

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta  
Katedra buněčné biologie



**Antigeny HLA II. třídy jako hlavní predispoziční faktor  
autoimunitního diabetu mellitus**

**HLA Class II Antigens as a Main Predisposition Factor for  
Autoimmune Diabetes Mellitus**

Bakalářská práce

## **ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, s použitím uvedených zdrojů a konzultací se svou školitelkou.

V Praze dne 30. dubna 2010

.....

Veronika Zikmundová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych na tomto místě poděkovala Doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za vedení mé bakalářské práce, za její čas a mnoho cenných rad.

## **ABSTRAKT**

Autoimunitní diabetes (diabetes 1. typu) je multifaktoriální onemocnění, při kterém jsou pankreatické  $\beta$ -buňky Langerhansových ostrůvků napadeny imunitním systémem. Jejich postupná destrukce způsobuje nedostatečnou produkci inzulínu pro organismus a tvorbu autoantilátok. Ty slouží jako markery autoimunitní inzulitidy ještě před vlastní manifestací choroby.

T1D vzniká u geneticky predisponovaných jedinců vlivem environmentálních faktorů. Genetická predispozice se týká především genů HLA, které zodpovídají až 50 % za familiární výskyt. Jako nejrizikovější se zatím jeví antigeny HLA-DR3, HLA-DR4 a HLA-DQ8. Jejich aminokyselinová struktura určuje, které peptidy a jak pevně se budou vázat k jednotlivým antigenům. Ty ale nefungují samostatně. Nacházejí se v silné vazebné nerovnováze, a proto určení funkce každého z nich v autoimunitním procesu není jednoznačné.

Environmentální faktory mají na jedince protektivní vliv (například vitamin D), ale stejně tak jsou spouštěčem autoimunity. Nejčastěji diskutovanými vyvolávajícími mechanismy jsou virové infekce (konkrétně virus Coxsackie B4) a předčasná expozice dětí kravskému mléku.

**Klíčová slova:** HLA-DQ, HLA-DR, T1D, autoimunitní diabetes, predispozice, inzulitida.

## **ABSTRACT**

Autoimmune diabetes (type 1 diabetes, T1D) is a multifactorial disease, where the immune system reacts against pancreatic  $\beta$ -cells of Langerhans islets. Their progressive destruction causes insufficient function of insulin for the organism and production of autoantibodies. These antibodies serve as markers of autoimmune insulinitis even before the manifestation of the disease.

T1D is triggered by environmental factors in genetically predisposed individuals. Genetic susceptibility mainly relates to HLA genes, which cause about 50 % of familiar occurrences. The most risk factors are HLA-DR3, HLA-DR4 and HLA-DQ8 antigens. Their aminoacidic structure determines which peptides would bind to individual antigens and how firmly. However, these antigens do not function separately. They are in tight linkage disequilibrium and it is therefore not possible to determine the individual function of each of them in autoimmune process unambiguously.

Environmental factors can have protective effect on individuals (e.g. vitamin D), but they can have predisposition effect for autoimmunity as well. The most discussed trigger mechanisms are viral infections (specifically Coxsackie B4 virus) and premature exposure of newborns to cow-milk.

Keywords: HLA-DQ, HLA-DR, T1D, autoimmune diabetes, predisposition, insulinitis.

# **OBSAH**

|   |           |
|---|-----------|
| <b><u>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</u></b>                                      | <b>7</b>  |
| <b><u>ÚVOD</u></b>  | <b>9</b>  |
| <b><u>ZÁKLADNÍ INFORMACE</u></b>  | <b>10</b> |
| <b>HISTORIE DIABETU</b>   | <b>10</b> |
| <b>DIABETES MELLITUS</b>  | <b>11</b> |
| DIAGNOSTIKA DM  | 11        |
| KLASIFIKACE DM  | 12        |
| <b><u>PATOGENEZE AUTOIMUNITNÍHO DIABETU MELLITUS</u></b>                    | <b>13</b> |
| <b>LANGERHANSOVY OSTRŮVKY</b>   | <b>14</b> |
| INZULÍN   | 14        |
| NEDOSTATEK INZULÍNU   | 16        |
| <b>AUTOIMUNITNÍ INZULITIDA</b>  | <b>16</b> |
| <b>AUTOTOLERANCE</b>  | <b>18</b> |
| <b>MECHANISMUS IMUNITNÍ REAKCE NAMÍŘENÉ PROTI <math>\beta</math>-BUŇKÁM</b> | <b>18</b> |
| <b><u>FAKTORY PODÍLEJÍCÍ SE NA VZNIKU DIABETU</u></b>                       | <b>19</b> |
| <b>GENETICKÉ FAKTORY</b>  | <b>20</b> |
| HLA   | 21        |
| STRUKTURA HLA   | 21        |
| FUNKCE HLA  | 22        |
| NOMENKLATURA HLA  | 22        |
| GENOVÁ OBLAST HLA II. TŘÍDY   | 23        |
| PREDISPOZIČNÍ A PROTEKTIVNÍ HLA ALELY                                       | 24        |
| MODEL PEPTIDOVÉ KOMPETICE   | 25        |
| HLA-DQ  | 25        |
| HLA-DR  | 27        |
| VLIV STRUKTURY HLA NA FUNKCI  | 28        |
| <b>ENVIRONMENTÁLNÍ FAKTORY</b>  | <b>29</b> |
| VIROVÉ INFEKCE  | 30        |
| NUTRIČNÍ A DALŠÍ FAKTORY  | 30        |
| <b><u>ZÁVĚR</u></b>   | <b>32</b> |
| <b><u>SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ</u></b>                                      | <b>33</b> |
| <b><u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u></b>                                     | <b>34</b> |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|       |  |
|-------|--|
| APC   | Antigen prezentující buňka (Antigen Presenting Cell)   |
| ATP   | Adenosintrifosfát  |
| CLIP  | Invariantní peptidový řetězec asociovaný s HLA II. třídy (Class II-Associated Invariant Chain Peptide) |
| CTLA  | Cytotoxický T-lymfocytární antigen (Polymorphic Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen)             |
| Da    | Dalton (jednotka molekulární hmotnosti)  |
| DC    | Dendritické buňky (Dendritic Cells)  |
| DM    | Diabetes mellitus  |
| DNA   | Deoxyribonukleová kyselina   |
| Fas   | Faktor iniciující apoptózu (Apoptosis-Signaling Factor)  |
| FasL  | Ligand pro faktor iniciující apoptózu  |
| FPG   | Měření hladiny glukózy nalačno (Fasting Plasma Glucose)  |
| GAD   | Dekarboxyláza kyseliny glutamové (Glutamic Acid Decarboxylase)   |
| GDM   | Gestační diabetes mellitus   |
| HLA   | Hlavní lidský histokompatibilní antigen (Human Leukocyte Antigen)                                      |
| IAA   | Autoprotilátky proti inzulínu (Insulin Autoantibodies)   |
| ICA   | Protilátky proti buňkám Langerhansových ostrůvků (Islet Cell Antibodies)                               |
| ICAM  | Interbuněčná adhezní molekula (Inter-Cellular Adhesion Molecule)                                       |
| ICSA  | Autoprotilátky proti povrchovým buňkám Langerhansových ostrůvků (Islet Cell Surface Autoantibody)      |
| IDDM  | Inzulín-dependentní diabetes mellitus  |
| IFIH1 | Interferon-Induced Helicase C Domain-Containing Protein 1  |
| IFN   | Interferon   |
| IgA   | Imunoglobulin A  |
| IL    | Interleukin  |
| IL2RA | Interleukin-2 receptor alfa  |
| In    | Inzulín  |
| iNOS  | Kalcium-insenzitivní syntáza oxidu dusičnatého   |
| IU    | Mezinárodní jednotka (International Unit)  |
| LADA  | Latentní autoimunitní diabetes dospělých (Latent Autoimmune Diabetes of Adult)                         |

|          |   |
|----------|---|
| MerTK    | C-mer Proto-Oncogene Tyrosine Kinase  |
| MHC      | Hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)                                   |
| MLR      | Smíchání lymfocytárních kultur (Mixed Leukocyte Reaction)   |
| MODY     | Typ diabetu dospělých vzniklý v mládí (Maturity-Onset Diabetes of the Young)                          |
| MRDM     | Diabetes způsobený malnutricí (Malnutrition-Related Diabetes Mellitus)                                |
| mTEC     | Medulární thymické epiteliální buňky  |
| NIDDM    | Non-inzulín-dependentní diabetes mellitus   |
| NK buňky | „Natural Killer“ buňky  |
| NOD myš  | Neobézní diabetická myš (Non-Obese Diabetic mouse)  |
| oGTT     | Orální glukózový toleranční test  |
| PCR      | Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)  |
| Proin    | Proinzulín  |
| PTPN22   | Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 22  |
| RFLP     | DNA analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphisms) |
| T1D      | Diabetes 1. typu (type 1 diabetes)  |
| T2D      | Diabetes 2. typu (type 2 diabetes)  |
| TAP      | Peptidový transportér (transporter associated with antigen processing)                                |
| TCR      | Receptor T lymfocytů (T cell receptor)  |
| Th       | Pomocný T lymfocyt (helper T cell)  |
| TNF      | Faktor nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Factor)   |
| VCAM     | Vaskulární buněčná adhezní molekula (Vascular Cell Adhesion Molecule)                                 |
| WHO      | Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)   |



## ÚVOD

Diabetes mellitus 1. typu je významné orgánově specifické autoimunitní onemocnění, pro které je typický postupný zánik Langerhansových ostrůvků pankreatu obsahující  $\beta$ -buňky. Ostatní typy buněk slinivky nejsou tímto procesem zasaženy. Jelikož ostrůvkové  $\beta$ -buňky produkují pro život nezbytný inzulín, jehož syntéza s postupující destrukcí klesá, je nutné ho dodávat exogenně a pacient se na něm stává závislým. Úplné uzdravení pacienta není možné, léčba spočívá pouze ve snaze co nejlépe diabetes kompenzovat a vyhnout se případným komplikacím.

T1D vzniká souhrou genetických a environmentálních faktorů. V současné době je snahou vědců odhalit rizikové alely predisponující ke vzniku nemoci a pochopit, jakým způsobem ovlivňuje vnější prostředí rozvoj autoimunitního procesu. Environmentální vlivy mohou mít na jedince protektivní účinek nebo naopak mohou onemocnění spustit. Bylo by proto vhodné zjistit, které vnější faktory jsou rizikové a pomoci jedincům nesoucím predispoziční alelu se jim vyhnout a tím zabránit rozvoji nemoci.

Ve své práci se nejprve věnuji obecné charakteristice diabetu mellitus, později se zaměřím na T1D. Stěžejní částí je pak kapitola o genetických faktorech, konkrétně o antigenech HLA, jejich funkci, struktuře a vazbě autoantigenů. Odhalení rizikových HLA alel a nalezení mechanismu, kterým destrukce  $\beta$ -buněk probíhá, by významně pomohlo predikci a léčbě tohoto onemocnění.

## ZÁKLADNÍ INFORMACE

### **HISTORIE DIABETU**

Diabetes mellitus (z lat. diabetes = odtékat, mellitus = sladký) je metabolické onemocnění projevující se hyperglykemií a následnou glykosurií. Ta je způsobena sníženou nebo zcela pozastavenou funkcí slinivky břišní, mající za následek nedostatečnou produkci inzulínu, případně sníženou schopností buněk na něj reagovat.

Nejstarším dochovaným dokumentem popisujícím diabetes je egyptský papyrus pocházející z roku 1550 před Kristem. Ve druhé polovině 19. století byl v Luxoru zakoupen Georgem Ebersem, po kterém byl svitek pojmenován. Nyní je uložen v knihovně Univerzity v Lipsku. Autor dokumentu se domníval, že se nemocný díky zvýšenému pitnému režimu rozpouští a močí odchází ven (<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/177583/Ebers-papyrus>). Ve 2. století našeho letopočtu nazval Aretaeus z Kapadocie, jeden z nejváženějších řeckých lékařů, tuto nemoc diabetem. Diabetes byl odlišen od ostatních chorob provázených polyurií až v 17. století (Bartoš et al. 2003).

