Tato data naznačují, že Dex/ VitD2 tDC si udržují svůj tolerogenní fenotyp i po restimulaci prozánětlivými faktory.

Obr. 10



Obr. 10 - pokračování



Obr. 10: Dex/VitD2 tDC vykazují stabilní semimaturovaný fenotyp a produkují protizánětlivé cytokiny

DC byly diferencovány z monocytů v Cell Gro médiu s GM-CSF a IL-4 v přítomnosti (tDC, černé sloupce) nebo bez přítomnosti Dex a VitD2 (cDC, šedé sloupce). Takto vygenerované buňky jsou nezralé tDC/ cDC (médiu). Buňky byly následně aktivované MPLA po dobu 24h (MPLA). (a) Povrchové markery byly následně analyzovány pomocí průtokové cytometrie. (c) Cytokiny produkované cDC/ tDC byly analyzovány ze supernatantu pomocí metody Luminex (tDC černé čtverce, cDC šedé čtverce).

Po aktivaci MPLA v Cell Gro (CG), buňky byly promyty a reaktivovány v kompletním RPMI bez tolerogenních faktorů a vystaveny prozánětlivým agens – cytokinový koktejl (CC) nebo lipopolysacharid (LPS) nebo poly I:C nebo CD40L nebo byly nechány nestimulované (RPMI). (b) Sloupcový graf ukazuje povrchovou expresi analyzovanou pomocí průtokové cytometrie. (d) Cytokiny uvolněné z DC analyzované pomocí metod Luminex/ ELISA, 24h po restimulaci. (e) Procento prolifерujících T-lymfocytů kultivovaných s tDC/ cDC v Cell Gro (CG), následně promytých a reaktivovaných v RPMI médiu bez tolerogenních faktorů. Byly přidány prozánětlivé agens: cytokinový koktejl (CC), lipopolysacharid (LPS), polyI:C nebo CD40L nebo ponechány bez stimulace (RPMI). Proliferace byla analyzována 6. den pomocí diluce CFSE.

Data jsou ukázána jako MFI (medián intenzity fluorescence) \pm SEM nebo procento z pozitivních buněk (CD1a a CD11c) alespoň ze 3 nezávislých experimentů od nejméně 10 dárců. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (párový t-test).

4.1.1.2. Metabolismus tDC a signalizační dráhy, které využívají k zajištění tolerogenního fenotypu

Nejprve jsme analyzovali u tDC a cDC aktivaci signalizačních drah MAPK, zahrnující p38MAPK, JNK/SAPK a ERK1/2, jelikož tyto dráhy se podílí na maturaci DC a řídí produkci IL-10 a IL-12 cytokinů. tDC připravené v Cell Gro vykazovaly vyšší aktivitu (analyzovanou jako míru fosforylace) JNK/SAPK oproti cDC, fosforylace p38MAPK a ERK1/2 byly u tDC i cDC srovnatelné. Po restimulaci DC prozánětlivými faktory (LPS, CC, poly I:C a CD40L) došlo k významnému zvýšení fosforylace ERK1/2 a JNK/SAPK u tDC a snížení fosforylace p38 MAPK v porovnání s cDC. tDC dále exprimovaly imunoregulační molekulu IDO a to jak v Cell Gro médiu, tak i při všech restimulacích oproti cDC, Obr. 11a.

Diferenciace a maturace DC byla popsána také díky aktivaci NF- κ B, a zároveň suprese NF- κ B se zdá být nezbytná k diferenciaci Dex/VitD2 tDC. V naší práci jsme nejprve testovali, zda u tDC vystaveným prozánětlivým faktorům (LPS, CC, poly I:C a CD40L) bez přítomnosti tolerogenních agens (Dex, VitD2) dojde k reaktivaci NF- κ B. Nejprve jsme analyzovali protein I κ B- α , který ve své fosforylované podobě inhibuje NF- κ B. Fosforylovaný I κ B- α (pI κ B- α) byl významně snížen u tDC připravených v Cell Gro a i při všech následných restimulacích na rozdíl od cDC, Obr. 11a.

Pro kvantifikaci NF- κ B aktivity jsme analyzovali DNA-vazebnou aktivitu NF- κ B podjednotek p50, p65RelA, RelB a c-Rel v buněčném jádře. U tDC připravených v Cell Gro byla nízká vazebná aktivita jednotek p65RelA, RelB a c-Rel v porovnání s cDC. Tato aktivita zůstala u tDC nízká i po restimulaci prozánětlivými faktory na rozdíl od cDC. Na druhou stranu, vazebná aktivita NF- κ B jednotky p50 byla u tDC zvýšena, a to jak v základních podmínkách, tak při všech restimulacích, stejně jako u cDC. Obr.11b.

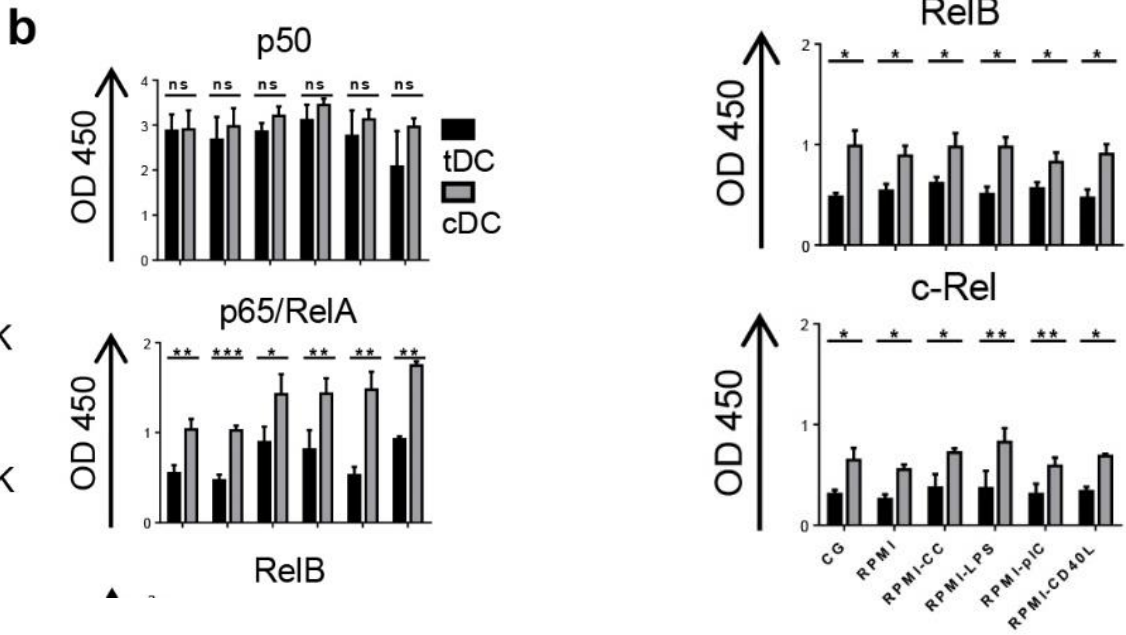
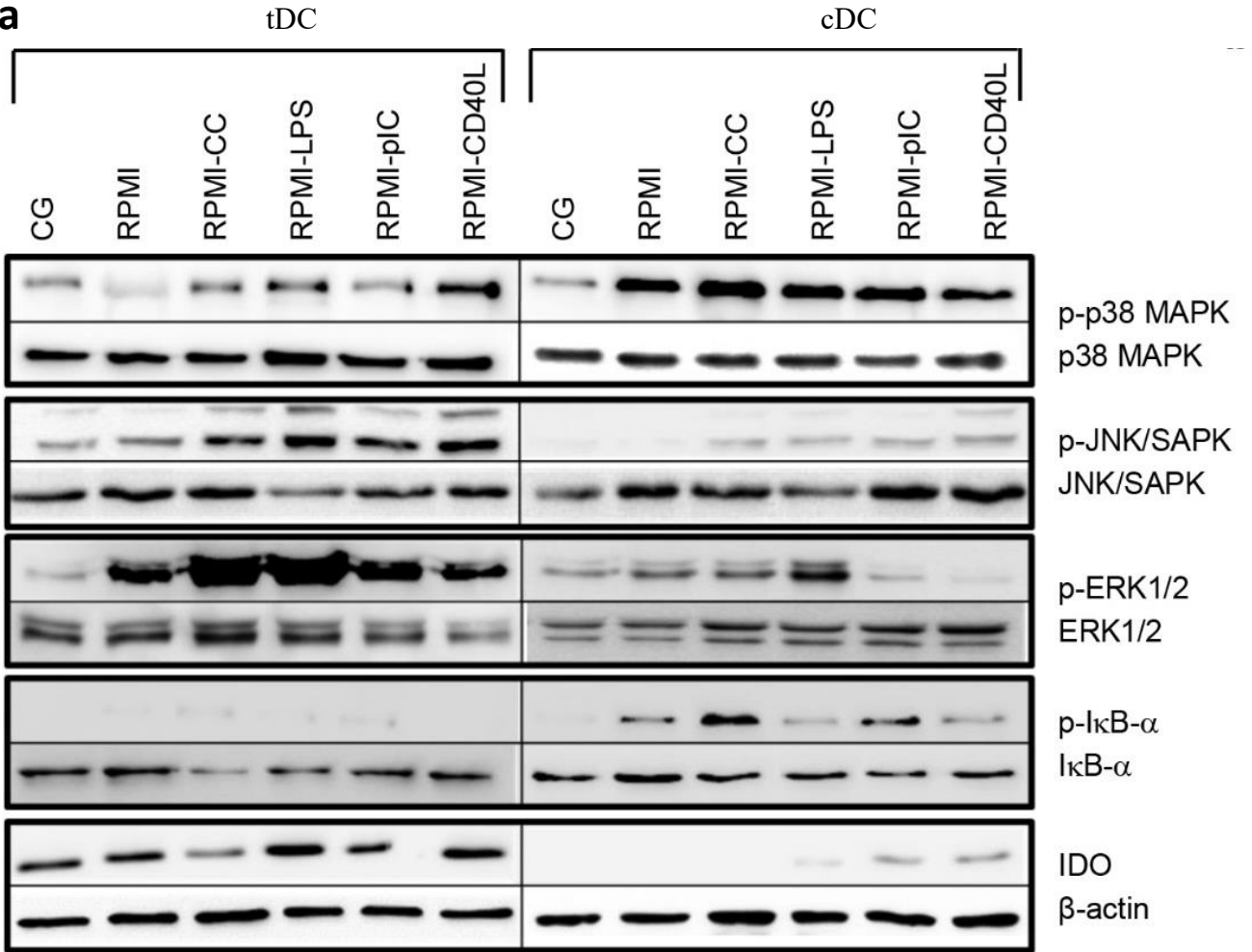
Pro zjištění, jaký vliv mají signalizační dráhy MAPK a NF- κ B při restimulaci DC prozánětlivými faktory jsme použili jejich specifické inhibitory, které byly přidány před stimulací. Poté byly analyzovány cytokiny IL-10, IL-12. Produkce protizánětlivého cytokinu IL-10 byla signifikantně závislá na p38 MAPK, JNK/SAPK a ERK1/2 signalizační dráze po stimulaci LPS, CC a CD40L. Také inhibitor NF- κ B (Bay 11-7082) snižoval produkci IL-10 u tDC. U cDC byla produkce IL-10 snížena pouze po stimulaci LPS, Obr. 11c. Naopak inhibitory p38MAPK a NF- κ B významně snižovaly produkci IL-12 u cDC po stimulaci LPS a CC, ale na produkci IL-12 u tDC neměly vliv, Obr. 11c.

Co se týče povrchových markerů, inhibitor p38 MAPK snižoval expresi inhibičních molekul ILT-3 a PD-L1 u tDC v porovnání s cDC, Obr. 11d. Inhibitor ERK1/2 snižoval expresi PDL-1 u tDC po restimulaci LPS, ale signifikantně zvyšoval expresi CD86 u tDC za všech testovacích podmínek, Obr. 11d. Z toho vyplývá, že u tDC p38 MAPK a ERK1/2 hrají roli při udržení tolerogenního fenotypu díky regulaci produkce IL-10 a exprese PDL-1, ILT-3 a CD86, což má vliv na aktivaci T-lymfocytů.

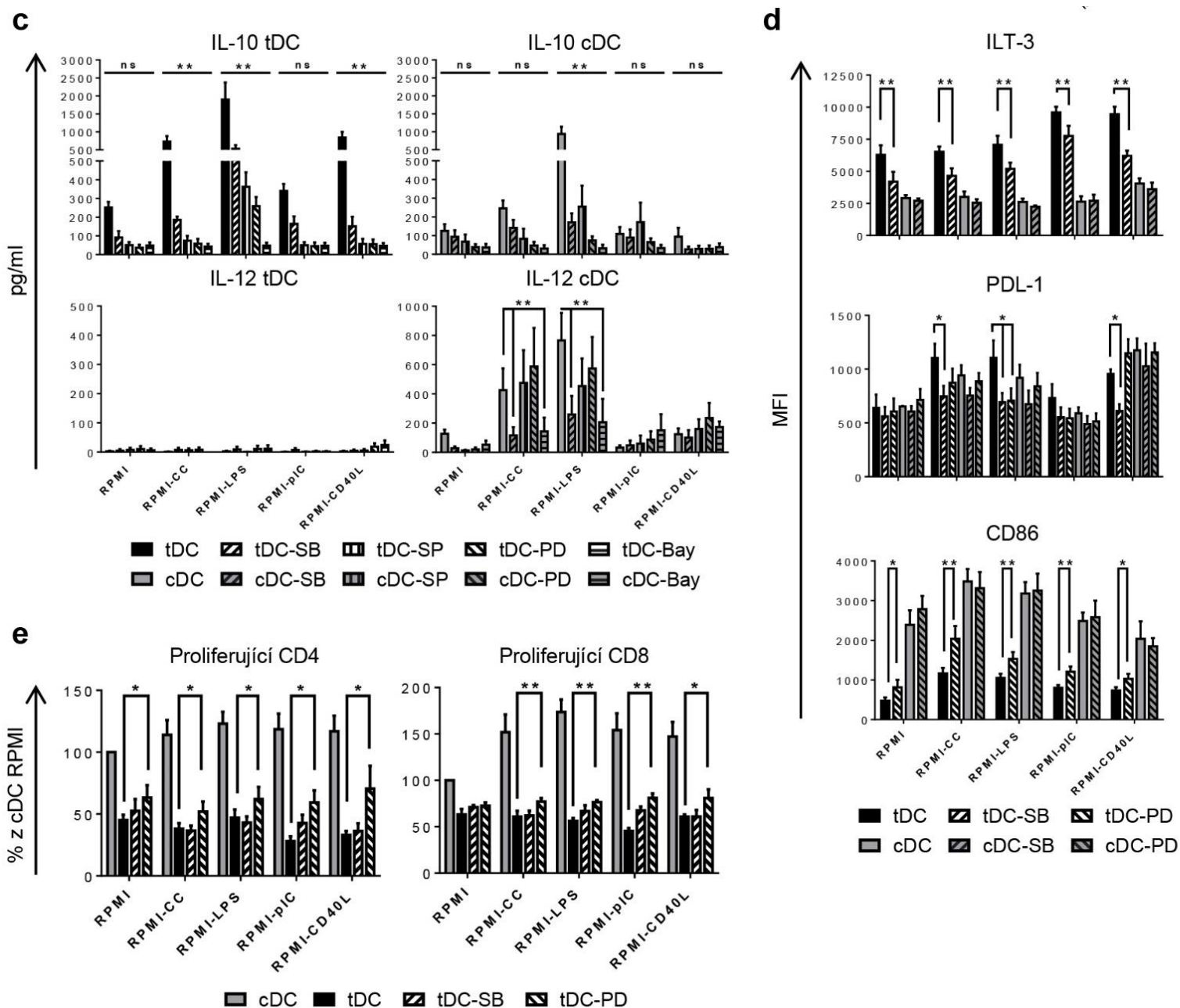
Jak je uvedeno na Obr. 11e, ERK1/2 inhibitor zvýšil schopnost Dex/VitD2 tDC stimulovat alogenní T-lymfocyty v porovnání s Dex/VitD2 tDC bez přidání ERK1/2 inhibitoru.

Souhrnně lze konstatovat, že odlišná aktivace MAPK signalizační dráhy u tDC a cDC a také snížená aktivita NF- κ B u tDC tedy přispívá k udržení stabilního tolerogenního fenotypu včetně snížení alostimulační kapacity u Dex/VitD2 tDC.

Obr. 11 **a**



Obr. 11 - pokračování



Obr. 11 tDC a cDC využívají rozdílné signalizační dráhy po napodobení *in vivo* aktivace

DC byly vygenerovány v Cell Gro médiu v přítomnosti (tDC) nebo bez přítomnosti Dex a VitD2 (cDC) a aktivovány MPLA (CG). Poté byly tDC a cDC promyty, reaktivovány v kompletním RPMI bez tolerogenních faktorů a vystaveny následujícím stimulům: cytokinový koktejl (CC); lipopolysacharid (LPS); poly I:C; CD40L nebo ponechány bez stimulace (RPMI).

(a) 60 min po restimulaci byla analyzována fosforylace p38 MAPK, JNK/SAPK, ERK1/2, I κ B- α a hladina IDO pomocí western blotu. Celkový p38 MAPK, JNK/SAPK, ERK1/2, I κ B- α nebo β -aktin v každém vzorku byl použit

jako kontrola. **(b)** 90 min po restimulaci byla analyzována DNA-vazebná aktivita podjednotek NF- κ B pomocí kolorimetrické eseje. **(c)** Produkce IL-10 a IL-12 po 24h restimulaci tDC/ cDC pomocí CC, LPS, poly I:C a CD40L v přítomnosti p38 MAPK inhibitoru SB203580 (SB), JNK/SAPK inhibitoru SP600125 (SP), ERK1/2 inhibitoru PD98059 (PD), NF- κ B inhibitoru Bay 11-7082 (Bay) byla hodnocena metodou ELISA. **(d)** ILT-3, PDL-1 a CD86 exprese na tDC/ cDC po 24h restimulaci CC, LPS, poly I:C a CD40L v přítomnosti p38 MAPK inhibitoru SB203580 (SB) a ERK1/2 inhibitoru PD98059 (PD) byla analyzována pomocí průtokové cytometrie. **(e)** K tDC byl přidán p38 MAPK inhibitor SB203580 (SB) a ERK1/2 inhibitor PD98059 (PD), následně byly restimulovány po dobu 24h. tDC byly následně kultivovány společně s alogenními T-lymfocyty. Proliferace byla měřena 6. den. Data reprezentují průměr \pm SEM z alespoň 3 nezávislých experimentů. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (párový t-test).

4.1.1.3. mTOR-dependentní glykolýza přispívá k udržení stabilního tolerogenního fenotypu tDC po restimulaci

Při aktivaci/ maturaci DC dochází k metabolickému reprogramování uvnitř buněk. Při aktivaci skrze TLR receptor dochází k PI3/Akt – dependentní změně metabolismu s vyšším zapojením glykolýzy (312). V této signalizační kaskádě byl popsán mTOR jako důležitá signalizační molekula, regulující metabolismus glukózy. Nicméně, jak bude uvedeno dále, naše data ukázala silnou fosforylaci mTOR u tDC po restimulaci TLR ligandem (LPS) a i po restimulaci ostatními prozánětlivými agens (CC, CD40L), Obr. 12a. Tato aktivace mTOR nebyla doprovázena maturací tDC. Proto jsme se zaměřili na to, zda aktivace mTOR u tDC je doprovázená metabolickým přesmykem buněk na glykolýzu a jestli je glykolýza důležitá pro udržení stabilního tolerogenního fenotypu u Dex/VitD2 tDC po restimulaci.

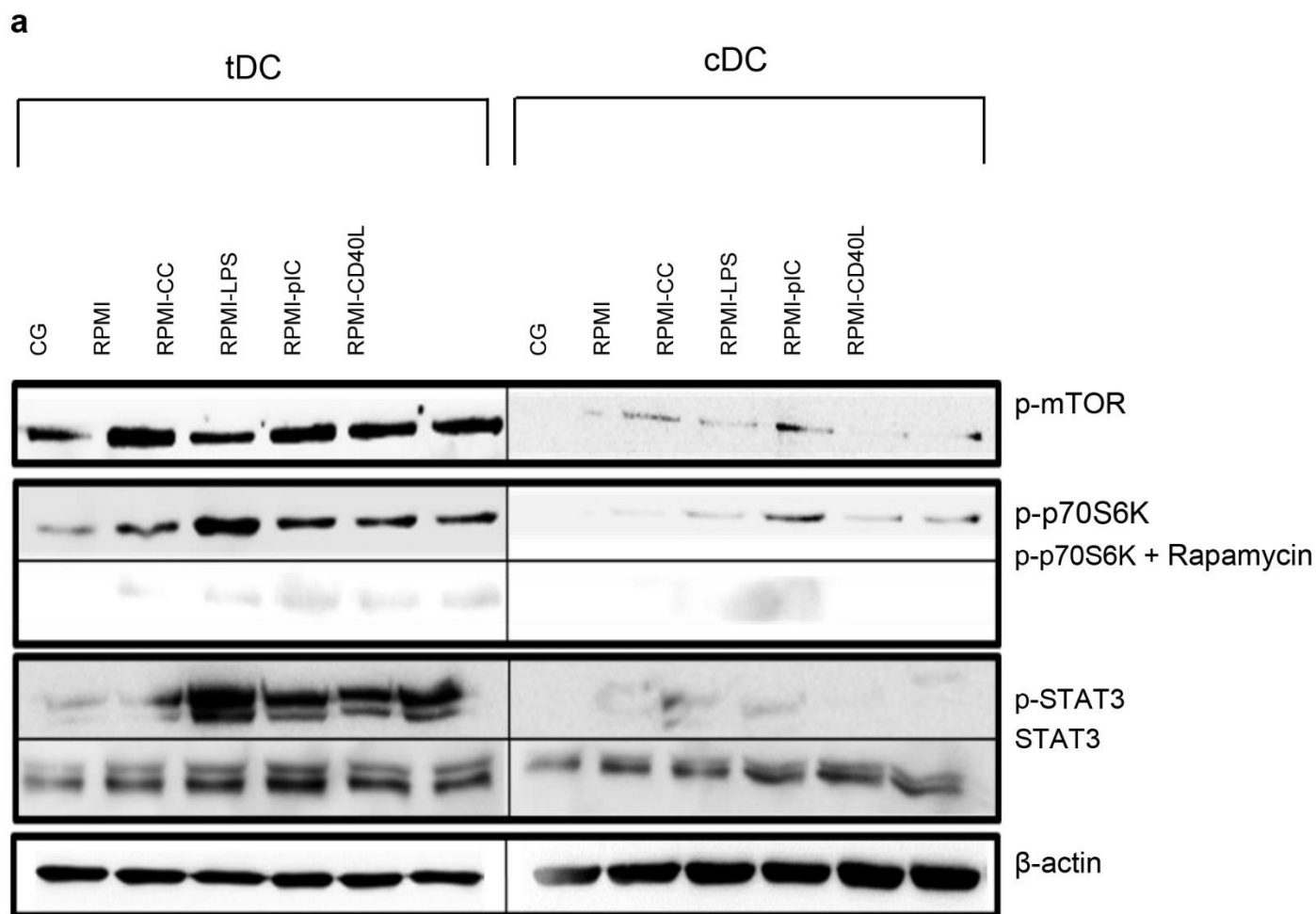
Glykolytická aktivita byla měřena jako spotřeba glukózy a produkce laktátu v supernatantu tDC a cDC. Jak je uvedeno na Obr. 12b, v supernatantu tDC/ cDC v Cell Gro bylo zaznamenáno srovnatelné množství laktátu. Nicméně při restimulaci, tDC vykazovaly výrazně větší produkci laktátu a vyšší spotřebu glukózy v mediu oproti cDC. Zároveň tDC po restimulaci vykazovaly vyšší aktivitu laktát-dehydrogenázy v porovnání s cDC. Z uvedeného vyplývá, že Dex/VitD2 tDC vykazují vyšší aktivitu glykolýzy v nepřítomnosti tolerogenních faktorů a po restimulaci prozánětlivými faktory v porovnání s cDC.

Pro zjištění role mTOR v regulaci glykolýzy u tDC byl přidán specifický inhibitor rapamycin a následně analyzován buněčný metabolismus. Rapamycin významně snížil produkci laktátu v supernatantu tDC, Obr. 12c.

Pro ověření, zda je glykolýza důležitá pro udržení tolerogenního fenotypu, byla do kultury přidána 10mM 2-deoxyglukóza (2-DG), která inhibuje glykolýzu. Po přidání 2-DG tDC nebyly schopny zvýšit expresi ILT-3, PDL-1 a produkci IL-10, Obr. 13a, b. Expresie CD86 a produkce IL-12p70 zůstala v porovnání s cDC nezměněna. Inhibice glykolýzy u tDC také částečně zvýšila schopnost tDC indukovat proliferaci alogenních T-lymfocytů, Obr. 13c.

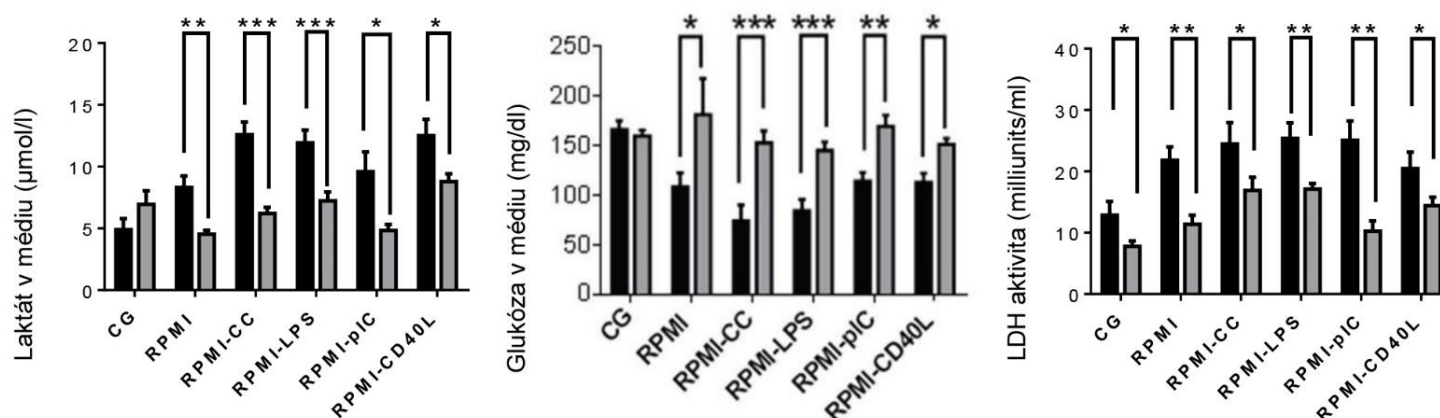
Získaná data podporují hypotézu, že tDC jsou schopny udržet si svůj tolerogenní fenotyp v nepřítomnosti tolerogenních faktorů a po restimulaci prozánětlivými faktory díky mTOR-dependentní glykolýze.

