

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Aneta Buchtelová**

Vliv glukózy na imunitní procesy zprostředkované monocyty. Fyziologie a patologie  
s ohledem na diabetes mellitus

Effect of glucose on monocyte-mediated immune processes. Physiology and pathology with  
respect to diabetes

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

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

V Praze, 12.5.2017

Aneta Buchtelová

**Poděkování:**

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky, ochotu a čas vynaložený při vypracování mé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala své rodině za podporu při studiu.

# Abstrakt

Monocyty patří mezi komponenty neadaptivní složky imunitního systému. V průběhu svého životního cyklu se mohou diferencovat na další buněčné typy, a to například makrofágy, dendritické buňky, osteoklasty nebo mikroglie. Jejich aktivita je spojena s řadou signálních mechanismů, nejčastěji s expresí povrchových receptorů Toll-like (TLR) anebo produkcí mediátorů (IL-6 nebo IL-10). Spuštění těchto drah je podmíněno vnějším stimulem, jakým může být i výkyv v hladině krevní glukózy. Monocyty reagují na změnu hladiny glukózy mnoha způsoby, nadprodukcí TLRs, prozánětlivých mediátorů a adhezních molekul, což činí z hypoglykémie i hyperglykémie prozánětlivý stav. Ten zvyšuje riziko vzniku patologií, a to především u jedinců s narušenou schopností regulace glykémie – u diabetiků. Mezi tyto patologie patří hlavně kardiovaskulární choroby (CVD). Buněčné a molekulární mechanismy diskutované v této práci tak umožňují pochopit, proč pacienti s diabetem ohrožuje výrazně vyšší riziko vzniku CVD oproti zdravým nediabetickým jedincům.

## **Klíčová slova:**

monocyty, glukóza, hyperglykémie, hypoglykémie, diabetes, kardiovaskulární onemocnění

# Abstract

Monocytes represent a component of the non-adaptive part of the immune system. During their life cycle, they can differentiate into other cell types, such as macrophages, dendritic cells, osteoclasts or microglia. Their activity is associated with a wide variety of signaling mechanisms, mostly with the expression of cell surface Toll-like receptors (TLR) or production of mediators (IL-6 or IL-10). Activation of these pathways is mediated by an external stimulus, which may be a fluctuation in the blood glucose level. Monocytes respond to changes in glucose levels in many ways, overexpression of TLRs, adhesion molecules and release of proinflammatory mediators among them, which makes both, hyperglycemia and hypoglycemia to be proinflammatory states. It increases the risk of pathologies, especially in subjects with impaired glycemic control – in diabetic patients. These pathologies mainly include cardiovascular diseases (CVD). Thus, cellular and molecular mechanisms described in this thesis contribute to understanding why diabetic patients suffer from a significantly higher CVD risk when compared to healthy non-diabetic subjects.

**Key words:**

monocytes, glucose, hyperglycemia, hypoglycemia, diabetes, cardiovascular diseases

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Imunitní systém a monocyty .....	2
2.1	Klasifikace monocytů .....	2
2.2	Makrofágy a dendritické buňky .....	3
2.3	Toll-like a jiné receptory .....	4
2.4	Mediátory imunitního systému .....	7
2.5	Záněť .....	7
3	Metabolismus glukózy a diabetes mellitus .....	10
3.1	Odbourávání a syntéza glukózy .....	10
3.2	Langerhansovy ostrůvky pankreatu .....	10
3.2.1	Regulace hladiny glukózy v krvi .....	11
3.3	T1D .....	11
3.3.1	Role nespecifické složky imunitního systému při vzniku T1D .....	12
3.3.2	Genetika T1D .....	12
3.3.3	Environmentální faktory T1D .....	13
3.4	T2D .....	14
3.4.1	Genetika T2D .....	14
3.4.2	Environmentální faktory T2D .....	14
3.5	Ostatní typy diabetu .....	15
3.6	Komplikace diabetu .....	15
4	Hyperglykémie .....	16
4.1	Expres adhezních molekul .....	16
4.2	Expres TLRs .....	18
4.3	Hladiny specifických cytokinů a dalších mediátorů .....	20
4.4	Osteoklasty .....	24

4.5	Mikroglie .....	24
5	Hypoglykémie .....	26
5.1	Expres adhezních molekul .....	26
5.2	Hladiny specifických cytokinů a dalších mediátorů .....	28
6	Závěr .....	30
7	Seznam zkratk.....	31
8	Seznam použité literatury .....	34