V 18. století byla u nemocných diabetem v moči a séru prokázána glukóza, což vedlo lékaře k domněnce, že diabetes je zapříčiněn špatnou funkcí ledvin. Tuto teorii vyvrátili roku 1889 němečtí lékaři Oskar Minkowski a Josef von Mehring, kteří provedli pankreatektomii psa. U něj se po operaci objevily symptomy diabetu (Anděl et al. 2001). Díky tomu si mohli být jisti, že pankreas obsahuje látku, která pomáhá snižovat hladinu cukru v krvi a stala se předmětem výzkumu vědců i lékařů.

Po deset let byl inzulín pouze hormonem, o kterém se mluvilo, ale nikdo jej nebyl schopen extrahovat. To se podařilo až kanadskému chirurgovi Fredericku Bantingovi a jeho asistentovi Charlesu Bestovi roku 1921. Úspěchu dosáhli podvázáním kravského pankreatu a následným oddělením inzulínu. Svůj objev pak přenechali Torontské univerzitě jako vděk za pronájem laboratoře. První úspěšná inzulínová léčba byla provedena v roce 1922, kdy byl diabetickému pacientovi podáván kravský inzulín. Tato terapie prodloužila pacientovi život o 13 let. Spolu s nadějí na možnost léčby začal stoupat i zájem o tento hormon, jehož výroby se ujala firma Eli Lilly na místo Torontské univerzity, která již nezvládla uspokojovat poptávku. Eli Lilly zvýšila čistotu i množství vyráběného inzulínu, které bylo dostatečné i pro klinické účely.

V 50. a 60. letech byla objasněna struktura prekurzoru inzulínu, proinzulínu, včetně produktů jeho rozkladu, inzulínu a C-peptidu. Znamé vnitřní uspořádání a složení lidského inzulínu motivovalo vědce k jeho umělé syntéze. Nevýhoda dřívějšího používání kravského či vepřového tkvěla v jejich občasně nesnášenlivosti – tvorbě protilátek proti podávanému inzulínu. Problém byl vyřešen roku 1986, kdy byl poprvé připraven inzulín lidský metodou DNA rekombinace. (Anděl et al. 2001, Bartoš et al. 2003)

Další léta přinesla zlepšení kvality života diabetiků. Konstrukce inzulínového pera usnadnila aplikaci inzulínu, stejně jako inzulínové pumpy - vnější nebo v podkoží. Ve vývoji jsou v současné době například inhalační inzulín či „inzulín z pole“, kdy je gen pro inzulín vnesen do DNA světlice barvířské a následně získáván z jejích semen.

## **DIABETES MELLITUS**

Diabetes mellitus (DM) je chronické, multifaktoriální onemocnění, kterým dle WHO trpí přes 220 milionů lidí na celém světě a jejich počet by se měl do budoucna zvyšovat (odhaduje se, že počet nemocných roku 2030 dosáhne 366 milionů) ([http://www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/en/](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/)). Mezi jeho hlavní příznaky patří polydipsie, z ní plynoucí polyurie, dech páchnoucí po acetonu, poruchy zažívání, ztráta vědomí až kóma.

### **Diagnostika DM**

V současné době je DM u pacienta diagnostikován, pokud splňuje jedno z následujících kritérií (American Diabetes Association, 2010):

1. Hladina glykovaného hemoglobinu A1C je  $\geq 6,5\%$ ,
2. FPG (Fasting Plasma Glucose, měření hladiny glukosy nalačno) je  $\geq 7,0$  mmol/l,
3. Hladina glukózy v plasmě je po 2 hodinách od orálního podání 75 g glukózy  $\geq 11,1$  mmol/l (jedná se o test oGTT = orální glukózový toleranční test)
4. U pacienta se objevily klasické příznaky jako je hypoglykémie nebo hyperglykémie a náhodně změřená glykémie je  $\geq 11,1$  mmol/l.

## Klasifikace DM

Dříve se DM rozděloval na inzulín-dependentní (IDDM), non-inzulín-dependentní (NIDDM), gestační (GDM) a diabetes způsobený malnutricí (MRDM). Tento systém se však setkal s velkou kritikou, a proto Americká diabetická asociace podala roku 1997 návrh na novou klasifikaci. Ten byl brzy přijat WHO a funguje dodnes. DM má tedy dnes následujících pět podkategorií (Bartoš et al. 2003, American Diabetes Association, 2010):

1. Diabetes mellitus 1. typu (T1D, Type 1 Diabetes) – pacienti s T1D jsou doživotně závislí na exogenním podávání inzulínu
  - a. Autoimunitní – způsoben autoimunitní destrukcí  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků, pacienti mají absolutní nedostatek inzulínu
  - b. Idiopatický – není u něj prokázána autoimunita ani asociace s HLA, někteří pacienti trpí permanentní inzulínopenií a jsou náchylní ke ketoacidóze
2. Diabetes mellitus 2. typu (T2D, Type 2 Diabetes) – pacienti s inzulínovou rezistencí a pouze relativním nedostatkem inzulínu, nejsou závislí na podávání exogenního inzulínu (jsou léčeni převážně dietou a perorálními antidiabetiky)
3. Gestační diabetes mellitus (GDM)
4. Ostatní specifické typy diabetu
  - a. Genetický defekt funkce  $\beta$ -buněk – patří sem MODY (maturity-onset type diabetes of the young) – vykazuje dominantní autozomální dědičnost, projeví se do 25 let věku a je několik let kontrolovatelná bez podávání inzulínu (Nyunt et al. 2009)
  - b. Genetický defekt účinku inzulínu – typ A inzulínové rezistence, leprechaunismus a další
  - c. Nemoci exokrinního pankreatu – pankreatitida, pankreatektomie a další
  - d. Endokrinopatie – akromegalie, Cushingův syndrom, glukagonom a další
  - e. Diabetes vyvolaný chemikáliemi nebo léčivy – diazoxid, kyselina nikotinová, glukokortikoidy, interferon a další
  - f. Infekce – cytomegalovirus, kongenitální rubeola a další
  - g. Neobvyklé formy autoimunitního diabetu – „Stiff-man“ syndrom a další
  - h. Ostatní genetické syndromy v některých případech asociované s diabetem

## **PATOGENEZE AUTOIMUNITNÍHO DIABETU MELLITUS**

T1D je onemocnění způsobené autoimunitní destrukcí pankreatických  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků, v jejímž důsledku dochází k nedostatečné produkci inzulínu. Ten ve zdravém organismu umožňuje vstup glukózy do buněk. U pacienta s T1D je množství sekretovaného inzulínu menší, a proto se zvyšuje hladina krevní glukózy. Buňky tedy mají nedostatek základního substrátu pro výrobu energie a jsou nuceny využít zdroje záložní. Těmi jsou mastné kyseliny, které se metabolicky přeměňují na ketolátky a mohou sloužit jako náhradní energetický zdroj pro mozek a zároveň jejich přítomnost v moči značí nedostatečnou kompenzaci T1D.

Rychlost destrukce  $\beta$ -buněk je značně variabilní, u dětí k ní dochází mnohonásobně pomaleji než u dospělých. Již před prvními klinickými projevy nemoci lze zjistit započatou autoimunitu pomocí protilátek přítomných v krvi. Jedná se zejména o autoprotilátky proti ostrůvkovým buňkám pankreatu (ICA – Islet Cell Autoantibody), povrchovým buňkám ostrůvků (ICSA – Islet Cell Surface Autoantibody), inzulínu (IAA – Insulin Autoantibody), dekarboxyláze kyseliny glutamové (GAD – Glutamic Acid Decarboxylase) a tyrosinfosfatáze. Jedna, či více z nich je přítomna až u 90% pacientů. (Bartoš et al. 2003, American Diabetes Association 2010)

U dětí se obvykle jako první příznak nemoci objeví ketoacidóza. Pokud se T1D projeví až v dospělosti (onemocnění je pak označováno jako LADA – Latent Autoimmune Diabetes in Adults), pacienti často mají částečně zachovanou funkci  $\beta$ -buněk a tím je ketoacidóze předcházeno. Ve druhé fázi nemoci se však stávají na inzulínu závislími, jsou pak ketoacidózou ohroženi stejně jako děti. Všichni pacienti jsou náchylní i k dalším autoimunitním onemocněním jako je Gravesova choroba a Hashimotova choroba (onemocnění štítné žlázy) (Van den Driessche et al. 2009), Addisonova choroba (selhání funkce nadledvinek) (Queiroz 2008), vitiligo (kožní onemocnění) (Mahajan et al. 2003) či zhoubná anémie (Kinoshita et al. 2010).

Zánik buněk produkujících inzulín je dán jak genetickými predispozicemi (asociace s HLA), tak environmentálními vlivy, které mohou rozvoj nemoci urychlit či zpomalit. Proto se T1D může rozvinout v každém věku.

## LANGERHANSOVY OSTRŮVKY

Langerhansovy ostrůvky jsou shluky asi 3000 buněk endokrinní části pankreatu oddělené od jeho exokrinní části kolagenem. Celkem se jich u člověka nachází 1 milion. Jejich hmota u dospělého člověka činí 2 – 3% hmoty žlázy, zatímco u novorozence je to až 20%. K růstu dochází neogenezí (hlavní mechanismus v perinatálním a fetálním období), neoplazií a replikací (hlavní mechanismus po narození).

V ostrůvcích se nachází 4 základní typy buněk:

1. A ( $\alpha$ ) – produkují glukagon zvyšující hladinu cukru v krvi (působí jako antagonist inzulínu)
2. B ( $\beta$ ) – produkují inzulín snižující hladinu cukru v krvi
3. D ( $\delta$ ) – produkují somatostatin, který inhibuje sekreci glukagonu i inzulínu
4. PP - produkují pankreatický polypeptid, jehož význam v energetickém metabolismu nebyl dosud prokázán
5. další minoritní typy buněk, kterých je méně než 1% (D1, P apod.) a jejichž produkty jsou neznámé

B buňky jsou již od dvacátého fetálního týdne detekovatelné ve střední části ostrůvku a tvoří jeho dřev, ostatní buňky jsou rozmístěny na povrchu. (Bartoš et al. 2003, Anděl et al. 2001)

## Inzulín

Inzulín je hormon vznikající v pankreatických  $\beta$ -buněkách Langerhansových ostrůvků. Jde o glykoprotein skládající se z A řetězce, který má 21 aminokyselin, a B řetězce obsahujícího 30 aminokyselin. K sobě jsou spojeny dvěma disulfidickými můstky. Jeho molekulová hmotnost činí 5808 Da. (Bartoš et al. 2003)

U obratlovců je aminokyselinová struktura inzulínu velice dobře zakonzervovaná. ([http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin\\_struct.html](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin_struct.html))

Hovězí inzulín se liší od lidského ve třech aminokyselinách, prasečí od lidského pouze v jedné. Dokonce i některé druhy ryb mají strukturu natolik podobnou našemu inzulínu, že by mohl být používán v klinické praxi.

