

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Název práce

**Imunointervenční terapie nově vzniklého autoimunitně podmíněného diabetu u NOD myši**

Autor

**MUDr. Lenka Vargová**

2016

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika diabetologie IKEM

Školitel: Prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

Konzultant: MUDr. Jan Kříž, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

Obsah	3
Abstrakt v českém jazyce	4
Abstrakt v anglickém jazyce	5
1. Úvod	6
2. Hypotézy a cíle práce	7
3. Materiál a metodika	8
4. Výsledky	11
5. Diskuze	13
6. Závěry	16
7. Použitá literatura	17
Seznam publikací	20
1. Publikace, které jsou podkladem disertace	20
2. Publikace bez vztahu k tématu disertace	20

## Abstrakt

**Úvod:** Diabetes mellitus 1. typu je chronické metabolické onemocnění způsobené autoimunitní destrukcí beta buněk pankreatu. Aktuálně přijímaná teorie vzniku onemocnění vychází zejména ze studia průběhu onemocnění u non-obese diabetic (NOD) myši, kdy k rozvoji cukrovky dochází následkem poruchy v regulaci imunitního systému. Experimentální a klinická data ukazují, že autoimunita může být utlumena až potlačena prostřednictvím imunitní intervence. Ta, pokud je zahájena včas, může zpomalit probíhající zánik beta buněk a zachovat zbytkovou sekreci inzulínu. K nastolení normoglykémie ale samotná imunointervence většinou nestačí. Jak prokázalo několik intervenčních studií na zvířecích modelech, je současně nutná stimulace proliferace anebo regenerace beta buněk.

**Cíl práce:** Zjistit, zda kombinováním látky s imunosupresivním účinkem (myši anti-thymocytární globulin (mATG), gusperimus), s látkou, která podporuje obnovu pankreatických beta buněk (sitagliptin), dojde ke zpomalení či zvrácení průběhu diabetu. A jakým mechanismem dané látky působí.

**Materiál a metody:** K pokusům byly použity samice myšičího kmene NOD/ShiLtJ ( $H2^g7$ ). U těchto myši jsme v den 0, 7, 14 a 28 stanovovali glykémii, subpopulace T-lymfocytů pomocí průtokové cytometrie, míru zánětu a přítomnost endokrinních buněk imunohistochemickým vyšetřením řezů pankreatu. Dále jsme stanovovali koncentraci dipeptidyl peptidázy IV (DPP-IV) a transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF $\beta$ ) v krvi, profil genové exprese ve splenocytech a intraperitoneální glukózový toleranční test.

**Výsledky:** Ve skupině léčené mATG se remise vyskytla u 3 zvířat z 28. V gusperimové, sitagliptinové a v diabetické kontrolní skupině se remise vyskytla po jednom případě. Ve skupině s kombinovanou léčbou nebylo dosaženo remise u žádného z pokusných zvířat. Jediný vliv léčby na populaci regulačních T-lymfocytů jsme zaznamenali ve skupině léčené mATG, kde byl patrný výrazný vzestup 7. den pokusu z hodnoty 8,8 (6,2 – 10,0) % v den 0 na 14,9 (12,3 – 23,4) %;  $P < 0,01$ . Ve stejné době došlo ve skupině léčené mATG k razantnímu poklesu populace CD8+ T-lymfocytů z původní hodnoty 16,7 (10,9 - 21,9) % na 4,9 (1,8 - 8,5) %;  $P < 0,001$ . Koncentrace DPP-IV byla v den ukončení pokusu nejvyšší ve skupině léčené gusperimem a činila 885,3 (183,4 – 2175,4) ng/ml, nejnižší byla koncentrace DPP-IV u myši, které dosáhly remise a činila 321,8 (277,0 - 737,5) ng/ml se signifikantním rozdílem mezi těmito dvěma skupinami;  $P < 0,01$ . Hodnota TGF $\beta$  byla nejvyšší ve skupině myši v remisi, kde činila 81172,0 (66779,9 - 132703,9) pg/ml, čímž se výrazně lišila od hodnoty naměřené u skupiny léčené sitagliptinem, kde byla hodnota nejnižší a činila 36670,2 (4627,5 - 64787,5) pg/ml;  $P < 0,001$ .

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

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

## Abstract

**Introduction:** Type 1 diabetes mellitus is a chronic metabolic disease caused by autoimmune destruction of pancreatic beta cells. The theory of the disease onset is derived from study of a disease course in non-obese diabetic (NOD) mice, in which the diabetes occurs due to a dysregulation of the immune system. Experimental and clinical studies showed that the autoimmunity may be abrogated by immune intervention, which if initiated early enough may at least slow down the ongoing beta cells lost and preserve residual insulin secretion. But immune intervention alone is not sufficient to restore normoglycemia in the majority of cases. Several interventional studies showed that stimulation of proliferation and/or regeneration of beta cells are necessary to restore normoglycemia in animal models.

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

**Material and methods:** All experiments were performed in female NODShiLtJ (H2<sup>g7</sup>) mice. The following parameters were examined at day 0, 7, 14 and 28: blood glucose, subpopulations of T-lymphocytes by flow cytometry, islet inflammation and presence of endocrine cells by immunohistochemical examination of pancreatic sections. Concentration of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) in blood, gene expression profile from splenocytes and intraperitoneal glucose tolerance test.