# 1 Úvod

V lidském těle probíhá mnoho pro život nepostradatelných dějů – ať už jde o dýchání, trávení, srdeční rytmus anebo činnost imunitního systému. Právě imunitní systém, a především jedna jeho složka, monocyty, jsou ústředním motivem této bakalářské práce. Jako u kteréhokoli jiného orgánu či systému v lidském těle je nutné, aby imunitní systém uměl reagovat na změny vnitřní i vnější, a to jak krátkodobé, tak dlouhodobé. Mezi tyto změny může patřit změna vnější i vnitřní teploty, zvýšená fyzická zátěž a v některých případech s ní související nefyziologická hladina glukózy v krvi. Ta může být buď abnormálně vysoká (hyperglykémie) anebo naopak příliš nízká (hypoglykémie). Tyto stavy jsou pro imunitní systém varovným signálem a je třeba jeho relevantní odpověď. Je-li řeč o abnormální hladině glukózy v těle, je důležité také zmínit, čím může být způsobená. Bylo poznamenáno, že může souviset s fyzickou aktivitou, ale také s procesem opačným, kdy tělo energii dostává – tedy s příjmem potravy. Tělo zdravého jedince si s těmito situacemi snadno poradí a glykémie se velmi rychle vrátí do normálu. Pokud jsou ale v těle narušeny procesy udržující normální hladinu glukózy v krvi, jedná se o patologický stav. Diabetes mellitus je jedním z nich.

Diabetes mellitus je souhrnný název pro skupinu onemocnění, jejichž společným jmenovatelem je porucha regulace hladiny glukózy v krvi. Nejdiskutovanější a nejfrekventovanější jsou dva typy: diabetes mellitus prvního typu (T1D) je řazen mezi autoimunitní choroby, diabetes mellitus 2. typu (T2D) je charakterizován jako stav inzulinové rezistence. Přestože dnes existují spolehlivé metody diagnostiky a terapie tohoto onemocnění, čímž se výrazně zvyšuje kvalita života pacientů, ohromující čísla o vzrůstajícím počtu nemocných činí z diabetu předmět mnoha výzkumů, jež se zaměřují především na prevenci, a to jak choroby samotné, tak i souvisejících komplikací. Faktorů podmiňujících vznik diabetu je mnoho, od genetických až po ty environmentální, ovšem některé zřejmě stále zůstávají nepoznané.

Jak ale konkrétně rozdílné hladiny glukózy v krvi ovlivňují procesy a buněčné komponenty imunitního systému, především monocyty, a to jak u zdravých jedinců, tak i u pacientů s diabetem? Právě tato otázka dala vzniknout tématu této bakalářské práce.



## 2 Imunitní systém a monocyty

Monocyty řadíme spolu s neutrofilními, bazofilními a eosinofilními granulocyty mezi složky buněčné nespecifické (též vrozené nebo neadaptivní) imunity. Monocyty vznikají z myeloidního prekursoru v kostní dřeni a mohou se dále diferencovat například v makrofágy, dendritické buňky nebo osteoklasty. Jejich hlavní rolí je rozpoznání patogenu, následně jeho fagocytóza, produkce prozánětlivých cytokinů, prezentace patogenních antigenů ostatním složkám imunitního systému (především T-lymfocytům a B-lymfocytům) a aktivace specifických reakcí imunitní odpovědi.

### 2.1 Klasifikace monocytů

Nově vytvořené monocyty kolují v krevním řečišti. V případě zánětu dochází ke zvýšení produkce monocytů v kostní dřeni, k jejich migraci do místa infekce a diferenciaci na makrofágy (Vanfurth and Cohn 1968), kde mimo jiné plní funkci antigen prezentujících buněk (APC).

Lidské monocyty lze na základě odlišné hladiny exprese povrchových markerů CD14 a CD16 klasifikovat do 3 podskupin na klasické, přechodné a neklasické, viz tabulka č. 1 (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Tabulka 1 - Klasifikace lidských monocytů

Subtyp monocytů	Exprese CD14/CD16 antigenů
Klasické	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>
Přechodné	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>
Neklasické	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>

*Upraveno podle Ziegler-Heitbrock et al. 2010*

Marker CD14 je schopen vázat bakteriální lipopolysacharidy (LPS) (Hailman et al. 1994). CD16 je receptorem pro imunoglobulinový IgG Fc fragment (Clarkson and Ory 1988). Symbolem „<sup>+</sup>“ označujeme ten stav, kdy je exprese 10krát vyšší než u izotypové kontroly, symbolem „<sup>++</sup>“ potom 100krát vyšší expresi markeru oproti kontrole. Klasické monocyty tedy vykazují velmi vysokou míru exprese CD14 molekul a nulovou expresi CD16, oproti tomu monocyty neklasické mají nižší hladinu exprese CD14 a velmi vysokou hladinu exprese CD16 molekul.