Syntéza inzulínu začíná v ribosomech, kde působením proteázy vzniká z preproinzulínu proinzulín, složený z řetězce A, B a C-peptidu. Ukládá se do sekrečních granulí  $\beta$ -buněk, kde je následně v Golgiho aparátu sloučen se sekrečními váčky bohatými na vápenaté a zinečnaté ionty a vzniká hexamer  $((\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Proin})_6)$ . Ve vezikulu je  $((\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Proin})_6)$  přeměněn na inzulínový hexamer  $((\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{In})_6)$  pomocí

proteolytických enzymů. Tato konverze významně sníží rozpustnost hexameru, což způsobí jeho krystalizaci uvnitř váčku. Hexamer  $((\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{In})_6)$  je allosterický protein, který prochází ligandem zprostředkovanou interkonverzí mezi třemi konformačními stavy: T(6), T(3)R(3) a R(6). Zatím byly popsány dvě třídy allosterických míst: hydrofobní kapsy (3 v T(3)R(3) a 6 v R(6)), které váží fenol, a aniontová místa (1 v T(3)R(3) a 2 v R(6)), na která se poutají jednovazebné anionty. Jednotlivé allosterické stavy se mezi sebou liší díky různým hodnotám fyzikální a chemické stability inzulínových podjednotek. Vypuštění inzulínových krystalů do intracelulární matrix je uskutečněno fúzí váčku s plazmatickou membránou. Krevní oběh pak zajistí rozpuštění krystalů, disociaci hexamerů na monomery a transport monomerů do tkání. Působení inzulínu je následně zprostředkované inzulínovými receptory. (Dunn 2005)

Inzulín je syntetizován i uchováván v podobě hexameru. Jde o inaktivní formu hormonu s velkou stabilitou, která umožňuje skladovat vysoce reaktivní monomery inzulínu v pohotovosti. Monomer je schopen působit rychleji než hexamer, neboť rychlost reakce je nepřímo úměrná velikosti částice. To, že má monomer větší rychlost reakce, znamená, že si diabetici nemusí píchat tuto formu inzulínu tak často a mají tím zajištěn větší komfort. (Dunn 2005)

Počátečním impulsem k biosyntéze inzulínu je vzestup ATP, který je navozen zvýšenou hladinou glukózy po příjmu potravy. Koncentrace glukózy potřebná pro spuštění biosyntézy je nižší, než koncentrace nutná k sekreci, čímž je zajištěno, že v sekrečních granulích bude vždy uchováno určité množství inzulínu. Jelikož biosyntéza inzulínu trvá 30–120 minut, je tato zásoba využívána těsně po jídle, než se stihne nasyntetizovat inzulín nový.

Sekrece inzulínu je řízena nejen hladinou glukózy v krvi, ale také humorálně a nervově. Bazální sekrece se pohybuje mezi 0,25-1,5 IU za hodinu. Uvolňuje se pulsatilně v malých dávkách během dne i noci, nezávisle na příjmu potravy. Celková denní sekrece je pak 20-40 IU. Rozdíl mezi celkovou a bazální sekrecí tvoří sekrece stimulovaná, ke které dochází při příjmu potravy.

Mezi hlavní biologické účinky inzulínu patří stimulace anabolismu a zároveň inhibice katabolismu. Byla dokázána proliferační (mitogenní) aktivita i vliv na transport iontů. Zvyšuje retenci  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  a zajišťuje jejich distribuci. Hlavní cílové tkáně inzulínu jsou játra, svaly a tuk. V játrech inzulín zvyšuje uptake glukózy, usnadňuje její fosforylaci a tím stimuluje glykogenogenezi a zároveň urychluje glykolýzu, brzdí glukoneogenezi a stimuluje syntézu mastných kyselin. Ve svalech zvyšuje vychytávání glukózy, podporuje její fosforylaci a tím opět stimuluje glykogenogenezi a akcentuje glykolýzu. Jelikož ve svalech neprobíhá

lipogeneze, jsou tříuhlíkaté produkty glykogenolýzy odnášeny krví do jater, kde jsou použity na syntézu mastných kyselin a glykogenogenezi. Má také proteosyntetický účinek, díky kterému je zajištěn růst a udržování svalové hmoty. V tukové tkáni brání lipolýze inhibicí hormon-senzitivní lipázy. (Bartoš et al. 2003)

### **Nedostatek inzulínu**

Nedostatek inzulínu v organismu může být absolutní nebo relativní. Absolutní nedostatek je zapříčiněn nedostatečnou sekrecí inzulínu  $\beta$ -buňkami (objevuje se u T1D). Relativní nedostatek inzulínu se může projevit v důsledku nadměrné sekrece antagonistů inzulínu (např. glukagonu), tvorby protilátek proti inzulínu či neschopnosti buněk na inzulín reagovat (kvůli mutaci inzulínového receptoru, jejich nedostatku apod.).

Při inzulínové deficienci nemůže glukóza vstupovat do buněk, hromadí se v krvi a způsobuje hyperglykémii. Pokud glykémie překročí určitou hranici, začne glukóza vstupovat i do moči. V proximálním tubulu nefronů nedojde k její zpětné resorpci, váže na sebe vodu a tím způsobuje polyurii. Při osmotické diuréze dochází k velkým ztrátám iontů sodíku, chloru, hořčíku či vápníku. Taktéž je obvyklý deficit draslíku v těle, způsobený selháním aktivního membránového transportu.

Pokud mají buňky nedostatek glukózy, potřebují jiný zdroj energie. Tím bývají v první řadě mastné kyseliny. Jsou uvolňovány z tukové tkáně a následně transportovány do jater, kde probíhá jejich oxidace za vzniku acetoacetátu a 3-hydroxybutyrátu. Spontánní dekarboxylací acetoacetátu vzniká aceton, který je cítit při vydechování nemocných. Vysoká hladina ketolátek (jako je acetoacetát a 3-hydroxybutyrát) v krvi snižuje její pH, dochází ke ketoacidóze. Ketoacidóza je velmi závažnou komplikací diabetu, pokud se rozvine do pozdní fáze, je pacient ohrožen na životě. Kromě těchto akutních komplikací dochází i ke komplikacím chronickým. Mezi ně patří mikroangiopatie (prezentovaná retinopatií (Frank 2004), či nefropatií (Molitch et al. 2003)), nebo makroangiopatie (například ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin, cévní mozková příhoda). (Bartoš et al. 2003)

### **AUTOIMUNITNÍ INZULITIDA**

Inzulitida je zánětlivý proces probíhající v pankreatických Langerhansových ostrůvcích, díky kterému dochází k poškození  $\beta$  buněk. Do mezibuněčného prostoru se z nich



uvolňují tělu vlastní peptidy (autoantigeny), které se váží na molekuly HLA. Následuje aktivace a proliferace příslušných T lymfocytů a autoimunitní reakce namířená proti vlastním buňkám. U NOD myší, které jsou používány jako modelové organismy pro studium lidského T1D, bylo dokázáno, že na vzniku zánětlivé reakce se podílí Mer tyrosin kináza. Pokud byla exprese genů pro MerTK potlačena, zánětlivá reakce v ostrůvcích byla snížena a diabetes nepropukl. (Wallet et al. 2009)

Během autoimunitní inzulitidy je narušena regulace humorální i buněčné části imunity. Příkladem je pozměněná odpověď na makrofágy a T buňkami produkované cytokiny a posun v diferenciaci Th buněk ve prospěch patogenické Th1 linie. Cytokiny Th1 buněk, IL-2 a IFN-1, přímo navozují destrukci  $\beta$ -buněk tím, že urychlují jejich apoptózu a produkci adhezivních molekul a také usnadňují navádění autoreaktivních leukocytů, čímž je destrukce podpořena. (Almawi et al. 1999)

Infiltrát způsobující inzulitidu obsahuje mnoho buněčných typů. Nejhojnějším je v ostrůvcích populace  $CD8^+$  cytotoxických T buněk. V menším množství jsou v časně i pozdní fázi inzulitidy zastoupeni makrofágové ( $CD68^+$ ). Další významnou skupinou jsou  $CD4^+$ , avšak už jsou méně hojné.  $CD20^+$  B buňky jsou přítomné v poměrně malém množství v časně fázi.  $CD138^+$  jsou vzácné ve všech stádiích. NK buňky se objevují výjimečně, dokonce i v silně zanícených ostrůvcích. (Willcox et al. 2008)

Průběh autoimunitní inzulitidy lze charakterizovat Eisenbarthovým schématem. Má následujících šest stádií (Anděl et al. 2001):

1. genetická susceptibilita – jedná se zejména o osoby s přítomností HLA antigenů DR3 a DR4
2. spouštěcí mechanismus – o několik let může předcházet manifestaci diabetu, jedná se zejména o virové infekce
3. počínající inzulitida
4. plně vyvinutá inzulitida – postupně klesá sekrece inzulínu, v okamžiku, kdy klesne sekrece o 80%, projeví se příznaky diabetu
5. manifestace diabetu – může být postupná (za přítomnosti charakteristických příznaků diabetu jako je únava, hubnutí, polyurie, akutně hyperglykemické ketoacidotické kóma) nebo akutní (nejčastěji pod vlivem stresu, ať už psychického nebo fyzického, poté, co odezní, může být sekrece ještě několik let dostatečná)
6. stadium nulové sekrece inzulínu – pacient se stává plně závislým na substituční terapii zvířecím nebo rekombinantním lidským inzulínem.

## **AUTOTOLERANCE**

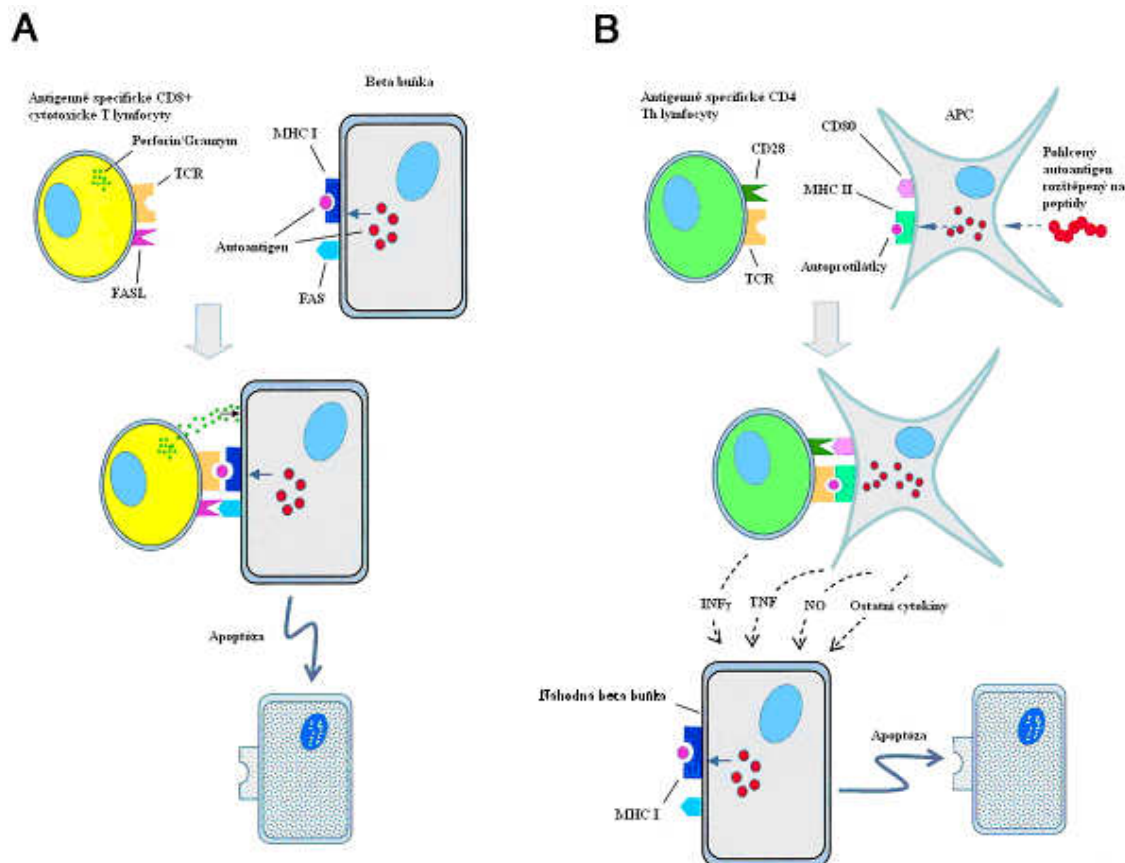
Imunitní systém má tři hlavní funkce: chránit organismus před škodlivými vnějšími vlivy (patogenními organismy), rozpoznávat a odstraňovat poškozené či mutované buňky a také musí umět rozpoznat a tolerovat vlastní tkáň. Schopnost tolerance získávají T lymfocyty v thymu. Tam se nacházejí dvojitě pozitivní  $CD4^+CD8^+$  T lymfocyty, které rozpoznávají HLA s navázanými vlastními peptidy na epiteliálních dendritických buňkách. Tyto lymfocyty podstupují pozitivní a negativní selekci. Pozitivní selekci přežijí ty, které jsou schopné rozeznávat HLA s vlastními navázanými peptidy s nízkou afinitou. Vznikají tak  $CD4^+CD8^-$  nebo  $CD4^-CD8^+$  T lymfocyty. Během negativní selekce jsou eliminovány autoreaktivní buňky a je navozena tolerance vlastních buněk.