**Results:** In the mATG group the remission occurred in 3 out of 28 mice. In the gusperimus, sitagliptin and in the diabetic control group the remission occurred in one case each. In the combined group the remission was not achieved in any case. The only effect of therapy on regulatory T-lymphocytes values was recorded in the mATG group, where a marked increase from 8.8 (6.2 – 10.0) % at day 0 to 14.9 (12.3 – 23.4) % at day 7 was present;  $P < 0.01$ . At the same time dropped in the mATG group values of CD8+ T-lymphocytes from 16.7 (10.9 – 21.9) % to 4.9 (1.8 – 8.5) %;  $P < 0.001$ . The concentration of DPP-IV was at the end of the study highest in the gusperimus group and made 885.3 (183.4 – 2175.4) ng/ml, the lowest concentration was in mice with remission and made 321.8 (277.0 – 737.5) ng/ml with significant difference between those two groups;  $P < 0.01$ . TGF $\beta$  concentration was highest in mice with remission in which represented 81172.0 (66779.9 – 132703.9) pg/ml and was significantly different from the sitagliptin group in which the concentration TGF $\beta$  was the lowest and made 36670.2 (4627.5 – 64787.5) pg/ml;  $P < 0.001$ .

**Conclusion:** In the case of overt diabetes none of the therapies seemed to be efficient to cure or at least slow down the course of the disease. Neither the combination of two diversely acting substances did lead to better results. Remission of diabetes was very rare and was accompanied by lowered concentration of DPP-IV and higher concentration of TGF $\beta$  in blood. Administration of sitagliptin led to a decrease of TGF $\beta$  values. Only the mATG administration had positive influence on T-lymphocytes subpopulations. Gusperimus, on the other hand, kept the inflammatory process in active phase.

**Key words:** Type 1 diabetes, NOD mouse, DPP-IV, TGF $\beta$ , mATG, gusperimus, sitagliptin, Tregs, autoimmunity

## 1. Úvod

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je chronické metabolické onemocnění způsobené autoimunitní destrukcí beta buněk pankreatu (Pelikánová T. et al., 2012). Aktuálně přijímaná teorie vzniku onemocnění vychází zejména ze studia průběhu onemocnění u non-obese diabetic (NOD) myši, kdy k rozvoji DM1 dochází následkem poruchy v regulaci imunitního systému, vedoucí k expanzi autoreaktivních CD4+ a CD8+ T-lymfocytů, autoprotilátky produkujících B lymfocytů a aktivaci přirozeného imunitního systému, které spolupracují v ničení beta buněk pankreatu. Místem aktivace T-lymfocytů jsou pankreatické lymfatické uzliny na základě prezentace antigenů z beta buněk prostřednictvím antigen prezentujících buněk (APC). Autoreaktivní T-lymfocyty po klonální expanzi migrují do ostrůvků, kde napadají beta buňky (Bluestone J.A. et al., 2010). Proti cytotoxickým T-lymfocytům působí regulační T-lymfocyty (Tregs), které mohou v časném stádiu destrukci beta buněk zastavit tím, že inhibují diabetogenní T-lymfocyty a buňky přirozené imunity prostřednictvím interleukinu 10 (IL-10) a transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Lehuen A. et al., 2010). Tregs jsou charakterizovány mimo jiné expresí transkripčního faktoru forkhead box P3 (FOXP3). Beta buňky v zánětlivém prostředí pouze nezanikají, ale mají i velkou snahu o regeneraci, jak bylo dokumentováno u NOD myši. Experimentální a klinická data ukazují, že autoimunita může být utlumena až potlačena prostřednictvím imunitní intervence. Ta, pakliže je zahájena včas, může zpomalit probíhající zánik beta buněk a zachovat zbytkovou sekreci inzulinu (Herold K.C. et al., 2005; Ludvigsson J. et al., 2008). K nastolení normoglykémie ale samotná imunointervence většinou nestačí. Jak prokázalo několik intervenčních studií na zvířecích modelech, je současně nutná stimulace proliferace anebo regenerace beta buněk. (Ogawa N. et al., 2004; Shoda L.K. et al., 2005).

### Imunointervence

Z hlediska potlačení autoimunity se nejvíce účinná jevší léčba specificky zaměřená proti T-lymfocytům. Odpověď na léčbu je spojena se změnou poměru CD4+ a CD8+ buněk (Herold K.C. et al., 2002). Tato léčba také vede k výraznému zvětšení populace Tregs (Feng X. et al., 2008). Alternativou mohou být imunosupresivní léky s více komplexním mechanismem účinku. Jednou z těchto látek je gusperimus (deoxyspergualin) podávaný k potlačení autoimunitní reakce u autoimunitních chorob jako lupusová nefritida (Lorenz H.M. et al., 2011) nebo Wegenerova granulomatóza (Flossmann O., Jayne D.R., 2010).

### Regenerace beta buněk

Vhodnými a dostupnými prostředky ke zvýšení množství beta buněk se zdají být analoga glucagon-like peptide 1 (GLP-1) či inhibitory jeho degradace, které představují novou skupinu léků užívaných v léčbě diabetiků 2. typu. GLP-1 podporuje proliferaci beta buněk a snižuje jejich apoptózu (Drucker D.J., 2003; Li Y. et al., 2003; Xu G. et al., 2006). Po uvolnění do krevního oběhu je GLP-1 proteolyticky degradován během několika minut prostřednictvím dipeptidyl peptidázy-IV (DPP-IV). Tomuto lze zabránit podáním inhibitorů DPP-IV (Pospisilik J.A. et al., 2003).