Přechodné monocyty exprimují CD14 stejně jako klasické, ale na rozdíl od nich se u nich vyskytuje v nižší míře i exprese CD16 (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Nejvyšší zastoupení v těle mají klasické monocyty – cca 85 %, nejméně naopak přechodné – pouhých 5 %. Tyto tři třídy se dále liší produkcí odlišných druhů cytokinů (např. IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) jako odpovědi na bakteriální LPS (Wong et al. 2012). Klasické monocyty se mohou diferencovat na přechodné a ty pak případně na neklasické. Neklasické monocyty produkují velmi málo protizánětlivého interleukinu (IL-10) a naopak velmi mnoho prozánětlivých mediátorů jako například tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) (Frankenberger et al. 1996) a velmi se tak podobají alveolárním makrofágům (Zieglerheitbrock et al. 1993). Vylučování prozánětlivých markerů je typické nejen pro neklasické monocyty, ale i pro přechodné, proto jsou někdy tyto dvě skupiny označovány jako prozánětlivé či CD16<sup>+</sup> monocyty. Typická pro ně je již zmíněná nízká produkce protizánětlivého IL-10 a naopak vyšší produkce prozánětlivých TNF- $\alpha$  a IL-12 (Frankenberger et al. 1996).

## 2.2 Makrofágy a dendritické buňky

Makrofágy jsou deriváty monocytů a patří mezi tkáňově-rezidentní fagocytické buňky. Nalezneme je například v centrální nervové soustavě (mikroglie, meningeální makrofágy, makrofágy plexus choroideus), v játrech (Kupfferovy buňky) či slezině. Jejich hlavní funkcí je fagocytovat cizorodé částice, ať už patogenní či nepatogenní. Rozpoznání těchto částic probíhá pomocí škály různých receptorů, které tyto buňky exprimují na svém povrchu a mohou díky nim rozeznávat ligandy pocházející od patogenu. Citlivost rozpoznávací reakce je dána především díky Toll-like receptorům (TLRs) na plazmatické membráně či na cytosolickém vakuolárním kompartmentu. Rozpoznání v cytoplazmě však může být zprostředkováno také pomocí NOD-like receptorů (z anglického nucleotide oligomerization domain-like receptors, NLR) nebo receptorů rodiny RLR (z anglického RIG-I-helicase receptors). Makrofágy mohou mít jak prozánětlivé, tak i protizánětlivé účinky a účastní se tak průběhu celé zánětlivé reakce včetně jejího ukončení. Jsou také zprostředkovateli komunikace mezi nespecifickou a specifickou složkou imunitního systému.

Dendritické buňky (DCs), další možné deriváty monocytů, zajišťují prezentaci antigenu T-lymfocytům v lymfatických tkáních. Lze je rozdělit to tři podtypů – plasmacytoidní, které se nacházejí v nezralém stavu v krevním řečišti a teprve kontakt s antigenem se stává signálem

k jejich maturaci, a 2 podtypy myeloidních DCs. Plasmacytoidní buňky vykazují velkou produkci interferonu typu I v místě zánětu (Cella et al. 1999) a jejich odlišnost byla určena na základě exprese markeru CD303. Myeloidní DCs mají společný původ z progenitorové buňky myeloidní linie a přímo souvisí s monocyty. Podtypy myeloidních DCs rozlišujeme na základě produkce 2 markerů - CD1c<sup>+</sup> DCs, u kterých můžeme nalézt expresi specifických druhů prozánětlivých chemokinů (Penna et al. 2002), a CD141<sup>+</sup> DCs, které patří mezi hlavní producenty interferonu  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

## 2.3 Toll-like a jiné receptory

Receptory pro rozpoznávání patogenních částic (PRRs) patří mezi důležitou komponentu imunitního systému. Nejvýznamnější z nich jsou u nespecifické složky imunitního systému Toll-like receptory, pojmenované podle Toll receptorů *Drosophily*, kde navíc hrají roli v určování dorzoventrální polarity embrya (Hashimoto et al. 1988). Umožňují rozpoznání nejrůznějších exogenních i endogenních molekul na povrchu patogenů (Roach et al. 2005), tzv. PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) a následné spuštění specifických imunitních odpovědí. TLRs jsou transmembránové proteiny mající extracelulární N-konec bohatý na aminokyselinu leucin (LRR) a C-konec orientovaný do cytoplazmy obsahující Toll-IL1-receptorovou (TIR) doménu (Medzhitov et al. 1997). Na svém povrchu jsou schopny vázat nejrůznější typy molekul, například bakteriální lipopolysacharidy, peptidoglykan či lipoproteiny, dále obalové proteiny virů nebo GPI kotvy na membránách některých prvoků (shrnuto v Uematsu a Akira 2006). Rodina TLRs má v současné době 13 savčích členů. Rozlišují se podle toho, jaké váží molekuly a jak na takový stimul reagují. Rozdělení podle schopnosti vázat určité patogenní struktury jednotlivých TLRs ukazuje tabulka č. 2 (Uematsu and Akira 2006).