Vznik a rozvoj T1D je důsledkem neefektivní negativní selekce thymocytů a dysregulace mechanismů periferní tolerance. (Anderson et al. 2005) Neefektivní negativní selekce studovaná na NOD myši je za prvé důsledkem vazebných vlastností molekuly I-A<sup>g7</sup> MHC glykoproteinů II. třídy (které jsou analogem lidských HLA-DQ8) a za druhé relativní necitlivostí NOD  $CD4^+CD8^+$  dvojitě pozitivních (double-positive, DP) thymocytů k dějům navozujícím apoptózu. (Kanagawa et al. 1998, Zucchelli et al. 2005, Liston et al. 2004) Jednou z možností regulace účinnosti negativní selekce by mohla být aktivace a/nebo funkční stav medulárních thymických epiteliálních buněk (mTEC) a rezidentních dendritických buněk (DC). Zesílená negativní selekce byla navozena u myši s potlačenou expresí genu pro MerTK. Zároveň u nich byla zvýšena kapacita thymických dendritických buněk na odstraňování thymocytů a tím radikálně klesla pravděpodobnost vzniku T1D. (Wallei et al. 2009)

## **MECHANISMUS IMUNITNÍ REAKCE NAMÍŘENÉ PROTI $\beta$ -BUŇKÁM**

Dodnes nevíme jistě, jakým mechanismem dochází k destrukci pankreatických  $\beta$ -buněk. Existují dva základní modely. První model předpokládá, že autoantigeny jsou prezentovány v podobě peptidů v komplexu s MHC I. třídy na povrchu  $\beta$ -buněk a rozeznávány specifickými  $CD8^+$  cytotoxickými T lymfocyty. To má mít za následek zvýšení počtu kostimulačních molekul (např. Fas/FasL) a spuštění signalizační kaskády, která končí apoptózou  $\beta$ -buněk některou z mnoha efektorových cest (např. Fas/FasL, perforin/granzym). Druhý model je spojený s vazbou peptidů získaných z autoantigenů na MHC II. třídy a jejich prezentací na APC (např. makrofázích nebo dendritických buňkách). Peptidy jsou rozeznávány specifickými  $CD4^+$  pomocnými T lymfocyty. Je zvýšena hladina kostimulačních

molekul (CD28/CD80) a z  $CD4^+$  T lymfocytů a APC uvolněna řada cytokinů.  $IFN-\gamma$  stimuluje makrofágy k produkci  $IL-1\beta$  a  $TNF-\alpha$ , které společně s  $IFN-\gamma$  vedou k toxicitě  $\beta$ -buněk cestou specifické indukce kalcium-insenzitivní syntázy oxidu dusičnatého (iNOS) a aktivací apoptózy. Z tohoto modelu vyplývá, že  $IL-1$  vede k expresi Fas v  $\beta$ -buňkách, čímž se stanou náchylné k lýzi způsobené Th1 a T buňkami s exprimovaným FasL. (Notkins 2002, Mauricit et al. 1998) Viz obr. 1



**Obrázek 1: Mechanismus destrukce beta buněk A) přímá destrukce, B) nepřímá destrukce.** (upraveno podle Notkins 2002)

## FAKTORY PODÍLEJÍCÍ SE NA VZNIKU DIABETU

Diabetes mellitus je onemocnění s vysokou morbiditou, invaliditou i mortalitou. Jeho incidence se v jednotlivých státech velmi liší. Roční incidence kolísá od 0,61 na 100 000 obyvatel v Číně, přes 25 případů na 100 000 obyvatel v České republice až po 41,4 případů na 100 000 obyvatel ve Finsku. Obecně lze říci, že incidence klesá od severních států směrem k jihu. Dalším faktorem je prostředí a životní styl. Přestože má Estonsko a Finsko stejné

geografické podmínky, je incidence T1D v Estonsku asi třikrát nižší. Ještě nápadnější jsou rozdíly v Itálii. Zatímco pevninská část Itálie má incidenci 8,4/100 000 obyvatel, ostrov Sardinie má dokonce 36,9 nových případů na 100 000 obyvatel za rok. Tyto rozdíly poukazují na to jak zásadní roli hrají environmentální faktory v rozvoji T1D. (Silink 2002, Soltesz et al. 2007)

## **GENETICKÉ FAKTORY**

Diabetes mellitus I. typu je onemocnění s komplexní etiologií. Jeho vznik je podmíněn mnoha faktory, genetickými i environmentálními. Autoimunitní proces je spouštěn u geneticky predisponovaných osob virovou infekcí nebo jinou formou stresu.

T1D má převážně non-familiární výskyt. Studie zabývající se familiárním výskytem diabetu ukazují, že nebezpečí vzniku diabetu u příbuzných diabetického pacienta je dáno věkem, ve kterém je pacient diagnostikován. Například sourozenci pacienta s T1D, který byl diagnostikován před dosažením pěti let věku, mají až pětikrát větší šanci, že se u nich do 20 let věku objeví diabetes než sourozenci pacienta, který byl diagnostikován mezi pátým a patnáctým rokem života. (Gillespie et al. 2002) Výsledky starších studií z 80. a 90. let se však liší. Ve Winsconsinu (Allen et al. 1991) a Minnesotě (Chern et al. 1982) zjistili, že největší riziko pro sourozence představuje pacient, kterému byl T1D diabetes diagnostikován před desátým rokem života. Výzkum v Pittsburgu pro změnu neodhalil zvýšené riziko pro sourozence pacientů diagnostikovaných před dosažením pěti let věku. (Wagener et al. 1982) Pokud se v rodině vyskytne více diabetických dětí, je asi 50% případů vysvětlováno HLA genotypem, dalších cca 50% je přičítáno non-HLA genům. (Gillespie et al 2002, Todd et al. 2007)

Genetické faktory ovlivňující vznik T1D se nejnázve sledují u dvojčat. Konkordance u monozygotních dvojčat se pohybuje mezi 13 a 52%, u dizygotních mezi 2,5 a 14%. To znamená, že oproti T2D, který má konkordanci u jednovaječných dvojčat téměř 100%, má na T1D velký vliv i prostředí. Velmi se tím komplikuje predikce onemocnění. (Hytinen et al. 2003)

Diabetes mellitus 1. typu je polygenně vázané onemocnění. Studie kandidátních genů odhalily, že pro vznik onemocnění jsou určující především geny HLA (human leukocyte antigen), INS (insulin), PTPN22 (protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22), CTLA4 (polymorphic cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen), IL2RA (interleukin-2 receptor alpha), IFIH1 (interferon-induced helicase C domain-containing protein 1) (Howson et al.

2009) a nejnověji také SLC30A8 (gen pro ZnT-8, zinc transporter 8) (Chistiakov et al. 2009). Lokusy, ve kterých jsou umístěné geny asociované se vznikem T1D jsou označovány IDDM1 – IDDM18.

## **HLA**

Genová oblast HLA, hlavního lidského antigenu, leží na krátkém raménku 6. chromozomu a obsahuje více než 200 genů. Tento lokus byl nazván IDDM1 (z angl. insulin-dependent diabetes mellitus). Přestože je podíl tohoto lokusu na riziku vzniku T1D znám už více než 30 let, přesná varianta haplotypu způsobující onemocnění ještě nebyla objasněna. Jako nejdůležitější predispoziční faktor, stejně jako u dalších autoimunitních onemocnění, byla určena oblast HLA druhé třídy, konkrétně geny HLA-DQB1, HLA-DQA1 a HLA-DRB1. (Notkins 2002)

## **Struktura HLA**

MHC (z angl. major histocompatibility complex) jsou glykoproteiny, které se u lidí označují jako HLA (human leukocyte antigen). Hrají zásadní roli ve funkci imunitního systému.

HLA molekuly I. třídy se nacházejí na všech jaderných buňkách organismu. Na svůj povrch váží peptidy produkované buňkou. Klasické izotypy HLA I. třídy se značí HLA-A, HLA-B a HLA-C, neklasické HLA-E, HLA-F a HLA-G. Každá molekula se skládá ze dvou řetězců,  $\alpha$  a  $\beta$ . Transmembránový řetězec  $\alpha$  má molekulovou hmotnost 45 kDa. K němu je nekovalentně vázán  $\beta$ -řetězec (někdy též nazývaný  $\beta_2$ -mikroglobulin) o hmotnosti 12 kDa, který je kódovaný na 15. chromozomu. Řetězec  $\alpha$  se dále rozděluje na 3 domény: doména  $\alpha_3$  k sobě při povrchu membrány váže  $\beta_2$ -mikroglobulin, distální domény  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  pak vytvářejí vazebné místo pro peptid. To má podobu rýhy na povrchu molekuly. Jeho dno tvoří  $\beta$ -skládaný list, který je ohraničen dvěma  $\alpha$ -šroubovicemi. Jelikož má vazebné místo pevné hranice, mohou na něj nasedat pouze peptidy, které odpovídají jeho velikosti, to znamená peptidy obsahující 8-10 aminokyselin.

HLA molekuly II. třídy se nacházejí pouze na buňkách prezentujících antigen. Konkrétně se jedná o makrofágy, dendritické buňky, monocyty, B lymfocyty a aktivované T lymfocyty. Na svůj povrch váží peptidy, které buňka pohltila. Existují tři lokusy, které se označují jako HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP a které kódují tři typy molekul. Každá molekula

HLA II. třídy se skládá ze dvou řetězců,  $\alpha$  a  $\beta$ , které jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu společně s invariantním řetězcem. Řetězce  $\alpha$  i  $\beta$  mají dvě domény,  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  a  $\beta_2$ . Distální domény  $\alpha_1$  a  $\beta_1$  tvoří společně vazebné místo v podobě žlábků pro peptidy. Žlábek je ucpán invariantním řetězcem, který pomáhá směřovat molekulu HLA II. třídy nejprve do Golgiho aparátu a následně na endosomální/lysozomální cestu. Tam je proteolyticky štěpen, dokud z něj nezůstane pouze CLIP – class II-associated invariant chain peptide. Speciální lysozomální chaperon HLA-DM pak katalyzuje výměnu CLIPu za stabilně se vážící antigenní peptid. Vazebné místo není ohraničeno tak jako u HLA I. třídy, a proto se do něj mohou vázat peptidy různých délek, nejčastěji se však jedná o peptidy 15-35 aminokyselin dlouhé. Pokud je peptid delší než vazebné místo, jeho konce přecházejí, nebo se do vazebného místa přiloží konce peptidu a střed je vypouklý.