### Kombinovaná léčba

Důvodem neuspokojivých výsledků monoterapií v léčbě DM1 může být to, že žádný z léčebných postupů není dostatečně účinný k potlačení autoimunitního procesu a současně schopný navodit proliferaci beta buněk pankreatu. Kombinace vhodných látek by mohla vylepšit účinek jejich léčebného potenciálu.

## **2. Hypotézy a cíle práce**

### **Cíl práce**

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

### **Hypotéza č. 1**

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

### **Hypotéza č. 2**

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

### **Hypotéza č. 3**

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

### 3. Materiál a metodika

Abychom objasnili působení jednotlivých látek a efekt jejich kombinace, uspořádali jsme celkem 5 pokusů, které jsme následně doplnili o porovnání výsledků zjištěných u diabetických zvířat s hodnotami stanovenými u nediabetických zvířat a zvířat, která dosáhla remise. Maximální dobu sledování jsme stanovili na 28 dní. V rámci jedné skupiny byly diabetické myši dále rozděleny do čtyř podskupin s odlišnou dobou ukončení pokusu, a to v den 0, 7, 14 a 28. V těchto časových úsecích jsme stanovovali subpopulace T-lymfocytů průtokovou cytometrií, prováděli imunohistochemické vyšetření řezů pankreatem, stanovení DPP-IV a TGF $\beta$  z krve, profil genové exprese splenocytů a v den 24 byl proveden intraperitoneální glukózový toleranční test. Glykémie byly měřeny z žíly na konci ocasu v průběhu celé doby pokusu 2x týdně za pomoci glukometru Accu-Check Performa Nano (Roche, Basel, Švýcarsko). Všechny experimenty byly prováděny na myších samicích kmene NOD/ShiLtJ (H2<sup>g</sup>). V průběhu celé doby pokusu nebyl zvířatům podáván exogenní inzulín.

#### Jednotlivé skupiny

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

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

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

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

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

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

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

#### Průtoková cytometrie

V den ukončení pokusu byly ze zvířat odebrány pankreatické lymfatické uzliny a slezina. Splenocyty získané jemným rozmělněním sleziny v Iscove's modified Dulbecco's mediu byly odděleny gradientovou centrifugací na Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko). Buňky pankreatických lymfatických uzlin byly získány propasírováním uzlin přes 60  $\mu$ m sítko. Získané buňky byly označeny a vyšetřeny pomocí průtokové cytometrie. K obarvení buněk jsme použili fluorescenční protilátky proti povrchovým antigenům CD3, CD4, CD8, CD25 (A488 anti-CD3, eBioscience, San Diego, USA; Qdot605 anti-CD4, Invitrogen, Eugene, USA; PerCP-Cy5.5 anti-CD8, eBioscience; APC anti-CD25, vyrobená v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, Praha, Česká republika). Následně byly buňky nafixovány a permeabilizovány (FoxP3 Staining Buffer Set, eBioscience). Nitrobuňčný antigen FoxP3 byl detekován pomocí protilátky značené phycoerythrinem (eBioscience). U kontrolních



vzorků byla použita odpovídající isotypová kontrola značená phycoerythrinem (eBioscience). Označené buňky byly vyhodnoceny pomocí průtokového cytometru LSR II FACSDiva softwarem (BD, San Jose, USA). Ve vzorcích byly stanoveny následující subpopulace T-lymfocytů: podíl CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů a populace CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulačních T-lymfocytů mezi CD4<sup>+</sup> lymfocyty (Tregs).

### **Imunofluorescenční barvení buněk ostrůvků**

Přibližně polovina z každého pankreatu byla fixována ve 4 % formaldehydu a zalita do parafínu. Imunofluorescenční barvení bylo provedeno na 5 µm řezech. Před samotnou detekcí antigenu byla tkáň nejprve inkubována v Target Retrieval Solution, Citrate pH 6, (Dako, Glostrup, Dánsko) dle návodu výrobce, tj. tkáň umístěná v roztoku byla inkubována po dobu 30 min. ve vodní lázni s teplotou 97° C a posléze ponechána 15 min při pokojové teplotě. K blokování nespecifických vazebných míst bylo použito 5 % oslí sérum, které bylo aplikováno na řezy po dobu 30 min. při pokojové teplotě (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Specifické protilátky proti c-peptidu a glukagonu pak byly na řezech ponechány přes noc při 4° C (králičí protilátky proti c-peptidu a glukagonu; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Sekundární protilátka proti potkanímu IgG byla spojena s AlexaFluor 555 a protilátky proti králičím IgG byly spojeny s AlexaFluor 488 (oboje Invitrogene, OR, USA). Jádra byla nabarvena pomocí 4,6-diamino-2-fenylindolu (DAPI) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Řezy byly uchovány v roztoku 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu a polyvinyl alkoholu (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) v glycerolu. Následně byly vyhodnoceny na fluorescenčním mikroskopu značky Olympus BX41 vybaveném digitální kamerou Olympus DP71 (Olympus, Japonsko).