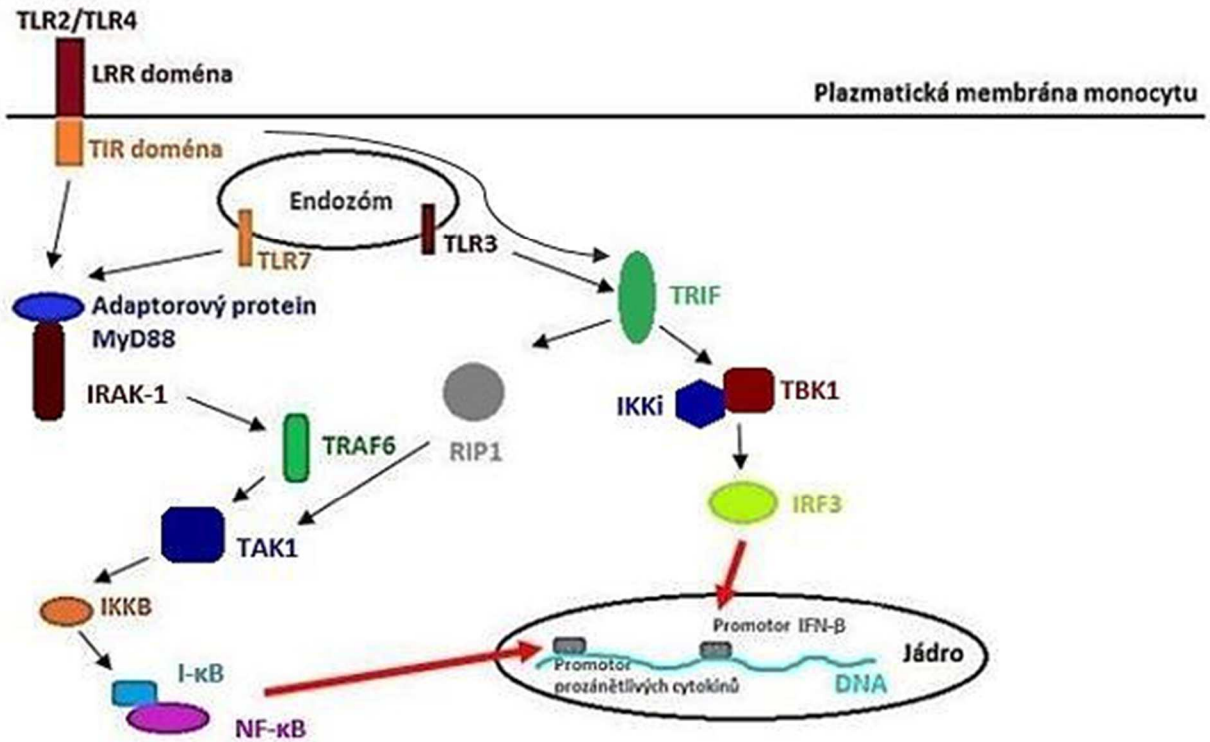
Tabulka 2 – Rozdělení členů savčích TLRs

TLRs	Typ ligandu
TLR1	Bakteriální triacyl lipopeptidy
TLR2	Peptidoglykany, atypické lipopolysacharidy bakterií, zymosan hub, obalové proteiny virů
TLR3	Virová dsRNA
TLR4	Bakteriální lipopolysacharidy
TLR5	Bakteriální flagellin
TLR6	Bakteriální diacyl lipopeptidy
TLR7/TLR8	Virová ssRNA
TLR9	CpG DNA, hemozoin prvoků
TLR11	Komponenty uropatogenních bakterií, profilin-like molekula prvoků
TLR12	Profilin-like molekula prvoků (Koblansky et al. 2013)
TLR13	Ligand neznámý (obrana proti virům způsobujícím vezikulární stomatitidu) (Shi et al. 2011)

*Upraveno podle Uematsu and Akira 2006, Koblansky et al. 2013, Shi et al. 2011*

TLRs nalezneme jak na plazmatické membráně monocytů, tak i na membránách jejich endozómů. Důležitou komponentou TLRs je již zmiňovaná cytosolická TIR doména, která po vazbě mikrobiálního antigenu spouští dimerizaci receptorů a homotypickou asociaci TIR domény s adaptorovým proteinem MyD88. MyD88 dále aktivuje receptorovou kinázu IL-1 (IRAK-1), která následně fosforyluje protein TRAF6. TRAF6 označuje ubiquitinem TAK1 kinázu, která poté fosforyluje IKK- $\beta$  kinázu, čímž dojde k fosforylaci I- $\kappa$ B. I- $\kappa$ B je inhibitorem nukleárního faktoru NF- $\kappa$ B a fosforylace způsobuje jeho degradaci, takže NF- $\kappa$ B může volně vstupovat do jádra a spouštět transkripci prozánětlivých cytokinů. Tato dráha je shodná pro všechny třídy TLRs kromě TLR3, kde je adaptorovým proteinem TRIF. Ten aktivuje TBK1 a IKKi kinázy fosforylující IRF3 faktor, který tak může prostoupit do jádra a spouštět transkripci IFN- $\beta$ . TRIF ale může také aktivovat protein RIP1 a ten následně TAK1 kinázu. Tím dojde