Obr. 12

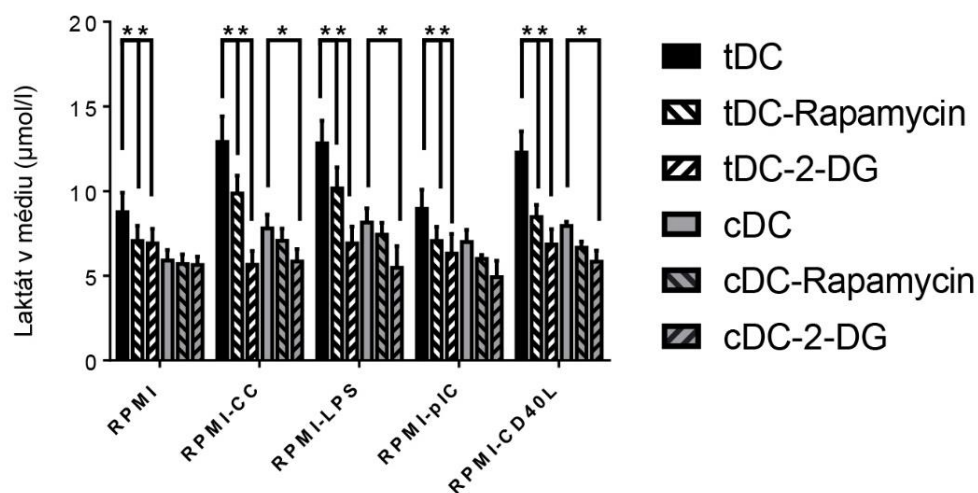


Obr. 12 - pokračování

b



c

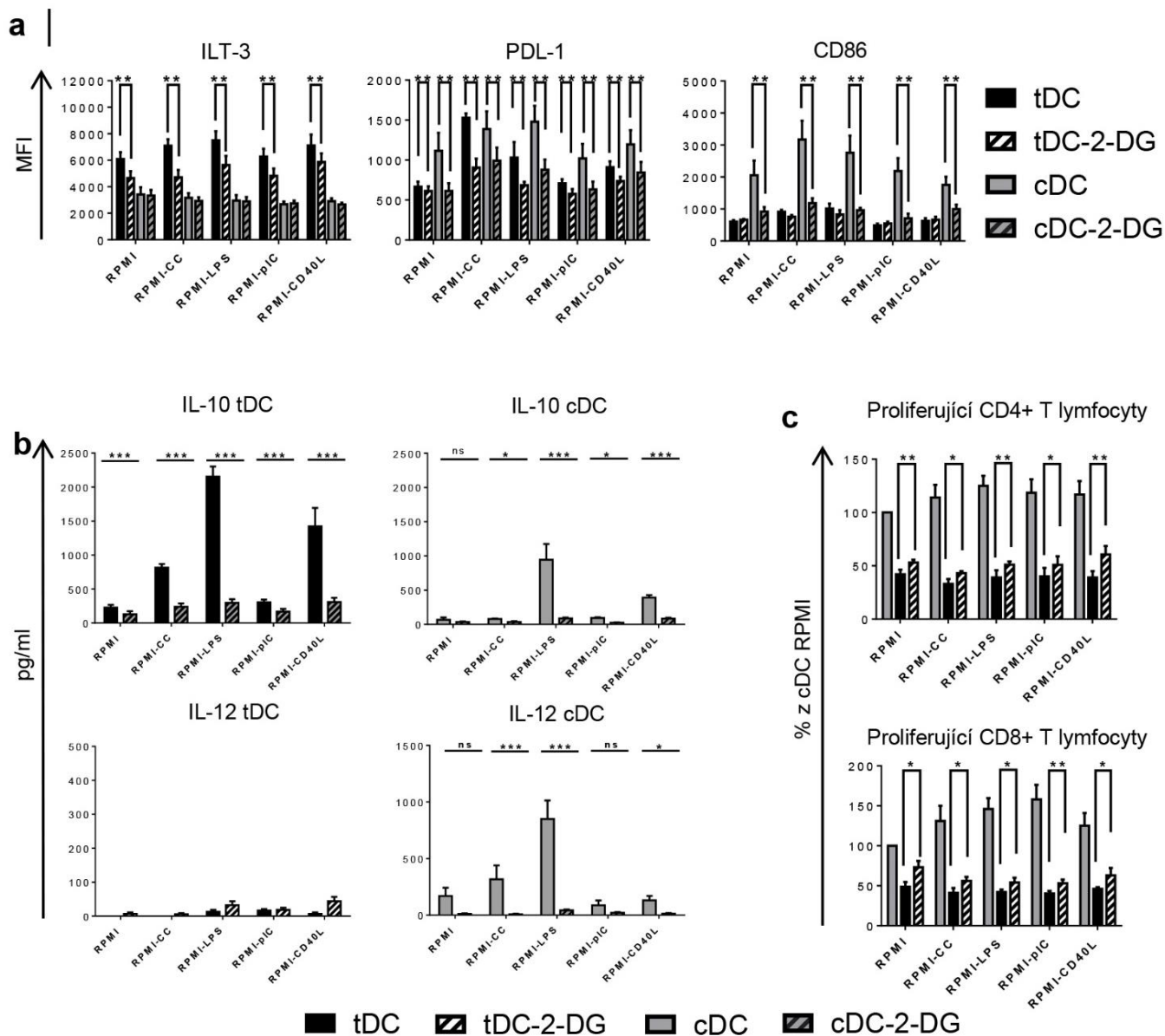


Obr. 12 mTOR a STAT3 regulují tolerogenní vlastnosti tDC po jejich restimulaci

DC byly diferencovány v Cell Gro v přítomnosti (tDC) nebo bez přítomnosti (cDC) Dex a VitD2 a následně aktivovány MPLA (CG). Poté byly tDC/ cDC promyty, reaktivovány v kompletním RPMI bez přítomnosti tolerogenních faktorů a restimulovány cytokinovým koktejlem (CC); lipopolysacharid (LPS); poly I:C; CD40L nebo byly ponechány bez stimulace (RPMI). Před restimulací byl k tDC/cDC přidán mTOR inhibitor rapamycin nebo STAT3 inhibitor Stattic po dobu 30min. (a) 60min po restimulaci byl proveden western blot a detekována fosforylace mTOR, p70S6K a STAT3. β -aktin byl použit jako kontrola. Je zobrazen jeden ze 3 experimentů.

(b) Po 24h restimulaci byla analyzována koncentrace glukózy a laktátu v supernatantu. Aktivita laktát-dehydrogenázy (LDH) byla analyzována z buněčného lyzátu. (c) 30 min před restimulací byl přidán rapamycin nebo 2-deoxyglukóza, poté po 24h restimulaci byla analyzována koncentrace laktátu v supernatantu. Data reprezentují průměr \pm SEM z alespoň 3 nezávislých experimentů. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (párový t-test).

Obr. 13



Obr. 13: Zvýšená glykolýza reguluje tolerogenní fenotyp u Dex/VitD2 tDC

K tDC/ cDC byl přidán inhibitor glykolýzy 2-deoxyglukóza(2-DG) a následně byly restimulovány prozánětlivými agens - cytokinovým koktejlem (CC); lipopolysacharidem (LPS); poly I:C; CD40L/ nebo zůstaly bez restimulace (RPMI médium). **(a)** Expres ILT-3, PDL-1 a CD86 na DC měřena průtokovou cytometrií. **(b)** Produkce IL-10 a IL-12 dendritickými buňkami (DC) měřena metodou ELISA. **(c)** Restimulované DC s přidáním inhibitorem glykolýzy 2-DG byly kultivovány společně s alogenními lymfocyty. Proliferace lymfocytů byla měřena 6. den. Data reprezentují průměr ± SEM z alespoň 3 nezávislých experimentů. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (párový t-test).

4.1.1.4. mTOR a STAT3 regulují u tDC produkci IL-10 a expresi ILT-3, PD-L1 a CD86 po restimulaci prozánětlivými faktory

Pro další detailnější analýzu signalizačních drah zapojených v udržení tolerogenního fenotypu byl analyzován mTOR, jakožto důležitý regulátor pro/ protizánětlivého fenotypu u monocytů a DC. Bylo popsáno, že aktivace/fosforylace mTOR vede ke snížení aktivity NF- κ B a zvýšení aktivity STAT3 (313).

V našich experimentech se ukázalo, že u tDC dochází k významné fosforylaci mTOR a STAT3 po jejich restimulaci prozánětlivými faktory v porovnání s cDC. Fosforylace mTOR vedla k fosforylaci ribosomálního proteinu p70S6K, který je zahrnut v downstream signalizační kaskádě mTORC1. Fosforylace p70S6K byla snížena po přidání mTOR specifického inhibitoru rapamycinu, Obr. 12a.

K zjištění vlivu mTOR a STAT3 na produkci cytokinů IL-10 a IL-12 a na expresi povrchových molekul PDL-1, ILT-3 a CD86 byly provedeny experimenty s přidáním specifických inhibitorů mTOR (rapamycin) a STAT3 (Stattic). Po přidání rapamycinu a Stattic inhibitoru vykazovaly tDC nižší produkci IL-10, cDC vykazovaly nižší produkci IL-10 jen po restimulaci LPS, Obr. 14a.

Sekrece prozánětlivého cytokinu IL-12 nebyla u tDC zvýšena ani po přidání mTOR a STAT3 inhibitoru, a to ani po restimulaci. U cDC měl inhibitor mTOR vliv na zvýšení IL-12 po restimulaci LPS a CC, sekrece IL-12 u cDC inhibitorem STAT3 nebyla ovlivněna, Obr. 14a.

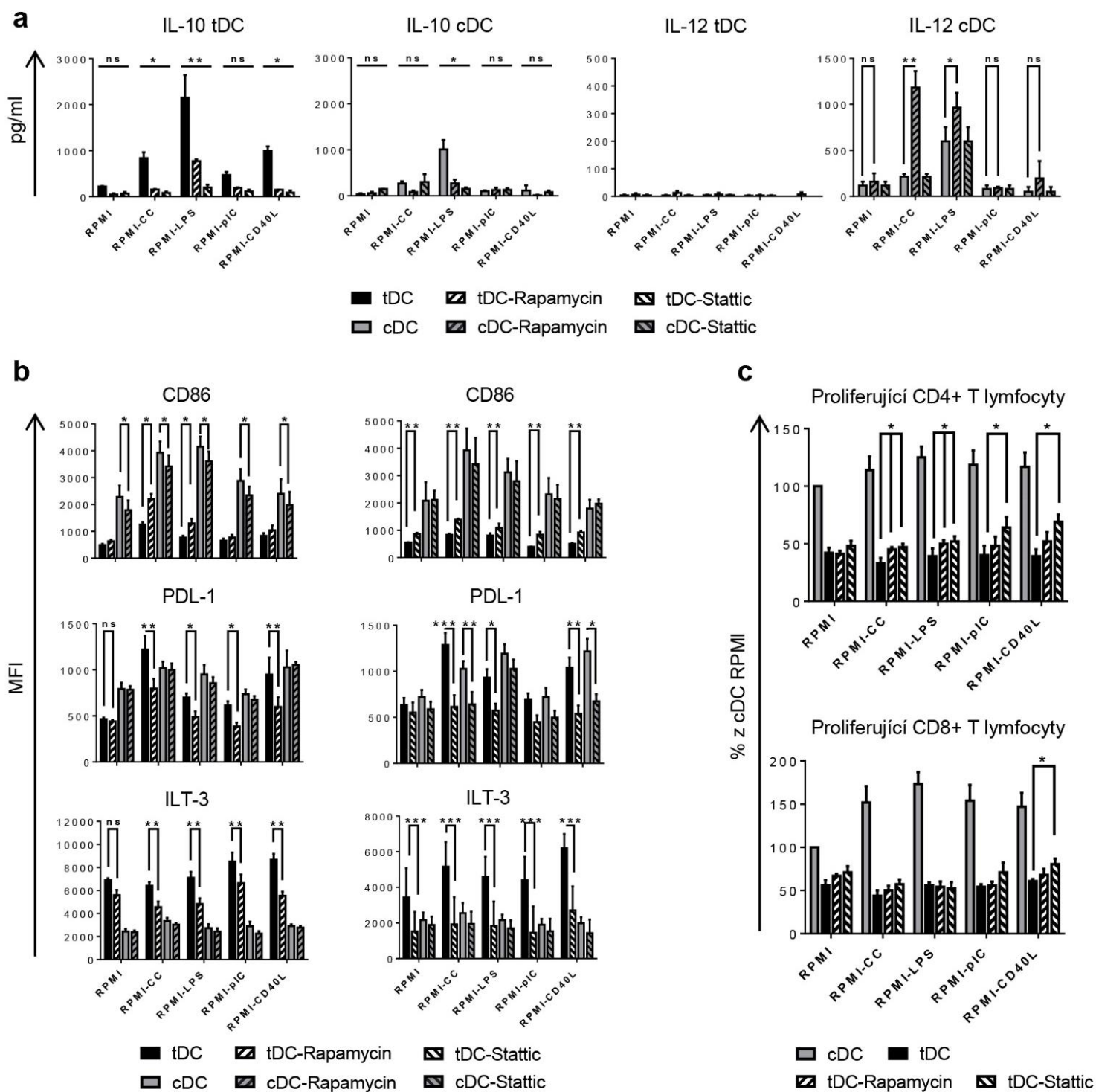
Navíc, inhibice mTOR a STAT3 vedla k významnému snížení povrchové exprese PDL-1 a ILT-3 u tDC a zvýšení CD86 molekuly u tDC po restimulaci LPS a CC (Rapamycin) a po restimulaci LPS, CC, poly I:C a CD40L (Stattic), Obr. 14b. Tato skutečnost byla reflektována i alostimulační esejí, kde tDC po přidání mTOR a STAT3 inhibitorů vykazovaly částečně zvýšenou kapacitu stimulovat alogenní T-lymfocyty, Obr. 14c.

Z uvedených dat, že mTOR a STAT3 mají významnou imunoregulační úlohu v tDC ovlivňující sekreci IL-10 a expresi PDL-1, ILT-3 a CD86.

Data z první části práce ukazují, že Dex/VitD2 tolerogenní DC vykazují inhibiční vlastnosti a jsou schopny si je udržet i v nepřítomnosti regulačních faktorů a po přidání prozánětlivých

faktorů napodobující chronický zánět v organismu. Tato schopnost je daná snížením aktivity NF- κ B a mírnou aktivací p38 MAPK v porovnání s cDC. U tDC po restimulaci dochází naopak k významné aktivaci ERK1/2 a IDO. mTOR a STAT3 signální molekuly pak regulují expresi inhibičních molekul, jako jsou PDL-1, ILT-3 a kostimulačních molekul CD86 a produkci cytokinů IL-10 a IL-12p70. U Dex/VitD2 tDC jsme prokázali aktivaci mTOR dependentní glykolýzy, která je rovněž důležitá pro udržení jejich tolerogenního fenotypu.

Obr. 14



Obr. 14: mTOR a STAT3 regulují tolerogenní vlastnosti u tDC po restimulaci prozánětlivými agens

K tDC/ cDC byl přidán mTOR inhibitor rapamycin nebo STAT3 inhibitor Stattic po dobu 30min a poté byly tDC/ cDC restimulovány prozánětlivými agens - cytokinovým koktejlem (CC); lipopolysacharidem (LPS); poly I:C; CD40L/ nebo zůstaly bez restimulace (RPMI médium).

(a) Produkce IL-10 a IL-12 dendritickými buňkami (DC) 24h po restimulaci byla měřena metodou ELISA. (b) Exprese CD86, PDL-1 a ILT-3 po restimulaci v přítomnosti specifických inhibitorů byla měřena průtokovou cytometrií. (c) Restimulované tDC v přítomnosti specifických inhibitorů byly následně kultivované společně s alogeny T-lymfocyty. Proliferace byla měřena 6. den.

Data reprezentují průměr \pm SEM z alespoň 3 nezávislých experimentů. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (párový t-test).

4.1.2. Tolerogenní DC u pacientů s T1D

Cílem další práce bylo připravit tDC z krevních monocytů od pediatrických pacientů s T1D pomocí Dex a VitD2 v GMP protokolu. Následně analyzovat jejich fenotyp a funkční vlastnosti jako je schopnost indukovat T regulační buňky a navodit antigen-specifickou T buněčnou neodpovídavost. Zároveň nás zajímalo, zda odlišná metabolická kompenzace jednotlivých pacientů, a tedy hladina glykémie ovlivňuje fenotyp připravených tDC a jejich supresivní vlastnosti. **Výsledky práce byly publikovány v článku Dáňová et al., J Immunol 2017, IF 4,5 (254).**

4.1.2.1. tDC od pacientů s T1D vykazují inhibiční fenotyp a indukují antigen-specifickou autologní neodpovídavost T-lymfocytů v závislosti na stavu dlouhodobé kompenzace glykémie

Pacienti s T1D byli rozděleni do dvou skupin podle hladiny glykovaného hemoglobinu HbA1c (G1 a G2). Bylo zjištěno, že tDC připravené z krve pacientů s uspokojivou metabolickou kompenzací ze skupiny 1 vykazují vyšší povrchovou expresi inhibičních molekul PDL-1 a ILT-3 v porovnání s tDC připravených z krve pacientů s neuspokojivou mírou kompenzace glykémie (skupina 2), Obr. 15a. Povrchová exprese PDL-1 na tDC se signifikantně snižovala se zvyšující se hladinou HbA1c, Obr. 15b.

Poté jsme analyzovali schopnost tDC-pulzovaných GAD-65 (GAD65-tDC) připravených z krve diabetických pacientů a tDC-pulzovaných PPD (PPD-tDC) připravených z krve zdravých dárců

modulovat autologní T-lymfocytární odpověď pomocí analýzy proliferace T-lymfocytů a indukce Th1/Th17- lymfocytů. T-lymfocyty, které byly kultivované společně s antigenem stimulovanými tDC (u T1D pacientů i u zdravých dárců) vykazovaly nižší proliferaci a nižší produkci IFN- γ v porovnání s T-lymfocyty kultivovanými s antigenem stimulovanými cDC. Nebyl zaznamenán rozdíl mezi jednotlivými skupinami G1, G2 a zdravými dárci, Obr. 15c.

Naopak počet IL-17A produkujících CD4+ buněk byl signifikantně snížen u skupiny G1 a u zdravých dárců po kultivaci s antigenem-stimulovanými tDC, ale nikoliv u skupiny G2, Obr. 15c.

Pro detailnější analýzu jsme detekovali určené cytokiny ze supernatantu primární kultury GAD65-tDC/ cDC a autologních T-lymfocytů u G1 a G2. U G1 skupiny obsahoval supernatant s tDC signifikantně méně Th1-cytokinů (IFN- γ , TNF- α) i Th17-cytokinů (IL-17A, IL-9 a IL-23) a více protizánětlivého cytokinu IL-10 než supernatant z kultury T-lymfocytů a cDC, Obr. 15d. U G2 skupiny byla v supernatantu s tDC detekována také nižší produkce IFN- γ , TNF- α , IL-9 oproti supernatantu s cDC, ale nikoliv IL-23 a IL-17A.

Z uvedených dat vyplývá, že tDC u pacientů ze skupiny 1 (s optimální metabolickou kompenzací) jsou lépe schopny navodit neodpovídavost u autologních GAD65 reaktivních T-lymfocytů, doprovázenou větším snížením Th1- a Th17- cytokinů oproti tDC od pacientů ve skupině 2 (suboptimální metabolická kompenzace).

Překvapivě jsme zjistili i odlišnosti v základní charakteristice T-buněčné proliferace indukované cDC pulsovanými antigenem mezi skupinami pacientů G1 a G2. U optimálně kompenzovaných pacientů ze skupiny 1 vykazovaly CD4+ T-lymfocyty vyšší antigenně specifickou proliferaci a produkci IFN- γ a IL-17A po stimulaci GAD65-cDC, Obr. 15c. Na rozdíl od skupiny G2, kde CD4+ T-lymfocyty měly zvýšenou základní (antigenně-nezávislou) proliferaci i produkci IFN- γ a IL-17A, indukovanou cDC. Rozdíl v proliferaci lymfocytů indukovaných GAD65-cDC nebo nepulzovanými cDC byl u skupiny G2 výrazně nižší než u skupiny G1, Obr. 15c.

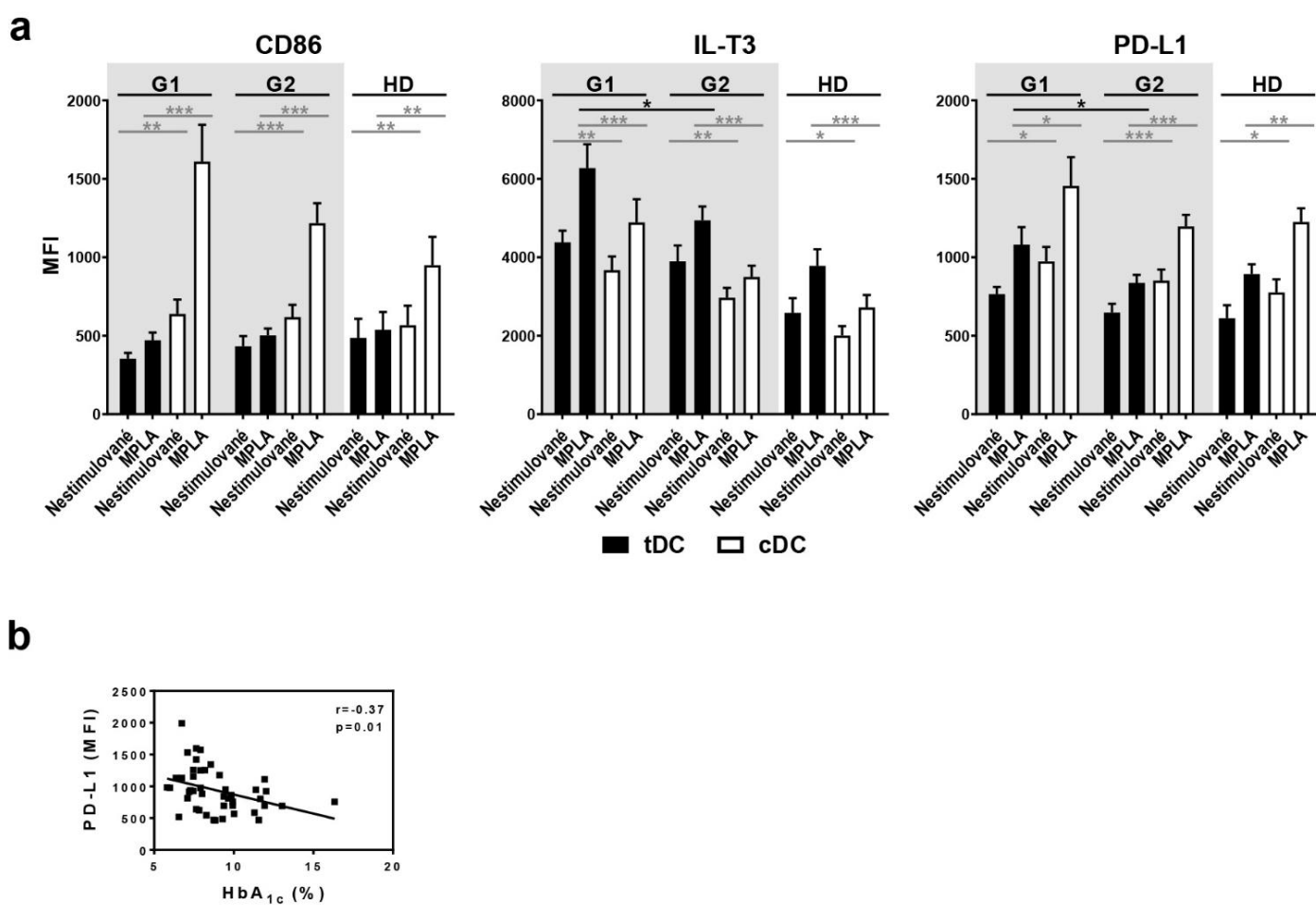
Zajímavé je, že bazální hladina IFN- γ produkovaná nestimulovanými T-lymfocyty byla vyšší u skupiny G2 oproti G1, Obr. 15d.

Korelační analýza ukázala negativní korelaci mezi antigenně specifickou odpovědí u CD4+ T-lymfocytů, stejně jako produkcí IFN- γ a IL-17A indukovanou GAD65-cDC a hladinou HbA1c.

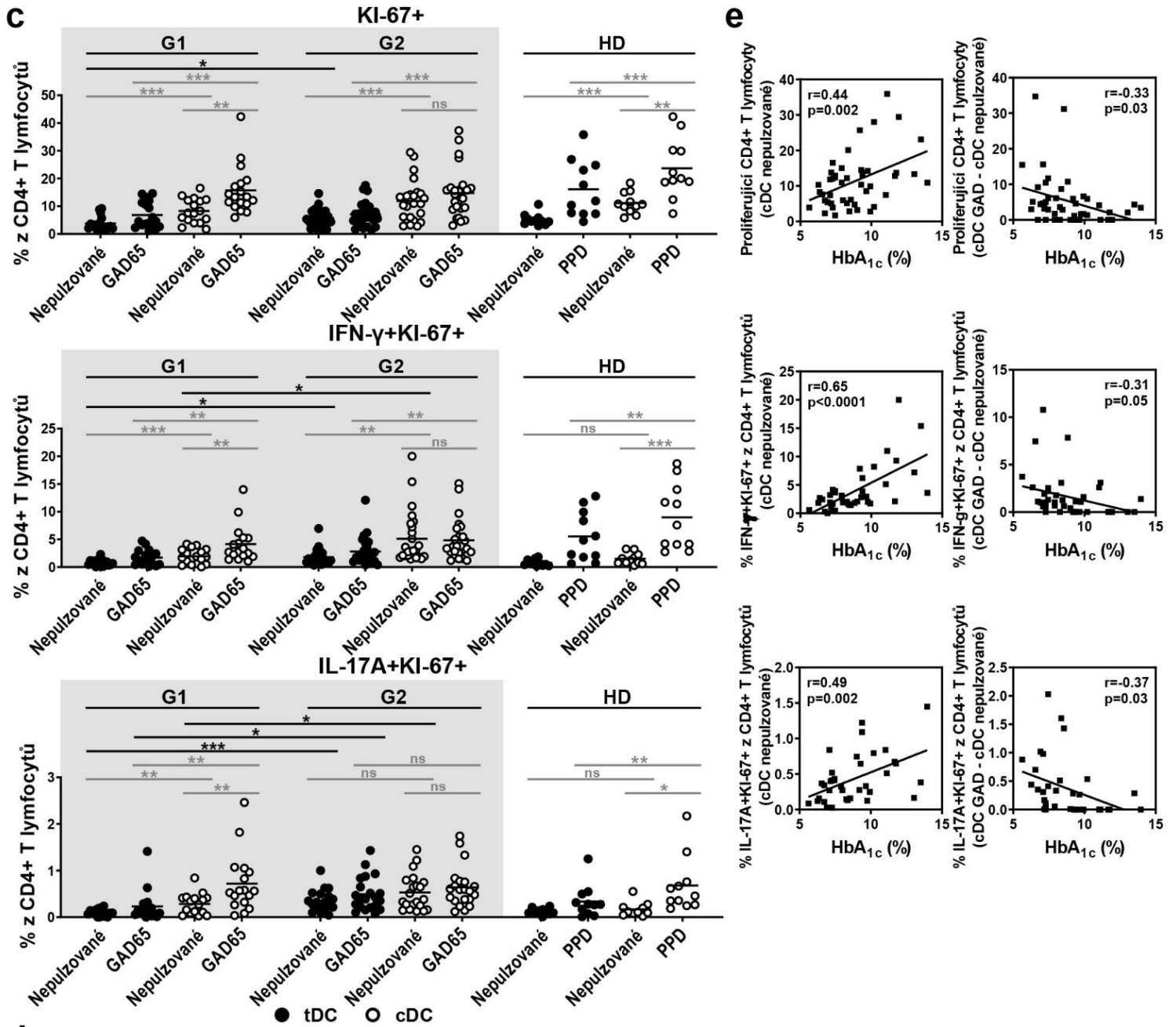
Pozitivní korelace byla mezi CD4+ proliferací, sekrecí IFN- γ a IL-17A indukovanou nepulzovanými cDC a hladinou HbA1c, Obr. 15e.