### **Morfologie ostrůvků**

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

### **Stanovení koncentrace DPP-IV v plazmě**

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

### **Stanovení koncentrace TGFβ v séru**

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

## **Profil genové exprese ve splenocytech**

Splenocyty získané jemným rozmělněním sleziny v Iscove's modified Dulbecco's mediu byly odděleny gradientovou centrifugací na Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko). Veškerá RNA byla extrahována za pomoci RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. K izolaci byl použit přístroj QIAcube (Qiagen, Hilden, Německo). RNA byla vyluhována do 14  $\mu$ l čisté vody a čistota a koncentrace RNA byla stanovena pomocí ultrafialového-viditelného spektrofotometru (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RNA o celkovém množství 2-4  $\mu$ g byla užita k syntéze cDNA za pomoci SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Profil genové exprese 11 zvolených genů (Bax, Bcl2, FasL, Il1b, Il6, Il10, Ifng, Tnf, Nfkb1, Nfkb2, Ikbkb) byl stanoven pomocí kvantitativní real-time RT-PCR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) za použití ribozomální RNA (18S rRNA) jako vnitřní kontroly, která byla vybrána ze 4 testovaných provozních (housekeeping) genů (Actb, Hprt, Gapdh, 18S) užitím NormFinder softwaru. Ke kalibraci pro relativní kvantifikaci byla použita cDNA kontrolního vzorku. Kvantifikace mRNA byla provedena v triplicátech prostřednictvím na zakázku vyrobené TaqMan® Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems) a rychlého protokolu (TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems). Amplifikace RT-qPCR byla provedena na přístroji ABI Prism® 7900 H.T. Sequence Detection system (Applied Biosystems). Data byla vyhodnocena jako relativní množství (RQ) za použití RQ manager 1.2. software pro automatickou analýzu dat (Applied Biosystems).

## **Intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT)**

Byl naplánován na 24. den pokusu. Po nočním lačnění byla formou intraperitoneální injekce zvířeti podána glukóza (1 mg/g tělesné hmotnosti) ve formě 10 % roztoku. Hodnoty glykémii byly zjišťovány v 0., 10., 20., 30., 40., 50. a 60. min testu z žíly na konci ocasu pomocí glukometru Accu-Chek Performa Nano (Roche, Basel, Švýcarsko). Z těchto hodnot byl pak vypočítán koeficient asimilace glukózy dle vzorce  $x = (\ln C_1 - \ln C_2) / (t_1 - t_2)$ . C – glykémie, t – čas.

## **Statistické vyhodnocení**

Výsledky jsou uvedeny jako medián (min – max). Ke statistickému vyhodnocení jsme využili počítačový software GraphPad Prism 6 po předchozí konzultaci s nezávislým statistikem. Neparametrické testy, jako je Kruskal-Wallisův test, Mann-Whitney test nebo Studentův t-test, byly použity ke stanovení rozdílu mezi skupinami. Chí kvadrát test byl použit ke zjištění rozdílu ve stupních infiltrace. Hodnoty  $P < 0,05$  jsme považovali za statisticky významné.

## 4. Výsledky

### Hodnoty glykémii a výskyt remise diabetu

U skupiny zvířat léčené mATG bylo dosaženo remise u 3 zvířat. V gusperimové, sitagliptinové a v diabetické kontrolní skupině se remise vyskytla po jednom případě. Ve skupině s kombinovanou léčbou nebylo dosaženo remise u žádného z pokusných zvířat.

### Populace regulačních T-lymfocytů

Populace Tregs vzrůstaly v průběhu pokusu u všech diabetických skupin. Jediný vliv léčby na hodnoty Tregs jsme zaznamenali ve skupině léčené mATG, kde jsme zaznamenali výrazný vzestup již 7. den pokusu z hodnoty 8,8 (6,2 – 10) % v den 0 na 14,9 (12,3 – 23,4) % v den 7;  $P < 0,01$ . Nicméně nebyl trvalý a na konci pokusu se jednotlivé diabetické skupiny od sebe neodlišovaly.

### Populace CD4+ T-lymfocytů

Populace CD4+ T-lymfocytů vzrostla ve skupině léčené mATG na 77,1 (67,9 – 82) % a naopak klesla v diabetické kontrolní skupině na 70,5 (55,9 – 74,5) %, tím se tyto dvě skupiny na konci pokusu významně lišily;  $P < 0,01$ . V ostatních skupinách jsme nezaznamenali žádné výraznější změny.

### Populace CD8+ T-lymfocytů

Ve skupině léčené mATG došlo po jeho podání k razantnímu poklesu v populaci CD8+ T-lymfocytů z původní hodnoty 16,7 (10,9 - 21,9) % na 4,9 (1,8 - 8,5) % v den 7;  $P < 0,001$ . Tento pokles přetrval až do konce experimentu, kdy populace CD8+ T-lymfocytů činila 7,4 (6,2 - 13,8) %, čímž se výrazně odlišovala od hodnoty v diabetické kontrolní skupině, kde došlo naopak k nárůstu a činila 15,5 (11,8 - 20,8) %;  $P < 0,001$ . V ostatních diabetických skupinách jsme nezaznamenali žádné významné změny.

### Skóre beta buněk

V době manifestace diabetu byla již většina beta buněk zničena. V průběhu celé doby pokusu zůstalo množství beta buněk na velmi nízké až téměř nulové hodnotě.