Molekuly HLA II. třídy vykazují vysokou míru polymorfismu. Ten se projevuje záměnami aminokyselin v řetězcích. Pokud k takové záměně v řetězci  $\alpha_1$  nebo  $\beta_1$  dojde, změní se i povaha slabých vazebných interakcí, které jsou mezi řetězci, částečně se změní terciární struktura a tím i funkce HLA. (Hořejší et al. 2009, Černá et al. 2000, Černá 2008)

## **Funkce HLA**

Molekuly HLA se zúčastňují prezentace peptidových antigenů na buněčném povrchu. Tato vazba umožňuje T lymfocytům, aby peptid rozeznaly pomocí svých receptorů (TCR) a případně zahájily imunitní reakci proti buňce.  $CD4^+$  T lymfocyty reagují s HLA II. třídy, které na svém povrchu prezentují extracelulární peptidy (bakteriální peptidy či autoantigeny). Peptidy asociují s HLA až v endosomech tím, že nahradí invariantní řetězec.  $CD8^+$  T lymfocyty reagují s HLA I. třídy. Ty na svém povrchu vážou intracelulární peptidy (virové či nádorové). K asociaci HLA I. třídy s peptidy dochází již v endoplazmatickém retikulu. (Černá et al. 2000)

## **Nomenklatura HLA**

Nomenklatura HLA je poměrně složitá. Její spletitost je způsobena tím, že k detekci antigenů byly během posledních padesáti let používány různé techniky a podle nich dostávaly antigeny různé názvy.

V 60. letech se začala používat sérologie. Pomocí ní byly identifikovány antigeny HLA I. i II. třídy. Antigeny se značily číslem, které bylo dáno pořadím, v němž byly

detekovány. Mnoho tehdy používaných protilátek bylo nespecifických, a tak rozpoznávaly antigenní determinanty (epitopy) několika různých druhů molekul. Následně se ukázalo, že lze sérologicky lépe rozlišit jednotlivé epitopy a to vedlo k první korekci nomenklatury. Molekuly, které dříve byly rozpoznávány jako shodné, se začaly rozdělovat do dvou a více skupin (např. DR5 se rozdělila na DR11 a DR12). Antigeny HLA II. třídy byly objeveny pomocí smíšených lymfocytárních kultur (MLR) a byly zprvu považovány za produkt jednoho genu D. S příchodem nových, modernějších technik, jako jsou proteinová 2D gelová elektroforéza a DNA analýza délkového polymorfismu restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphisms – RFLP) či pomocí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) (Černá et al. 2000, Wordsworth 1994), se výrazně zlepšila schopnost rozlišování epitopů, ale opět se zvýšila komplexnost názvosloví. V posledních letech byla tradiční HLA typizace nahrazena DNA sekvenací příslušných genů.

Názvy nejmodernější nomenklatury obsahují jméno genu a čtyři až osm číslic dlouhý kód (ve dvou až čtyřech sadách). Každá alela získá čtyřmístný kód, další číslice jsou přidány pouze pokud je potřeba. První sada dvojčíslic určuje typ alely, který koresponduje se sérologickou specifitou antigenu. Další dvojčíslice určují podtyp alely. Alely, které se liší v prvních čtyřech číslech, obsahují jednu či více nukleotidových substitucí měnící pořadí aminokyselin v kódovaném proteinu. Jedná-li se o synonymní nukleotidovou substituci beze změny sekvence aminokyselin, doplní se třetí sada dvojčíslic. Čtvrtá a poslední sada dvojčíslic doplňuje číselný kód v případě, že jsou alely polymorfní pouze v nekódujících oblastech. (Robinson et al. 2009, <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>)

### **Genová oblast HLA II. třídy**

Tato oblast zahrnuje tři hlavní lokusy, DR, DQ a DP. Každý lokus obsahuje geny pro řetězec  $\alpha$  a  $\beta$  (DRA, DRB atd.). Produkty dalších přítomných genů DMA, DMB a DOA, DOB jsou modulační molekuly nacházející se v endosomech a lysozomech. Jejich funkcí je regulovat zpracovávání HLA molekul II. třídy. Dále se zde nacházejí geny kódující transmembránové peptidové transportéry TAP1 a TAP2. Jejich produkty pomáhají transportovat peptidy do endoplazmatického retikula, kde jsou navázány na HLA molekuly I. třídy, společně pak přesunuty do Golgiho aparátu a následně na buněčný povrch. (Černá 2008)

## **Predispoziční a protektivní HLA alely**

Dle současných výzkumů by měla k rozeznání alel, které predisponují nositele pro T1D, od alel protektivních stačit znalost polárních aminokyselinových zbytků beta řetězců molekul DR a DQ na pozici  $\beta 9$  a  $\beta 37$ . Elektrostatický potenciál přítomný ve vazebném místě má velký vliv na diabetogenní epitopy, obzvlášť na ty s bazickými zbytky, které se pak budou snadno vázat. (Parry et al. 2008)

Produkty predispozičních alel váží autoantigeny dlouhodobě silnou vazbou s velkou afinitou. Naopak produkty protektivních alel je váží slabě a produkty neutrálních alel velice špatně nebo vůbec. Často diskutovaný je vliv non-asparagové kyseliny na pozici  $\beta 57$ . Jeví se zatím jako modulátor, který mění riziko vzniku nemoci, ale pouze v přítomnosti polymorfního polárního páru na pozici  $\beta 9$  a  $\beta 37$ . (Parry et al. 2008)

Za predispoziční alely (antigeny) DR lokusu jsou považovány DRB1\*0301 (DR3) a DRB1\*0401 (DR4). (Noble et al. 1996) Molekuly DR3, DR4 nebo obě zároveň se vyskytují v bělošské populaci asi u 95 % pacientů, tedy více než dvakrát častěji než u jedinců zdravých. (Cohen-Haguenauer et al. 1985, Thomson 1984) S nimi v silné vazebné nerovnováze se vyskytují predispoziční alely (antigeny) DQ lokusu DQA1\*0501-DQB1\*0201 (DQ2) a DQA1\*0301-DQB1\*0302 (DQ8), které jsou považovány za hlavní. Ne u všech nositelů rizikových alel se rozvine autoimunitní diabetes, což opět poukazuje na značný význam vnějšího prostředí.

Haplotyp dominantně protektivní je DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 (DR15-DQ6.2). Jeho přítomnost představuje pro nositele ochranu před vznikem T1D i v případě, že se u něj současně vyskytne alela predispoziční. (Kockum et al. 1995)

Ve všech populacích existují haplotypy, které určují větší náchylnost ke vzniku T1D, a naopak haplotypy protektivní. U různých etnik se však můžou velmi lišit. Například u Číňanů jsou k T1D náchylní nositelé DR3/DRW9, u Japonců to jsou nositelé DR4/DRW9. (Hawkins et al. 1987, Kida et al. 1989)

HLA-DQ8 je molekula známá jako hlavní predispoziční faktor T1D v bělošské populaci. (Todd et al. 1987) Tato predispozice k T1D je dále modulována ostatními molekulami HLA jako je například HLA-DR. (Sheehy et al. 1989) Výsledky studie ukazují, že různé haplotypy DQ8-DRB1\*04 jsou asociovány s rizikem vzniku diabetu v různé míře v závislosti na podtypu DR4, a to v tomto pořadí: DQ8-DRB1\*0405 > DQ8-DRB1\*0402 > DQ8-DRB1\*0401 > DQ8-DRB1\*0404 > DQ8-DRB1\*0403. Stupeň protekce alely DR4 odpovídá její schopnosti kompetovat o diabetogenní peptidy (Cucca et al. 1995) s DQ8 molekulou.



Snížená prezentace peptidů na DQ8 v přítomnosti DRB1\*0401, zapříčiněná kompeticí o peptidy, se projeví snížením odpovědi Th1 lymfocytů. IFN- $\gamma$  uvolňovaný Th1 má mnohočetný vliv na destrukci  $\beta$ -buněk, jako je například rekrutování patogenních CD4/CD8 T lymfocytů do Langerhansových ostrůvků a zvýšení citlivosti  $\beta$ -buněk s využitím upregulace zpracování a prezentace antigenů. (Boehm et al. 1997, Wang et al. 1997) Proto snížená produkce IFN- $\gamma$  Th1 lymfocyty částečně přispívá ke snížení infiltrace CD4/CD8 T lymfocyty. (Wen et al. 2001) Nebylo nijak prokázáno, že by protektivní alely byly schopny odstraňovat autoreaktivní CD4 T lymfocyty nebo selektovat v thymu regulační T lymfocyty lépe než predispoziční alely. A právě proto, že tento důkaz chybí, je pravděpodobné, že tu funguje mechanismus periferní tolerance, jako je například model peptidové kompetice. (Ge et al. 2006)

### **Model peptidové kompetice**

Dle modelu peptidové kompetice je hlavním mechanismem ochrany proti vzniku T1D kompetice o hlavní diabetogenní peptidy mezi rezistentními a predispozičními molekulami HLA. (Nepom et al. 1990) Silný kompetitor může opakovaně „krást“ antigenní peptidy predispozičním HLA molekulám, jako je třeba HLA-DQ8. Tím se snižuje množství komplexu peptid-DQ8. Efekt této kompetice je tím větší, čím je antigen vzácnější. Snížené množství komplexu peptid-DQ8 vede k insuficienci DQ8-specifických autoreaktivních T lymfocytů. Nedávno publikovaný článek uvádí, že inzulínový peptid (InsB5-15) byl schopen vázat predispoziční antigen DQ\*0604 a rezistentní DQ\*0602 s různými afinitami. (Ettinger et al. 2006) Odlišná vazba antigenního peptidu s různými alelami je nezbytnou podmínkou pro tento model. Nicméně peptidová kompetice není omezena na HLA molekuly kódované jedním lokusem; některé peptidy lidské dekarboxylázy kyseliny glutamové (hGAD65) jsou schopné vázat jak DQ8, tak i DR4 (DRB1\*0401). (Wicker et al. 1996)

### **HLA-DQ**

Diabetes mellitus 1. typu je nejvýznamněji asociován s DQ molekulou kódovanou alelami DQA1\*0301-DQB1\*0302 (dle starší nomenklatury se označuje jako DQ8). Jejím myším homologem je I-A<sup>g7</sup>. (Todd et al. 1990, Acha-Orbea et al. 1987) Zatímco význam I-A<sup>g7</sup> ve vývoji diabetu u myši bývá stanovován in vivo, role DQA1\*0301-DQB1\*0302 u lidí je většinou odvozena nepřímo pomocí genetické asociační analýzy. Při výzkumu se začaly

používat také transgenní myši, které nesou lidské HLA DQA1\*0301-DQB1\*0302 molekuly, ale chybí jim myší MHC II. třídy. (Junliang et al. 1999)

Geny DQA a DQB určují, jaké aminokyseliny se budou objevovat v  $\alpha$ -šroubovicích a  $\beta$ -skládaných listech ve vazebném místě HLA. Vazebné místo HLA (žlábek) váže antigen, který je následně prezentován T lymfocytům. Schopnost prezentace antigenních peptidů může být modifikována přítomností různě nabitých aminokyselin ve vazebném místě. Gen DQB1, kódující beta řetězec, je značně polymorfní. Kyselina asparagová na pozici 57 (DQ $\beta$  Asp57) se jeví jako protektivní genetický faktor. Její absence naopak pozitivně koreluje s výskytem T1D. (Dorman et al. 1990) Další roli v etiopatogenezi T1D hraje arginin na pozici 52 alfa řetězce (DQ $\alpha$  Arg52). Tyto dva aminokyselinové zbytky, DQ $\beta$  Asp57 a DQ $\alpha$  Arg52, se nacházejí ve žlábků na opačných stranách  $\alpha$ -šroubovice.