k propojení obou drah a spuštění NF- $\kappa$ B signalizace. Schéma této signalizace je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1 – Schéma signalizace přes TLRs. Zpracováno podle Uematsu and Akira 2006

Dalšími PRRs buněk imunitního systému jsou NOD-like receptory. Na rozdíl od TLRs se nacházejí pouze v intracelulárním prostředí, kde rozpoznávají peptidoglykan a jemu podobné mikrobiální molekuly. Skládají se z několika domén – NOD domény, která je konzervovaná pro všechny typy NLRs, LRRs domény a CARD domény. Nejvýznamnějšími typy jsou NOD1 a NOD2, přičemž oba dva vedou ke spuštění NF- $\kappa$ B a MAP kinázové dráhy a následné produkci prozánětlivých cytokinů. Další možnou odpovědí přes NLRs může být tvorba tzv. inflamazómu, cytoplazmatického proteinového komplexu, kde hraje důležitou roli především aktivace kaspázy 1. Kaspáza 1 následně štěpí různé prekurzory prozánětlivých interleukinů (např. pro-IL-1 $\beta$  na IL-1 $\beta$ ). Tyto receptory účastní se tvorby inflamazómu pak také navíc obsahují ještě pyrinovou doménu.

## 2.4 Mediátory imunitního systému

Mezi hlavní mediátory imunitního systému patří cytokiny. Obecně se jedná o důležité signální peptidy, které zprostředkovávají imunitní buněčnou odpověď. K jejich klasifikaci lze použít několik kritérií, pro potřeby této bakalářské práce je ale důležité rozdělení na prozánětlivé a protizánětlivé. Mezi prozánětlivé řadíme některé interleukiny (např. IL-1, IL-6, IL-12), TNF- $\alpha$  (Wang et al. 2015) a IFN- $\gamma$ , k protizánětlivým pak patří IL-4, IL-10 a transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Elenkov and Chrousos 2002).

Signalizační mechanismus cytokinů začíná vazbou na příslušný cytokinový receptor sestávající obvykle ze dvou až tří podjednotek. Jedna z podjednotek zajišťuje vazbu specifického cytokinu, ostatní jsou zodpovědné za přenos signálu dále do buňky. Cytokinové receptory fungují jako tyrosinkinázové receptory a aktivují kinázy rodiny JAK či transkripční faktor třídy STAT. Signalizace tak může být snadno regulována pomocí fosfatáz, příkladem může být tyrosin fosfatáza hematopoetické buňky (Ihle 1995).

Rozpustným mediátorem buněk imunitního systému je i oxid dusnatý (NO). Zmiňuji ho zde především v souvislosti s T1D, protože právě NO spolu s dalšími mediátory imunitního systému (IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ ) způsobuje destrukci  $\beta$  buněk pankreatu produkujících inzulín s následnou manifestací inzulín-dependentního typu diabetu (Hirasawa et al. 1997). Dalším mediátorem především makrofágů jsou reaktivní formy kyslíku (ROS) a to hlavně superoxidový radikál. Tvoří se v průběhu oxidativního vzplanutí makrofágů po pohlcení nějaké patogenní částice a má za úkol zahubení patogenu (Brehm et al. 1996). Vzniká díky aktivitě enzymu NADPH-oxidázy, která katalyzuje přenos elektronu na kyslík za vzniku O<sub>2</sub><sup>-</sup>. ROS působí na nejrůznější buněčné struktury od membránových lipidů, přes proteiny a enzymy až k nukleovým kyselinám. Způsobují jejich strukturní změny, především oxidaci a glykaci, vedoucí k poškození molekul a buněk jako takových. Tyto změny pak v konečném důsledku vyústí v destrukci a zánik buněk.

## 2.5 Zánět

Zánět je systémová odpověď organismu na škodlivý stimul z okolí, může se jednat o napadení patogenem či poškození tkáně, které může souviset i s nefyziologickými hladinami glukózy v krvi. Těmto souvislostem však bude věnována pozornost později. Cílem

zánětu je především ochrana poškozené tkáně proti možné infekci a snaha o zachování integrity organismu. Obecně lze zánět charakterizovat čtyřmi typickými symptomy – zčervenání, otok, teplota, bolestivost.