### Skóre alfa buněk

Skóre alfa buněk signifikantně narostlo v průběhu pokusu ve skupinách, kterým byl podáván sitagliptin. Ve skupině s kombinovanou léčbou došlo k nárůstu z hodnoty 1,04 (0,42 - 1,53) v den 0 na 1,87 (1,00 - 2,33) v den 28;  $P < 0,01$  a ve skupině se sitagliptinem samotným z hodnoty 1,0 (0,42 – 1,48) v den 0 na 1,73 (1,00 - 2,13) v den 28;  $P < 0,01$ .

### Stupeň infiltrace

Jednotlivé diabetické skupiny se v průběhu pokusu nelišily od diabetické kontrolní skupiny a ve všech kromě gusperimové došlo k poklesu v tíži infiltrace imunitními buňkami.

V den ukončení pokusu se pak od nediabetické kontrolní skupiny ve stupních infiltrace lišila skupina s kombinovanou léčbou a léčbou sitagliptinem a také diabetická kontrolní skupina. Skupina léčená gusperimem se od nediabetické kontrolní skupiny nelišila.

### Koncentrace DPP-IV v plazmě

Koncentrace DPP-IV v sitagliptinem léčené skupině klesla 7. den pokusu na hodnotu 292,9 (124,5 – 376,8) ng/ml z původní hodnoty 712,9 (550,0 – 775,2) ng/ml. Dále její hodnota kontinuálně stoupala na hodnotu 390,4 (219,6 – 660,9) ng/ml v den 14 a 848,7 (642,6 – 1033,6) ng/ml v den 28. Ve skupině s kombinovanou léčbou byl ne zcela signifikantní pokles patrný v den 14 (289,5 (153,4 – 655,9) ng/ml) následovaný opět vzestupem na hodnotu 668,2 (344,2 – 1215,5) ng/ml v den 28;  $P < 0,05$ . K mírnému nárůstu v hodnotách DPP-IV došlo také u skupiny léčené guserimem na hodnotu 885,3 (183,4 – 2175,4) ng/ml v den 28 a u diabetické kontrolní skupiny na hodnotu 851,1 (289,2 – 1623,0) ng/ml v den 28. Oproti sitagliptinem léčené skupině se diabetická kontrolní skupina signifikantně lišila jen sedmý den pokusu. V den ukončení pokusu pak byla hodnota DPP-IV ve skupině léčené guserimem nejvyšší a lišila se tak od nediabetické kontrolní skupiny, kde koncentrace DPP-IV činila 488,6 (473,2 – 523,4) ng/ml;  $P < 0,05$ . Jednotlivé diabetické skupiny se na konci pokusu mezi sebou nelišily. Naopak nejnižší byla koncentrace DPP-IV v plazmě myši, které dosáhly remise a činila 321,8 (277 - 737,5) ng/ml. Tím se tato skupina lišila od diabetické kontrolní, guserimové a sitagliptinové skupiny.

### **Koncentrace TGFβ v séru**

Ve skupině léčené mATG došlo 7. den pokusu k signifikantnímu vzestupu TGFβ na hodnotu 95711,6 (77748,9 – 141247,6) pg/ml z původních 54526,8 (33252,4 – 80150,4) pg/ml;  $P < 0,05$ . Zvýšená hodnota přetrvávala i v den ukončení pokusu. V diabetické kontrolní skupině ani ve skupině léčené guserimem či kombinovanou léčbou k žádným změnám v hodnotách TGFβ nedošlo. Na konci pokusu naopak hodnota TGFβ klesla ve skupině léčené sitagliptinem na hodnotu 41223,9 (4627,5 - 66779,9) pg/ml a tím se tato skupina lišila od diabetické kontrolní skupiny, kde hodnota TGFβ činila 67050,3 (16617,1 - 114930,6) pg/ml;  $P < 0,05$ . Hodnota TGFβ byla nejvyšší ve skupině myši v remisi, kde činila 81172,0 (66779,9 - 132703,9) pg/ml, čímž se výrazně lišila od hodnoty ve skupině myši léčených sitagliptinem, kde byla hodnota nejnižší a činila 36670,2 (4627,5 - 64787,5) pg/ml;  $P < 0,001$ .

### **Profil genové exprese splenocytů**

Relativní intenzita genové exprese pro gen Bcl2 byla nejvyšší u guserimové skupiny, kde činila 1,575 (0,909 - 2,182), zatímco v diabetické kontrolní skupině 0,869 (0,829 - 1,042);  $P < 0,05$  a v nediabetické kontrolní skupině 0,702 (0,554 - 0,961);  $P < 0,01$ . Expese genu pro Ikbkb byla také nejvyšší u guserimové skupiny, kde dosahovala hodnoty 1,809 (0,902 – 3,29), zatímco v diabetické kontrolní skupině 0,800 (0,709 - 1,449);  $P < 0,05$  a v nediabetické kontrolní skupině 0,682 (0,601 - 1,192);  $P < 0,01$ . Expese genu pro Tnf dosáhla v guserimové skupině hodnoty 1,042 (0,599 - 2,730), čímž se lišila od nediabetické kontrolní skupiny, kde činila hodnota 0,533 (0,340 - 0,617);  $P < 0,05$ . U genu kódujícího Nfkb1 byla nejnižší hodnota zaznamenána v sitagliptinem léčené skupině, a to 0,788 (0,548 - 1,479), nejvyšší v guserimem léčené skupině 1,626 (1,120 - 3,047);  $P < 0,01$ . Taktéž u genu pro Il10 byla nejnižší hodnota zaznamenána v sitagliptinem léčené skupině, a to 0,490 (0,195 - 1,638), nejvyšší v guserimem léčené skupině 3,239 (0,445 - 7,447);  $P < 0,05$ .