Data naznačují, že dlouhodobá hyperglykémie (reflektovaná jako hladina HbA1c) zvyšuje bazální proliferaci T-lymfocytů a negativně ovlivňuje GAD65 specifickou T-buněčnou odpověď po stimulaci cDC.

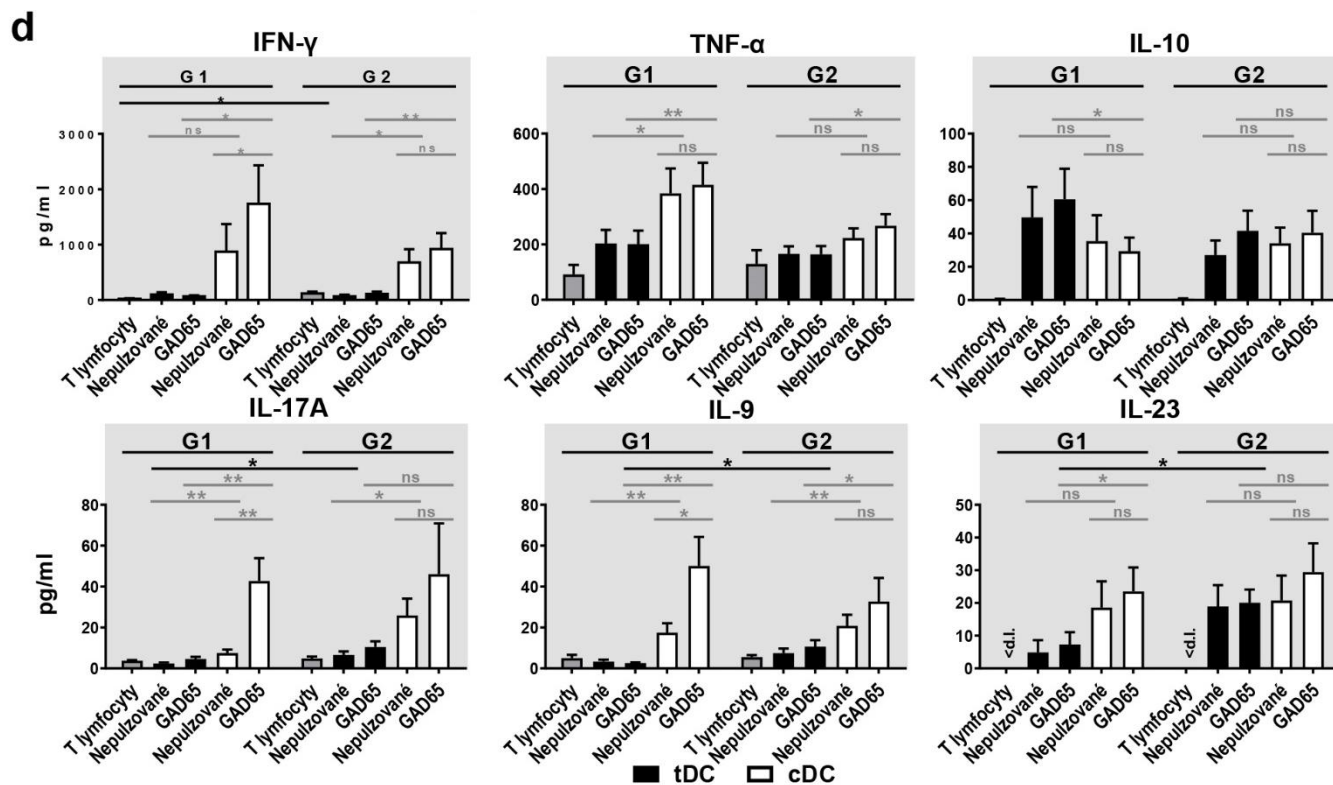
Obr. 15



Obr. 15 - pokračování



Obr. 15 - pokračování



Obr. 15: tDC vykazují inhibiční fenotyp a indukují antigen-specifickou autologní neodpověď T-lymfocytů v závislosti na dlouhodobé hladině glykémie

(a) Povrchová exprese CD86, IL-T3, a PD-L1 na nestimulovaných nebo MPLA-stimulovaných tDC (černé sloupce) nebo cDC (bílé sloupce) byla analyzována pomocí průtokové cytometrie. Data jsou ukázána jako MFI (medián intenzity fluorescence) \pm SEM alespoň z 10 nezávislých experimentů. G1 – skupina pacientů s optimální metabolickou kompenzací, n = 23; G2 skupina pacientů se suboptimální metabolickou kmpenzací (n= 50); HD – zdraví dárce (n= 11). (b) Korelační analýza exprese PD-L1 a hladiny glykovaného hemoglobinu HbA1c. Každý bod reprezentuje MFI hodnotu od jednotlivého subjektu. Hodnota r značí Pearsonův korelační index.

Analýza T-lymfocytární odpovědi indukované tDC/ cDC u pacientů s optimální metabolickou kompenzací – skupina G1(n = 18) a suboptimální metabolickou kompenzací - skupina G2 (n = 29), HD – zdraví dárce (n = 11). (c) Proliferace a procento IFN- γ +Ki-67+ T –lymfocytů a IL-17A+Ki-67+ T-lymfocytů z CD4+ T-lymfocytů, která byla indukovaná pomocí tDC/cDC. Tyto DC byly buď bez pulzace antigenem nebo pulzované antigeny (GAD65 nebo PPD–tDC (●)/ cDC (○)). Měřeno 6. den průtokovou cytometrií. Každý bod reprezentuje hodnotu od jednotlivého subjektu z 10 experimentů.

(d) Koncentrace cytokinů v supernatantu nestimulovaných T-lymfocytů (šedé sloupce) a stimulovaných T-lymfocytů pomocí nepulzovaných nebo GAD65-pulzovaných tDC (černé sloupce) nebo cDC (bílé sloupce).

Měřeno pomocí Luminox eseje. Skupina G1 (n = 20), G2 (n = 32). Data představují průměr ± SEM z alespoň 10 experimentů.

(e) Korelační analýza CD4⁺ T-lymfocytární odpovědi a hladiny HbA1c u T1D pacientů.

Korelace mezi procentem proliferujících T-lymfocytů, procentem IFN- γ +KI-67⁺ T-lymfocytů a procentem IL-17A+Ki-67⁺ T-lymfocytů, které byly indukovány pomocí nepulzovaných cDC a hladinou HbA1c (panel vlevo). Korelace mezi GAD65-specifickou proliferací T-lymfocytů, indukcí IFN- γ +KI-67⁺ T-lymfocytů nebo IL-17A+Ki-67⁺ T-lymfocytů z CD4⁺ T-buněk a hladinou HbA1c. Tato specifická proliferace byla stanovena jako % T-lymfocytů odpovídajících na stimulaci GAD65-cDC mínus % T-lymfocytů odpovídajících na stimulaci nepulzovanými cDC (panel vpravo). Ki-67, IFN- γ a IL-17A byly detekovány průtokovou cytometrií v den 6. Každý bod reprezentuje hodnotu od jednotlivého subjektu z 10 experimentů. Hodnota r značí Pearsonův korelační index.

*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001; ns – nesignifikantní; d.l. – below detection limit (nedetekovatelné)

4.1.2.2. Schopnost tDC navodit stabilní antigenně-specifickou neodpovídavost T-lymfocytů závisí na metabolickém stavu pacienta

Pro zjištění, zda tDC jsou schopny navodit stabilní antigenně specifickou neodpovídavost T-lymfocytů, byl proveden následující dvoukrokový experiment. Nejprve byly T-lymfocyty generované od pacientů s T1D kultivovány v primární kultuře s autologními GAD65-tDC nebo s GAD65-cDC po dobu 6 dní. Pro zjištění stabilní neodpovídavosti T-lymfocytů byly T-lymfocyty poté promyty, obarveny CFSE a následně restimulovány autologními GAD65-cDC.

Pro zjištění, zda je neodpovídavost T-lymfocytů antigenně specifická, byl proveden experiment, kdy T-lymfocyty z primární kultury byly vyjmuty, obarveny CFSE a následně stimulovány cDC pulzovanými jiným antigenem – PPD-cDC.

U zdravých dárců byl experiment proveden následovně: T-lymfocyty byly primárně kultivovány s autologními PPD-tDC nebo s PPD-cDC. Následně byly T-lymfocyty vyjmuty a restimulovány buď PPD-cDC (pro zjištění stability) nebo tetanovým toxoidem TT-cDC (pro zjištění Ag-specificity). Schéma experimentu je znázorněno na Obr. 8 (oddíl Metody).

Experiment byl proveden u následujících skupin – pacienti s uspokojivou metabolickou kompenzací (G1), pacienti s neuspokojivou metabolickou kompenzací (G2) a zdraví dárce (HD).

Jak je uvedeno na Obr. 16a. T-lymfocyty z primární kultury s GAD65-tDC, restimulované GAD65-cDC vykazovaly nižší proliferaci u pacientů z G1 skupiny než u pacientů z G2 skupiny.

Obdobně tyto T-lymfocyty vykazovaly nižší produkci IFN- γ a IL-17A, Obr. 16b. U skupiny G1, T-lymfocyty stimulované primárně GAD65-tDC vykazovaly při druhé stimulaci vyšší proliferaci na jiný antigen (při stimulaci PPD-cDC) než při stimulaci GAD-cDC. U skupiny G2 nebyly rozdíly v T-lymfocytární proliferaci při stimulaci odlišnými antigeny (GAD65-cDC a PPD-cDC) signifikantní.

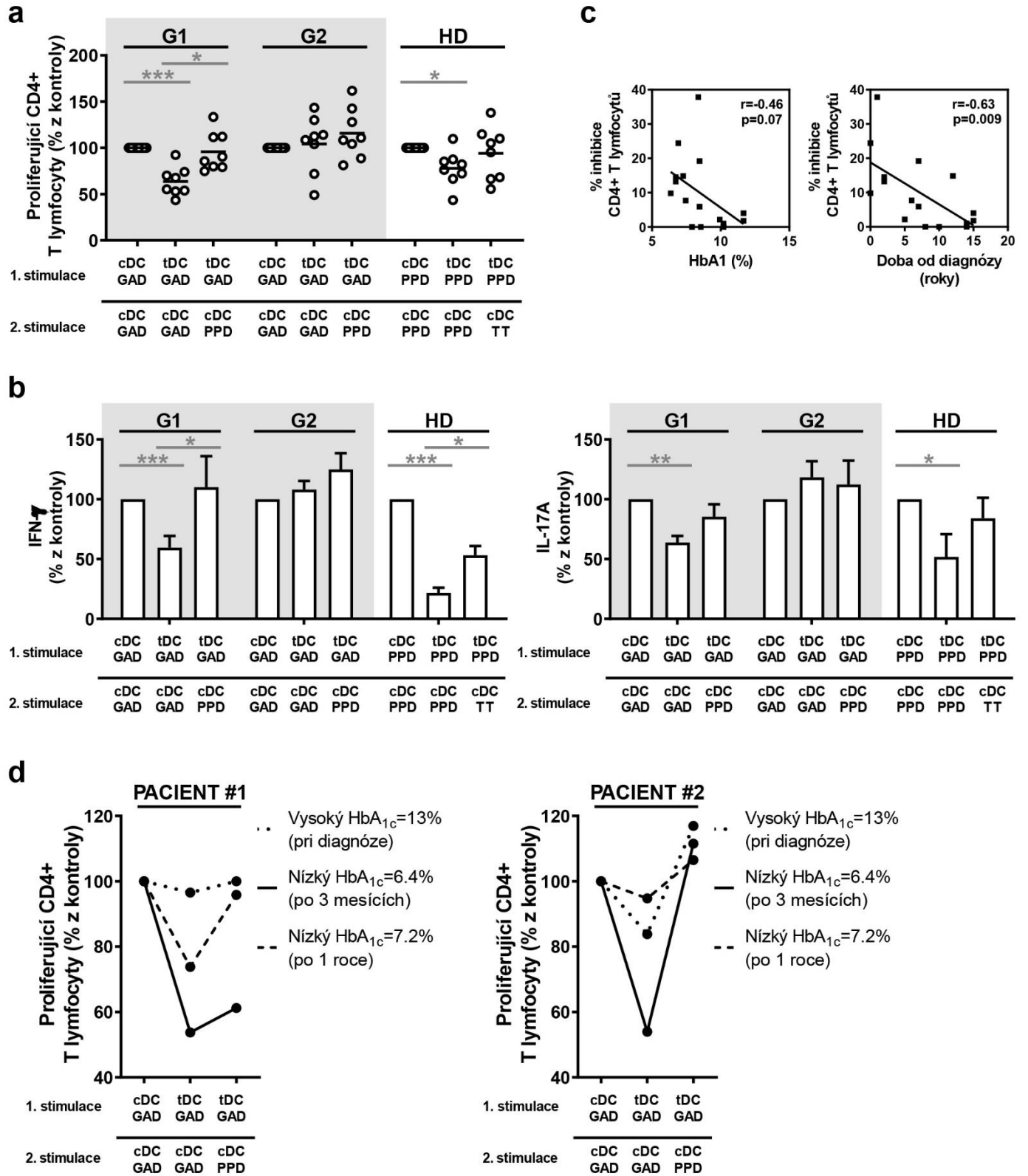
Zajímavé je, že schopnost tDC navodit stabilní Ag-specifickou T-lymfocytární neodpovídavost byla závislá na hladině HbA1c. Tato „tolerance“ T-lymfocytů ke GAD65 byla analyzována jako % proliferujících T-lymfocytů (primárně stimulovaných GAD65-cDC a následně GAD65-cDC) mínus % proliferujících T-lymfocytů (primárně stimulovaných GAD65-tDC a následně GAD65-cDC.) Tolerance jak CD4+ T-lymfocytů, tak i CD8+ lymfocytů ke GAD65 negativně korelovala s hladinou HbA1c i s délkou diagnózy T1D, Obr. 16c.

Z uvedeného vyplývá, že dlouhodobá hladina glykemie významně snižuje schopnost tDC navodit u T-lymfocytů stabilní Ag-specifickou neodpovídavost.

Tato schopnost je však reversibilní při změně dlouhodobé hladiny glykemie. U 2 pacientů byly generovány tDC a proveden stejný experiment ve 3 různých časech. Nejprve v době záchytu T1D, kdy hladina HbA1c byla u obou zvýšena, poté po 3 měsících od diagnózy, kdy byli oba pacienti uspokojivně kompenzováni a nakonec po 1 roce od diagnózy, kdy u 1. pacienta byla stále uspokojivá metabolická kompenzace, ale u 2. pacienta došlo ke zhoršení metabolických parametrů. Jak je uvedeno na Obr. 16d, tDC-navozená stabilní Ag-neodpovídavost T-lymfocytů byla největší u pacientů 3 měsíce po diagnóze, kdy měli uspokojivou metabolickou kompenzaci. Tato schopnost tDC však byla opět potlačena u 2. pacienta po 1 roce od diagnózy, kdy došlo k zhoršení kompenzace.

Souhrně tyto data naznačují, že dlouhodobá hyperglykemie negativně ovlivňuje tolerogenní fenotyp a funkci tDC a definování určité skupiny pacientů s T1D by mohlo mít zásadní vliv na potenciální terapii založenou na tolerogenních dendritických buňkách. Z dosavadních *in vitro* provedených experimentů se nejvhodnější jeví pacienti krátce po diagnóze s optimální metabolickou kompenzací. Při zohlednění patogeneze T1D by se však mohlo cílit i na pacienty v riziku, u kterých lze předpokládat rozvoj této choroby.

Obr. 16



Obr. 16: Indukce stabilní GAD65-specifické neodpovědi T-lymfocytů

(a) Proliferace T-lymfocytů detekovaná jako diluce CFSE. Každý bod reprezentuje hodnotu od jednotlivého subjektu z 5 experimentů. Proliferace T-lymfocytů stimulovaných nejprve GAD-cDC a následně také GAD-cDC byla stanovena jako hodnota 100% u T1D pacientů a analogicky stimulace PPD-cDC u zdravých dárců. Skupina s optimální metabolickou kompenzací G1 (n = 8), suboptimální metabolickou kompenzací G2 (n = 8), zdraví dárce –HD (n = 8). **(b)** Sekrece IFN- γ a IL-17A detekovaná v supernatantu Luminex esejí. Data představují průměr \pm SEM ze sekrece vypočítané jako % z kontrolní hodnoty 100% (stanovené jako proliferace T-lymfocytů stimulovaných nejprve GAD-cDC a následně také GAD-cDC u T1D pacientů a analogicky stimulace PPD-cDC u zdravých dárců). Průměr je stanoven z 5 experimentů.

(c) Korelační analýza hladiny HbA1c nebo doby od diagnózy s inhibicí proliferace (vypočítané jako % proliferujících T-lymfocytů stimulovaných GAD-cDC minus % proliferujících T-lymfocytů stimulovaných nejprve GAD-tDC a následně GAD-cDC). Každý bod reprezentuje hodnotu od jednotlivého subjektu. Hodnota r značí Pearsonův korelační index. **(d)** tDC byly vygenerovány a T-lymfocyty izolovány od 2 T1D pacientů ve 3 různých časech: při záchytu T1D a vysoké hladině HbA1c (pacient 1, HbA1c 13%; pacient 2, HbA1c 12%) a 3 měsíce potom, kdy hladina HbA1c byla v normě (pacient 1, HbA1c 6.4%; pacient 2, HbA1c 6.9%); a poté po 1 roce, kdy se hladina HbA1c u těchto 2 pacientů lišila (pacient 1, HbA1c 7.2%; pacient 2, HbA1c 9.7%). Byla analyzována schopnost GAD-tDC indukovat stabilní antigenně specifickou neodpověď. Data ukazují T-lymfocytární proliferaci detekovanou pomocí diluce CFSE. Každý bod reprezentuje hodnotu proliferace CD4+ buněk z celkových CD4+ buněk. Proliferace T-lymfocytů stimulovaných nejprve GAD-cDC a následně také GAD-cDC byla stanovena jako hodnota 100%.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

4.2. MDSC

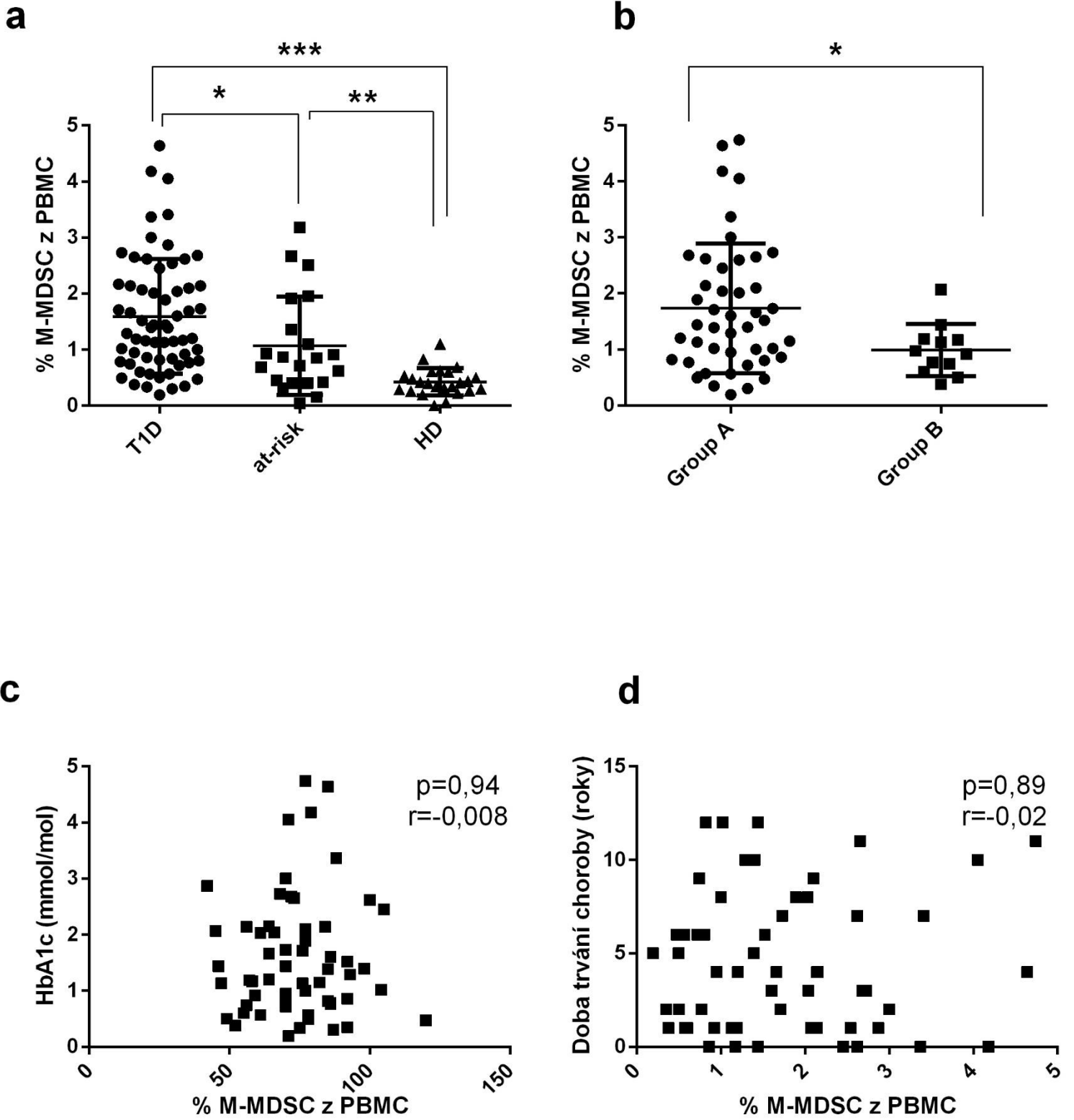
V této části práce jsem se zaměřila na analýzu a roli MDSC u diabetických pacientů a jejich prvostupňových příbuzných. Analyzovali jsme jejich fenotyp a funkční vlastnosti s ohledem na supresi T-lymfocytů a schopnost potlačit produkci prozánětlivých cytokinů a detailněji jsme analyzovali mechanismus, který MDSC využívají k navození imunologické suprese. **Výsledky práce byly publikovány v článku Grohová et al., PLoS One 2020, IF 3,2 (191).**

4.2.1. Charakteristika MDSC a jejich frekvence u pacientů s diabetem, jejich příbuzných a u zdravých dárců.

Pro analýzu MDSC byly odebrány vzorky krve od T1D, jejich prvostupňových příbuzných s pozitivními autoprotilátkami (at-risk) a od zdravých dárců. Nejprve jsme pomocí průtokové cytometrie analyzovali frekvenci CD14⁺ HLA-DR^{low/neg} CD11b⁺CD33^{high} M-MDSC z PBMC, čerstvě vyizolovaných z periferní krve jednotlivých subjektů. V porovnání se zdravými dárci, pacienti s T1D a stejně tak jejich příbuzní v riziku vykazovali znatelné zvýšení frekvence CD14⁺ HLA-DR^{low/neg} CD11b⁺CD33^{high} M-MDSC v periferní krvi, Obr. 17a.

Dále jsme posuzovali, zda dlouhodobá hyperglykemie má vliv na expanzi MDSC v periferní krvi, neboť chronické zvýšení hladiny glukózy v plazmě bylo popsáno jako silný prozánětlivý faktor (254, 314-317). Pacienti s T1D byli rozděleni do dvou skupin podle hladiny glykovaného hemoglobinu HbA1c na podkladě ADA (American Diabetes Association) (311). Frekvence M-MDSC byla signifikantně zvýšena u skupiny A zahrnující pacienty s HbA1c > 7.5% oproti skupině B zahrnující pacienty s HbA1c ≤ 7.5% , Obr. 17b. Nicméně, korelační analýza neprokázala závislost mezi frekvencí M-MDSC a hladinou glykovaného hemoglobinu, Obr. 17c. Podobně nebyla prokázána ani závislost mezi frekvencí M-MDSC a délkou trvání choroby, Obr.17d.

Obr. 17



Obr. 17: Frekvence MDSC v periferní krvi u T1D pacientů a jejich příbuzných a její vztah k dlouhodobé kompenzaci onemocnění a době trvání onemocnění

(a) Frekvence M-MDSC z PBMC u T1D pacientů (T1D, n= 63), jejich příbuzných (at risk, n=21) a zdravých dárců (HD, n=24) byla detekována průtokovou cytometrií. V porovnání se zdravými dárci, T1D pacienti i jejich příbuzní vykazovali signifikantní zvýšení frekvence M-MDSC v periferní krvi. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (Mann-Whitney test). (b) Pacienti s T1D byli rozděleni podle hladiny HbA1c; Skupina A, HbA1c of $> 7.5\%$ (n=52) a Skupina B, HbA1c of $\leq 7.5\%$ (n=12). Frekvence M-MDSC z PBMC byla signifikantně vyšší u skupiny A. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (Mann-Whitney test). (c) Korelační analýza mezi hladinou HbA1c a frekvencí M-MDSC z PBMC u T1D pacientů (n=58). Nebyla nalezena signifikantní korelace. Každý bod reprezentuje hodnotu pro jednotlivého pacienta. Hodnota r představuje korelační index podle Spearmanovy korelační analýzy. (d) Korelační analýza mezi frekvencí M-MDSC z PBMC u T1D subjektů (n=57) a časem od diagnózy. Žádná signifikantní korelace nebyla nalezena. Každý bod reprezentuje hodnotu pro jednotlivého pacienta. Hodnota r představuje korelační index podle Spearmanovy korelační analýzy.