Pro zánětlivou odpověď je typický nárůst počtu leukocytů, jejich zvýšená adheze na cévní endotel a vstup do místa zánětu (diapedéza). S tím souvisí i zvýšená exprese adhezních molekul, L-selektinu na leukocytech a trombocytech a P-selektinu a E-selektinu na endoteliálních buňkách. Leukocyt je v cévách nejprve zpomalen pomocí selektinů (rolování) a následně dochází k vazbě leukocytu na endotel. „Lákání“ neutrofilních granulocytů a ostatních leukocytů do místa zánětu je zprostředkováno pomocí prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , které jsou produkovány makrofágy po pohlcení antigenu. Dalšími molekulami exprimovanými endoteliálními buňkami jsou cévní buněčná adhezní molekula-1 (VCAM-1), endoteliální leukocytární adhezní molekula-1 (ELAM-1) a intracelulární adhezní molekula-1 (ICAM-1). ICAM-1 slouží jako ligand pro leukocytární integriny, mezi něž patří CD11b, CD62L (Cottam et al. 2002) nebo CD66b (de Vries et al. 2015). V této fázi se uplatňují i další leukocytární povrchové molekuly, mezi nimi CD14 nebo CD16 (Horvath et al. 2015). Endoteliální buňky ovšem neprodukují pouze adhezní molekuly, produkují také chemoatraktanty přitahující rolující monocyty. K nim patří monocytární chemoatraktantní protein-1 (MCP-1) a IL-8 (Gerszten et al. 1999). Exprese E-selektinu je podmíněna hlavně působením prozánětlivých mediátorů, především IL-1 a TNF- $\alpha$ , inhibována může být účinkem TGF- $\beta$ .

Po prostupu cévní stěnou dochází k degranulaci granulocytů a diferenciaci monocytů na makrofágy, které dále prezentují antigeny T-lymfocytům a podílejí se na vyčištění místa zánětu fagocytózou. T-lymfocyty, které dostanou stimul od makrofágů, začínají produkovat další cytokiny, zejména IFN- $\gamma$ , pod jehož vlivem dochází k plné aktivaci makrofágů. T-lymfocyty mohou také dále stimulovat B-lymfocyty k produkci protilátek proti cizorodému patogenu. Během zánětlivé reakce dochází k produkci proteinů akutní fáze, které se za normálního stavu v séru nevyskytují nebo se vyskytují ve výrazně menší míře. Nejznámější z nich, který se také využívá v diagnostice zánětlivých onemocnění, jakým je například i diabetes je C-reaktivní protein (CRP). Objevený byl v roce 1930 a název získal díky své interakci s pneumokokálním C-polysacharidem (Tillett and Francis 1930).

Mezi signální mechanismy zánětlivé reakce patří především aktivace protein kinázy C (PKC), mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) a aktivace NF- $\kappa$ B a s tím související zvýšení hladiny transkripce prozánětlivých cytokinů. Dalším markerem zánětu může být vyšší produkce ROS, především  $O_2^{\cdot-}$ , jako snaha o zničení patogenního mikroorganismu. ROS jsou produkovány zejména aktivovanými makrofágy a neutrofilními granulocyty, tedy profesionálními fagocyty, které se tímto podílejí na aktivní obraně organismu. Důležitou roli ale také hrají během ukončení zánětu, kdy je potřeba tkáň vyčistit a případně zahájit její remodelaci.

Během ukončování zánětlivé odpovědi tedy dochází k čištění místa zánětu fagocyty – fagocytóze apoptotických buněk, dále k přesměrování drah syntézy prozánětlivých mediátorů, přesměrování drah syntézy prozánětlivých cytokinů na protizánětlivé a celková regenerace poškozené tkáně, například angiogeneze.

Na tomto místě je důležité zmínit i aterosklerózu, zánětlivé onemocnění patřící mezi nemoci kardiovaskulárního systému (CVD). Jedním z rizikových faktorů jejího vzniku je totiž diabetes (Kannel and McGee 1979), jehož vliv na propuknutí CVD bude ještě vysvětlen. Podstatné je, že ateroskleróza vzniká postupně. Stimulem může být například poškození cévního endotelu, jež vyvolá lokální zánětlivou odpověď a do místa zánětu jsou rekrutovány imunitní buňky – monocyty. Dochází k jejich adhezi na endotelové buňky díky adhezním molekulám. Po průniku endotelem diferencují v makrofágy, které se pohlcováním lipidových částic mění na pěnové buňky, zároveň produkují další prozánětlivé mediátory rekrutující do místa další buňky imunitního systému a také trombocyty (Funk et al. 1993). Akumulací buněk a lipidových částic dochází k tvorbě aterosklerotických plaků ve stěně cévy a jejímu zúžení, které v krajních případech může vyústit až v úplné ucpání dané cévy.