### **IPGTT**

Vzhledem k vysoké mortalitě myši po IPGTT jsme ve skupině s kombinovanou léčbou od tohoto testu ustoupili. V ostatních diabetických skupinách se hodnoty asimilace glukózy od sebe statisticky vzájemně nelišily, nicméně nejnižších hodnot bylo dosahováno ve skupině myši léčených sitagliptinem. Myši léčené sitagliptinem se také nejvíce odlišovaly v hodnotách glykemií naměřených v průběhu pokusu ve srovnání s hodnotami naměřenými u myši v remisi.

## 5. Diskuse

Nejúčinnějším prostředkem v léčbě DM1 se zdá být léčba mATG, neboť prokázala alespoň částečné metabolické zlepšení již hyperglykemických NOD myši. Žádná z terapií však nevedla k jasnému vyléčení myši s již manifestním diabetem. Bohužel ani kombinovaná léčba nevedla k lepším výsledkům.

K navození remise je potřebné potlačení autoimunity a obnovení tolerance k vlastním autoantigenům. Za udržení periferní tolerance jsou zodpovědné regulační T-lymfocyty. Inhibiční účinek Tregs po jejich aktivaci je dán buď přímým buněčným kontaktem prostřednictvím inhibičních molekul jako je CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) nebo prostřednictvím sekrece IL-10 a TGF $\beta$  (Broere F. et al., 2011). Po terapii mATG došlo k vzestupu populace Tregs. Ve stejné době jsme zaznamenali i vzestup v hodnotách TGF $\beta$ , který je důležitý pro vznik a zachování Tregs. Při porovnání diabetických myši s nediabetickými či s myši, které dosáhly remise, se populace Tregs na konci pokusu nijak zásadně neodlišovaly, ačkoliv u všech diabetických zvířat došlo k menšímu či výraznějšímu nárůstu v jejich populaci. Také Mellanby (Mellanby R.J. et al., 2007) nezaznamenal rozdíl v množství Tregs mezi diabetickými a nediabetickými NOD myši. Z těchto výsledků se zdá, že jediný pozitivní vliv na populaci Tregs mělo podávání mATG. Tento efekt byl ale patrný pouze v době jeho podávání.

Pomocné CD4+ T-lymfocyty hrají hlavní roli ve vzniku a regulaci autoimunitních onemocnění. Ve všech diabetických skupinách došlo k mírnému poklesu CD4+ T-lymfocytů, ale nevýraznější pokles jsme zaznamenali u diabetické kontrolní skupiny. Léčba mATG vedla jako jediná k nárůstu CD4+ T-lymfocytů.

Efektorové CD8+ T-lymfocyty představují hlavní buněčnou komponentu při autoimunitní destrukci beta buněk v pozdější fázi onemocnění. Ve všech diabetických skupinách, kromě skupiny myši, které jsme podávali mATG, jsme na konci pokusu zaznamenali nárůst CD8+ T-lymfocytů. Tento nárůst byl nejvýraznější v diabetické kontrolní skupině. Naopak velmi dramatický pokles CD8+ T-lymfocytů zaznamenaný po podání mATG může ukazovat na kýžený útlum cytotoxické aktivity.

Při podávání gusperimu jsme nezaznamenali žádné změny v počtu CD4+ či CD8+ T-lymfocytů. Z práce Wanga (Wang B.B. et al., 1996) vyplývá, že gusperimus je schopen blokovat diferenciaci T-lymfocytů na počáteční úrovni (jejich prekursorů v thymu), ale nemá žádný měřitelný účinek na pozdní vývojová stádia T-lymfocytů a že plně dozralé periferní T-lymfocyty jsou jeho vlivu ušetřeny. Taktéž podávání sitagliptinu nemělo vliv na množství CD4+ či CD8+ T-lymfocytů. Žádný signifikantní rozdíl jsme nezaznamenali v hodnotách Tregs, CD4+ či CD8+ T-lymfocytů při porovnání diabetických skupin s myši v remisi.

V čem se ale myši v remisi odlišovaly od ostatních diabetických myši, byly hodnoty TGF $\beta$  a DPP-IV. Stěžejní funkcí TGF $\beta$  je udržování tolerance pomocí regulace proliferace, diferenciaci a přežívání efektorových T-lymfocytů, zachování Tregs a dále také ovlivnění chemotaxe (Chen G. et al., 2007). U myši, které dosáhly remise, byly hodnoty TGF $\beta$  nejvyšší a vysoce převyšovaly hodnoty, které jsme naměřili u myši léčených sitagliptinem samotným. Nižší hodnoty TGF $\beta$  měla skupina léčená sitagliptinem i v porovnání s diabetickou kontrolní skupinou. Pozitivní vliv na hodnoty TGF $\beta$  mělo podání mATG. Hodnoty TGF $\beta$  se zdají být nezávislé na množství Tregs a zdají se mít lepší vypovídající hodnotu o nastavení imunitní reakce či o úspěšnosti léčby.