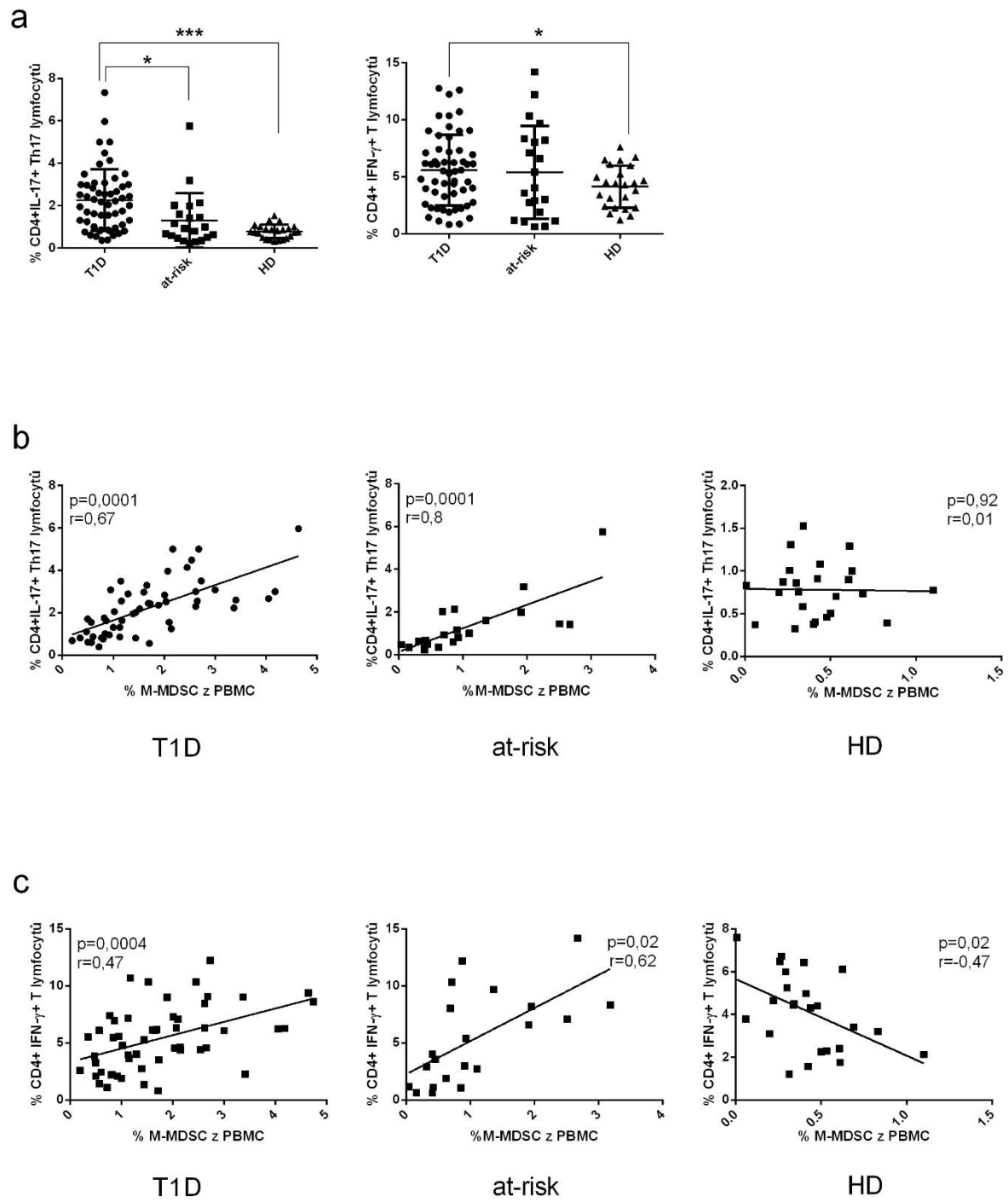
4.2.2. Frekvence M-MDSC pozitivně koreluje s frekvencí Th17- a IFN- γ -T-lymfocytů u diabetických pacientů a jejich příbuzných.

CD4⁺IL-17⁺ Th17 T-lymfocyty a CD4⁺IFN- γ ⁺ T – lymfocyty jsou popisovány jako důležité buňky v patogenezi T1D (318-320). Doposud však nebyl zkoumán vliv MDSC na tyto prozánětlivé T-lymfocyty. Proto jsme provedli analýzu, zda u subjektů zahrnutých v naší studii existuje korelace mezi frekvencí prozánětlivých T-lymfocytů (CD4⁺IL-17⁺ Th17 a CD4⁺ IFN- γ ⁺ T-lymfocytů) a frekvencí M-MDSC. Nejdříve jsme hodnotili frekvenci CD4⁺IL-17⁺ Th17 lymfocytů a CD4⁺IFN- γ ⁺ T-lymfocytů z PMBC od T1D pacientů, jejich příbuzných a od zdravých dárců. Jak je ukázáno na Obr.18a, u pacientů s T1D a jejich příbuzných byla zaznamenána signifikantní expanze CD4⁺IL-17⁺ Th17 lymfocytů v porovnání se zdravými dárci. Frekvence CD4⁺IFN- γ ⁺ T-lymfocytů byla také zvýšena u T1D pacientů a jejich příbuzných, ačkoliv signifikantní rozdíl byl prokázán pouze mezi HD a T1D pacienty. Následně jsme analyzovali, zda počet prozánětlivých T-lymfocytů závisí na M-MDSC neboť MDSC jsou spíše považovány za regulační buňky, které tlumí prozánětlivou odpověď. Byla provedena korelační analýza mezi frekvencí M-MDSC a frekvencí CD4⁺IL-17⁺ Th17- a CD4⁺IFN- γ ⁺ T-lymfocytů v PBMC. Překvapivě bylo zjištěno, že frekvence M-MDSC pozitivně koreluje s počtem CD4⁺IL-17⁺ Th17 buněk u pacientů s T1D a jejich příbuzných, nikoliv však u zdravých

dárců. Navíc byla zjištěna silná pozitivní korelace mezi frekvencí CD4⁺IFN- γ ⁺ T-lymfocytů a frekvencí M-MDSC u diabetických pacientů i jejich příbuzných v riziku. U zdravých dárců vykazovala analýza negativní korelaci mezi M-MDSC a CD4⁺IFN- γ ⁺ T-lymfocyty, Obr. 18b, c.

Tyto data naznačují vzájemnou souhru mezi prozánětlivými T-lymfocyty a M-MDSC v patogenezi T1D s reciproční expanzí M-MDSC v důsledku zánětlivého prostředí v organismu diabetických pacientů a jejich příbuzných v riziku. Přesto si však M-MDSC udržují svůj supresivní potenciál *in vitro*, jak je ukázáno v následujících experimentech.

Obr. 18



Obr. 18: Korelace mezi procentem M-MDSC a prozánětlivými T-lymfocyty

(a) Frekvence CD4⁺IL-17⁺ Th17-buněk a CD4⁺ IFN- γ ⁺ T-buněk z PBMC byla zvýšena u T1D pacientů (n=55) a jejich příbuzných (n=21) v porovnání se zdravými dárci (HD), (n=24). *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 (Mann-Whitney test). (b) Frekvence CD4⁺IL-17⁺ Th17-buněk silně korelovala s frekvencí M-MDSC z PBMC u T1D pacientů a jejich příbuzných. Žádná korelace nebyla nalezena mezi frekvencí M-MDSC a Th17-lymfocytů u zdravých dárců. Každý bod reprezentuje hodnotu pro jednotlivého pacienta. Hodnota r představuje korelační index podle Spearmanovy korelační analýzy. (c) Frekvence CD4⁺ IFN- γ ⁺ T-lymfocytů pozitivně korelovala s frekvencí M-MDSC v PBMC u T1D pacientů a jejich příbuzných. Naopak, mírná negativní korelace byla nalezena mezi frekvencí M-MDSC a CD4⁺ IFN- γ ⁺ T-lymfocytů u zdravých dárců. Každý bod reprezentuje hodnotu pro jednotlivého pacienta. Hodnota r představuje korelační index podle Spearmanovy korelační analýzy.

4.2.3. M-MDSC tlumí proliferaci T-lymfocytů ve vysokém poměru MDSC: T lymfocytům

Předchozí studie jiných autorů ukázala, že CD33⁺ MDSC expandované *in vitro* pomocí cytokinů u T1D pacientů a HD srovnatelně suprimovaly alogenní proliferaci T-lymfocytů, zatímco CD33⁺ MDSC přímo vyizolované z krve T1D pacientů vykazovaly snížené supresivní vlastnosti *in vitro* ve smyslu snížené schopnosti tlumit proliferaci T-lymfocytů vyizolovaných od zdravých dárců (302).

V naší studii jsme zjišťovali schopnost M-MDSC přímo vyizolovaných z krve od T1D pacientů tlumit autologní i alogenní proliferaci T-lymfocytů.

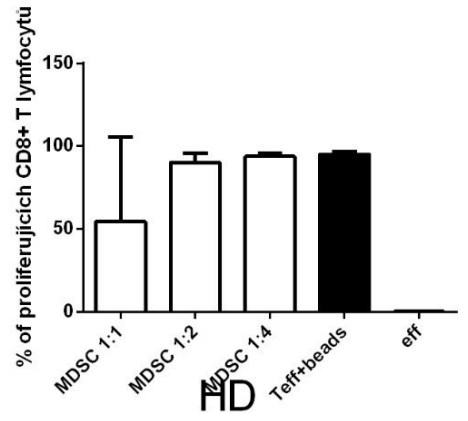
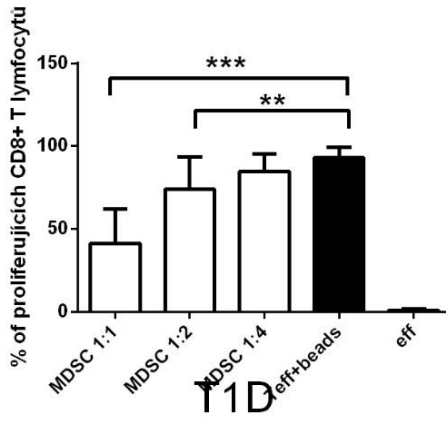
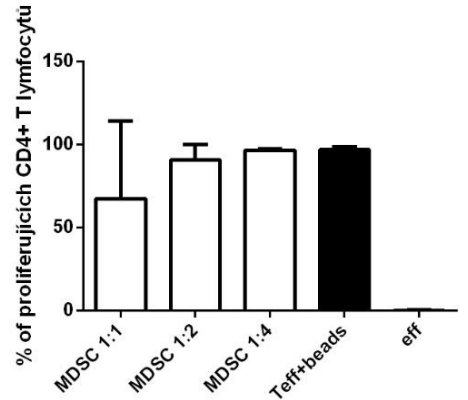
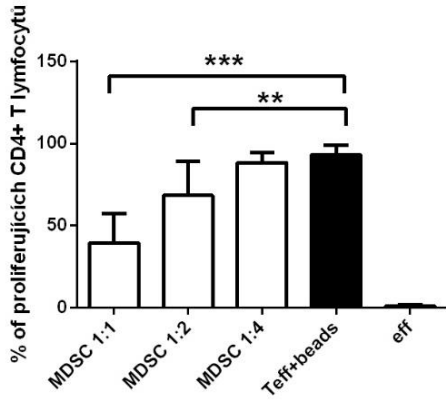
M-MDSC izolované pomocí sorteru z PBMC byly v různém poměru přidány ke kultuře autologních nebo alogenních T-lymfocytů (zahrnujících celou CD3⁺ populaci) aktivovaných pomocí anti-CD3/CD28 kuliček 1h před přidáním M-MDSC. Zatímco M-MDSC od zdravých dárců vykazovaly pouze marginální efekt na autologní T-lymfocytární proliferaci, M-MDSC od T1D pacientů signifikantně inhibovaly proliferaci autologních CD4⁺ i CD8⁺ T-lymfocytů v závislosti na jejich vzájemném poměru.

Nejúčinněji M-MDSC inhibovaly proliferaci v poměru 1:1 MDSC: T cell. (kdy maximální suprese byla okolo 50%). Inhibiční efekt M-MDSC v poměru 1:4 MDSC: T cell již nebyl patrný, Obr. 19a.

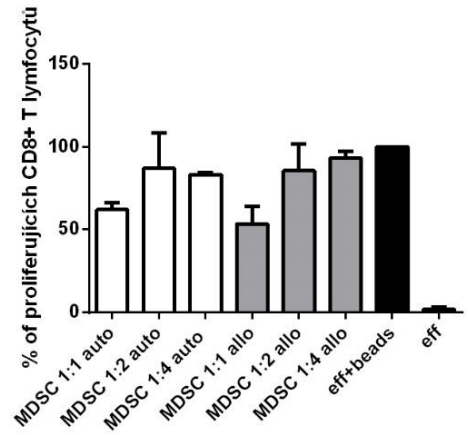
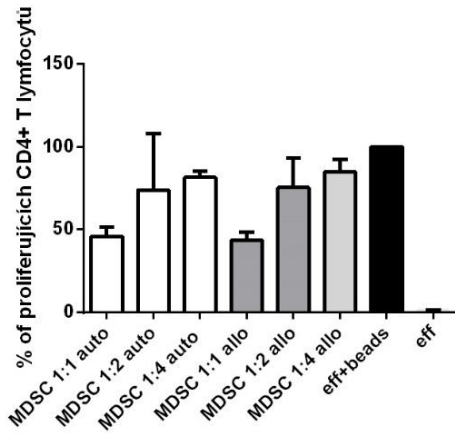
Stejně jak v autologním systému, byla i proliferace alogenních CD4+ a CD8+ T-lymfocytů snížena přidáním M-MDSC vyizolovaných z krve T1D pacientů v závislosti na jejich vzájemném poměru, Obr.19b.

V souladu s faktem, že M-MDSC snižují proliferaci CD4+ a CD8+ T-lymfocytů, byla v kultuře snížena i hladina T-buněčných cytokinů IFN- γ a IL-17. Tyto cytokiny byly analyzovány ze supernatantu pomocí metody ELISA. Ke signifikantnímu snížení hladiny obou prozánětlivých cytokinů došlo u T1D pacientů při kultivaci aktivovaných autologních T-lymfocytů a M-MDSC v poměru 1:1. Jak jsme očekávali na základě experimentu s T-buněčnou proliferací, u zdravých dárců neměly M-MDSC efekt na snížení prozánětlivých cytokinů v kultuře s autologními T-lymfocyty, Obr. 19c.

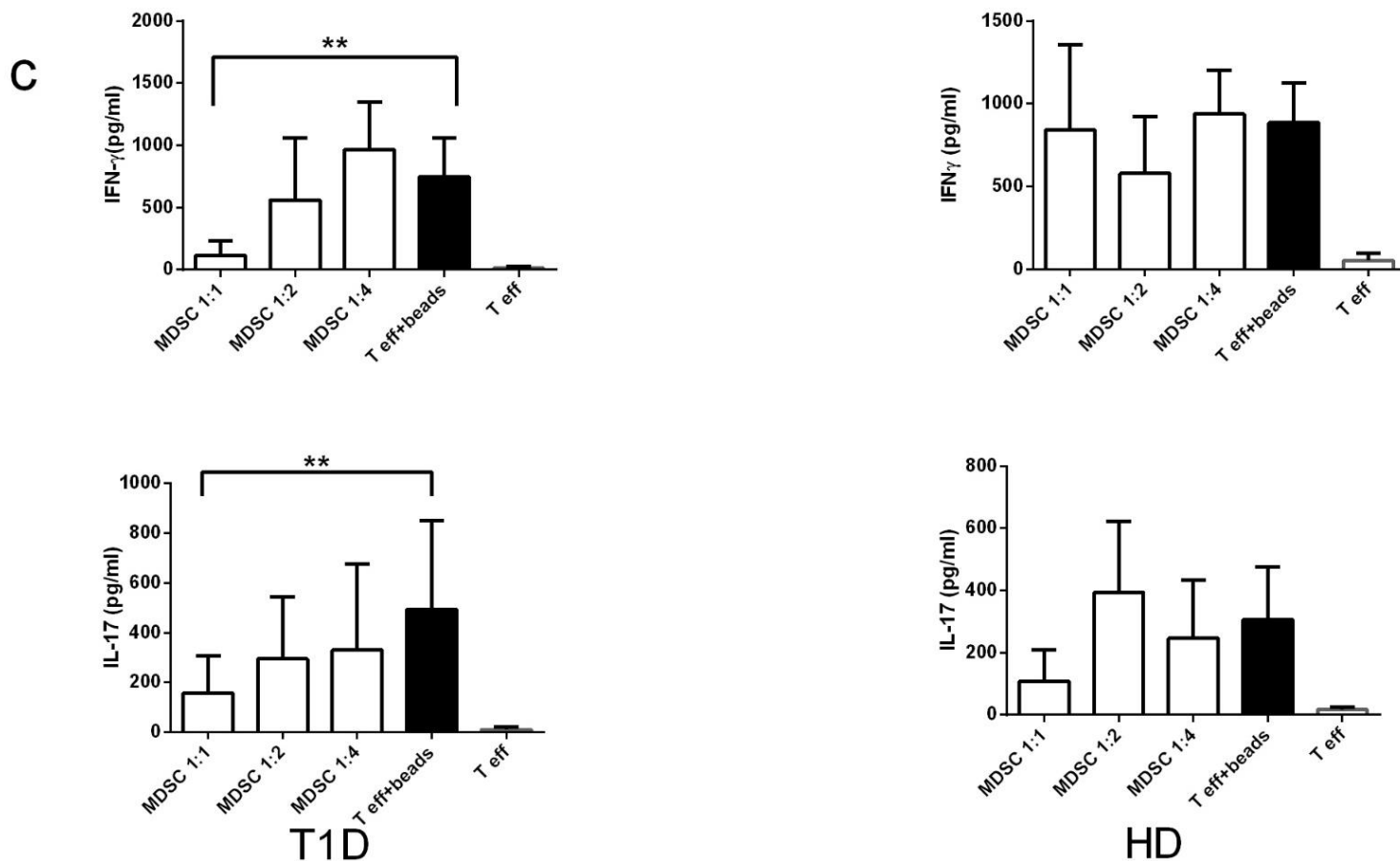
a



b



Obr. 19 - pokračování



Obr. 19: M-MDSC od T1D pacientů suprimují CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytární proliferaci a produkci prozánětlivých cytokinů

(a) M-MDSC vysortované z PBMC od T1D pacientů (n=15) a zdravých dárců (HD) (n=3) byly kultivovány společně s autologními CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty aktivovanými pomocí antiCD3/CD28 kuliček. M-MDSC od T1D pacientů signifikantně inhibovaly proliferaci T-lymfocytů v závislosti na jejich dávce. Poměr MDSC/ T cell 1:1 byl neefektivnější, zatímco inhibiční efekt byl ztracen při poměru 1:4. M-MDSC od zdravých dárců měly pouze nepatrný efekt na T-lymfocytární proliferaci. *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 (párový t-test). (b) Vysortované M-MDSC od T1D pacientů (n=2) byly kultivovány společně s autologními/ alogenními T-lymfocyty v definovaném poměru (1:1, 1:2 and 1:4). M-MDSC suprimovaly stejně proliferaci jak autologních, tak alogenních CD4⁺ T- i CD8⁺ T-lymfocytů v závislosti na jejich vzájemném poměru. (c) Koncentrace prozánětlivých T-buněčných cytokinů (IFN- γ a IL-17) byla měřena metodou ELISA ze supernatantů kultury aktivovaných autologních T-lymfocytů a odpovídajících M-MDSC. Produkce IFN- γ ⁺ a IL-17 byla signifikantně snížena při poměru 1:1 u T1D pacientů (n=15). Žádný signifikantní rozdíl nebyl nalezen u zdravých dárců (n=3). *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 (párový t-test).

4.2.4. M-MDSC potřebují k supresi T-lymfocytů mezibuněčný kontakt a také produkci TGF- β

Supresivní vlastnosti MDSC jsou obecně připisovány produkci arginázy-1, indukci iNOS a ROS a produkci TGF- β a IL-10 (275, 321-323). Většina těchto studií byla provedena na myších modelech nebo na MDSC izolovaných od pacientů s nádorovým onemocněním. Doposud bylo publikováno jen málo dat, zaměřujících se na mechanismus, který využívají MDSC při supresi T-lymfocytů, přímo izolované od pacientů s autoimunitním onemocněním.

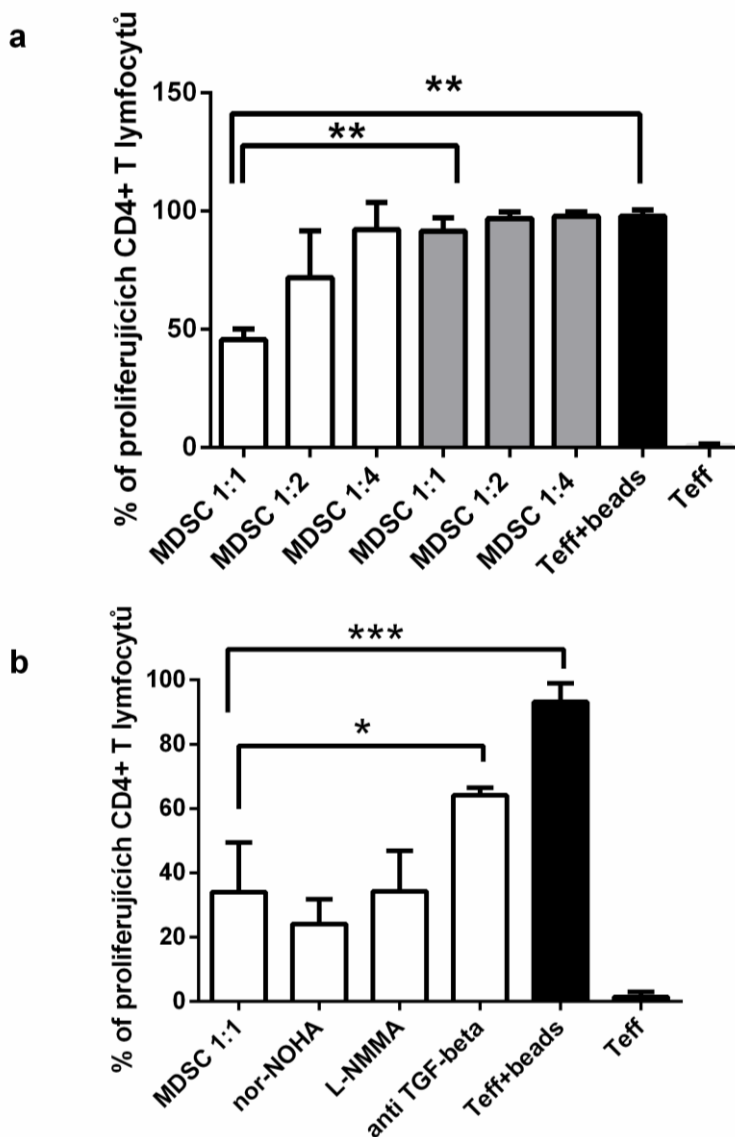
V naší práci jsme jako první podrobně analyzovali mechanismus, kterým nativní M-MDSC získané z periferní krve od diabetických pacientů pomocí sorteru, používají k zajištění suprese T-lymfocytů.

Nejprve jsme zjišťovali, zda suprese mediovaná M-MDSC vyžaduje přímý buněčný kontakt s T-lymfocyty. K tomuto účelu jsme použili dvoukomorový “transwell” system, obsahující “transwellový insert”. Do dolní komory byly přidány autologní T-lymfocyty (aktivované pomocí CD3/CD28) a M-MDSC získané pomocí sorteru byly přidány do horní komory v definovaném poměru (1:1, 1:2 a 1:4). T-lymfocytární proliferace byla měřena jako diluce CFSE na průtokovém cytometru. Tímto experimentem jsme zjistili jasnou závislost M-MDSC mediované suprese na mezibuněčném kontaktu. Jak je uvedeno na Obr. 20a, schopnost M-MDSC tlumit proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů byla v poměru 1:1 a při provedení transwellové eseje byla v tomto poměru ztracena.

Tato data podporují hypotézu, že mezibuněčný kontakt je nezbytný pro MDSC, aby naplnily svůj supresivní potenciál.

Dále jsme analyzovali, zda je pro supresivní funkci M-MDSC důležitá produkce iNOS, TGF- β a arginázy-1. Jak je uvedeno na Obr. 20b., T-lymfocyty byly kultivovány společně s autologními M-MDSC a aktivovány pomocí CD3/CD28 kuliček. Následně byly ke kultuře přidány specifické inhibitory v definovaném množství, a to L-NMMA – iNOS inhibitor, anti-TGF- β mAb a Nor-NOHA – argináza -1 inhibitor. Proliferace T-lymfocytů byla analyzována jako diluce CFSE na průtokovém cytometru. Suprese CD4⁺ T-lymfocytů pomocí M-MDSC byla signifikantně závislá na produkci TGF- β a zdá se být nezávislá na produkci iNOS a arginázy-1.

Obr. 20



Obr.20: M-MDSC suprese T-buněčné odpovědi závisí na mezibuněčném kontaktu a produkci TGF- β

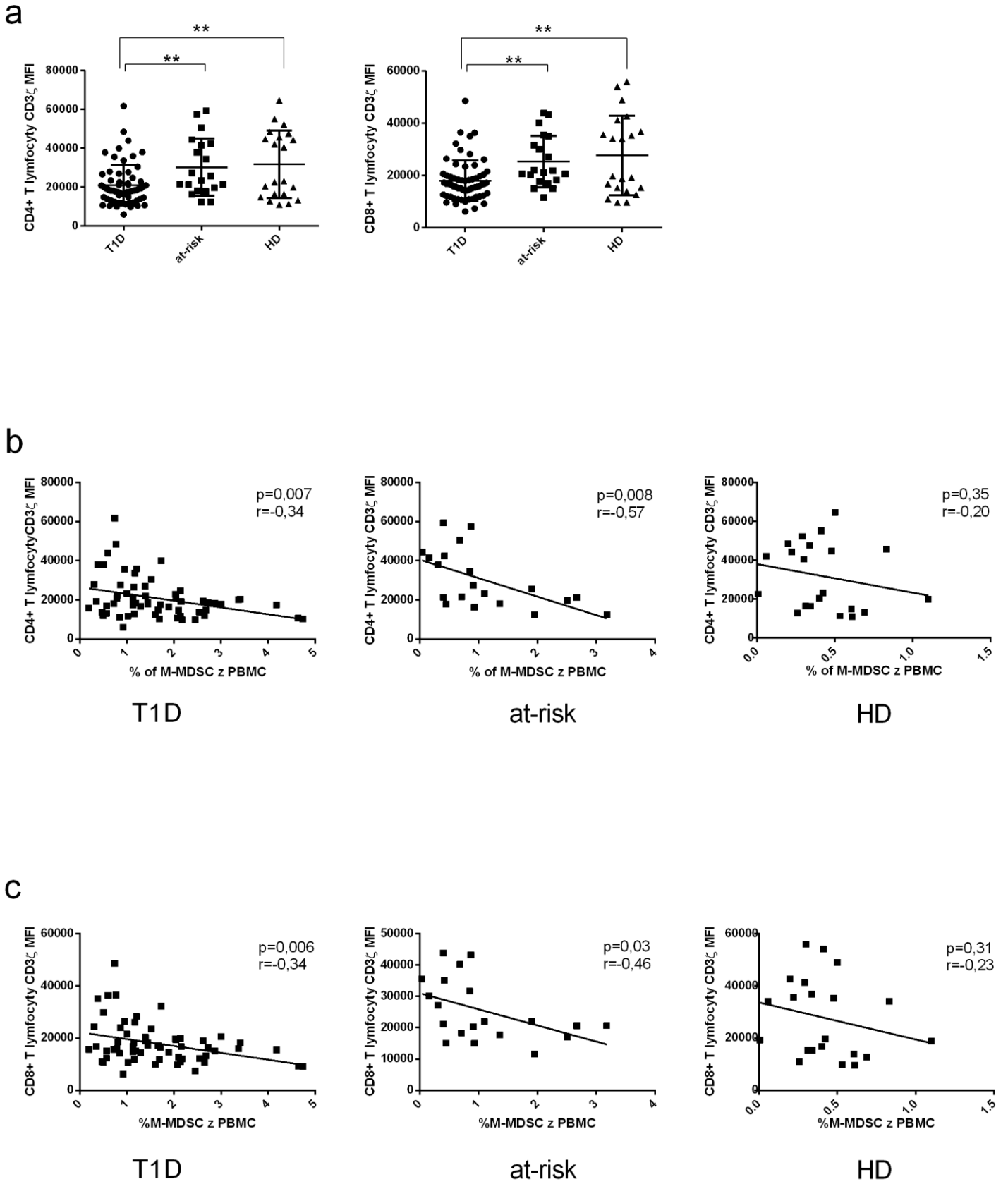
(a) U T1D pacientů byla provedena autologní kultura CD4⁺ T-lymfocytů a vysortovaných M-MDSC v definovaném poměru (T cell: M-MDSC 1:1, 1:2 and 1:4), (n=4) za použití dvoukomorového transwell systému (šedé sloupce) a bez něj (bílé sloupce). Suprese proliferace CD4⁺ T-lymfocytů byla signifikantní pouze v modelu bez transwell systému, a to v poměru 1:1. Černé sloupce ukazují kontrolní proliferaci T-efektorových lymfocytů (eff) aktivovaných pomocí anti-CD3/CD28 kuliček a bez aktivace. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (párový t-test).