Zkoumána dále byla záměna DQ $\beta$  Asp57 za neutrální aminokyselinu (serin, valin, alanin) za přítomnosti argininu na pozici 76 alfa řetězce (DQ $\alpha$  Arg76). Solný můstek mezi DQ $\beta$  Asp57 a DQ $\alpha$  Arg76 je velmi dobře konzervován a pokud dojde k záměně DQ $\beta$  Asp57, můstek je porušen. Otevře se C-terminální konec peptidu tvořícího vazebné místo, naruší se stabilita HLA molekuly a je umožněna vazba široké škále peptidů. (Ettinger et al. 1998) Vazebná síť vodíkových můstků zahrnující DQ $\alpha$  Arg76, DQ $\beta$  Tyr37, vázanou vodu a DQ $\beta$  Tyr9 u DQ8 zapříčiní pevné uchopení peptidu inzulínu v kapse 9 (P9). Tyto jedinečné interakce nejspíše vedou k neobvykle silné vazbě peptidu a pomalejší disociační kinetice, která způsobí změnu exprese různých druhů cytokinů. Exprese cytokinů a odpověď pomocných CD4 T lymfocytů závisí na afinitě komplexu peptid-MHC II. třídy. Malé změny aminokyselinových zbytků v peptidu nebo vazebného místa MHC mění T buněčnou odpověď na částečnou, vedoucí k "anergii", změněné proliferaci a odpovědi cytokinů. (Chaturvedi et al. 1996) Vazba jiných autoantigenů než je inzulín zatím takto důkladně prostudována nebyla.

DQA1\*0301-DQB1\*0302 (DQ8) a DQA1\*0501-DQB1\*0201 (DQ2) s non-Asp v pozici 57 beta řetězce (DQ $\beta$  non-Asp57), stejně jako další výše uvedené varianty, se jeví jako diabetogenní, alespoň u evropské populace. (Khalil et al. 1990, Ettinger et al. 1998) Hypotéza DQ $\beta$  non-Asp57 má ale i své nedostatky. Nedokáže totiž vysvětlit silnou asociaci DR3 a DR4 s autoimunitním diabetem. DR3 i DR4 mají zachovanou DR $\beta$  Asp57. Zatímco alely DQ $\beta$  non-Asp57 se často objevují u pacientů v bělošské populaci (Todd et al. 1987), v ostatních populacích je vysoká prevalence diabetu u nositelů DQ $\beta$  Asp57. (Awata et al. 1990)

Tolerance autoantigenů chrání organismus před destrukcí vlastních buněk. Autotolerance zahrnuje dvě části: centrální toleranci a periferní toleranci. (Miller et al. 1993) Autoreaktivní T lymfocyty jsou v thymu odstraněny negativní selekcí, která je závislá na afinitě každé ze složek komplexu HLA-peptid-TCR. (Robey et al. 1994) Některé T lymfocyty jsou schopné se tomuto procesu vyhnout a putují dále do periferních lymfatických orgánů. (Heath et al. 1997) Základním rysem MHC II. třídy, konkrétně HLA-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (DQ8) je jejich nízká afinita k antigenním peptidům. (Kanagawa et al. 1997) Proto T lymfocyty selektované na těchto HLA snadněji unikají na periferii a tam přežívají. Pouze přítomnost autoreaktivních CD4 T lymfocytů na periferii k vyvolání autoimunitního diabetu nestačí. Některé studie prokázaly, že pro vznik nemoci je zásadní přítomnost aktivovaných CD4 i CD8 T lymfocytů. (Mora et al. 1999) Autoreaktivní T lymfocyty na periferii jsou supresované a chráněné před autodestrukcí tím, že exprimují jen malé množství HLA I. třídy a neexprimují HLA II. třídy či kostimulační signály, které jsou nutné k plné aktivaci T lymfocytů. Z tohoto úhlu pohledu je tedy spuštění autoimunity značně závislé na tkáňových buňkách exprimujících HLA I. třídy a na expresi příslušných kostimulačních molekul na buňkách, které prezentují autoantigeny.

Mechanismus, kterým HLA-DQ8 specifické CD4 T lymfocyty usnadní rozvoj T1D, není zcela znám. Je možné, že APC exprimující HLA-DQ8, jako jsou dendritické buňky (DC), vychytávají autoantigeny z apoptotických  $\beta$ -buněk a prezentují je T lymfocytům. Autoreaktivní CD4 T lymfocyty mohou rozpoznat stejný autoantigen prezentovaný DC a aktivují se. Tyto CD4 T lymfocyty by pak mohly aktivovat další APC pomocí interakcí CD40L-CD40 a uvolněním cytokinů. Aktivované DC pak mohou zkříženě-prezentovat antigeny CD8 T lymfocytům (Schoenberger et al. 1998), stejně jako dalším CD4 T lymfocytům, čímž se zesílí autodestrukce. Kromě toho mohou CD4 T lymfocyty usnadnit přesun CD8 T lymfocytům do ostrůvků pankreatu pomocí zvýšené regulace interbuněčné adhezní molekuly (ICAM-1) působením vaskulární buněčné adhezní molekuly (VCAM). Up-regulace ICAM-1 na obou druzích lymfocytů infiltrujících ostrůvky a  $\beta$ -buňky umožňuje maximální kostimulaci na autoreaktivních T lymfocytech, což dále zhoršuje autoimunitní destrukci. (Wen et al. 2000)

## **HLA-DR**

Lokusy DR a DQ se nacházejí v těsné vazebné nerovnováze (Thomson 1984), a proto je těžké určit, který z nich v jaké míře přispívá k predispozici T1D. V důsledku toho bylo

diskutováno, zda je lokus DR vůbec lokusem způsobující náchylnost k autoimunitnímu diabetu (She 1996). V současné době je však všeobecně přijímán názor, že DR i DQ se podílejí na vzniku neutrální odpovědi, predispozice i dominantní protekce (Sheehy et al. 1989)

Molekuly HLA II. třídy mají ve svém žlábků 5 vazebných kapes, které se označují se jako P1, P4, P6, P7 a P9, podle pořadí aminokyseliny v peptidu, který se do něho váže (Jardetzky et al. 1996). Díky jejich rozdílné velikosti a chemické povaze se různí i vazebné možnosti alotypů HLA. Rozdílné aminokyselinové zbytky ve vazebné kapse P9 molekul DR3 a DR52a vedou k rozdílům v náboji i výběru vazebných epitopů. DR3 a DR52a mají částečně se překrývající, ale zároveň jasně dané požadavky na peptidovou specifitu. Avšak zatímco DR3 je silně asociován se vznikem diabetu 1. typu, DR52a není. Tento významný rozdíl je pravděpodobně dán elektrostatikou kapsy P9 (Parry et al. 2007). Právě proto bylo provedeno porovnání elektrostatických povrchů DR52a (Parry et al. 2007) a DQ8 (Lee et al. 2001). DR52a má v kapse P9 neutrální povrchový potenciál. Naproti tomu diabetogenní DQ8 má vysoký kladný potenciál. Na základě toho je možné říci, že rozdíly v P9 a z nich plynoucí asociace s diabetem vyplývají z různorodosti polarizovatelných aminokyselinových zbytků:  $\beta$ 9 Glu (u DR52a) proti Tyr (u DQ8) a  $\beta$ 37 Phe (u DR52a) proti Tyr (u DQ8). (Parry et al. 2008)

Nedávno objasněná struktura DRA-DRB3\*0101 (DR52a) odhalila (Parry et al. 2007), že  $\beta$ 57 asparagová kyselina je nahrazena valinem, což je stejná záměna, ke které dochází u HLA-DQ. U DQ molekuly je taková záměna asociována s predispozicí k T1D, a stejně je tomu i u DR7, naopak u DR52a  $\beta$ 57 valin riziko vzniku T1D nezvyšuje.

### **Vliv struktury HLA na funkci**

Výše zmíněné rozdíly ve struktuře ilustrované na příkladu DQ8 a DR52a mají samozřejmě vliv na to, které peptidy se budou na HLA vázat a tudíž i na to, které alely budou predispoziční pro autoimunitní diabetes. Proto byla srovnávána data z epidemiologických a genotypových analýz s elektrostatickým potenciálem pomocí tří polymorfních markerů:  $\beta$ 9,  $\beta$ 37 a  $\beta$ 57. Počet polárních nebo nabitých aminokyselinových zbytků v kapse P9 tvořilo skóre, které nahrazovalo skutečnou hodnotu elektrostatického potenciálu. Výskyt tří nabitých reziduí v P9 ve 100% případů korelovalo s dříve zjištěnou predispozicí alely k T1D. Pokud se výsledné skóre rovnalo dvěma (v P9 se vyskytovaly dvě nabitě aminokyseliny), ve většině případů se taktéž jednalo o predispoziční alelu. Naopak v případě výskytu pouze jediné nabitě

aminokyseliny v P9 se nikdy nejednalo o HLA molekulu II. třídy, které by byla přisuzována asociace s T1D. Toto jednoduché kritérium naznačuje, že náchylnost HLA k T1D je funkcí náboje aminokyselinových zbytků nebo množství polarizovatelných reziduí v kapse P9 HLA molekul II. třídy.

Přítomnost dvou ze tří markerů, konkrétně polární aminokyselinový zbytek v polohách  $\beta 9$ ,  $\beta 37$  a non-Asp  $\beta 57$  (skóre = 2), rozlišuje predispoziční od nepredispozičních molekul s pozoruhodnou přesností. Méně rizikové alely DRB1\*0301, DRB1\*0401 a DRB1\*1301 mají skóre 2 z důvodu přítomnosti polárních reziduí v pozicích  $\beta 9$  a  $\beta 37$ . Ostatní alely silně asociované se vznikem T1D, DRB1\*0405, DRB1\*0409, DRB1\*0901, DQ\*0302 nebo DQB1\*0604 mají skóre 3. Obsahují jednak dva polární zbytky a jednak je u nich nahrazena silně konzervovaná  $\beta 57$  Asp. Haplotyp spojený s nejvyšším rizikem DR4-DQ8 odpovídá kritériím této analýzy a podporuje hypotézu. Na druhé straně DR7 (skóre 1 z důvodu záměny  $\beta 57$  Asp na Val a hydrofobního charakteru  $\beta 9$  a  $\beta 37$ ) není predisponující a tudíž potvrzuje výše uvedená pravidla. Ochranný haplotyp DRB1\*1501-DQB\*0602 má skóre 1 z důvodu přítomnosti polárního aminokyselinového zbytku na  $\beta 37$  u obou beta řetězců. Model je tedy funkční až na několik případů u skóre 2.

Jde říci, že přítomnost polárních aminokyselinových zbytků na pozicích  $\beta 9$  i  $\beta 37$  odlišuje predispoziční alely HLA molekul II. třídy od těch nepredispozičních. Naopak pouze jedna polární aminokyselina na pozici  $\beta 37$  (ale nikoli na  $\beta 9$ ) navozuje dominantní protekci. Hydrofobní aminokyselinový zbytek na pozici  $\beta 37$  vyvolává neutrální odpověď (pasivní rezistenci). (Parry et al. 2008)

## **ENVIRONMENTÁLNÍ FAKTORY**

Vnější prostředí má zásadní roli v iniciaci autoimunitního diabetu. Mezi nejčastěji diskutované vlivy patří:

1. Virové infekce,
2. Nutriční faktory.

Dalšími jsou vyšší věk matky při porodu, porod císařským řezem či vyšší porodní hmotnost. Vliv environmentálních faktorů lze dobře pozorovat například u jednovaječných dvojčat, u nichž je konkordance do 52 % a je tedy zřejmý jejich význam v rozvoji nemoci.