Vedle TGF $\beta$  je IL-10 dalším důležitým cytokinem s protizánětlivými, imunosupresivními a imunomodulačními účinky (Goudy K.S. et al., 2003). I exprese genu pro IL-10 byla u myši léčených sitagliptinem ze všech skupin nejnižší.

Snížená exprese IL-10 i TGF $\beta$  je velmi pravděpodobně dána útlumem nukleárního faktoru kappa B (NF-kB), který jsme při podávání sitagliptinu zaznamenali. Naopak u skupiny léčené gusperimem byla exprese IL-10 signifikantně zvýšena. Což bylo patrně dáno snahou o útlum dlouhotrvající zánětlivé reakce. Aktivace transkripčního faktoru NF-kB je zásadní pro produkci cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a přežití aktivovaných buněk imunitního systému. NF-kB blokuje buněčnou smrt navozením transkripce genů kódujících anti-apoptotické (Bcl2) a antioxidační proteiny (Baldwin A.S., 2012; Lawrence T. et al., 2001). Je to hlavní regulátor vrozené i získané imunity a zánětlivé odpovědi (Vallabhapurapu S., Karin M., 2009). Zvýšená aktivace NF-kB ve skupině léčené gusperimem byla patrná ze zvýšené intenzity exprese IKK- $\beta$  (Ikkb), což vedlo ke zvýšení genové exprese B-cell lymphoma 2 (Bcl2) při porovnání s diabetickou a zejména nediabetickou kontrolní skupinou.

Další známkou zvýšené prozánětlivé aktivity byla ve skupině léčené gusperimem zvýšená exprese tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) oproti nediabetické kontrolní skupině. TNF $\alpha$  je cytokin s širokým spektrem účinků důležitých v rozvoji diabetu. Jedná se o silný mediátor zánětu (O'Garra A. et al., 1997).

Při sledování infiltrace ostrůvku imunitními buňkami jsme v průběhu času pozorovali její pokles, což odpovídalo snižujícímu se množství beta buněk zbývajících v ostrůvcích. Nejvýraznější byl pak pokles u skupiny léčené sitagliptinem a kombinovanou léčbou v porovnání s nediabetickou kontrolou. Při podávání samotného gusperimu nedošlo k poklesu ve stupních infiltrace. Což bylo patrně dáno delším přežíváním aktivovaných T-lymfocytů v infiltrátu při zvýšené expresi antiapoptotického proteinu Bcl2. Proto se gusperimová skupina na konci pokusu nelišila od nediabetické skupiny, kde byl také přítomen ve zvýšené míře 4. stupeň infiltrace, který byl v nediabetické skupině ale spojen s přítomností ještě funkčních beta buněk.

Již v době manifestace diabetu a zařazení myši do pokusu byla u diabetických myši většina beta buněk zničena a bylo téměř nemožné popsat změny v jejich množství.

Nárůst v množství alfa buněk byl nejvýraznější ve skupině léčené sitagliptinem a ve skupině s kombinovanou léčbou. I u lidí byl po roce podávání sitagliptinu zaznamenán nárůst v množství alfa buněk (Butler A.E. et al., 2013). Možným vysvětlením je mechanismus působení sitagliptinu i na alfa buňky, ve kterých tlumí sekreci glukagonu a může tím nejspíš vyvolat kontraregulační reakci v podobě jejich zmnožení. Alfa buňky mohou být přímým zdrojem nových beta buněk jejich transdiferenciací. U dospělých myši byla zaznamenána přeměna alfa buněk v beta buňky při jejich extrémní ztrátě (Thorel F. et al., 2010).

V práci publikované Makdissim se výrazný a trvalý vzestup v koncentraci DPP-IV objevil druhý týden studie, kdy byl pacientům s diabetem mellitem 2. typu podáván sitagliptin. Tento nárůst není dán ztrátou inhibičního účinku sitagliptinu na enzymatickou aktivitu DPP-IV, která zůstává utlumena, ale nárůstem plasmatické koncentrace DPP-IV v podobě proteinu (Makdissi A. et al., 2012). Nicméně při diabetu dochází k vzestupu v aktivitě DPP-IV, jak již bylo popsáno u lidí (Mannucci E. et al., 2005). Stejný nálezn byl publikován také u NOD myši, kdy diabetické myši měly vyšší hodnoty v aktivitě DPP-IV oproti nediabetickým (Kim S.J. et al., 2010). Možným vysvětlením je opět kontraregulační mechanismus, kdy u diabetických

myši byly nalezeny zvýšené hladiny plazmatického GLP-1 v porovnání s nediabetickými (Rydgren T. et al., 2012), což patrně vede k zvýšené aktivitě DPP-IV. Při porovnání s nediabetickou kontrolní skupinou měla nejvyšší hodnoty koncentrace DPP-IV na konci pokusu skupina léčená gusperimem. Může to být dáno právě vyšší prozánětlivou aktivací při podávání gusperimu, neboť aktivované T-lymfocyty vykazují zvýšené hodnoty molekuly CD26 (cluster of differentiation 26), která odpovídá molekule DPP-IV na povrchu T-lymfocytů (Salgado F.J. et al., 2012). Velmi zajímavý je poznatek, že u myši, u nichž bylo dosaženo remise, byly hodnoty DPP-IV oproti ostatním diabetickým skupinám sníženy. Nejvýraznější byl tento rozdíl opět v porovnání se skupinou léčenou gusperimem. U pacientů s DM1 v částečné klinické remisi byly nalezeny signifikantně nižší hodnoty GLP-1 a glukagonu v porovnání s pacienty bez remise (Kaas A. et al., 2012). Což by opět mohlo vysvětlovat změny v aktivitě DPP-IV a naznačovat, že u pacientů s DM1 možná není nárůst hodnot GLP-1 úplně žádoucí.