(b) CD4⁺ T-lymfocyty byly kultivovány společně s autologními M-MDSC T1D pacientů (n=4). Specifické inhibitory byly přidány, Nor-NOHA – argináza-1 inhibitor, L-NMMA – iNOS inhibitor a anti-TGF- β mAb. Suprese proliferace T-lymfocytů byla signifikantně závislá na TGF- β a zdá se být nezávislá na iNOS a argináze - 1. Černé sloupce reprezentují kontrolní proliferaci T-efektorových lymfocytů (eff) aktivovaných anti-CD3/CD28 kuličkami nebo bez aktivace. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (párový t-test).

4.2.5. Frekvence M-MDSC negativně koreluje s expresí CD3 ζ řetězce na T-lymfocytech u diabetických pacientů a jejich příbuzných

Další mechanismus, který používají M-MDSC k zajištění imunologické suprese je snižování CD3 ζ exprese na T-lymfocytech (324). Proto jsme pomocí průtokové cytometrie analyzovali expresi CD3 ζ na T-lymfocytech vyizolovaných z PBMC od diabetických pacientů, jejich příbuzných a zdravých dárců.

CD3 ζ exprese na T-lymfocytech byla signifikantně snížena u diabetických pacientů v porovnání se skupinou rizikových příbuzných a se zdravými dárci, Obr. 21a. Byla zjištěna i jasná negativní korelace mezi procentem M-MDSC v PBMC a expresí CD3 ζ na CD4⁺ T-lymfocytech, a to jak u diabetických pacientů, tak i u jejich rizikových příbuzných a zdravých dárců. Statisticky významná negativní korelace mezi M-MDSC a CD3 ζ expresí na CD8⁺ T-lymfocytech byla patrná jen u pacientů s T1D, ale nikoliv u rizikových příbuzných a zdravých dárců, přestože byl zaznamenán podobný trend, Obr. 21b, c.



Obr.21: Supresivní aktivita M-MDSC je asociována se snížením CD3 ζ exprese na T-lymfocytech

(a) Down-regulace CD3 ζ na CD4⁺ a CD8⁺T-lymfocytech byla patrna u T1D pacientů (n=63) v porovnání s jejich příbuznými (at-risk), (n=20) a zdravými dárči (HD), (n=21). *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 (Mann-Whitney test). (b, c) Korelační analýza mezi frekvencí M-MDSC a expresí CD3 ζ na CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytech u T1D pacientů, příbuzných (at-risk) a zdravých dárců (HD). Jasná negativní korelace byla patrna mezi frekvencí M-MDSC a CD3 ζ expresí na CD4⁺ T-lymfocytech u T1D pacientů, jejich příbuzných i u zdravých dárců. Statisticky signifikantní negativní korelace mezi M-MDSC a CD3 ζ expresí na CD8⁺ T-lymfocytech byla patrna jen u T1D pacientů, nikoliv u jejich příbuzných ani u zdravých dárců, přestože byl podobný trend. Každý bod reprezentuje hodnotu pro jednotlivého pacienta. Hodnota r představuje korelační index podle Spearmanovy korelační analýzy.

4.2.6. M-MDSC izolované od pacientů s T1D vykazovaly nižší schopnost tlumit proliferaci T-lymfocytů než M-MDSC izolované od pacientů s nádorovým onemocněním

V nedávné době bylo provedeno mnoho studií zaměřujících se na mechanismy, které využívají MDSC k tlumení protinádorové imunity. MDSC suprimují antigenně specificky protinádorovou imunitu pomocí interakce s T-regulačními lymfocyty (Tregs), zvyšují také produkci IL-10 u T-lymfocytů a snižují produkci IFN- γ (259, 325, 326). Mnohem méně je však známo o jejich roli a mechanismu působení u pacientů s autoimunitními chorobami, včetně diabetu 1. typu. (285, 302).

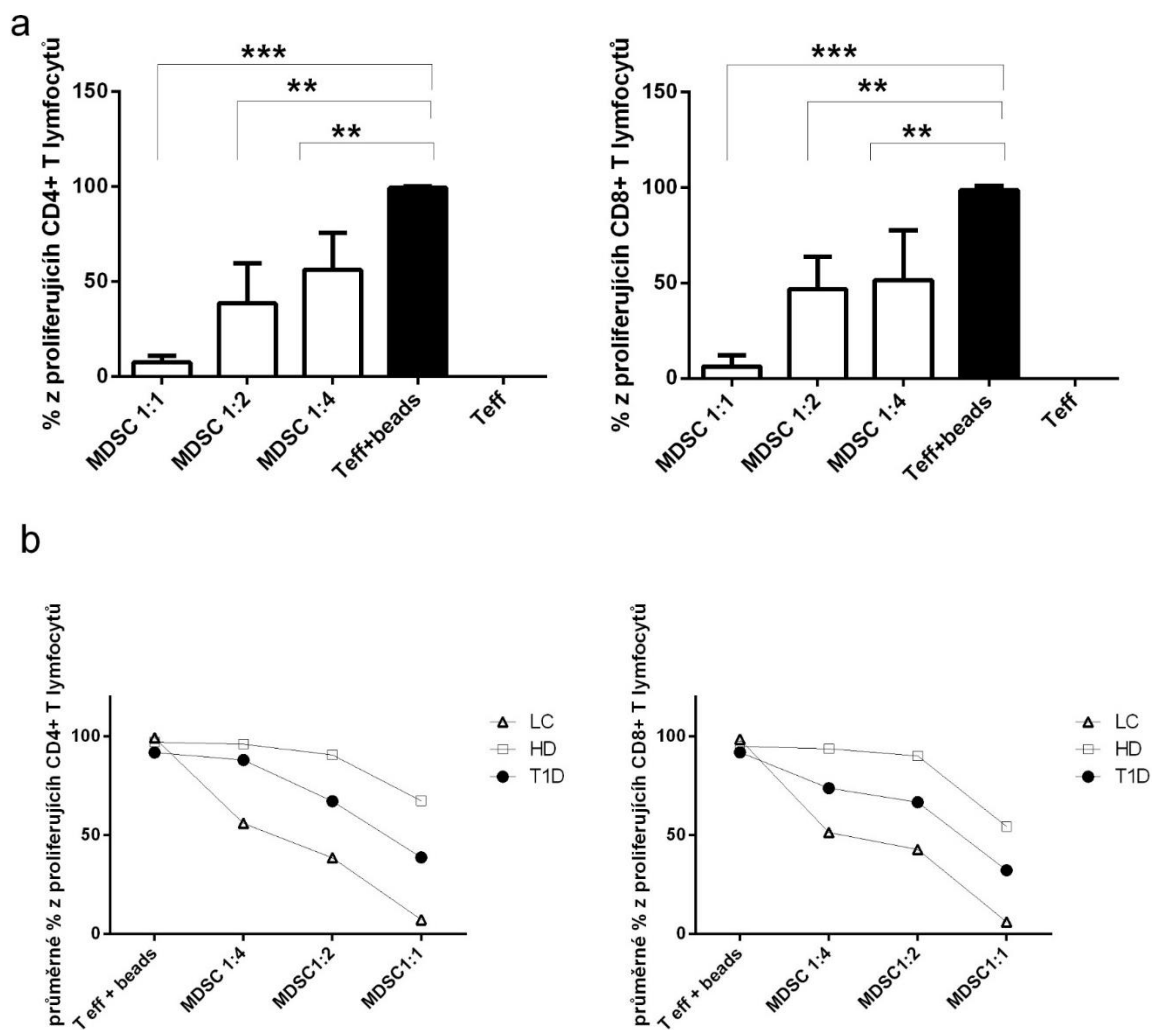
Z našich dosavadních dat vyplývá, že MDSC u diabetiků vykazují supresivní vlastnosti a k zajištění T-lymfocytární suprese využívají produkci TGF- β a mezibuněčný kontakt. Položili jsme si otázku, zda tyto M-MDSC izolované přímo od pacientů s T1D jsou stejně schopné tlumit proliferaci T-lymfocytů jako M-MDSC vyizolované od pacientů s nádorovým onemocněním.

Provedli jsme experiment, kdy jsme společně kultivovali T-lymfocyty s vyizolovanými CD14⁺ HLA-DR^{low/neg} CD33^{high} M-MDSC od pacientů s T1D, pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic a od zdravých dárců v definovaném poměru (MDSC/ T cell 1:1, 1:2 a 1:4).

V souladu s předchozími výsledky jsme zaznamenali u diabetických pacientů signifikantní supresi T-lymfocytů po přidání M-MDSC v definovaném poměru (MDSC/ T cell poměr 1:1 byl nejefektivnější, zatímco inhibiční efekt M-MDSC byl ztracen v poměru 1:4, jak je uvedeno na

Obr. 19a.) Nicméně tato inhibice byla slabší, než jsme zaznamenali u M-MDSC vyizolovaných od pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic, kde MDSC byly schopné účinně tlumit proliferaci T-lymfocytů i při poměru 1:4 (M-MDSC/ Tcells). Supresivní efekt M-MDSC vyizolovaných od zdravých dárců byl zanedbatelný, Obr. 22.a, b.

Obr. 22



Obr. 22: M-MDSC od pacientů s karcinomem plic mají největší supresivní vliv na proliferaci T-lymfocytů

(a) M-MDSC vysortované z PBMC od pacientů s karcinomem plic (n=4) byly kultivovány společně s autologními CD4⁺ T a CD8⁺ T lymfocyty. M-MDSC signifikantně inhibovaly T-lymfocytární proliferaci v závislosti na jejich vzájemném poměru, kdy poměr T cell/MDSC 1:1 byl nejefektivnější. *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 (párový t-test).

(b) Srovnání mezi M-MDSC potenciálem tlumit T-lymfocytární proliferaci u T1D pacientů (●), pacientů s karcinomem plic, LC (Δ) a zdravých dárců, HD (□). Kultivace M-MDSC a CD4⁺ / CD8⁺ T-lymfocytů byla provedena v následujících poměrech (M-MDSC/ T lymfocyty 1:1, 1:2, 1:4) a byly porovnány mezi sebou jednotlivá procenta proliferujících buněk. Nejvíce supresivní potenciál byl patrný u M-MDSC izolovaných od pacientů s karcinomem plic.

Z uvedených dat vyplývá, že M-MDSC mají zřejmou roli při autoimunitních onemocněních, zde konkrétně u T1D. Jejich zvýšená frekvence byla zejména u pacientů s neuspokojivou dlouhodobou kompenzací hladiny glukózy. Frekvence M-MDSC pozitivně korelovala s frekvencí prozánětlivých lymfocytů, což může být dáno jejich vzájemnou indukcí. Přes zvýšené množství M-MDSC u diabetických pacientů a u jejich příbuzných si však tyto buňky udržují svůj supresivní potenciál a tato vlastnost je závislá na mezibuněčném kontaktu a produkci TGF-β. Ačkoliv M-MDSC vy izolované od pacientů s nádorovým onemocněním vykazovaly vyšší potenciál ve snížení proliferace T-lymfocytů, z našich dat vyplývá, že M-MDSC u T1D pacientů mají supresivní fenotyp a mohly by být využity jako nástroj v buněčné terapii autoimunitních chorob.

5. Diskuze

Autoimunitní choroby vznikající na podkladě narušení imunitní homeostázy jsou v současné době značným problémem zasahujícím do zdraví a kvality života mnohých pacientů. Velmi vhodnou terapeutickou strategií by bylo zaměřit se přímo na kauzální léčbu imunopatogenního stavu, neboť dosavadní terapie je zaměřená spíše na nespecifickou imunosupresi či suplementaci chybějících hormonů z poškozených tkání. Data z recentních studií naznačují, že buněčná terapie u autoimunitních chorob je bezpečná, nicméně přes její dílčí úspěchy má několik problematických aspektů.

Jako jeden z hlavních problémů se jeví schopnost navození permanentní imunologické suprese (173, 327, 328). V naší práci jsme prokázali, že jak tDC, tak MDSC vykazují inhibiční fenotyp a jsou schopny tlumit proliferaci T-lymfocytů. Nicméně tato vlastnost je v závislosti na jejich vzájemném poměru. Určení optimální dávky imunoregulačních buněk je tedy jednou z otázek budoucích studií. Například studie Zubizarreta et al. zaměřená na terapii MS pomocí dexamethasonem-indukovaných tDC poukázala na technickou limitaci při eskalaci dávek tDC k *i.v.* podání. Nejvýše plánované množství tDC (300×10^6) nebylo možné podat kvůli nedostatku buněk získaných z leukaferézy (329). Zároveň i cesta podání buněk, jejich schopnost migrace a životnost v organismu jsou významné proměnné faktory mající vliv na účinnost buněčné terapie. Např. při intra-dermálním či subkutánním podání byla prokázána dobrá migrace DC do regionálních uzlin, nicméně tato strategie vyžaduje podání vysokého množství buněk v malém objemu, což může ovlivnit přežití buněk (330-334).

Jako klíčové pro zavedení buněčné terapie do klinické praxe se jeví stabilita regulačních buněk (335). Tyto buňky nesmí pod vlivem zánětlivých faktorů v organismu maturovat, jinak by mohlo dojít ke zhoršení základní choroby. U tDC je možnost antigeně specifické terapie, u které nehrozí nežádoucí účinky z celkové imunosuprese. Antigení specifita má však také svoje nevýhody. T1D je polyklonální autoimunitní onemocnění s vícečetnými T-lymfocytárními epitopy. Proto může být limitací správný výběr konkrétních autoantigenů u jednotlivých pacientů.

Z pohledu současné imunoterapie T1D ustupuje buněčná terapie lehce do pozadí díky moderním rekombinantním technologiím. Tyto postupy nevyžadují tak náročnou přípravu jako buněčné vakcíny. Některé technologické procesy jsou velikou výzvou v terapii T1D, a dokonce

postoupily do dalších fází klinického testování. Velmi nadějnou strategií je vyvinutí imunotopu – modifikovaného peptidu, který generuje β -buněčné antigenně specifické cytolytické CD4+ T-lymfocyty. Tyto cytolytické CD4+ T-lymfocyty jsou schopny přesně eliminovat APC, které aktivují patogenní lymfocyty zodpovědné za zničení vlastní tkáně. Patogenní T-lymfocyty aktivované jinými epitopy na stejné APC jsou také zničeny díky těmto cytolytickým CD4+ lymfocytům v rámci bystander efektu. S touto molekulou nyní probíhá 2. fáze klinické studie u pacientů s T1D (NCT04524949). Na myším modelu se dále úspěšně testuje strategie využívající imunologické check-pointy. β -buňky jsou upraveny *in situ* pomocí biochemické “click reakce”, kdy dojde k navázání PD-L1 ligandu na povrch β -buněk. Na tomto modelu došlo k navození antigenně specifické tolerance (336). Tyto recentní strategie by mohly pomoci v budoucnu více zacílit terapii u konkrétních jedinců a tím zlepšit její účinnost s minimem nežádoucích účinků (337).

V následující části práce budu diskutovat výsledky z našich experimentů zaměřených zejména na stabilitu tDC a na detailnější analýzu tDC a MDSC u pacientů s T1D. Tato část diskuze bude z důvodu přehlednosti rozdělena do dvou částí, kde v první se budu věnovat tDC a v druhé části pojednám o problematice MDSC a jejich funkčních vlastnostech u diabetických pacientů.

5.1. Tolerogenní DC

5.1.1. Stabilita tDC

Jak již bylo uvedeno, tDC mohou nabízet terapeutickou možnost pro znovunavození imunologické tolerance u autoimunitních chorob. tDC vykazují nezralý/semi-maturovaný fenotyp charakterizovaný nízkou expresí kostimulačních molekul a MHC molekul a odlišným cytokinovým profilem oproti cDC. Prezentace nízké hladiny antigenů bez kostimulačních molekul vede k anergii T-lymfocytů a spolu s regulačními cytokiny indukuje diferenciaci T-regulačních lymfocytů (338).

Ačkoliv bylo popsáno více protokolů na generaci tDC pouze několik splňuje požadavky správné výrobní praxe s možností klinické aplikace. Boks et al. ve své práci srovnával jednotlivé protokoly výroby tDC (VitD3, dexamethason, TGF- β , rapamycin, a IL-10) s ohledem na

potenciální implementaci do klinické praxe, kde se nejslibněji jevil protokol využívající IL-10. Tyto tDC vykazovaly dobrou stabilitu při jejich restimulaci zánětlivými faktory (232, 339).

V naší práci jsme stanovili nový GMP protokol k výrobě dexamethason/ paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂) – modulovaných tDC, které vykazují rovněž stabilní tolerogenní fenotyp. Tyto buňky jsme rozsáhle testovali v *in vitro* navozeném prozánětlivém prostředí bez tolerogenních faktorů. tDC exprimují řadu receptorů pro růstové faktory a cytokiny a pattern-recognition receptory, které mohou být v zánětlivém prostředí znovu aktivovány.

Dex-VitD₂ tDC vykazovaly v nepřítomnosti regulačních faktorů a po restimulaci prozánětlivými faktory up-regulaci PDL-1 a ILT-3. Tyto molekuly jsou důležité při indukci T-regulačních lymfocytů (340) a ILT-3 navíc moduluje aktivaci NF- κ B a p38 MAPK dráhu v DC (219). Po aktivaci ILT-3 receptoru dochází k fosforylaci jeho cytoplasmatické domény (ITIM), která pak přes cytosolové mediatory (SHP-1, SHIP) inhibuje fosforylaci a degradaci I κ B- α , a tím snižují NF- κ B aktivitu (341), která byla v našich experimentech tDC rovněž snížena. Stabilita Dex-VitD₂ tDC byla prokázána i v jejich funkci s ohledem na udržení stabilního inhibičního cytokinového profilu (zejména sekrece IL-10 a TGF- β) a schopnost méně indukovat proliferaci T-lymfocytů.

Dále jsme se zaměřili na signalizační dráhy, které Dex-VitD₂ tDC využívají k udržení tolerogenního fenotypu. V souladu s našimi přechodnými experimenty jsme prokázali stabilní snížení NF- κ B, což bylo dokumentováno sníženou fosforylací I κ B- α v tDC. Nukleární translokace jednotlivých podjednotek NF- κ B (RelA, RelB a c-Rel) byla u tDC snížena v porovnání s cDC. Jednotlivé podjednotky NF- κ B rodiny zastávají odlišné funkce v DC (342, 343). Grumont et al. prokázali, že c-Rel je nezbytný u CD8⁺ α DC pro produkci IL-12 (344). Na podkladě dostupné literatury, která poukazuje na to, že diferenciaci DC a regulace jejich cytokinové produkce je vysoce specificky řízena jednotlivými proteiny z NF- κ B rodiny konstatujeme, že downregulace c-Rel podjednotky u Dex-VitD₂ tDC může mít také vliv na sekreci IL-12p70, neboť sekrece IL-12 byla u těchto tDC snížena v porovnání s cDC, a to i po provedených restimulacích. Sekrece IL-12 u cDC však byla částečně utlumena po přidání inhibitoru NF- κ B.

Naopak vysoká nukleární translokace podjednotky p50 jak u tDC tak u cDC může odrážet jejich aktivaci pomocí MPLA (analog LPS), který aktivuje kanonickou dráhu NF- κ B s formací

heterodimeru p50/RelA (345). Zároveň Cao et al. zjistili ve své práci, že homodimer p50 u makrofágů potlačuje produkci prozánětlivých cytokinů a je transkripční aktivátor IL-10 (346). V souladu s tímto tvrzením je výsledek našeho experimentu, kdy po přidání inhibitoru NF- κ B došlo k signifikantní redukci IL-10 sekrece u tDC.

Aktivace nekanonické dráhy NF- κ B s převahou formace heterodimeru p52 a RelB byla popsána jako důležitá pro diferenciaci regulačních DC s produkcíIDO (347). V naší práci jsme neanalyzovaly nukleární translokaci podjednotky p52, nicméně částečná lokalizaci RelB v jádře může s produkcíIDO souviset. Dex-VitD2 tDC stabilně exprimovalyIDO, která je důležitá pro indukci T-regulačních lymfocytů a přímou supresi T – efektorových lymfocytů (348, 349).

Z uvedeného lze shrnout, že role NF- κ B v diferenciaci a aktivaci DC je velmi komplexní a pravděpodobně závisí na specifické regulaci jednotlivých proteinových podjednotek z NF- κ B rodiny a vzájemné kooperaci mezi kanonickou a nekanonickou dráhou (343).

Zajímavé bylo zjištění, že Dex-VitD2 tDC si udržují svůj tolerogenní fenotyp díky odlišné aktivaci signalizačních drah oproti cDC. U tDC dochází k mírné aktivaci p38 MAPK signalizační dráhy, ale výrazné aktivaci ERK 1/2, mTOR a STAT3, které regulují expresi CD86, ILT-3, PDL-1 a produkci IL-10 a IL-12p70. Toto bylo reflektováno zvýšenou alostimulační kapacitou T-lymfocytů při selektivním zablokování těchto signalizačních drah specifickými inhibitory.

Naše data ukazují novou důležitou roli mTOR a STAT3 v regulačním fenotypu DC a přinášejí informace o komplexní roli mTOR u dendritických buněk. mTOR je známý pro svoji nezastupitelnou roli v regulaci buněčného růstu, metabolismu a regulaci proteosyntézy v mnoha buňkách. Specifický inhibitor komplexu mTORC1 rapamycin vykazuje potentní imunosupresivní vlastnosti (350). Tato protizánětlivá vlastnost rapamycinu je mediovaná díky snížení aktivity NF- κ B a zvýšení aktivity STAT3 (351). Nicméně Haidinger et al. ve svém review shrnuli komplexní funkci mTOR u DC, která pravděpodobně závisí na typu DC (352). Nedávno bylo publikováno, že inhibice mTORC1 rapamycinem v monocytech zvyšovala produkci IL-12 a IL-23, zatímco sekrece IL-10 byla snížena (353, 354). Inhibice mTOR v myeloidních buňkách pak například blokovala protizánětlivý efekt glukokortikoidů (355). Na základě těchto studií a experimentech provedených v naší práci můžeme předpokládat, že u

Dex/VitD2 tDC je komplex mTORC1 nezbytný pro navození a udržení tolerogenního fenotypu indukovaného dexamethasonem.

Zároveň jsme prokázali, že u Dex/VitD2 tDC je pro udržení tolerogenního fenotypu nezbytná i mTOR mediovaná glykolýza. Tento výsledek je v souladu s již publikovanou prací, kde PI3/Akt/mTOR dependentní glykolýza byla důležitá k udržení tolerogenního fenotypu i u VitD3 – indukovaných DC (356). Ačkoliv glykolýza byla popsána jako nezbytná pro prozánětlivou maturaci DC (312), některé práce ukazují, že PI3/Akt/mTOR dependentní glykolýza může ovlivňovat tolerogenní fenotyp a funkci DC v závislosti na růstových a aktivačních faktorech primárně diferencujících DC (357, 358).

V závěru lze shrnout, že Dex/VitD2 tDC si zachovávají svůj tolerogenní fenotyp i po rozsáhlých testech s restimulováním prozánětlivými faktory. Tato vlastnost se zdá být regulována pomocí p38 MAPK, ERK1/2, mTOR a STAT3 a metabolickému reprogramování s využitím glykolýzy namísto OXPHOS, která byla popsána u tDC generovanými odlišnými protokoly. Komplexní role a interakce mezi jednotlivými podjednotkami NF- κ B u tDC vyžaduje další detailnější studie, nicméně u Dex/VitD2 tDC vykazovaly jednotlivé podjednotky NF- κ B spíše nižší nukleární translokaci v porovnání s cDC.

Souhrnně lze konstatovat, že tyto tDC připravené v GMP protokolu by mohly být vhodné pro další pre/klinické testování v terapii autoimunitních chorob pro svoje zjevné stabilní imunosupresivní vlastnosti.

5.1.2. Schopnost tDC potlačit antigenně specifickou proliferaci T-lymfocytů u diabetických pacientů

tDC jsme následně v rámci preklinických studií generovali přímo od pacientů s T1D. I tyto buňky vykazovaly tolerogenní fenotyp s upregulací ILT-3, PDL-1 a TLR-2 a zároveň příznivý cytokinový profil. Zároveň bylo zajímavé, že tDC generované od pacientů s optimální hladinou HbA1c vykazovaly vyšší expresi PD-L1 and IL-T3 než pacienti s vysokou hladinou HbA1c. Bylo prokázáno, že vysoká hladina glukózy ovlivňuje přímo receptor pro vitamin D ve smyslu snížení jeho exprese a funkce (359). To může následně ovlivnit tolerogenní efekt vitaminu D, který jsme použili při generaci tDC, a který je zodpovědný za indukci ILT-3 a PDL-1 u DC (360).

Hyperglykémie však navozuje prozánětlivé prostředí i jinými mechanismy zahrnující mimo jiné formování AEG produktů v rámci neenzymové glykace. AGEs se mohou vázat na kompatibilní receptory, převážně RAGE, ale i na další např. AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, scavengerové receptory či TLR-2, TLR-4 receptory (361, 362). AGE-RAGE signální kaskáda aktivuje např. NF- κ B a nastavuje tak prozánětlivý stav buněk (363, 364).

Nadto mohou AGEs modifikovat a měnit strukturu proteinů, což významně ovlivňuje jejich strukturu a funkci a nejedná se tedy jen o receptorově-zprostředkovaný efekt (365). Proto lze předpokládat, že u pacientů s dlouhodobou optimální kompenzací a nižší hladinou glukózy v plazmě můžeme lépe navodit tolerogenní fenotyp u DC generovaných *ex vivo*.