## **Virové infekce**

Virové infekce jsou v současné době považovány za jeden z hlavních spouštěcích faktorů destrukce  $\beta$ -buněk u T1D. Přesto není konkrétní mechanismus fungování znám. (Cavallo et al. 1992)

Epidemiologické studie ukazují asociaci mezi enterovirovými infekcemi (hlavně virem coxsackie B4) a vznikem autoimunitního diabetu u geneticky predisponovaných jedinců. Tato teorie je podpořena nálezem viru v pankreatu diabetických pacientů. (Jaïdane et al. 2008) Některé studie však asociaci viru coxsackie B4 s T1D nepotvrzují. (Marttila et al. 2001)

Na destrukci  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků se podílí několik patogenních mechanismů, přičemž nemůžeme vyloučit, že infekce jiné tkáně než pankreatu, například thymu (centrálního místa vývoje autotolerance), mají zásadní důsledky a hlavní roli v autoimunitním procesu. Navíc perzistentní enterovirová infekce (jakožto iniciátor vzniku T1D) kombinovaná s akutní reinfekcí může být akcelerátorem rozvoje nemoci. (Jaïdane et al. 2008)

Mezi další viry diskutované v souvislosti s rozvojem autoimunitního diabetu patří virus průšnic (Goto et al. 2008, Hyöty et al. 1985), zarděnek, spalniček, rotavirus či cytomegalovirus. (Lindberg et al. 1999, Sano et al. 2008, Graham et al. 2008, Tirabassi et al. 2010)

## **Nutriční a další faktory**

Mechanismus účinku, kterým různé nutrienty mohou ovlivňovat rozvoj autoimunitní reakce proti  $\beta$ -buňkám, je z velké části neznámý. Stejně tak nevíme, jestli expozice těmto látkám či jejich nedostatek vyvolává autoimunitu proti  $\beta$ -buňkám nebo jen urychluje již započatý proces. Reakce na podání rizikových nutrientů se může lišit ve fetálním období, raném dětství a u adolescentů. Jejich účinky mohou být specifické i nespecifické.

Pozorování z počátku 70. let 20. století potvrdila asociaci zvýšené tělesné hmotnosti v kojeneckém věku s větším rizikem diabetu 1. typu. Později byla doplněna o další možný rizikový faktor, kterým je vyšší přírůstek výšky a váhy v dětství. Zvýšený přírůstek tělesné hmotnosti společně s větším příjmem energie byl zaznamenán u dětí na umělé výživě v porovnání s kojenými dětmi od 3 měsíců věku (Heinig et al. 2003). Zvýšení insulinové poptávky a zvýšení tělesné hmotnosti vyvolané příkrmováním může přispívat k vývoji diabetu 1. typu. Avšak podle zjištění v kontrolní skupině, rychlý přírůstek hmotnosti v dětství a příliš brzká expozice kravskému mléku predisponují k T1D nezávisle (Hyppönen et al.

1999). Geneticky podmíněný rychlý růst, který zvyšuje exogenní insulinovou poptávku, nebo geneticky daná tendence k hyperinzulinémii vede k akceleraci růstu, což by mohlo vysvětlit, proč byl vysoký vzrůst asociován s rizikem T1D (Blom et al. 1992). Hyperinzulinémie sama o sobě vede k nadváze a obézní děti rostou rychleji než ostatní děti (Vignolo et al. 1988).

Kojení naopak by mělo před vznikem autoimunitního diabetu chránit. Mateřské mléko obsahuje protilátky, které kojenci zajišťují ochranu před infekcemi. Je v něm také mnoho cytokinů, růstových faktorů a i imunokompetentních buněk, které mají vliv na maturaci GALT (gut-associated lymphoid tissue) (Srivastava et al. 1996). Dále je u kojených dětí v porovnání s dětmi na umělé výživě zvýšená proliferace  $\beta$ -buněk a oddálená expozice cizím potravinovým antigenům (Juto 1985). To vše má na kojence pozitivní vliv.

Strava matky a složení mateřského mléka pravděpodobně hrají roli v rozvoji autoimunitních onemocnění. Mateřské mléko má vysokou koncentraci lidského inzulínu (Shehadeh et al. 2001), potenciálně kritického antigenu v procesu vedoucímu k T1D, a také malé množství proteinů kravského mléka,  $\beta$ -laktoglobulinu (pokud její strava je bohatá na kravské mléko) (Axelsson et al. 1984). Proto i u výhradně kojených velice citlivých dětí se může rozvinout alergie na kravské mléko (Høst 1994).

Některé N-nitroso sloučeniny, jako je streptozotocin, mají toxický účinek na  $\beta$ -buňky pankreatu. Mechanismy působení diabetogenních N-nitroso sloučenin se liší, buď poškozují buněčné organely prostřednictvím vytváření volných kyslíkových radikálů, nebo indukují zlomy v DNA. V některých případech byl diabetes dokonce přenesen na několik po sobě jdoucích generací potkanů. (LeDoux et al. 1988)

Zdá se, že některé vitaminy a minerální látky mohou pomoci chránit proti T1D. Ochranný vliv je připisován například vitaminu D, který navodí syntézu regulačních cytokinů. Následně stoupne hladina regulačních buněk, které jsou schopné snížit autoagresivní imunitní odpověď. Podávání vitaminu D zvyšuje množství mRNA pro IL-4 a transformující růstový faktor beta a snižuje koncentraci mRNA pro interferon a TNF. To znamená, že vitamin D může vyvolat specifickou odchylku v imunitním systému, konkrétně u Th2 lymfocytů. (Gregori et al. 2002). Biologické účinky vitamínu D jsou pravděpodobně ovlivněny polymorfismem genu pro receptor vitaminu D (McDermott et al. 1997). Nicméně o imunologických účincích vitaminu D na člověka víme zatím ještě velmi málo.

## ZÁVĚR

V současné době je na světě přes 220 milionů diabetických pacientů a incidence onemocnění celosvětově stoupá, za posledních dvacet let se dokonce zdvojnásobila. Proto někteří lékaři a vědci hovoří o epidemii diabetu. Největší skupinou jsou diabetici 2. typu, pacientů s T1D je asi 10krát méně. Jelikož je nepravděpodobné, že by se za tak krátkou dobu tak výrazně změnil poměr jednotlivých alel v populaci, je nejspíš způsobena zhoršujícími se vnějšími podmínkami nebo zlepšující se schopností lékařů onemocnění diagnostikovat. To ale nemusí být pravda ve všech světových regionech. Podle mého názoru je velmi nízká incidence v Číně (0,61 na 100 000 obyvatel), například oproti Finsku (41,1 na 100 000 obyvatel), způsobena špatnou dostupností lékařské péče a následnou diagnostikou. Na druhé straně tento velký rozdíl v incidenci by mohl také být způsoben genetickou odlišností asijské a evropské populací.

Jelikož T1D není onemocnění banální, ale velmi významné autoimunitní onemocnění s četnými komplikacemi přímo ohrožující pacienta na životě, je třeba zajistit včasnou diagnostiku a následnou adekvátní péči. Ideální by bylo u dětí z rizikových rodin provést molekulárně genetickou analýzu predispozičních či protektivních alel HLA a stanovit přítomnost autoprotilátek. Při vysoké pravděpodobnosti vzniku onemocnění zajistit jedinci vhodné vnější podmínky, aby se riziko spuštění autoimunitního procesu minimalizovalo. V současné době jsou u pacientů rutinně prováděné testy, až když se projeví symptomy typické pro diabetes, tedy při manifestaci choroby. Pokud se diagnóza potvrdí, je dotčený odkázán k doživotnímu exogennímu podávání inzulínu. Tomu se lze vyhnout pouze případnou transplantací pankreatu nebo  $\beta$ -buněk od živého či zesnulého dárce. V současné době se u pacientů s T1D experimentálně podává monoklonální protilátka Teplizumab, která je schopna zpomalit destrukci  $\beta$ -buněk, usnadňuje glykemickou kontrolu a snižuje inzulinové požadavky pacientů.

Jelikož počet nemocných stoupá, je čím dál naléhavější potřeba objasnit celý proces vzniku autoimunitního diabetu, což by následně umožnilo i lepší terapii. O to více je to významné, když si uvědomíme, že T1D je prakticky neléčitelný a přináší nemocnému četné sociální i ekonomické problémy. Vzhledem ke vzůstajícím technickým možnostem a stupňům poznání by se však celá situace mohla v budoucnu zlepšit.



## **SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: **Notkins AL** (2002): Immunologic and Genetic Factors in Type 1 Diabetes. *J Biol Chem* 277(46): 43545-43548.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Acha-Orbea H, McDevitt HO** (1987): The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(8): 2435-2439.

**Allen C, Palta M, D'Alessio DJ** (1991): Risk of diabetes in siblings and other relatives of IDDM subjects. *Diabetes* 40(7): 831-836.

**Almawi WY, Tamim H, Azar ST** (1999): Clinical review 103: T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type I (insulin-dependent) diabetes. *The J Clin Endocrinol Metab* 84(5): 1497-1502.

**American Diabetes Association** (2010): Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 33(1): 62-69.

**Anděl M a kol.** (2001): Diabetes mellitus a další poruchy metabolismu. *Galén, Praha*, 220s.

**Anderson MS, Bluestone JA** (2005): The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23: 447-485

**Awata T, Kuzuya T, Matsuda A, Iwamoto Y, Kanazawa Y, Okuyama M, Juji T** (1990) High frequency of aspartic acid at position 57 of HLA-DQ beta-chain in Japanese IDDM patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* 39(2): 266-269.

**Axelsson I, Jakobsson I, Lindberg T, Benediktsson B** (1984): Bovine beta-lactoglobulin in the human milk. A longitudinal study during the whole lactating period. *Acta Paediatr* 75: 702-707.

**Bartoš V, Pelikánová T** (2003): Praktická diabetologie. *Maxdorf, Praha*, 479s.

**Blom LG, Persson LÅ, Dahlquist GG** (1992): A high linear growth is associated with an increased risk of childhood diabetes. *Diabetologia* 35: 528-533.

**Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC** (1997): Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-795.

**Cavallo MG, Baroni MG, Toto A, Gearing AJ, Forsey T, Andreani D, Thorpe R, Pozzilli P** (1992): Viral infection induces cytokine release by beta islet cells. *Immunology* 75(4): 664-668.

**Cohen-Haguenaer O, Robbins E, Massart C, Busson M, Deschamps I, Hors J, Lalouel JM, Dausset J, Cohen D** (1985): A systematic study of HLA class II-beta DNA restriction fragments in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(10): 3335-3339.

**Cucca F, Lampis R, Frau F, Macis D, Angius E, Masile P, Chessa M, Frongia P, Silveti M, Cao A, De Virgiliis S, Congia M** (1995): The distribution of DR4 haplotypes in Sardinia suggests a primary association of type I diabetes with DRB1 and DQB1 loci. *Hum Immunol* 43(4): 301-308.

- Černá M, Žďárský E, Anděl M** (2000): HLA systém a diabetes mellitus 1. typu. *Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa* 3: 83-91.
- Černá M** (2008): Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr* 158(1-2): 2-12.
- Dorman JS, LaPorte RE, Stone RA, Trucco M** (1990): Worldwide differences in the incidence of type I diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19): 7370-7374.
- Dunn MF** (2005): Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals* 18(4): 295-303.
- Ettinger RA, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW** (1998): Exceptional stability of the HLA-DQA1\*0102/DQB1\*0602 alpha beta protein dimer, the class II MHC molecule associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 161(11): 6439-6445.
- Ettinger RA, Papadopoulos GK, Moustakas AK, Nepom GT, Kwok WW** (2006): Allelic variation in key peptide-binding pockets discriminates between closely related diabetes-protective and diabetes-susceptible HLA-DQB1\*06 alleles. *J Immunol* 176(3): 1988-1998.
- Frank RN** (2004): Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med* 350: 48-58.
- Ge X, Piganelli JD, Tse HM, Bertera S, Mathews CE, Trucco M, Wen L, Rudert WA** (2006): Modulatory role of DR4- to DQ8-restricted CD4 T-cell responses and type 1 diabetes susceptibility. *Diabetes* 55(12): 3455-3462.
- Gillespie KM, Gale EAM, Bingley PJ** (2002): High Familial Risk and Genetic Susceptibility in Early Onset Childhood Diabetes. *Diabetes* 51(1): 210-214.
- Goto A, Takahashi Y, Kishimoto M, Nakajima Y, Nakanishi K, Kajio H, Noda M** (2008): A case of fulminant type 1 diabetes associated with significant elevation of mumps titers. *Endocr J* 55(3): 561-564.
- Graham KL, Sanders N, Tan Y, Allison J, Kay TW, Coulson BS** (2008): Rotavirus infection accelerates type 1 diabetes in mice with established insulinitis. *J Virol* 82(13): 6139-6149.
- Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L** (2002): A 1{alpha},25-dihydroxyvitamin D3 analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51: 1367-1374.
- Hawkins BR, Lam KS, Ma JT, Low LC, Cheung PT, Serjeantson SW, Yeung RT** (1987): Strong association of HLA-DR3/DRw9 heterozygosity with early-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Chinese. *Diabetes* 36(11): 1297-1300.
- Heath V, Mason D, Ramirez F, Seddon B** (1997): Homeostatic mechanisms in the control of autoimmunity. *Semin Immunol* 9(6): 375-380.