## 3 Metabolismus glukózy a diabetes mellitus

Glukóza je patrně jedním z nejnámějších a také nejdůležitějších monosacharidů jak v živočišné, tak v rostlinné říši. Představuje palivo pro organismus a je potřeba pro správné fungování tělních buněk – a to i pro buňky imunitního systému. Zároveň může být důležitá i jako signální molekula a poukazovat na změny či defekty metabolismu daného organismu či buněčného typu. Například pro lidský mozek je nejvýznamnější energetickým zdrojem a poruchy metabolismu glukózy v mozku vedou k fatálním dysfunkcím nervového systému, jakou je například Alzheimerova choroba (Mosconi et al. 2008). Poruchou regulačních procesů hladiny glukózy v krvi je pak typická další závažná choroba – diabetes mellitus.

Diabetes mellitus je název pro skupinu onemocnění, která se vyznačují především zvýšením krevního cukru a následnou glykosurií. To může být zapříčiněno celkovou absencí hormonu inzulínu produkovaného  $\beta$ -buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní a jedná se o autoimunitní onemocnění, nebo může být způsobeno sníženou citlivostí tělních buněk na tento hormon v případě neautoimunitního typu cukrovky.

### 3.1 Odbourávání a syntéza glukózy

Zásoby glukózy jsou v lidském těle uloženy ve formě glykogenu, který vzniká glykogenezí a to především ve svalech a v játrech. Při nedostatku glukózy v krvi (například při zvýšené námaze) se v játrech aktivuje glykogenolýza neboli rozklad glykogenu na molekuly glukózy a ty jsou pak uvolňovány do krve. Ve svalů při zvýšené námaze také dochází k nastartování glykogenolýzy, ale i ke spuštění glykolýzy, což vede k tvorbě pyruvátu a následně molekul ATP, které sval pro práci potřebuje.

### 3.2 Langerhansovy ostrůvky pankreatu

Slinivka břišní hraje důležitou úlohu nejen v regulaci hladiny glykémie, ale podílí se také na celkové homeostáze těla a trávení. Její funkce jsou jak endokrinní, tak i exokrinní. Exokrinní část produkuje pankreatickou šťávu obsahující důležité trávicí enzymy, jako jsou například lipázy, proteázy a amylázy, kdežto endokrinní část tvořená právě buňkami Langerhansových ostrůvků produkuje hormony inzulín ( $\beta$ -buňky), glukagon ( $\alpha$ -buňky), somatostatin ( $\delta$ -buňky)

a pankreatický polypeptid (F buňky). Ostrůvků nalezneme u zdravého dospělého člověka zhruba 1 milion a dohromady obsahují asi 3000 endokrinních buněk.

### 3.2.1 Regulace hladiny glukózy v krvi

Udržování konstantní glykémie je úloha dvou pankreatických enzymů - inzulínu a glukagonu. Po jídle se glykémie začíná zvyšovat a v pankreatických  $\beta$ -buňkách dochází k uvolňování inzulínu do krve. Ten v játrech spouští glykolýzu a glykogenezi a naopak potlačuje glukoneogenezi, čímž zajišťuje snížení hladiny plazmatické glukózy. Na molekulární úrovni jde o to, že se po navázání inzulínu na příslušný buněčný receptor spustí exprese genů pro glukózové transportéry, aby mohla glukóza vstupovat do buněk. Takovéto typy transportérů se mimo jiné nachází i na buňkách imunitního systému – konkrétně na monocytech se jedná o transportéry GLUT1, GLUT3 a GLUT4 (Dimitriadis et al. 2005). Naproti tomu glukagon je uvolňovaný z  $\alpha$ -buněk pankreatu při nízké glykémii, nebo po stimulaci bílkovinami z potravy, a jeho účinky jsou především aktivace glykogenolýzy v játrech a glukoneogeneze z aminokyselin, laktátu a glycerolu.

## 3.3 T1D

Diabetes mellitus prvního typu je autoimunitní onemocnění způsobené selektivní destrukcí  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu imunitním systémem. Vliv na vznik onemocnění mají jak genetické, tak environmentální faktory, a u jednotlivých pacientů je těžké určit přesnou kombinaci faktorů, které u něj vedly k propuknutí choroby. Autoimunitní reakce vede v konečném důsledku k totálnímu zničení všech inzulín produkujících buněk autoreaktivními T-lymfocyty.