Pro zjištění, zda hyperglykémie ovlivňuje i jiné funkční vlastnosti tDC jsme rozdělili pacienty podle hladiny glykovaného hemoglobinu do dvou skupin. Zjistili jsme, že GAD-65 specifické tDC od pacientů s optimální kompenzací lépe indukují antigenně specifickou neodpovídavost u autologních T-lymfocytů, což bylo doprovázeno i redukcí Th1– a Th17– cytokinů. Th1– a Th17– lymfocyty mají významný podíl na patogenezi T1D, proto jejich účinné potlačení pomocí tDC umožňuje použít tyto buňky v rámci utlumení škodlivé autoimunitní reakce. Lepší navození neodpovídavosti u T-lymfocytů může být dáno nejen samotnými tDC, které mohou u dobře kompenzovaných pacientů vykazovat lepší tolerogenní vlastnosti, ale také primárně odlišným nastavením T-lymfocytů u jednotlivých pacientů. T-lymfocyty od pacientů se suboptimální kompenzací vykazovaly vyšší hladinu bazální proliferace, vyšší sekreci Th1/Th17-cytokinů a nižší antigenně specifickou odpověď na GAD65 v primární kultuře. Tyto data jsou v souladu se studií Segovia-Gamboa et. al., kde antigenně specifická tolerance u T-lymfocytů byla minimální u pacientů, kteří měli vysokou homeostatickou proliferaci T-lymfocytů (366).

T-lymfocyty u dlouhodobě špatně kompenzovaných pacientů mohou vykazovat preaktivovaný fenotyp se zvýšenou sekrecí IFN- γ (367). Pravděpodobně to může být způsobeno prozánětlivým prostředím v autoimunitním terénu, potencovaném chronickou hyperglykemií. Vysoká hladina glukózy modifikuje přímo T-lymfocyty pomocí epigenetických změn, zvýšením odpovědi T-lymfocytů a polarizace k Th1/Th17 odpovědi (316, 317, 368). U autoimunitních chorob byl popsán i výskyt tzv. non-exhausted T-lymfocytů (369, 370), které mohou korelovat s horší progresí nemoci včetně T1D (371). T-lymfocytární vyčerpání je asociované s dlouhodobou prezentací antigenu (372) a tyto buňky vykazují progresivní ztrátu svých efektorových funkcí a

schopnost produkovat IL-2. Navození terapeutického “vyčerpání” T-lymfocytů se studuje i jako možnost terapie T1D (370, 373).

V souvislosti s ovlivněním vlastností tDC metabolickými parametry pacientů vyplývá důležitost pečlivého výběru pacientů, kteří by mohli být vhodnými kandidáty na eventuální buněčnou terapii založenou na Dex/VitD2 tDC. Na základě našich dat předpokládáme, že navození anergie u T-lymfocytů je snazší u pacientů s dobrou metabolickou kompenzací. Tento fakt se zdá být zapříčiněn nejen vygenerováním tDC s lepšími supresivními vlastnostmi u pacientů s dlouhodobě nižší glykemií, ale pravděpodobně i díky menšímu počtu preaktivovaných T-lymfocytů a odlišnému zastoupení buněk vykazující fenotyp T-lymfocytárního vyčerpání oproti pacientům s chronickou hyperglykemií.

Ačkoliv v naší studii jsme prokázali, že náprava glykémie vedla *in vitro* ke zlepšení vlastností tDC, díky tzv. fenoménu metabolické paměti nelze vyloučit efekt tranzientní hyperglykémie na tyto buňky, a tím i na účinnost případných buněčných vakcín. Jak již bylo uvedeno, hyperglykémie způsobuje kumulativní změny na makromolekulách, které mohou přetrvávat i po nápravě glykémie. Zde je potom veliký přínos časného záchytu T1D, kdy nedochází k závažné hyperglykémii, a tedy negativního ovlivnění imunitního systému. Vstupní kritéria by tedy mohla předurčovat úspěšnost této terapie.

V experimentech jsme rovněž prokázali, že Dex/VitD2 tDC připravené z NOD myší zpomalily rozvoj diabetu při adoptivním transferu do NOD-SCID myší, jak je uvedeno v naší originální publikaci (254). Nicméně přenesení do humánního modelu nemusí být zcela analogické díky relativní snadnosti prevence diabetu u NOD myší, které neodráží genetickou variabilitu lidského T1D (374).

5.2. MDSC

MDSC byly zkoumány především u nádorových onemocnění, kde vykazují imunosupresivní vlastnosti a pro jejich terapeutické využití v protinádorové imunitě (375). Několik studií však ukázalo, že MDSC mohou vykazovat různé vlastnosti v závislosti na signálech v jejich prostředí a vykazují funkční plasticitu (376).

Jejich role u autoimunitních onemocnění je mnohem méně prozkoumaná a jak již bylo výše uvedeno, dosavadní studie vykazují kontroverzní výsledky, co se týče jejich role při jednotlivých autoimunitách. U myšičího modelu T1D, MDSC byly schopny zabránit rozvoji diabetu díky snížení destrukce pankreatických ostrůvku a utlumení autoantigenních efektorových T-lymfocytů (301, 377). Whitfield-Larry et al. popsali ve své práci, že frekvence MDSC byla zvýšena v periferní krvi diabetických pacientů, a stejně tak i v periferní krvi a sekundárních lymfatických orgánech u NOD myší (302). Překvapivě byla frekvence MDSC snížena přímo v pankreatických ostrůvcích u NOD myší (302) podobně jako v práci Fu et al., kde prokázali negativní korelaci mezi MDSC vyskytujícími se v pankreatických ostrůvcích a progresí T1D (378). Tyto výsledky podporují hypotézu, že MDSC jsou zapojeny v patogenezi T1D.

Proto jsme se v této části práce zaměřili na bližší analýzu MDSC u diabetických pacientů, zejména, co se týče jejich zastoupení u jednotlivých skupin pacientů a jejich prvostupňových příbuzných s rizikem rozvoje T1D. Zároveň jsme si položili otázku, zda tyto MDSC vykazují inhibiční vlastnosti a jaké k tomu využívají mechanismy.

V souladu s výsledky studie od Whitfield-Larry (302) jsme pozorovali zvýšenou frekvenci M-MDSC v periferní krvi diabetických pacientů v porovnání se zdravými dárči. Navíc, zvýšená frekvence M-MDSC byla prokázána i u prvnostupňových příbuzných s rizikem rozvoje T1D.

Tato zvýšená frekvence M-MDSC u pacientů s T1D a jejich příbuzných může být v důsledku zvýšení různých působků, které se produkují při chronickém zánětu, kterým autoimunitní diabetes je. U řady prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1, IL-6 a IFN- γ , bylo popsáno, že přispívají k expanzi MDSC. Tyto cytokiny jsou také zvýšené v séru diabetických pacientů, a i u jejich zdravých příbuzných s rizikem rozvoje diabetu (127, 379-382). Tuto hypotézu o zvýšeném počtu MDSC díky nadprodukci prozánětlivých cytokinů podporují i další práce, které

prokázaly rovněž zvýšenou frekvenci MDSC v periferní krvi u pacientů s jinými autoimunitními onemocněními. Krom jejich elevace u diabetiků (302), byla zvýšená frekvence MDSC zaznamenána i u pacientů s revmatoidní artritidou (298), zánětlivými onemocněními střev (IBD) (295, 383) a psoriázou (384, 385).

Jako hlavní rys T1D je selhání interní regulace hladiny glukózy v organismu doprovázený chronickou hyperglykemií. Hyperglykemie je významný prozánětlivý faktor (316), který dále může přispívat k elevaci MDSC. Pro zjištění, zda má hyperglykemie vliv na frekvenci MDSC jsme rozdělili pacienty do dvou skupin podle hladiny glykovaného hemoglobinu HbA1c, který odráží dlouhodobou metabolickou kompenzaci pacientů a stanovovali frekvenci MDSC v periferní krvi. Tato frekvence byla vyšší u pacientů ve skupině A se suboptimální metabolickou kompenzací (HbA1c > 7.5%). Tento fakt pravděpodobně opět souvisí s vyšším stupněm prozánětlivého prostředí, které chronická hyperglykemie navozuje (314-316, 386). Zajímavé je, že u pacientů s nádorovým onemocněním bylo popsáno zvýšení MDSC díky signalizaci molekul ze S100 proteinové rodiny, které interagují s RAGE receptory (386-388). Tyto receptory jsou upregulované také u diabetiků (107). Proto předpokládáme, že elevace MDSC u diabetiků a zejména u těch, kteří mají dlouhodobou hyperglykémii, může být také potencována díky AGES-RAGE mediované interakci.

Ve studii Zhao et al. poukázali na roli TNF- α při expanzi MDSC (389). Ukázalo se také, že TNF- α je schopen zastavit diferenciaci nezralých MDSC, a tak zesilovat jejich supresivní vlastnosti (390). Ačkoliv jsme v naší práci neměřili hladinu TNF- α v séru vybraných subjektů, na základě velké meta-analýzy, která prokázala signifikantní zvýšení hladiny TNF- α u pacientů s T1D (391) předpokládáme, že zvýšená frekvence MDSC u pacientů zahrnutých v naší studii by mohla být i díky zvýšení hladiny TNF- α .

Dále jsme v naší práci jako první ukázali pozitivní korelaci mezi M-MDSC a prozánětlivými Th17- a IFN- γ produkujícími lymfocyty u pacientů s T1D a jejich příbuzných v riziku. Th17-lymfocyty a IFN- γ produkující lymfocyty jsou často zvýšené u autoimunitních chorob (39, 319, 379, 392), nicméně jejich vztah k MDSC se v doposavad publikovaných studiích liší. Byla prokázána jak jejich vzájemná pozitivní, tak i negativní korelace (298, 300, 393-396). U revmatoidní artritidy byly zvýšeně expandované MDSC společně s Th17 lymfocyty a byly asociovány s progresí choroby. (300). Naproti tomu, adoptivní transfer MDSC zabránil vzniku

rozvoje autoimunitní artritidy na myším modelu díky inhibici Th17 lymfocytů.(393). Tato nejednotnost není zcela vysvětlena. Pravděpodobně odlišné lokální mikroprostředí může mít vliv na stupeň aktivace MDSC a jejich expanzi a diferenciaci jednotlivých subpopulací MDSC (397). Pozoruhodné byly výsledky *in vitro* studie, které ukázaly, že jak lidské, tak myší MDSC mohou podporovat vznik Th-17 lymfocytů. Díky produkci IL-1 β , IL-6 and TGF- β (300, 398) a dále produkcí exogenního NO (395) mohou tak MDSC samotné indukovat vznik Th-17 lymfocytů (395, 399). Th17 expanze je asociována s produkcí cytokinu IL-17, který může také přispívat k další indukci a aktivaci MDSC při zachování jejich supresivních vlastností v rámci vzájemné regulace (400, 401). Díky této reciproční indukci dochází pravděpodobně k elevaci MDSC a zároveň Th-17 prozánětlivých lymfocytů u diabetických pacientů a jejich prvostupňových příbuzných.

Role INF- γ v indukci MDSC je velmi komplexní. Studie na myších s nádorovým onemocněním poukázaly na důležitost IFN- γ při aktivaci a indukci MDSC (281) a obdobné výsledky byly získány i ve studii na myším modelu s imunitně zprostředkovanou hepatitidou (402).

Co se týče supresivních vlastností MDSC, prokázali jsme v naší práci, že MDSC přímo izolované od diabetických pacientů si zachovávají svůj inhibiční potenciál *in vitro*. MDSC účinně suprimovaly proliferaci T-lymfocytů a jejich produkci IL-17 a IFN- γ . Tato suprese byla signifikantní při vysokém poměru MDSC: T lymfocytům. Zda MDSC vykazují supresivní vlastnosti i *in vivo*, není zcela jednoznačné. Při vzájemném zvýšení MDSC i prozánětlivých T-lymfocytů nemusí být jejich poměr dostatečný k efektivní supresi. Zároveň nemusí mít MDSC plně rozvinutý svůj inhibiční fenotyp díky vlivu lokálního mikroprostředí.

U zdravých dárců jsme nezaznamenali elevaci MDSC, což může být dáno obecně nezánětlivým prostředím u zdravých jedinců. Tyto MDSC také nemusí být plně aktivovány, což odráží jejich nižší supresivní potenciál, kdy vykazovaly nižší *in vitro* supresi T-lymfocytární proliferace než MDSC izolované od diabetických pacientů.

Dosud bylo málo zjištěno o mechanismech, které využívají MDSC přímo vyizolované od diabetických pacientů k navození suprese. Proto jsme se tomuto tématu rozhodli blíže věnovat. Zjistili jsme výrazné snížení CD3 ζ řetězce na T-lymfocytech a tento fakt přikládáme zvýšené frekvenci MDSC v jejich periferní krvi. Ačkoliv bylo popsáno, že MDSC způsobují downregulaci CD3 ζ řetězce hlavně díky produkci arginázy-1 (271, 403, 404), v našich

experimentech se argináza-1 nejevila jako zásadní k navození inhibice T-lymfocytů. V souladu s našimi výsledky, Bian et al. ukázali, že argináza – 1 nemusí být konstitutivně exprimována na povrchu MDSC a nemusí být nezbytná k MDSC-mediované downregulaci CD3 ζ řetězce. Navíc, některé prozánětlivé cytokiny jako jsou IL-17 a IFN- γ mohou negativně regulovat produkci arginázy-1 u MDSC (405). Proto předpokládáme, že M-MDSC analyzované u pacientů s T1D využívají jiný mechanismus k navození imunologické suprese. Na podkladě našich experimentů jsme zjistili, že MDSC potřebují k potlačení proliferace T-lymfocytů produkci TGF- β a také mezibuněčný kontakt.

Zajímavé je, že TNF- α , který byl prokázán ve zvýšené hladině u diabetických pacientů (391), může také zesilovat supresivní vlastnosti MDSC, což bylo v některých pracích reflektováno snížením CD3 ζ řetězce na T-lymfocytech (390, 406). Nicméně u jiných imunopatologických stavů jako jsou RA nebo SLE bylo zjištěno, že dochází k downregulaci CD3 ζ řetězce na T-lymfocytech právě díky samotnému TNF- α , který má za následek jeho degradaci v proteasomu (407, 408), a tedy nezávisle na MDSC.

Když jsme porovnávali supresivní vlastnosti M-MDSC izolovaných od pacientů s T1D a od pacientů s nádorovým onemocněním, nádorové MDSC vykazovaly mnohem vyšší supresivní potenciál. Tento fakt může být pravděpodobně způsoben odlišným cytokinovým mikroprostředím, které v rámci nádoru více zesiluje inhibiční vlastnosti M-MDSC. Naproti tomu M-MDSC vyizolované od zdravých dárců nebyly v supresi T-lymfocytů tak účinné, což může být dáno jejich nedostatečnou aktivací díky absenci prozánětlivých stimulů.

Na podkladě těchto faktů předpokládáme, že cytokinové prostředí je velmi důležité v regulaci supresivních vlastností M-MDSC a má vliv i na mechanismus, kterým supresi navozují.

Na závěr této části, bych ráda uvedla, že role MDSC u autoimunitních chorob je zřejmá, ačkoliv dostupná literatura nevykazuje jednotné závěry, co se týče jejich funkce. Tyto rozdíly mohou být dány heterogenitou MDSC, rozdílným mikroprostředím, ve kterém MDSC interagují s T-lymfocyty a v neposlední řadě i odlišnostmi mezi pacienty a různými stádii jednotlivých chorob.

Souhrnně však lze konstatovat, že M-MDSC u pacientů s T1D zastávají imunomodulační funkci a *in vitro* vykazují supresivní vlastnosti, co se týče inhibice proliferace T-lymfocytů. Zda by M-MDSC byly vhodné pro buněčnou terapii s cílem utlumit nežádoucí autoimunitní reakci není

zatím zcela jednoznačné. Konkrétně u T1D se pak naskýtá otázka, jaká je role MDSC přímo v pankreatu, v místě postiženém autoimunitním zánětem. Bylo popsáno, že MDSC byly snižené v pankreatických ostrůvcích u NOD myši a jejich redukce byla asociována s progresem onemocnění (302). U lidí zatím nebyla publikována studie zabývající se funkcí M-MDSC přímo v Langerhansových ostrůvcích, což je nepochybně dané díky obtížné dostupnosti vzorků. Zajímavá je otázka, zda by *in-vitro* cytokinová modulace mohla potencovat inhibiční efekt MDSC, které by pak byly více potentní v supresiv auto reaktivních T-lymfocytů, jak poukazují výsledky od auto reaktivních et al. (302). Je zjevné, že pro implementaci MDSC do klinické praxe je třeba provést ještě mnoho dalších studií, které by zmíněné otázky zodpověděly.

6. Závěr

V závěru bych ráda shrnula klíčové poznatky z mé práce týkající se regulačních buněk s možným využitím pro buněčnou terapii autoimunitních chorob. Jako jedny z kandidátů jsou tDC, které jsme generovali v GMP protokolu za pomoci dexamethasonu a vitamínu D2. Tyto buňky vykazovaly dobrou stabilitu v rozsáhlém testování pomocí různých prozánětlivých faktorů, což je pro klinickou aplikaci nezbytné.

Jakožto jednu z nejčastějších autoimunitních chorob jsme vybrali T1D, kde jsme analyzovali tDC vygenerované přímo od diabetických pacientů. Tyto tDC rovněž vykazovaly dobrý tolerogenní profil. Zároveň jsme však zjistili, že jejich schopnost inhibovat T-lymfocyty závisí na metabolickém stavu pacientů, konkrétně na dlouhodobé hladině glykémie.

Další nadějná buňka v terapii autoimunitních chorob by mohly být MDSC. Tyto buňky, které jsme izolovali od pacientů s T1D a jejich prvostupňových příbuzných vykazovaly dobré inhibiční vlastnosti. Zda však dosahují svého maximálního inhibičního potenciálu není zřejmé, neboť na jejich funkci má pravděpodobně vliv mikroprostředí, ve které se MDSC nachází a diferencují.

Předpokládáme, že buněčná terapie autoimunitních chorob je nadějná, ačkoliv z dosavadních klinických studií nebyla prokázána její dlouhodobá účinnost. V kontextu současné terapie se buněčná terapie ukazuje jako spíše doplňková či vhodná v kombinaci s jinou imunointervenční strategií. Její značnou nevýhodou je nutnost leukaferézy a individuální přípravy pro každého pacienta. Dále pak viabilita buněk a vhodnost výběru konkrétních autoantigenů v antigeně specifických režimech. To vše značně zvyšuje její nákladnost oproti standardní inzulinové terapii.

Díky rekombinantním technologiím přichází další nové terapeutické možnosti, jako jsou vakcíny s autoantigeny, blokace inhibičních receptorů či imunologických check-pointů a modifikované peptidy specificky blokující funkci APC. Vzhledem k rozvoji poznatků o imunobiologii a patogenezi autoimunitních chorob v kombinaci s moderními technologickými postupy existuje naděje na bezpečnou a účinnou terapii či prevenci diabetu 1. typu.

1. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010;107(9):1058-70.
2. Liew A, O'Brien T. The potential of cell-based therapy for diabetes and diabetes-related vascular complications. *Current diabetes reports*. 2014;14(3):469.
3. Youn JI, Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European journal of immunology*. 2010;40(11):2969-75.
4. Roep BO, Wheeler DCS, Peakman M. Antigen-based immune modulation therapy for type 1 diabetes: the era of precision medicine. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2019;7(1):65-74.
5. Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(11).
6. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*. 2003;46(3):305-21.
7. Miao D, Yu L, Eisenbarth GS. Role of autoantibodies in type 1 diabetes. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:1889-98.
8. Regnell SE, Lernmark A. Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(8):1370-81.
9. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G, Group ES. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009;373(9680):2027-33.
10. Majaliwa ES, Elusiyan BE, Adesiyun OO, Laigong P, Adeniran AK, Kandi CM, et al. Type 1 diabetes mellitus in the African population: epidemiology and management challenges. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 2008;79(3):255-9.
11. Cinek O, Kulich M, Sumnik Z. The incidence of type 1 diabetes in young Czech children stopped rising. *Pediatric diabetes*. 2012;13(7):559-63.
12. 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(7010):913-7.
13. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*. 1992;35(11):1060-7.
14. Inshaw JRJ, Cutler AJ, Burren OS, Stefana MI, Todd JA. Approaches and advances in the genetic causes of autoimmune disease and their implications. *Nature immunology*. 2018;19(7):674-84.
15. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gene. *Nature*. 1980;284(5751):26-32.
16. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*. 2004;53(11):3020-3.
17. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003;423(6939):506-11.
18. Qu HQ, Bradfield JP, Grant SF, Hakonarson H, Polychronakos C, Type IDGC. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes and immunity*. 2009;10 Suppl 1:S27-32.
19. Carlton VE, Hu X, Chokkalingam AP, Schrodri SJ, Brandon R, Alexander HC, et al. PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*. 2005;77(4):567-81.
20. Martinez A, Santiago JL, Cenit MC, de Las Heras V, de la Calle H, Fernandez-Arquero M, et al. IFIH1-GCA-KCNH7 locus: influence on multiple sclerosis risk. *European journal of human genetics : EJHG*. 2008;16(7):861-4.

21. Smyth DJ, Cooper JD, Howson JM, Clarke P, Downes K, Mistry T, et al. FUT2 nonsecretor status links type 1 diabetes susceptibility and resistance to infection. *Diabetes*. 2011;60(11):3081-4.
22. Wacklin P, Makivuokko H, Alakulppi N, Nikkila J, Tenkanen H, Rabina J, et al. Secretor genotype (FUT2 gene) is strongly associated with the composition of Bifidobacteria in the human intestine. *PLoS one*. 2011;6(5):e20113.
23. Wawrusiewicz-Kurylonek N, Goscik J, Chorazy M, Siewko K, Posmyk R, Zajkowska A, et al. The interferon-induced helicase C domain-containing protein 1 gene variant (rs1990760) as an autoimmune-based pathology susceptibility factor. *Immunobiology*. 2020;225(1):151864.
24. Hermann R, Knip M, Veijola R, Simell O, Laine AP, Akerblom HK, et al. Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with Type 1 diabetes--indication of an increased environmental pressure? *Diabetologia*. 2003;46(3):420-5.
25. Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, Gill GV, et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet*. 2004;364(9446):1699-700.
26. Henrick BM, Hutton AA, Palumbo MC, Casaburi G, Mitchell RD, Underwood MA, et al. Elevated Fecal pH Indicates a Profound Change in the Breastfed Infant Gut Microbiome Due to Reduction of Bifidobacterium over the Past Century. *mSphere*. 2018;3(2).
27. Writing Group for the TSG, Knip M, Akerblom HK, Al Taji E, Becker D, Bruining J, et al. Effect of Hydrolyzed Infant Formula vs Conventional Formula on Risk of Type 1 Diabetes: The TRIGR Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2018;319(1):38-48.
28. Antvorskov JC, Halldorsson TI, Josefsen K, Svensson J, Granstrom C, Roep BO, et al. Association between maternal gluten intake and type 1 diabetes in offspring: national prospective cohort study in Denmark. *Bmj*. 2018;362:k3547.
29. Groele L, Szajewska H, Szypowska A. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium lactis* Bb12 on beta-cell function in children with newly diagnosed type 1 diabetes: protocol of a randomised controlled trial. *BMJ open*. 2017;7(10):e017178.
30. Tauriainen S, Oikarinen S, Oikarinen M, Hyoty H. Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Seminars in immunopathology*. 2011;33(1):45-55.
31. Rasmussen T, Witso E, Tapia G, Stene LC, Ronningen KS. Self-reported lower respiratory tract infections and development of islet autoimmunity in children with the type 1 diabetes high-risk HLA genotype: the MIDIA study. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011;27(8):834-7.
32. Vatanen T, Franzosa EA, Schwager R, Tripathi S, Arthur TD, Vehik K, et al. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature*. 2018;562(7728):589-94.
33. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. 2018;562(7728):583-8.
34. Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune network*. 2014;14(6):277-88.
35. Kaisar MMM, Pelgrom LR, van der Ham AJ, Yazdanbakhsh M, Everts B. Butyrate Conditions Human Dendritic Cells to Prime Type 1 Regulatory T Cells via both Histone Deacetylase Inhibition and G Protein-Coupled Receptor 109A Signaling. *Front Immunol*. 2017;8:1429.
36. Sun M, Wu W, Chen L, Yang W, Huang X, Ma C, et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nature communications*. 2018;9(1):3555.
37. Li M, van Esch B, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *European journal of pharmacology*. 2018;831:52-9.

38. Makinen M, Simell V, Mykkanen J, Ilonen J, Veijola R, Hyoty H, et al. An increase in serum 25-hydroxyvitamin D concentrations preceded a plateau in type 1 diabetes incidence in Finnish children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(11):E2353-6.
39. Roep BO, Tree TI. Immune modulation in humans: implications for type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology*. 2014;10(4):229-42.
40. Paschou SA, Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine connections*. 2018;7(1):R38-R46.
41. Purcell AW, Sechi S, DiLorenzo TP. The Evolving Landscape of Autoantigen Discovery and Characterization in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2019;68(5):879-86.
42. Henry RA, Kendall PL, Thomas JW. Autoantigen-specific B-cell depletion overcomes failed immune tolerance in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2012;61(8):2037-44.
43. Gardner G, Fraker CA. Natural Killer Cells as Key Mediators in Type I Diabetes Immunopathology. *Front Immunol*. 2021;12:722979.
44. Tree TI, Lawson J, Edwards H, Skowera A, Arif S, Roep BO, et al. Naturally arising human CD4 T-cells that recognize islet autoantigens and secrete interleukin-10 regulate proinflammatory T-cell responses via linked suppression. *Diabetes*. 2010;59(6):1451-60.
45. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. *Journal of immunology*. 2004;172(10):5967-72.
46. Pugliese A. Autoreactive T cells in type 1 diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(8):2881-91.
47. Bender C, Rodriguez-Calvo T, Amirian N, Coppieters KT, von Herrath MG. The healthy exocrine pancreas contains preproinsulin-specific CD8 T cells that attack islets in type 1 diabetes. *Science advances*. 2020;6(42).
48. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(12):849-59.
49. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, et al. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(3):604-12.
50. Vesperas A, Vignali DA. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them? *Journal of immunology*. 2016;197(10):3762-70.
51. Marca V, Giancchetti E, Fierabracci A. Type 1 Diabetes and Its Multi-Factorial Pathogenesis: The Putative Role of NK Cells. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(3).
52. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001;358(9277):221-9.
53. Roep BO, Peakman M. Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(4):a007781.
54. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes care*. 2015;38(10):1964-74.
55. Ilonen J, Lempainen J, Hamaï A, Laine AP, Harkonen T, Toppari J, et al. Primary islet autoantibody at initial seroconversion and autoantibodies at diagnosis of type 1 diabetes as markers of disease heterogeneity. *Pediatric diabetes*. 2018;19(2):284-92.
56. Vcelakova J, Blatny R, Halhuber Z, Kolar M, Neuwirth A, Petruzelkova L, et al. The effect of diabetes-associated autoantigens on cell processes in human PBMCs and their relevance to autoimmune diabetes development. *Journal of diabetes research*. 2013;2013:589451.
57. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama*. 2013;309(23):2473-9.
58. Koczwara K, Bonifacio E, Ziegler AG. Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(1):1-4.