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

## 6. Závěry

### Ad hypotéza č. 1

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

### Ad hypotéza č. 2

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

### Ad hypotéza č. 3

Zkombinováním léčby jsme nedosáhli lepších výsledků než při podávání vybraných látek samostatně, neboť gusperimus nevedl k potlačení autoimunitního procesu, jak jsme původně očekávali. Gusperimus v našem experimentu nebyl schopen zvrátit již rozběhlou zánětlivou reakci a z výsledků se zdá, že ji spíše udržuje. Sitagliptin sice tlumí prozánětlivou aktivaci, ale vede k zániku beta buněk jejich nadměrným zatížením. Navíc také tlumí navození možné regulační odpovědi poklesem plazmatických hodnot TGFβ.

### Závěr a zhodnocení práce

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



## 7. Použitá literatura

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

Bluestone J.A. et al., 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464(7293):1293-1300.

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

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

Drucker D.J., 2003. Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology* 144(12):5145-5148.

Feng X. et al., 2008. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in vitro. *Blood* 111(7):3675-3683.

Flossmann O., Jayne D.R., 2010. Long-term treatment of relapsing Wegener's granulomatosis with 15-deoxyspergualin. *Rheumatology (Oxford)* 49(3):556-562.

Goudy K.S. et al., 2003. Systemic overexpression of IL-10 induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *Journal of Immunology* 171(5):2270-2278.

Griffin K.J. et al., 2014. Combination therapy with sitagliptin and lansoprazole in patients with recent-onset type 1 diabetes (REPAIR-T1D): 12-month results of a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Diabetes and Endocrinology* 2(9):710-8.

Herold K.C. et al., 2002. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 346(22):1692-1698.

Herold K.C. et al., 2005. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54(6):1763-1769.

Chen G. et al., 2007. Essential roles of TGF-beta in anti-CD3 antibody therapy: reversal of diabetes in nonobese diabetic mice independent of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Leuc Biology* 83(2):280-7

Kaas A. et al., 2012. Proinsulin, GLP-1, and glucagon are associated with partial remission in children and adolescents with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes* 13(1):51-58.

Kim S.J. et al., 2010. Sitagliptin (MK0431) inhibition of dipeptidyl peptidase IV decreases nonobese diabetic mouse CD4<sup>+</sup> T-cell migration through incretin-dependent and -independent pathways. *Diabetes* 59(7):1739-1750.

- Lawrence T. et al., 2001. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nature Medicine* 7(12):1291-7.
- Lehuen A. et al., 2010. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature reviews. Immunology* 10(7):501-513.
- Li Y. et al., 2003. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 278(1):471-478.
- Lorenz H.M. et al., 2011. Treatment of active lupus nephritis with the novel immunosuppressant 15-deoxyspergualin: an open-label dose escalation study. *Arthritis Res Ther* 13(2):R36.
- Ludvigsson J. et al., 2008. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 359(18):1909-1920.
- Makdissi A. et al., 2012. Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *PlosOne* 9(9):3333-41.
- Mannucci E. et al., 2005. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia* 48(6):1168-1172.
- Mellanby R.J. et al., 2007. Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunology* 121(1):15-28.
- O'Garra A. et al., 1997. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 9(6):872-83.
- Ogawa N. et al., 2004. Cure of overt diabetes in NOD mice by transient treatment with anti-lymphocyte serum and exendin-4. *Diabetes* 53(7):1700-1705.
- Pelikánová T. et al., 2012. *Praktická diabetologie. 5. vydání. Maxdorf Jessenius.*
- Pospisilik J.A. et al., 2003. Dipeptidyl peptidase IV inhibition in animal models of diabetes. *Advances in experimental medicine and biology* 524:281-291.
- Rydgren T. et al., 2012. Elevated glucagon-like peptide-1 plasma levels, as a possible adaptive response, in diabetic NOD mice. *Biochemi Biophys Res Commun* 423(3):583-587.
- Salgado F.J. et al., 2012. CD26: a negative selection marker for human Treg cells. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 81(10):843-855.
- Shoda L.K. et al., 2005. A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 23(2):115-126.
- Thorel F. et al., 2010. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464(7292):1149-54.

Vallabhapurapu S., Karin M., 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology* 27:693-733.

Wang B.B. et al., 1996. The immunosuppressant 15-deoxyspergualin [correction of 1,5-deoxyspergualin] reveals commonality between preT and preB cell differentiation, *Journal of Exp. Med.* 183(6):2427-36.

Xu G. et al., 2006. GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes Res Clin Pract* 73(1):107-110.

Zhang J. et al., 2007. Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia* 50(9):1900-1909.

## Seznam publikací

### 1. Publikace, které jsou podkladem disertace

#### a) s impakt faktorem

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

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

### 2. Publikace bez vztahu k tématu disertace

#### a) s impakt faktorem

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

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

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

#### b) bez impakt faktoru

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

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

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