**Heinig MJ, Nommsen LA, Peerson JM, Lonnerdal B, Dewey KG** (1993): Energy and protein intakes of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life and their association with growth velocity: the DARLING study. *Am J Clin Nutr* 58: 152–161.

**Hořejší V, Bartůňková J** (2009): *Základy imunologie. Triton, Praha*, 280s.

**Høst A** (1994): Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 5: 1–36.

**Howson JM, Walker NM, Smyth DJ, Todd JA; Type I Diabetes Genetics Consortium** (2009): Analysis of 19 genes for association with type I diabetes in the Type I Diabetes Genetics Consortium families. *Genes Immun* 10(1): 74-84.

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/177583/Ebers-papyrus>

<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

[http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin\\_struct.html](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin_struct.html)

[http://www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/en/](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/)

**Hyöty H, Huupponen T, Leinikki P** (1985): Humoral immunity against viral antigens in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM): altered IgA class immune response against mumps virus. *Clin Exp Immunol* 60(1): 139-144.

**Hyppönen E, Kenward MG, Virtanen SM, Piitulainen A, Virta-Autio P, Tuomilehto J, Knip M, Akerblom HK** (1999): Infant feeding, early weight gain, and risk of type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care* 22: 1961–1965.

**Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J** (2003): Genetic Liability of Type 1 Diabetes and the Onset Age Among 22,650 Young Finnish Twin Pairs. *Diabetes* 52(4): 1052-1055.

**Chaturvedi P, Yu Q, Southwood S, Sette A, Singh B** (1996): Peptide analogs with different affinities for MHC alter the cytokine profile of T helper cells. *Int Immunol* 8(5): 745-755.

**Chern MM, Anderson VE, Barbosa J** (1982): Empirical risk for insulin-dependent diabetes (IDD) in sibs. Further definition of genetic heterogeneity. *Diabetes* 31(12): 1115-1118.

**Chistiakov DA, Voronova NV** (2009): Zn(2+)-transporter-8: a dual role in diabetes. *Biofactors* 35(4): 356-363.

**Jäidane H, Hober D** (2008): Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 34(6): 537-548.

**Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC** (1996): Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2): 734-738.

**Junliang Liu, Lisa E. Purdy, Simon Rabinovitch, Anthony M. Jevnikar, and John F. Elliott** (1999): Major DQ8-Restricted T-Cell Epitopes for Human GAD65 Mapped Using Human CD4, DQA1\*0301,DQB1\*0302 Transgenic IAnull NOD Mice. *Diabetes* 48(3): 469-477.

**Juto P** (1985): Human milk stimulates  $\beta$  cell function. *Arch Dis Child* 60: 610–613

**Kanagawa O, Martin SM, Vaupel BA, Carrasco-Marin E, Unanue ER** (1998): Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1721-1724.

**Kanagawa O, Shimizu J, Unanue ER** (1997): The role of I-Ag7 beta chain in peptide binding and antigen recognition by T cells. *Int Immunol* 9(10): 1523-1526.

**Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I, Park MS, Degos L, Galibert F, Hors J** (1990): A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 85(4): 1315-1319.

**Kida K, Mimura G, Kobayashi T, Nakamura K, Sonoda S, Inouye H, Tsuji K** (1989): Immunogenetic heterogeneity in type 1 (insulin-dependent) diabetes among Japanese HLA antigens and organ-specific autoantibodies. *Diabetologia* 32(1): 34-39.

**Kinoshita J, Hata S, Yamazaki H, Tajima N** (2010): Slowly progressive insulin-dependent diabetes mellitus associated with pernicious anemia. *Internal medicine* 49(2): 155-159.

**Kockum I, Sanjeevi CB, Eastman S, Landin-Olsson M, Dahlquist G, Lernmark A** (1995): Population analysis of protection by HLA-DR and DQ genes from insulin-dependent diabetes mellitus in Swedish children with insulin-dependent diabetes and controls. *Eur J Immunogenet* 22(6): 443-465.

**LeDoux SP, Hall CR, Forbes PM, Patton NJ, Wilson GL** (1988): Mechanisms of nicotinamide and thymide protection from alloxan and streptozotocin toxicity. *Diabetes* 37: 1015–1019.

**Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC** (2001): Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2(6): 501-507.

**Lindberg B, Ahlfors K, Carlsson A, Ericsson UB, Landin-Olsson M, Lernmark A, Ludvigsson J, Sundkvist G, Ivarsson SA** (1999): Previous exposure to measles, mumps, and rubella--but not vaccination during adolescence--correlates to the prevalence of pancreatic and thyroid autoantibodies. *Pediatrics* 104(1): 12.

**Liston A, Lesage S, Gray DH, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM, Boyd RL, Wilson J, Baxter AG, Gallo EM, Crabtree GR, Peng K, Wilson SR, Goodnow CC** (2004): Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity* 21(6): 817-830.

**Mahajan S, Koranne RV, Sharma SK** (2003): Cutaneous manifestation of diabetes mellitus. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 69(2): 105-108.

**Marttila J, Juhela S, Vaarala O, Hyöty H, Roivainen M, Hinkkanen A, Vilja P, Simell O, Ilonen J** (2001): Responses of coxsackievirus B4-specific T-cell lines to 2C protein-characterization of epitopes with special reference to the GAD65 homology region. *Virology* 284(1): 131-141.

**Mauricio D, Mandrup-Poulsen T** (1998): Apoptosis and the Pathogenesis of IDDM. *Diabetes* 47(10): 1537-1543.

**McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, Snehalatha C, Hitman GA** (1997): Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 40: 971-975

**Miller JF** (1993): Self-nonsel self discrimination and tolerance in T and B lymphocytes. *Immunol Res* 12(2): 115-130.

**Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH; American Diabetes Association** (2003): Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 26: 94-98.

**Mora C, Wong FS, Chang CH, Flavell RA** (1999): Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA-deficient mice. *J Immunol* 162(8): 4576-4588.

**Nepom GT** (1990): A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM. *Diabetes* 39(10): 1153-1157.

**Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA** (1996): The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet* 59(5): 1134-1148.

**Notkins AL** (2002): Immunologic and Genetic Factors in Type 1 Diabetes. *J Biol Chem* 277(46): 43545-43548.

**Nyunt O, Wu JY, McGown IN, Harris M, Huynh T, Loeng GM, Cowley DM, Cotterill AM** (2009): Investigating Maturity Onset Diabetes of the Young, *Clin Biochem Rev* 30(2): 67-74

**Parry CS, Brooks BR** (2008): A new model defines the minimal set of polymorphism in HLA-DQ and -DR that determines susceptibility and resistance to autoimmune diabetes. *Biol Direct* 14: 3-42.

**Parry CS, Gorski J, Stern LJ** (2007): Crystallographic structure of the human leukocyte antigen DRA, DRB3\*0101: models of a directional alloimmune response and autoimmunity. *J Mol Biol* 371(2): 435-446.

**Queiroz MS** (2008): Type 1 diabetes and autoimmune polyendocrine syndromes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52(2): 198-204.

**Robey E, Fowlkes BJ** (1994): Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* 12: 675-705.

**Robinson J, Waller MJ, Fail SC, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG** (2009): The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 37: 1013-1017.

**Sano H, Terasaki J, Tsutsumi C, Imagawa A, Hanafusa T** (2008): A case of fulminant type 1 diabetes mellitus after influenza B infection. *Diabetes Res Clin Pract* 79(3): 8-9.

**She JX** (1996): Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* 17(7): 323-329.

**Sheehy MJ, Scharf SJ, Rowe JR, Neme de Gimenez MH, Meske LM, Erlich HA, Nepom BS** (1989): A diabetes-susceptible HLA haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and -DQ alleles. *J Clin Invest* 83(3): 830-835.

**Sheehy MJ, Scharf SJ, Rowe JR, Neme de Gimenez MH, Meske LM, Erlich HA, Nepom BS** (1989): A diabetes-susceptible HLA haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and -DQ alleles. *J Clin Invest* 83(3): 830-835.

**Shehadeh N, Gelertner L, Blazer S, Perlman R, Solovachik L, Etzioni A** (2001): Importance of insulin content in infant diet; suggestion for a new infant formula. *Acta Paediatr* 90: 93-95.

**Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ** (1998): T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393(6684): 480-483.

**Silink M** (2007): Childhood diabetes: a global perspective. *Horm Res* 57(1):1-5.

**Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G** (2007): Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology?. *Pediatr Diabetes* 8(6):6-14.

**Srivastava MD, Srivastava A, Brouhard B, Saneto R, Groh-Wargo S, Kubit J** (1996): Cytokines in human milk. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 93: 263-287.

**Thomson G** (1984): HLA DR antigens and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 36(6): 1309-1317.

**Tirabassi RS, Guberski DL, Blankenhorn EP, Leif JH, Woda BA, Liu Z, Winans D, Greiner DL, Mordes JP** (2010): Infection with viruses from several families triggers autoimmune diabetes in LEW\*1WR1 rats: prevention of diabetes by maternal immunization. *Diabetes* 59(1): 110-118.

**Todd JA, Bell JI, McDevitt HO** (1987): HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329(6140): 599-604.

**Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland,**

**Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG** (2007): Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 39(7): 857-864.

**Todd JA** (1990): Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. *Immunol Today* 11(4): 122-129.

**Van den Driessche A, Eenkhoorn V, Van Gaal L, De Block** (2009): Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. *Neth J Med* 67(11): 376-387.

**Vignolo M, Naselli A, Di Battista E, Mostest M, Aicardi G** (1988): Growth and development in simple obesity. *Eur J Pediatr* 147: 242-244.

**Wagener DK, Sacks JM, LaPorte RE, Macgregor JM** (1982): The Pittsburgh study of insulin-dependent diabetes mellitus. Risk for diabetes among relatives of IDDM. *Diabetes* 31(2): 136-144.

**Wallet MA, Flores RR, Wang Y, Yi Z, Kroger CJ, Mathews CE, Earp HS, Matsushima G, Wang B, Tisch R** (2009): MerTK regulates thymic selection of autoreactive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(12): 4810-4815.

**Wang B, André I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C, Mathis D** (1997): Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13844-13849.

**Wen L, Chen NY, Tang J, Sherwin R, Wong FS** (2001): The regulatory role of DR4 in a spontaneous diabetes DQ8 transgenic model. *J Clin Invest* 107(7): 871-880.

**Wen L, Wong FS, Tang J, Chen NY, Altieri M, David C, Flavell R, Sherwin R** (2000): In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J Exp Med* 191(1): 97-104.

**Wicker LS, Chen SL, Nepom GT, Elliott JF, Freed DC, Bansal A, Zheng S, Herman A, Lernmark A, Zaller DM, Peterson LB, Rothbard JB, Cummings R, Whiteley PJ** (1996): Naturally processed T cell epitopes from human glutamic acid decarboxylase identified using mice transgenic for the type 1 diabetes-associated human MHC class II allele, DRB1\*0401. *J Clin Invest* 98(11): 2597-2603.

**Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG** (2008): Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 155: 173-181.

**Wordsworth P** (1994): HLA nomenclature: a user-friendly system?. *Ann Rheum Dis* 53(3): 153-154.

**Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C, Mathis D** (2005): Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity* 22(3): 385-396.