59. Jaberi-Douraki M, Pietropaolo M, Khadra A. Predictive models of type 1 diabetes progression: understanding T-cell cycles and their implications on autoantibody release. *PloS one*. 2014;9(4):e93326.
60. Roep BO, Thomaidou S, van Tienhoven R, Zaldumbide A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the beta-cell (do not blame the immune system?). *Nature reviews Endocrinology*. 2021;17(3):150-61.
61. Campbell-Thompson M, Wasserfall C, Montgomery EL, Atkinson MA, Kaddis JS. Pancreas organ weight in individuals with disease-associated autoantibodies at risk for type 1 diabetes. *Jama*. 2012;308(22):2337-9.
62. Ifie E, Russell MA, Dhayal S, Leete P, Sebastiani G, Nigi L, et al. Unexpected subcellular distribution of a specific isoform of the Coxsackie and adenovirus receptor, CAR-SIV, in human pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2018;61(11):2344-55.
63. Thompson PJ, Shah A, Ntranos V, Van Gool F, Atkinson M, Bhushan A. Targeted Elimination of Senescent Beta Cells Prevents Type 1 Diabetes. *Cell metabolism*. 2019;29(5):1045-60 e10.
64. Marhfour I, Lopez XM, Lefkaditis D, Salmon I, Allagnat F, Richardson SJ, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(9):2417-20.
65. Meyerovich K, Ortis F, Allagnat F, Cardozo AK. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *Journal of molecular endocrinology*. 2016;57(1):R1-R17.
66. Moore F, Naamane N, Colli ML, Bouckenoghe T, Ortis F, Gurzov EN, et al. STAT1 is a master regulator of pancreatic {beta}-cell apoptosis and islet inflammation. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(2):929-41.
67. Roep BO, Kleijwegt FS, van Halteren AG, Bonato V, Boggi U, Vendrame F, et al. Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology*. 2010;159(3):338-43.
68. Carrero JA, McCarthy DP, Ferris ST, Wan X, Hu H, Zinselmeyer BH, et al. Resident macrophages of pancreatic islets have a seminal role in the initiation of autoimmune diabetes of NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(48):E10418-E27.
69. Kolb-Bachofen V, Kolb H. A role for macrophages in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 1989;3(2):145-54.
70. Gulden E, Wen L. Toll-Like Receptor Activation in Immunity vs. Tolerance in Autoimmune Diabetes. *Front Immunol*. 2014;5:119.
71. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes care*. 2020;43(Suppl 1):S14-S31.
72. Matveyenko AV, Butler PC. Relationship between beta-cell mass and diabetes onset. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2008;10 Suppl 4:23-31.
73. von Herrath M, Sanda S, Herold K. Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nature reviews Immunology*. 2007;7(12):988-94.
74. Erdem N, Montero E, Roep BO. Breaking and restoring immune tolerance to pancreatic beta-cells in type 1 diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2021;28(4):397-403.
75. Abdul-Rasoul M, Habib H, Al-Khouly M. 'The honeymoon phase' in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. *Pediatric diabetes*. 2006;7(2):101-7.
76. Tang R, Zhong T, Wu C, Zhou Z, Li X. The Remission Phase in Type 1 Diabetes: Role of Hyperglycemia Rectification in Immune Modulation. *Frontiers in endocrinology*. 2019;10:824.
77. Zhong T, Tang R, Gong S, Li J, Li X, Zhou Z. The remission phase in type 1 diabetes: Changing epidemiology, definitions, and emerging immuno-metabolic mechanisms. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2020;36(2):e3207.

78. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69-82.
79. Aly H, Gottlieb P. The honeymoon phase: intersection of metabolism and immunology. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2009;16(4):286-92.
80. Chobot A, Stompor J, Szyda K, Sokolowska M, Deja G, Polanska J, et al. Remission phase in children diagnosed with type 1 diabetes in years 2012 to 2013 in Silesia, Poland: An observational study. *Pediatric diabetes*. 2019;20(3):286-92.
81. Fonolleda M, Murillo M, Vazquez F, Bel J, Vives-Pi M. Remission Phase in Paediatric Type 1 Diabetes: New Understanding and Emerging Biomarkers. *Hormone research in paediatrics*. 2017;88(5):307-15.
82. Thiem K, Keating ST, Netea MG, Riksen NP, Tack CJ, van Diepen J, et al. Hyperglycemic Memory of Innate Immune Cells Promotes In Vitro Proinflammatory Responses of Human Monocytes and Murine Macrophages. *Journal of immunology*. 2021;206(4):807-13.
83. Fitas AL, Martins C, Borrego LM, Lopes L, Jorns A, Lenzen S, et al. Immune cell and cytokine patterns in children with type 1 diabetes mellitus undergoing a remission phase: A longitudinal study. *Pediatric diabetes*. 2018;19(5):963-71.
84. Moya R, Robertson HK, Payne D, Narsale A, Koziol J, Type 1 Diabetes TrialNet Study G, et al. A pilot study showing associations between frequency of CD4(+) memory cell subsets at diagnosis and duration of partial remission in type 1 diabetes. *Clinical immunology*. 2016;166-167:72-80.
85. Oras A, Peet A, Giese T, Tillmann V, Uibo R. A study of 51 subtypes of peripheral blood immune cells in newly diagnosed young type 1 diabetes patients. *Clinical and experimental immunology*. 2019;198(1):57-70.
86. Yao Y, Vent-Schmidt J, McGeough MD, Wong M, Hoffman HM, Steiner TS, et al. Tr1 Cells, but Not Foxp3+ Regulatory T Cells, Suppress NLRP3 Inflammasome Activation via an IL-10-Dependent Mechanism. *Journal of immunology*. 2015;195(2):488-97.
87. Guarda G, Dostert C, Staehli F, Cabalzar K, Castillo R, Tardivel A, et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature*. 2009;460(7252):269-73.
88. Villalba A, Fonolleda M, Murillo M, Rodriguez-Fernandez S, Ampudia RM, Perna-Barrull D, et al. Partial remission and early stages of pediatric type 1 diabetes display immunoregulatory changes. A pilot study. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2019;210:8-25.
89. Kurozumi A, Okada Y, Arao T, Miyazaki Y, Yoshikawa M, Torimoto K, et al. Pancreas-protective effect of rituximab for acute-onset type 1 diabetes in the honeymoon period: a case report. *Endocrinology, diabetes & metabolism case reports*. 2016;2016:160020.
90. Deng C, Xiang Y, Tan T, Ren Z, Cao C, Huang G, et al. Altered Peripheral B-Lymphocyte Subsets in Type 1 Diabetes and Latent Autoimmune Diabetes in Adults. *Diabetes care*. 2016;39(3):434-40.
91. Bjork E, Kampe O, Karlsson FA, Pipeleers DG, Andersson A, Hellerstrom C, et al. Glucose regulation of the autoantigen GAD65 in human pancreatic islets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1992;75(6):1574-6.
92. Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, Landin-Olsson M, Karlsten AE, Sundkvist G, et al. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(4):1505-11.
93. Pflieger C, Kaas A, Hansen L, Alizadeh B, Hougaard P, Holl R, et al. Relation of circulating concentrations of chemokine receptor CCR5 ligands to C-peptide, proinsulin and HbA1c and disease progression in type 1 diabetes. *Clinical immunology*. 2008;128(1):57-65.
94. Karges B, Durinovic-Bello I, Heinze E, Debatin KM, Boehm B, Karges W. Immunological mechanisms associated with long-term remission of human type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2006;22(3):184-9.

95. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2005;353(25):2643-53.
96. Jafar N, Edriss H, Nugent K. The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System. *The American journal of the medical sciences*. 2016;351(2):201-11.
97. Yip L, Fuhlbrigge R, Taylor C, Creusot RJ, Nishikawa-Matsumura T, Whiting CC, et al. Inflammation and hyperglycemia mediate Deaf1 splicing in the pancreatic lymph nodes via distinct pathways during type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015;64(2):604-17.
98. Menart-Houtermans B, Rutter R, Nowotny B, Rosenbauer J, Koliaki C, Kahl S, et al. Leukocyte profiles differ between type 1 and type 2 diabetes and are associated with metabolic phenotypes: results from the German Diabetes Study (GDS). *Diabetes care*. 2014;37(8):2326-33.
99. Yao K, Ge JB, Sun AJ, Hong XW, Shi HY, Huang RC, et al. [Effects and mechanism of hyperglycemia on development and maturation and immune function of human monocyte derived dendritic cells]. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi*. 2006;34(1):60-4.
100. Yan LJ. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Animal models and experimental medicine*. 2018;1(1):7-13.
101. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Experimental diabetes research*. 2007;2007:61038.
102. Noh H, King GL. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney international Supplement*. 2007(106):S49-53.
103. Ramana KV, Friedrich B, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Activation of nuclear factor-kappaB by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes*. 2004;53(11):2910-20.
104. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell death & disease*. 2018;9(2):119.
105. Geraldes P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation research*. 2010;106(8):1319-31.
106. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox biology*. 2014;2:411-29.
107. Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*. 2005;15(7):16R-28R.
108. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes and infection*. 2004;6(13):1219-25.
109. Senatus LM, Schmidt AM. The AGE-RAGE Axis: Implications for Age-Associated Arterial Diseases. *Frontiers in genetics*. 2017;8:187.
110. Wang M, Zhang W, Xu S, Peng L, Wang Z, Liu H, et al. TRB3 mediates advanced glycation end product-induced apoptosis of pancreatic beta-cells through the protein kinase C beta pathway. *International journal of molecular medicine*. 2017;40(1):130-6.
111. Akirav EM, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt AM, et al. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PloS one*. 2012;7(4):e34698.
112. Brisslert M, Amu S, Pullerits R. Intra-peritoneal sRAGE treatment induces alterations in cellular distribution of CD19(+), CD3 (+) and Mac-1 (+) cells in lymphoid organs and peritoneal cavity. *Cell and tissue research*. 2013;351(1):139-48.
113. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(10):1507-15.

114. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, et al. RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *Journal of immunology*. 2008;181(6):4272-8.
115. Morro M, Vila L, Franckhauser S, Mallol C, Elias G, Ferre T, et al. Vitamin D Receptor Overexpression in beta-Cells Ameliorates Diabetes in Mice. *Diabetes*. 2020;69(5):927-39.
116. Patel SR, Xu Y, Koenig RJ, Hsu CH. Effect of glucose on the function of the calcitriol receptor and vitamin D metabolism. *Kidney international*. 1997;52(1):79-86.
117. Monti P, Brigatti C, Krasmann M, Ziegler AG, Bonifacio E. Concentration and activity of the soluble form of the interleukin-7 receptor alpha in type 1 diabetes identifies an interplay between hyperglycemia and immune function. *Diabetes*. 2013;62(7):2500-8.
118. Bonifacio E. Predicting type 1 diabetes using biomarkers. *Diabetes care*. 2015;38(6):989-96.
119. Winkler C, Schober E, Ziegler AG, Holl RW. Markedly reduced rate of diabetic ketoacidosis at onset of type 1 diabetes in relatives screened for islet autoantibodies. *Pediatric diabetes*. 2012;13(4):308-13.
120. Writing Group for the DERG, Orchard TJ, Nathan DM, Zinman B, Cleary P, Brillon D, et al. Association between 7 years of intensive treatment of type 1 diabetes and long-term mortality. *Jama*. 2015;313(1):45-53.
121. Batstra MR, Aanstoot HJ, Herbrink P. Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using beta-cell autoantibodies. *Clinical laboratory*. 2001;47(9-10):497-507.
122. Petruzelkova L, Ananieva-Jordanova R, Vcelakova J, Vesely Z, Stechova K, Lebl J, et al. The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children from the onset of Type 1 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2014;31(2):165-71.
123. Wenzlau JM, Frisch LM, Gardner TJ, Sarkar S, Hutton JC, Davidson HW. Novel antigens in type 1 diabetes: the importance of ZnT8. *Current diabetes reports*. 2009;9(2):105-12.
124. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(43):17040-5.
125. Mayr A, Schlosser M, Grober N, Kenk H, Ziegler AG, Bonifacio E, et al. GAD autoantibody affinity and epitope specificity identify distinct immunization profiles in children at risk for type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(6):1527-33.
126. Jia X, He L, Miao D, Waugh K, Geno Rasmussen C, Dong F, et al. High-affinity ZnT8 autoantibodies by electrochemiluminescence assay improve risk prediction for type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2021.
127. Stechova K, Bohmova K, Vrabelova Z, Sepa A, Stadlerova G, Zacharovova K, et al. High T-helper-1 cytokines but low T-helper-3 cytokines, inflammatory cytokines and chemokines in children with high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2007;23(6):462-71.
128. Kayserova J, Vcelakova J, Stechova K, Dudkova E, Hromadkova H, Sumnik Z, et al. Decreased dendritic cell numbers but increased TLR9-mediated interferon-alpha production in first degree relatives of type 1 diabetes patients. *Clinical immunology*. 2014;153(1):49-55.
129. Diana J, Gahzarian L, Simoni Y, Lehuen A. Innate immunity in type 1 diabetes. *Discovery medicine*. 2011;11(61):513-20.
130. Nakanishi K, Saitoh S. Clinical and genetic characteristics of patients with type 1 diabetes associated with interferon therapy. *Diabetes care*. 2011;34(2):471-3.
131. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, et al. 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.
132. Pathak V, Pathak NM, O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Medina RJ. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clinical medicine insights Endocrinology and diabetes*. 2019;12:1179551419844521.

133. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes care*. 2021;44(Suppl 1):S1-S2.
134. Nielsen HB, Ovesen LL, Mortensen LH, Lau CJ, Joensen LE. Type 1 diabetes, quality of life, occupational status and education level - A comparative population-based study. *Diabetes research and clinical practice*. 2016;121:62-8.
135. Schram MT, Baan CA, Pouwer F. Depression and quality of life in patients with diabetes: a systematic review from the European depression in diabetes (EDID) research consortium. *Current diabetes reviews*. 2009;5(2):112-9.
136. Alvarado-Martel D, Velasco R, Sanchez-Hernandez RM, Carrillo A, Novoa FJ, Wagner AM. Quality of life and type 1 diabetes: a study assessing patients' perceptions and self-management needs. *Patient preference and adherence*. 2015;9:1315-23.
137. Riva A, Chokshi S. Immune checkpoint receptors: homeostatic regulators of immunity. *Hepatology international*. 2018;12(3):223-36.
138. Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(6):2228-33.
139. Scolding NJ, Pasquini M, Reingold SC, Cohen JA, International Conference on Cell-Based Therapies for Multiple S, International Conference on Cell-Based Therapies for Multiple S, et al. Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2017;140(11):2776-96.
140. Mount NM, Ward SJ, Kefalas P, Hyllner J. Cell-based therapy technology classifications and translational challenges. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2015;370(1680):20150017.
141. Heathman TR, Nienow AW, McCall MJ, Coopman K, Kara B, Hewitt CJ. The translation of cell-based therapies: clinical landscape and manufacturing challenges. *Regenerative medicine*. 2015;10(1):49-64.
142. Wang Z, Liu X, Cao F, Bellanti JA, Zhou J, Zheng SG. Prospects of the Use of Cell Therapy to Induce Immune Tolerance. *Front Immunol*. 2020;11:792.
143. Snowden JA, Badoglio M, Labopin M, Giebel S, McGrath E, Marjanovic Z, et al. Evolution, trends, outcomes, and economics of hematopoietic stem cell transplantation in severe autoimmune diseases. *Blood advances*. 2017;1(27):2742-55.
144. Muraro PA, Pasquini M, Atkins HL, Bowen JD, Farge D, Fassas A, et al. Long-term Outcomes After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis. *JAMA neurology*. 2017;74(4):459-69.
145. Alexander T, Bondanza A, Muraro PA, Greco R, Saccardi R, Daikeler T, et al. SCT for severe autoimmune diseases: consensus guidelines of the European Society for Blood and Marrow Transplantation for immune monitoring and biobanking. *Bone marrow transplantation*. 2015;50(2):173-80.
146. Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature*. 1981;292(5818):60-1.
147. Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*. 1981;11(3):195-9.
148. Holoshitz J, Naparstek Y, Ben-Nun A, Cohen IR. Lines of T lymphocytes induce or vaccinate against autoimmune arthritis. *Science*. 1983;219(4580):56-8.
149. Lider O, Reshef T, Beraud E, Ben-Nun A, Cohen IR. Anti-idiotypic network induced by T cell vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1988;239(4836):181-3.
150. Beraud E, Kotake S, Caspi RR, Oddo SM, Chan CC, Gery I, et al. Control of experimental autoimmune uveoretinitis by low dose T cell vaccination. *Cellular immunology*. 1992;140(1):112-22.

151. De Alboran IM, Gutierrez JC, Gonzalo JA, Andreu JL, Marcos MA, Kroemer G, et al. Ipr T cells vaccinate against lupus in MRL/lpr mice. *European journal of immunology*. 1992;22(4):1089-93.
152. Kakimoto K, Katsuki M, Hirofujii T, Iwata H, Koga T. Isolation of T cell line capable of protecting mice against collagen-induced arthritis. *Journal of immunology*. 1988;140(1):78-83.
153. Volovitz I, Marmor Y, Mor F, Flugel A, Odoardi F, Eisenbach L, et al. T cell vaccination induces the elimination of EAE effector T cells: analysis using GFP-transduced, encephalitogenic T cells. *Journal of autoimmunity*. 2010;35(2):135-44.
154. MacIsaac J, Siddiqui R, Jamula E, Li N, Baker S, Webert KE, et al. Systematic review of rituximab for autoimmune diseases: a potential alternative to intravenous immune globulin. *Transfusion*. 2018;58(11):2729-35.
155. Majzner RG, Mackall CL. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nature medicine*. 2019;25(9):1341-55.
156. Ellebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, Choi EJ, Mao X, Cho MJ, et al. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science*. 2016;353(6295):179-84.
157. Kansal R, Richardson N, Neeli I, Khawaja S, Chamberlain D, Ghani M, et al. Sustained B cell depletion by CD19-targeted CAR T cells is a highly effective treatment for murine lupus. *Science translational medicine*. 2019;11(482).
158. Dawson NAJ, Levings MK. Antigen-specific regulatory T cells: are police CARs the answer? *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2017;187:53-8.
159. Ellebrecht CT, Payne AS. Setting the target for pemphigus vulgaris therapy. *JCI insight*. 2017;2(5):e92021.
160. Jauregui-Amezaga A, Cabezon R, Ramirez-Morros A, Espana C, Rimola J, Bru C, et al. Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. *Journal of Crohn's & colitis*. 2015;9(12):1071-8.
161. Bell GM, Anderson AE, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry RA, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(1):227-34.
162. Ramalingam R, Larmonier CB, Thurston RD, Midura-Kiela MT, Zheng SG, Ghishan FK, et al. Dendritic cell-specific disruption of TGF-beta receptor II leads to altered regulatory T cell phenotype and spontaneous multiorgan autoimmunity. *Journal of immunology*. 2012;189(8):3878-93.
163. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(8):566-77.
164. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001;193(2):233-8.
165. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2011;34(9):2026-32.
166. Nikolic T, Zwaginga JJ, Uitbeijerse BS, Woittiez NJ, de Koning EJ, Aanstoot HJ, et al. Safety and feasibility of intradermal injection with tolerogenic dendritic cells pulsed with proinsulin peptide-for type 1 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(6):470-2.
167. Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Next-generation regulatory T cell therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2019;18(10):749-69.
168. Mohseni YR, Tung SL, Dudreuilh C, Lechler RI, Fruhwirth GO, Lombardi G. The Future of Regulatory T Cell Therapy: Promises and Challenges of Implementing CAR Technology. *Front Immunol*. 2020;11:1608.
169. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nature medicine*. 2011;17(6):673-5.
170. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature immunology*. 2018;19(7):665-73.

171. Viisanen T, Gazali AM, Ihantola EL, Ekman I, Nanto-Salonen K, Veijola R, et al. FOXP3+ Regulatory T Cell Compartment Is Altered in Children With Newly Diagnosed Type 1 Diabetes but Not in Autoantibody-Positive at-Risk Children. *Front Immunol*. 2019;10:19.
172. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Derkowska I, Juscinska J, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up. *Clinical immunology*. 2014;153(1):23-30.
173. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine*. 2015;7(315):315ra189.
174. Boardman D, Maher J, Lechler R, Smyth L, Lombardi G. Antigen-specificity using chimeric antigen receptors: the future of regulatory T-cell therapy? *Biochemical Society transactions*. 2016;44(2):342-8.
175. Sadeqi Nezhad M, Seifalian A, Bagheri N, Yaghoubi S, Karimi MH, Adbollahpour-Alitappeh M. Chimeric Antigen Receptor Based Therapy as a Potential Approach in Autoimmune Diseases: How Close Are We to the Treatment? *Front Immunol*. 2020;11:603237.
176. Fransson M, Piras E, Burman J, Nilsson B, Essand M, Lu B, et al. CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:112.
177. Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, et al. Prevention of Allograft Rejection by Use of Regulatory T Cells With an MHC-Specific Chimeric Antigen Receptor. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017;17(4):917-30.
178. MacDonald KG, Hoeppli RE, Huang Q, Gillies J, Luciani DS, Orban PC, et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(4):1413-24.
179. Skuljec J, Chmielewski M, Happle C, Habener A, Busse M, Abken H, et al. Chimeric Antigen Receptor-Redirected Regulatory T Cells Suppress Experimental Allergic Airway Inflammation, a Model of Asthma. *Front Immunol*. 2017;8:1125.
180. Liu X, Rui T, Zhang S, Ding Z. Heterogeneity of MSC: Origin, Molecular Identities, and Functionality. *Stem cells international*. 2019;2019:9281520.
181. Ansboro S, Roelofs AJ, De Bari C. Mesenchymal stem cells for the management of rheumatoid arthritis: immune modulation, repair or both? *Current opinion in rheumatology*. 2017;29(2):201-7.
182. Qi Y, Ma J, Li S, Liu W. Applicability of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with type 2 diabetes. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):274.
183. Zhao L, Chen S, Yang P, Cao H, Li L. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):182.
184. Li C, Zhao H, Wang B. Mesenchymal stem/stromal cells: Developmental origin, tumorigenesis and translational cancer therapeutics. *Translational oncology*. 2021;14(1):100948.
185. Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, El Gazzar M. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infection and immunity*. 2012;80(6):2026-34.
186. Hutchinson JA, Ahrens N, Riquelme P, Walter L, Gruber M, Boger CA, et al. Clinical management of patients receiving cell-based immunoregulatory therapy. *Transfusion*. 2014;54(9):2336-43.
187. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
188. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *European journal of immunology*. 2007;37 Suppl 1:S53-60.

189. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature immunology*. 2010;11(7):585-93.
190. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(1):19-30.
191. Palová-Jelínková AGKDL. Tolerogenní dendritické buňky a jejich využití v léčbě imunopatologických stavů. *Česko-slovenská pediatrie*. 2017;4:256-62.
192. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology*. 2004;5(12):1219-26.
193. Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia*. 2001;36(2):165-79.
194. Chung WS, Welsh CA, Barres BA, Stevens B. Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nature neuroscience*. 2015;18(11):1539-45.
195. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.
196. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain research Brain research reviews*. 1995;20(3):269-87.
197. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82(6):1365-74.
198. Li H, Shi B. Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cellular & molecular immunology*. 2015;12(1):24-30.
199. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and cell biology*. 2002;80(5):477-83.
200. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5.
201. Riolfi-Blanco L, Sanchez-Sanchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbi AL, et al. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *Journal of immunology*. 2005;174(7):4070-80.
202. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wyszocka M, Trinchieri G, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *European journal of immunology*. 1996;26(3):659-68.
203. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2000;18:767-811.
204. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Advances in immunology*. 2010;108:111-65.
205. Sallusto F, Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis research*. 2002;4 Suppl 3:S127-32.
206. Maggi J, Schafer C, Ubilla-Olguin G, Catalan D, Schinnerling K, Aguillon JC. Therapeutic Potential of Hyporesponsive CD4(+) T Cells in Autoimmunity. *Frontiers in immunology*. 2015;6:488.
207. Stumpfova Z, Hezova R, Meli AC, Slaby O, Michalek J. MicroRNA profiling of activated and tolerogenic human dendritic cells. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:259689.
208. Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Frontiers in immunology*. 2014;5:7.
209. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology*. 2002;23(9):445-9.
210. Thompson AG, Thomas R. Induction of immune tolerance by dendritic cells: implications for preventative and therapeutic immunotherapy of autoimmune disease. *Immunology and cell biology*. 2002;80(6):509-19.

211. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Frontiers in immunology*. 2013;4:82.
212. Pletinckx K, Dohler A, Pavlovic V, Lutz MB. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Front Immunol*. 2011;2:39.
213. Raker VK, Domogalla MP, Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front Immunol*. 2015;6:569.
214. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*. 2002;99(7):2468-76.
215. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(7):1027-34.
216. Wu J, Horuzsko A. Expression and function of immunoglobulin-like transcripts on tolerogenic dendritic cells. *Human immunology*. 2009;70(5):353-6.
217. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*. 2001;2(3):261-8.
218. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(13):3015-29.
219. Chang CC, Liu Z, Vlad G, Qin H, Qiao X, Mancini DM, et al. Ig-like transcript 3 regulates expression of proinflammatory cytokines and migration of activated T cells. *Journal of immunology*. 2009;182(9):5208-16.
220. Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathologie-biologie*. 2003;51(2):59-60.
221. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(8):585-98.
222. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2003;21:685-711.
223. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *Journal of immunology*. 2000;164(7):3596-9.
224. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(4):447-57.
225. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(6):1693-702.
226. Helft J, Bottcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*. 2015;42(6):1197-211.
227. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *Journal of immunological methods*. 1999;223(1):1-15.
228. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;311:17-58.
229. Yoo S, Ha SJ. Generation of Tolerogenic Dendritic Cells and Their Therapeutic Applications. *Immune network*. 2016;16(1):52-60.

230. Naranjo-Gomez M, Raich-Regue D, Onate C, Grau-Lopez L, Ramo-Tello C, Pujol-Borrell R, et al. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *Journal of translational medicine*. 2011;9:89.
231. Torres-Aguilar H, Sanchez-Torres C, Jara LJ, Blank M, Shoenfeld Y. IL-10/TGF-beta-treated dendritic cells, pulsed with insulin, specifically reduce the response to insulin of CD4+ effector/memory T cells from type 1 diabetic individuals. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(5):659-68.
232. Boks MA, Kager-Groenland JR, Haasjes MS, Zwaginga JJ, van Ham SM, ten Brinke A. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clinical immunology*. 2012;142(3):332-42.
233. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
234. Svajger U, Obermajer N, Jeras M. IFN-gamma-rich environment programs dendritic cells toward silencing of cytotoxic immune responses. *Journal of leukocyte biology*. 2014;95(1):33-46.
235. Kerkar SP, Chinnasamy D, Hadi N, Melenhorst J, Muranski P, Spyridonidis A, et al. Timing and intensity of exposure to interferon-gamma critically determines the function of monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*. 2014;143(1):96-108.
236. Harry RA, Anderson AE, Isaacs JD, Hilkens CM. Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(11):2042-50.
237. Ferreira GB, van Etten E, Verstuyf A, Waer M, Overbergh L, Gysemans C, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 alters murine dendritic cell behaviour in vitro and in vivo. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011;27(8):933-41.
238. Danova K, Klapetkova A, Kayserova J, Sediva A, Spisek R, Jelinkova LP. NF-kappaB, p38 MAPK, ERK1/2, mTOR, STAT3 and increased glycolysis regulate stability of paricalcitol/dexamethasone-generated tolerogenic dendritic cells in the inflammatory environment. *Oncotarget*. 2015;6(16):14123-38.
239. Nikolic T, Roep BO. Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin d3-treated tolerogenic dendritic cells. *Frontiers in immunology*. 2013;4:113.
240. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, de Ritis DG, Curti A, et al. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood*. 2006;108(1):218-27.
241. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 2005;436(7054):1181-5.
242. Hackstein H, Morelli AE, Larregina AT, Ganster RW, Papworth GD, Logar AJ, et al. Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166(12):7053-62.
243. Mehling A, Grabbe S, Voskort M, Schwarz T, Luger TA, Beissert S. Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol*. 2000;165(5):2374-81.
244. Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A, et al. Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood*. 2003;101(11):4457-63.
245. Trabanelli S, Lecciso M, Salvestrini V, Cavo M, Ocadlikova D, Lemoli RM, et al. PGE2-induced IDO1 inhibits the capacity of fully mature DCs to elicit an in vitro antileukemic immune response. *Journal of immunology research*. 2015;2015:253191.
246. Giannoukakis N. Tolerogenic dendritic cells for Type 1 diabetes. *Immunotherapy*. 2013;5(6):569-71.

247. Wang H, Qi F, Dai X, Tian W, Liu T, Han H, et al. Requirement of B7-H1 in mesenchymal stem cells for immune tolerance to cardiac allografts in combination therapy with rapamycin. *Transplant immunology*. 2014;31(2):65-74.
248. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-6.
249. Hilkens CM, Isaacs JD. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? *Clinical and experimental immunology*. 2013;172(2):148-57.
250. Hutchinson JA, Geissler EK. Now or never? The case for cell-based immunosuppression in kidney transplantation. *Kidney international*. 2015;87(6):1116-24.
251. Benham H, Nel HJ, Law SC, Mehdi AM, Street S, Ramnoruth N, et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Science translational medicine*. 2015;7(290):290ra87.
252. Bell GM, Anderson AE, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry RA, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016.
253. Young Bin Joo J-EP, Chan-Bum Choi, Jeongim Choi, Jin-ah Jang, Minkyu Heo, Hak-yeop Kim, Hye-Soon Lee, Yong-Soo Bae and Sang-Cheol Bae. Phase 1 Study of Immunotherapy Using Autoantigen-Loaded Dendritic Cells in Patients with Anti-Citrullinated Peptide Antigen Positive Rheumatoid Arthritis. *ACR/ARHP Annual Meeting 2014*.
254. Danova K, Grohova A, Strnadova P, Funda DP, Sumnik Z, Lebl J, et al. Tolerogenic Dendritic Cells from Poorly Compensated Type 1 Diabetes Patients Have Decreased Ability To Induce Stable Antigen-Specific T Cell Hyporesponsiveness and Generation of Suppressive Regulatory T Cells. *Journal of immunology*. 2017;198(2):729-40.
255. Ten Brinke A, Martinez-Llordella M, Cools N, Hilkens CMU, van Ham SM, Sawitzki B, et al. Ways Forward for Tolerance-Inducing Cellular Therapies- an AFACTT Perspective. *Front Immunol*. 2019;10:181.
256. Baas MC, Kuhn C, Valette F, Mangez C, Duarte MS, Hill M, et al. Combining autologous dendritic cell therapy with CD3 antibodies promotes regulatory T cells and permanent islet allograft acceptance. *Journal of immunology*. 2014;193(9):4696-703.
257. Pawelec G, Verschoor CP, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Not Only in Tumor Immunity. *Front Immunol*. 2019;10:1099.
258. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 2013;138(2):105-15.
259. Sacchi A, Tumino N, Sabatini A, Cimini E, Casetti R, Bordoni V, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Specifically Suppress IFN-gamma Production and Antitumor Cytotoxic Activity of Vdelta2 T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:1271.
260. Vetsika EK, Koinis F, Gioulbasani M, Aggouraki D, Koutoulaki A, Skalidaki E, et al. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. *Journal of immunology research*. 2014;2014:659294.
261. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(10):739-52.
262. Zhao Y, Wu T, Shao S, Shi B, Zhao Y. Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2016;5(2):e1004983.
263. Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, et al. Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2015;88(2):77-91.

264. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*. 2007;67(1):425; author reply 6.
265. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2016;65(2):161-9.
266. Cassetta L, Baekkevold ES, Brandau S, Bujko A, Cassatella MA, Dorhoi A, et al. Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2019;68(4):687-97.
267. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(8):1155-67.
268. Nagaraj S, Youn JI, Weber H, Iclozan C, Lu L, Cotter MJ, et al. Anti-inflammatory triterpenoid blocks immune suppressive function of MDSCs and improves immune response in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(6):1812-23.
269. Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity*. 2010;32(6):790-802.
270. Koehn BH, Apostolova P, Haverkamp JM, Miller JS, McCullar V, Tolar J, et al. GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 2015;126(13):1621-8.
271. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(24):21123-9.
272. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research*. 2005;65(8):3044-8.
273. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology*. 2009;182(9):5693-701.
274. Bronte V, Mocellin S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *Journal of immunotherapy*. 2009;32(1):1-11.
275. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(3):162-74.
276. Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of leukocyte biology*. 2012;91(1):167-81.
277. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal*. 1994;298 (Pt 2):249-58.
278. Garcia-Ortiz A, Serrador JM. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends in molecular medicine*. 2018;24(4):412-27.
279. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(5):781-90.
280. Lee CR, Kwak Y, Yang T, Han JH, Park SH, Ye MB, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Controlled by Regulatory T Cells via TGF-beta during Murine Colitis. *Cell reports*. 2016;17(12):3219-32.

281. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research*. 2006;66(2):1123-31.
282. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer research*. 2010;70(1):99-108.
283. Lelis FJN, Jaufmann J, Singh A, Fromm K, Teschner AC, Poschel S, et al. Myeloid-derived suppressor cells modulate B-cell responses. *Immunology letters*. 2017;188:108-15.
284. Ozkan B, Lim H, Park SG. Immunomodulatory Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells during B Cell-Mediated Immune Responses. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(5).
285. Crook KR, Jin M, Weeks MF, Rampersad RR, Baldi RM, Glekas AS, et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate T cell and B cell responses during autoimmune disease. *Journal of leukocyte biology*. 2015;97(3):573-82.
286. Gros A, Turcotte S, Wunderlich JR, Ahmadzadeh M, Dudley ME, Rosenberg SA. Myeloid cells obtained from the blood but not from the tumor can suppress T-cell proliferation in patients with melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(19):5212-23.
287. Crispen PL, Kusmartsev S. Mechanisms of immune evasion in bladder cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2020;69(1):3-14.
288. Blidner AG, Mendez-Huergo SP, Cagnoni AJ, Rabinovich GA. Re-wiring regulatory cell networks in immunity by galectin-glycan interactions. *FEBS letters*. 2015;589(22):3407-18.
289. Wang T, Chu Z, Lin H, Jiang J, Zhou X, Liang X. Galectin-3 contributes to cisplatin-induced myeloid derived suppressor cells (MDSCs) recruitment in Lewis lung cancer-bearing mice. *Molecular biology reports*. 2014;41(6):4069-76.
290. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *European journal of immunology*. 2010;40(1):22-35.
291. Lim HX, Kim TS, Poh CL. Understanding the Differentiation, Expansion, Recruitment and Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancers. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(10).
292. Lim HX, Hong HJ, Cho D, Kim TS. IL-18 enhances immunosuppressive responses by promoting differentiation into monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology*. 2014;193(11):5453-60.
293. Law AMK, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells*. 2020;9(3).
294. Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I, Deraos G, Matsoukas J, Gravanis A, et al. Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *Journal of immunology*. 2012;188(3):1136-46.
295. Haile LA, von Wasielewski R, Gamrekashvili J, Kruger C, Bachmann O, Westendorf AM, et al. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*. 2008;135(3):871-81, 81 e1-5.
296. Marhaba R, Vitacolonna M, Hildebrand D, Baniyash M, Freyschmidt-Paul P, Zoller M. The importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. *Journal of immunology*. 2007;179(8):5071-81.
297. Ji J, Xu J, Zhao S, Liu F, Qi J, Song Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to systemic lupus erythematosis by regulating differentiation of Th17 cells and Tregs. *Clinical science*. 2016;130(16):1453-67.

298. Jiao Z, Hua S, Wang W, Wang H, Gao J, Wang X. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlated negatively with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2013;42(2):85-90.
299. Kurko J, Vida A, Glant TT, Scanzello CR, Katz RS, Nair A, et al. Identification of myeloid-derived suppressor cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *BMC musculoskeletal disorders*. 2014;15:281.
300. Zhang H, Wang S, Huang Y, Wang H, Zhao J, Gaskin F, et al. Myeloid-derived suppressor cells are proinflammatory and regulate collagen-induced arthritis through manipulating Th17 cell differentiation. *Clinical immunology*. 2015;157(2):175-86.
301. Yin B, Ma G, Yen CY, Zhou Z, Wang GX, Divino CM, et al. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *Journal of immunology*. 2010;185(10):5828-34.
302. Whitfield-Larry F, Felton J, Buse J, Su MA. Myeloid-derived suppressor cells are increased in frequency but not maximally suppressive in peripheral blood of Type 1 Diabetes Mellitus patients. *Clinical immunology*. 2014;153(1):156-64.
303. Cabello-Olmo M, Arana M, Radichev I, Smith P, Huarte E, Barajas M. New Insights into Immunotherapy Strategies for Treating Autoimmune Diabetes. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(19).
304. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *The New England journal of medicine*. 2006;355(13):1318-30.
305. Faradji RN, Tharavanij T, Messinger S, Froud T, Pileggi A, Monroy K, et al. Long-term insulin independence and improvement in insulin secretion after supplemental islet infusion under exenatide and etanercept. *Transplantation*. 2008;86(12):1658-65.
306. Griffin KJ, Thompson PA, Gottschalk M, Kyllö JH, Rabinovitch A. Combination therapy with sitagliptin and lansoprazole in patients with recent-onset type 1 diabetes (REPAIR-T1D): 12-month results of a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2014;2(9):710-8.
307. Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia*. 2018;61(4):810-20.
308. Paun A, Yau C, Danska JS. The Influence of the Microbiome on Type 1 Diabetes. *Journal of immunology*. 2017;198(2):590-5.
309. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012;143(4):913-6 e7.
310. Marroqui L, Dos Santos RS, Op de Beeck A, Coomans de Brachene A, Marselli L, Marchetti P, et al. Interferon-alpha mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(4):656-67.
311. 12. Children and Adolescents: *Standards of Medical Care in Diabetes—2018*. *Diabetes care*. 2018;41(Supplement 1):S126-S36.
312. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. 2010;115(23):4742-9.
313. Zhang M, Fu Y, Chen Y, Ma Y, Guo Z, Wang Y, et al. Inhibition of the mTORC1/NF-kappaB Axis Alters Amino Acid Metabolism in Human Hepatocytes. *BioMed research international*. 2021;2021:8621464.
314. Grohová A, Dáňová K, Špišek R, Palová-Jelínková L. Cell Based Therapy for Type 1 Diabetes: Should We Take Hyperglycemia Into Account? *Frontiers in Immunology*. 2019;10(79).

315. Lu H, Yao K, Huang D, Sun A, Zou Y, Qian J, et al. High glucose induces upregulation of scavenger receptors and promotes maturation of dendritic cells. *Cardiovascular diabetology*. 2013;12:80.
316. Kumar P, Natarajan K, Shanmugam N. High glucose driven expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine genes in lymphocytes: molecular mechanisms of IL-17 family gene expression. *Cellular signalling*. 2014;26(3):528-39.
317. Han XQ, Gong ZJ, Xu SQ, Li X, Wang LK, Wu SM, et al. Advanced glycation end products promote differentiation of CD4(+) T helper cells toward pro-inflammatory response. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2014;34(1):10-7.
318. Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, Kobayashi M, Nakamura K, Satoh T, et al. Double deficiency in IL-17 and IFN-gamma signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*. 2013;56(8):1773-80.
319. Li Y, Liu Y, Chu CQ. Th17 Cells in Type 1 Diabetes: Role in the Pathogenesis and Regulation by Gut Microbiome. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:638470.
320. Reinert-Hartwall L, Honkanen J, Salo HM, Nieminen JK, Luopajarvi K, Harkonen T, et al. Th1/Th17 plasticity is a marker of advanced beta cell autoimmunity and impaired glucose tolerance in humans. *Journal of immunology*. 2015;194(1):68-75.
321. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology*. 2016;37(3):208-20.
322. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3356-64.
323. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer immunology research*. 2017;5(1):3-8.
324. Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology*. 2010;184(6):3106-16.
325. Fujimura T, Kambayashi Y, Aiba S. Crosstalk between regulatory T cells (Tregs) and myeloid derived suppressor cells (MDSCs) during melanoma growth. *Oncoimmunology*. 2012;1(8):1433-4.
326. Paluskievicz CM, Cao X, Abdi R, Zheng P, Liu Y, Bromberg JS. T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:2453.
327. Mosanya CH, Isaacs JD. Tolerising cellular therapies: what is their promise for autoimmune disease? *Annals of the rheumatic diseases*. 2019;78(3):297-310.
328. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International immunology*. 2009;21(10):1105-11.
329. Zubizarreta I, Florez-Grau G, Vila G, Cabezón R, España C, Andorra M, et al. Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(17):8463-70.
330. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, et al. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *International journal of cancer*. 2001;93(2):243-51.
331. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lysterly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer research*. 1999;59(1):56-8.
332. Butterfield LH. Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: are we making progress? *Front Immunol*. 2013;4:454.

333. De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JH, Van Muijen GN, et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer research*. 2003;63(1):12-7.
334. Hilkens CM, Isaacs JD, Thomson AW. Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *International reviews of immunology*. 2010;29(2):156-83.
335. Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, Steinbrink K. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front Immunol*. 2017;8:1764.
336. Au KM, Tisch R, Wang AZ. In Vivo Bioengineering of Beta Cells with Immune Checkpoint Ligand as a Treatment for Early-Onset Type 1 Diabetes Mellitus. *ACS nano*. 2021;15(12):19990-20002.
337. Rathod TN, Marathe NA, Sathe AH, Mohanty SS, Mallepally AR. Anterior Distraction and Reduction with Posterior Stabilization for Basilar Invagination: A Novel Technique. *World neurosurgery*. 2021;145:19-24.
338. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breitmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 2003;18(5):605-17.
339. Kryczanowsky F, Raker V, Graulich E, Domogalla MP, Steinbrink K. IL-10-Modulated Human Dendritic Cells for Clinical Use: Identification of a Stable and Migratory Subset with Improved Tolerogenic Activity. *Journal of immunology*. 2016;197(9):3607-17.
340. Unger WW, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *European journal of immunology*. 2009;39(11):3147-59.
341. Kalesnikoff J, Baur N, Leitges M, Hughes MR, Damen JE, Huber M, et al. SHIP negatively regulates IgE + antigen-induced IL-6 production in mast cells by inhibiting NF-kappa B activity. *Journal of immunology*. 2002;168(9):4737-46.
342. Ouaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity*. 2002;16(2):257-70.
343. Hofer S, Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Francolini M, Ricciardi-Castagnoli P. Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. *Microbes and infection*. 2001;3(4):259-65.
344. Grumont R, Hochrein H, O'Keeffe M, Gugasyan R, White C, Caminschi I, et al. c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(8):1021-32.
345. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*. 2017;2.
346. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(36):26041-50.
347. Tas SW, Vervoordeldonk MJ, Hajji N, Schuitemaker JH, van der Sluijs KF, May MJ, et al. Noncanonical NF-kappaB signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood*. 2007;110(5):1540-9.
348. Harden JL, Egilmez NK. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunological investigations*. 2012;41(6-7):738-64.
349. Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends in immunology*. 2014;35(3):114-22.
350. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(12):8023-32.

351. Jorgensen PF, Wang JE, Almløf M, Solberg R, Okkenhaug C, Scholz T, et al. Sirolimus interferes with the innate response to bacterial products in human whole blood by attenuation of IL-10 production. *Scandinavian journal of immunology*. 2001;53(2):184-91.
352. Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, Kasturi S, Zeyda M, Zlabinger GJ, et al. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *Journal of immunology*. 2010;185(7):3919-31.
353. Izzedine H, Brocheriou I, Frances C. Post-transplantation proteinuria and sirolimus. *The New England journal of medicine*. 2005;353(19):2088-9.
354. Dittrich E, Schmaldienst S, Soleiman A, Horl WH, Pohanka E. Rapamycin-associated post-transplantation glomerulonephritis and its remission after reintroduction of calcineurin-inhibitor therapy. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2004;17(4):215-20.
355. Weichhart T, Haidinger M, Katholnig K, Kopecky C, Poglitsch M, Lassnig C, et al. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood*. 2011;117(16):4273-83.
356. Ferreira GB, Vanherwegen AS, Eelen G, Gutierrez ACF, Van Lommel L, Marchal K, et al. Vitamin D3 Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. *Cell reports*. 2015;10(5):711-25.
357. Pearce EJ, Everts B. Dendritic cell metabolism. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(1):18-29.
358. Wculek SK, Khouili SC, Priego E, Heras-Murillo I, Sancho D. Metabolic Control of Dendritic Cell Functions: Digesting Information. *Front Immunol*. 2019;10:775.
359. Hernandez-Sanchez F, Guzman-Beltran S, Herrera MT, Gonzalez Y, Salgado M, Fabian G, et al. High glucose induces O-GlcNAc glycosylation of the vitamin D receptor (VDR) in THP1 cells and in human macrophages derived from monocytes. *Cell biology international*. 2017;41(9):1065-74.
360. Waschbisch A, Sanderson N, Krumbholz M, Vlad G, Theil D, Schwab S, et al. Interferon beta and vitamin D synergize to induce immunoregulatory receptors on peripheral blood monocytes of multiple sclerosis patients. *PloS one*. 2014;9(12):e115488.
361. Hodgkinson CP, Laxton RC, Patel K, Ye S. Advanced glycation end-product of low density lipoprotein activates the toll-like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(12):2275-81.
362. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;290(3):C917-24.
363. Tobon-Velasco JC, Cuevas E, Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF- κ B pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2014;13(9):1615-26.
364. Kim HJ, Jeong MS, Jang SB. Molecular Characteristics of RAGE and Advances in Small-Molecule Inhibitors. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(13).
365. Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2001;17(6):436-43.
366. Segovia-Gamboa N, Rodriguez-Arellano ME, Rangel-Cruz R, Sanchez-Diaz M, Ramirez-Reyes JC, Faradji R, et al. Tolerogenic dendritic cells induce antigen-specific hyporesponsiveness in insulin- and glutamic acid decarboxylase 65-autoreactive T lymphocytes from type 1 diabetic patients. *Clinical immunology*. 2014;154(1):72-83.
367. Bian ML, Haigh O, Munster D, Harris M, Cotterill A, Miles JJ, et al. Reactivated CD4⁺Tm cells of T1D patients and siblings display an exaggerated effector phenotype with heightened sensitivity to activation-induced cell death. *Diabetes*. 2015;64(6):2161-71.

368. Martinez N, Vallerskog T, West K, Nunes-Alves C, Lee J, Martens GW, et al. Chromatin decondensation and T cell hyperresponsiveness in diabetes-associated hyperglycemia. *Journal of immunology*. 2014;193(9):4457-68.
369. McKinney EF, Lee JC, Jayne DR, Lyons PA, Smith KG. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature*. 2015;523(7562):612-6.
370. Culina S, Lalanne AI, Afonso G, Cerosaletti K, Pinto S, Sebastiani G, et al. Islet-reactive CD8(+) T cell frequencies in the pancreas, but not in blood, distinguish type 1 diabetic patients from healthy donors. *Science immunology*. 2018;3(20).
371. McKinney EF, Smith KG. T cell exhaustion and immune-mediated disease-the potential for therapeutic exhaustion. *Current opinion in immunology*. 2016;43:74-80.
372. Kwong CJ, Selck C, Tahija K, McAnaney LJ, Le DV, Kay TW, et al. Harnessing CD8(+) T-cell exhaustion to treat type 1 diabetes. *Immunology and cell biology*. 2021;99(5):486-95.
373. Wiedeman AE, Muir VS, Rosasco MG, DeBerg HA, Presnell S, Haas B, et al. Autoreactive CD8+ T cell exhaustion distinguishes subjects with slow type 1 diabetes progression. *The Journal of clinical investigation*. 2020;130(1):480-90.
374. Funda DP, Palova-Jelinkova L, Golias J, Kroulikova Z, Fajstova A, Hudcovic T, et al. Optimal Tolerogenic Dendritic Cells in Type 1 Diabetes (T1D) Therapy: What Can We Learn From Non-obese Diabetic (NOD) Mouse Models? *Front Immunol*. 2019;10:967.
375. Ma P, Beatty PL, McKolanis J, Brand R, Schoen RE, Finn OJ. Circulating Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) That Accumulate in Premalignancy Share Phenotypic and Functional Characteristics With MDSC in Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:1401.
376. Tcyganov E, Mastio J, Chen E, Gabrilovich DI. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Current opinion in immunology*. 2018;51:76-82.
377. Hu C, Du W, Zhang X, Wong FS, Wen L. The role of Gr1+ cells after anti-CD20 treatment in type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology*. 2012;188(1):294-301.
378. Fu W, Wojtkiewicz G, Weissleder R, Benoist C, Mathis D. Early window of diabetes determinism in NOD mice, dependent on the complement receptor CR1g, identified by noninvasive imaging. *Nature immunology*. 2012;13(4):361-8.
379. Campbell IL, Kay TW, Oxbrow L, Harrison LC. Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87(2):739-42.
380. Fatima N, Faisal SM, Zubair S, Ajmal M, Siddiqui SS, Moin S, et al. Role of Pro-Inflammatory Cytokines and Biochemical Markers in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Correlation with Age and Glycemic Condition in Diabetic Human Subjects. *PloS one*. 2016;11(8):e0161548.
381. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(6):851-60.
382. Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, Gurgoze MK. Serum IL-1beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators of inflammation*. 2006;2006(1):59206.
383. Xi Q, Li Y, Dai J, Chen W. High frequency of mononuclear myeloid-derived suppressor cells is associated with exacerbation of inflammatory bowel disease. *Immunological investigations*. 2015;44(3):279-87.
384. Cao LY, Chung JS, Teshima T, Feigenbaum L, Cruz PD, Jr., Jacobe HT, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Psoriasis Are an Expanded Population Exhibiting Diverse T-Cell-Suppressor Mechanisms. *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(9):1801-10.
385. Ilkovitch D, Ferris LK. Myeloid-derived suppressor cells are elevated in patients with psoriasis and produce various molecules. *Molecular medicine reports*. 2016;14(4):3935-40.
386. Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1793(6):993-1007.

387. Huang M, Wu R, Chen L, Peng Q, Li S, Zhang Y, et al. S100A9 Regulates MDSCs-Mediated Immune Suppression via the RAGE and TLR4 Signaling Pathways in Colorectal Carcinoma. *Front Immunol.* 2019;10:2243.
388. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology.* 2008;181(7):4666-75.
389. Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *The Journal of clinical investigation.* 2012;122(11):4094-104.
390. Sade-Feldman M, Kanterman J, Ish-Shalom E, Elnekave M, Horwitz E, Baniyash M. Tumor necrosis factor-alpha blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity.* 2013;38(3):541-54.
391. Qiao YC, Chen YL, Pan YH, Tian F, Xu Y, Zhang XX, et al. The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS one.* 2017;12(4):e0176157.
392. Kim J, Kang S, Kim J, Kwon G, Koo S. Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of laboratory medicine.* 2013;33(1):52-9.
393. Zhang L, Zhang Z, Zhang H, Wu M, Wang Y. Myeloid-derived suppressor cells protect mouse models from autoimmune arthritis via controlling inflammatory response. *Inflammation.* 2014;37(3):670-7.
394. Fujii W, Ashihara E, Hirai H, Nagahara H, Kajitani N, Fujioka K, et al. Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. *Journal of immunology.* 2013;191(3):1073-81.
395. Wen L, Gong P, Liang C, Shou D, Liu B, Chen Y, et al. Interplay between myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and Th17 cells: foe or friend? *Oncotarget.* 2016;7(23):35490-6.
396. Guo C, Hu F, Yi H, Feng Z, Li C, Shi L, et al. Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2016;75(1):278-85.
397. Li M, Zhu D, Wang T, Xia X, Tian J, Wang S. Roles of Myeloid-Derived Suppressor Cell Subpopulations in Autoimmune Arthritis. *Front Immunol.* 2018;9:2849.
398. Yi H, Guo C, Yu X, Zuo D, Wang XY. Mouse CD11b+Gr-1+ myeloid cells can promote Th17 cell differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology.* 2012;189(9):4295-304.
399. Obermajer N, Wong JL, Edwards RP, Chen K, Scott M, Khader S, et al. Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. *The Journal of experimental medicine.* 2013;210(7):1433-445.
400. Novitskiy SV, Pickup MW, Gorska AE, Owens P, Chytil A, Aakre M, et al. TGF-beta receptor II loss promotes mammary carcinoma progression by Th17 dependent mechanisms. *Cancer discovery.* 2011;1(5):430-41.
401. He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA, Li J, Mountz JD, et al. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology.* 2010;184(5):2281-8.
402. Cripps JG, Wang J, Maria A, Blumenthal I, Gorham JD. Type 1 T helper cells induce the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in the inflamed Tgfb1 knockout mouse liver. *Hepatology.* 2010;52(4):1350-9.
403. Rodriguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological reviews.* 2008;222:180-91.
404. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews Immunology.* 2005;5(8):641-54.

405. Bian Z, Abdelaal AM, Shi L, Liang H, Xiong L, Kidder K, et al. Arginase-1 is neither constitutively expressed in nor required for myeloid-derived suppressor cell-mediated inhibition of T-cell proliferation. *European journal of immunology*. 2018;48(6):1046-58.
406. Bauswein M, Singh A, Ralhan A, Neri D, Fuchs K, Blanz KD, et al. Human T cells modulate myeloid-derived suppressor cells through a TNF-alpha-mediated mechanism. *Immunology letters*. 2018;202:31-7.
407. Ersek B, Molnar V, Balogh A, Matko J, Cope AP, Buzas EI, et al. CD3zeta-chain expression of human T lymphocytes is regulated by TNF via Src-like adaptor protein-dependent proteasomal degradation. *Journal of immunology*. 2012;189(4):1602-10.
408. Myers MD, Sosinowski T, Dragone LL, White C, Band H, Gu H, et al. Src-like adaptor protein regulates TCR expression on thymocytes by linking the ubiquitin ligase c-Cbl to the TCR complex. *Nature immunology*. 2006;7(1):57-66.

Přílohy