K terapii je využívána substituční léčba pomocí inzulínu. Ten je podáván injekčně pod kůži pacienta buď pomocí inzulínového pera, nebo poloautomaticky pomocí inzulínové pumpy (někdy označované za umělou slinivku). Pro eliminaci všech případných komplikací je ovšem zapotřebí, aby pacient dodržoval i vhodnou životosprávu v podobě správné diety a fyzické aktivity, po které je třeba vždy doplnit sacharidy nebo snížit dávku inzulínu. Zároveň je také důležité sledovat glykémii pomocí glukometru. Další možnou léčbou je samozřejmě i transplantace pankreatu, u které je však třeba počítat s následnou nutností aplikace imunosupresiv, což je značná nevýhoda. Nynější výzkumy se zabývají především možnostmi

přeprogramování určitých buněčných linií, jako například pankreatické exokrinní buňky AR42J, na inzulín-produkující buňky (Koblas et al. 2016). Výhodou takovéto léčby je fakt, že využívaná tkáň by byla pacientova vlastní, odpadly by tedy problémy s imunosupresivní léčbou.

### 3.3.1 Role nespecifické složky imunitního systému při vzniku T1D

Kromě autoreaktivních T-lymfocytů se na destrukci  $\beta$ -buněk pankreatu podílí i některé buňky nespecifické složky imunitního systému. Na myším modelu (NOD myši) bylo prokázáno, že aktivované T-lymfocyty mohou díky produkci IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  aktivovat makrofágy a lákat je do místa zánětu – tedy do pankreatu. Tyto aktivované makrofágy pak produkují prozánětlivé cytokiny, hlavně TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , chemokiny CCL3, CCL4, CCL6 a také NO. Na jejich povrchu pak byla patrná také zvýšená exprese chemokinových receptorů (Cantor and Haskins 2007). Hlavně produkce NO je z hlediska vývoje onemocnění podstatná, protože přispívá k zániku  $\beta$ -buněk. Zároveň je NO také produkován samotnými  $\beta$ -buňkami pod vlivem IL-1 $\beta$ , což má za následek sníženou inzulínovou sekreci a následnou smrt těchto buněk (Corbett et al. 1992).

### 3.3.2 Genetika T1D

Genetická predispozice pro vznik autoimunitní reakce vedoucí k rozvoji T1D je dána kombinací alel hlavního histokompatibilního komplexu (u člověka Human Leukocyte Antigen – HLA) II. třídy, ale vliv mají i non-HLA geny. Celkový odhadovaný počet genů asociovaných s T1D v současné době převyšuje 400, Jin et al. (2014) jich našli 454, z toho 112 velmi rizikových (Jin et al. 2014). Riziko vzniku diabetu u sourozence diabetického probanda je mnohem vyšší oproti probandu bez výskytu T1D v rodině (cca 6 % oproti 0,4 %) (Tillil and Kobberling 1987).

HLA molekuly II. třídy se nacházejí na buněčném povrchu antigen prezentujících buněk a prezentují antigeny CD4<sup>+</sup> T-lymfocytům. Tolerance T-lymfocytů k antigenům vlastního těla (autoantigenům) je dána selekcí autoreaktivních lymfocytů během jejich raného vývoje v thymu (brzlíku). Geny pro HLA se nacházejí na krátkém raménku 6. chromozómu v oblasti 6p21 a obsahují oblasti kódující různé alelické formy, přičemž pro vznik diabetu jsou klíčové především DR, DQ a DP. Produkty těchto genů tvoří heterodimery, každý heterodimer je tvořen  $\alpha$  a  $\beta$  glykopeptidovými řetězci ukotvenými v plazmatické membráně (Salamon et al.

1999). DR i DQ alely se mohou vyskytovat jak ve formě, která je riziková pro vznik diabetes mellitus 1. typu, tak ve formě s dominantně protektivním účinkem. Nejrizikovějším haplotypem je DRB1\*0405-DQA1\*0301-DQB1\*0302, přičemž kritický je především haplotyp alely DQB1\*0302 (Erlich et al. 2008). Vliv na protektivitu či náchylnost k onemocnění má také interakce dvou alel, a to DRB1 a DQB1. Mezi protektivní haplotypy pak patří DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303 či DRB1\*1401-DQA1\*0101-DQB1\*0503 (Erlich et al. 2008).

Mezi non-HLA geny podmiňující vznik diabetu se řadí také gen pro  $\alpha$  řetězec receptoru interleukinu-2 (IL-2R $\alpha$ , též CD25), jehož transkripčním faktorem je FOXP3. Receptor IL-2 je významný v buněčné signalizaci během vývoje a diferenciaci raných thymocytů (Willerford et al. 1995). Vyskytuje se na povrchu regulačních T-lymfocytů (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). CD25 váže molekuly IL-2, které jsou růstovými faktory T-lymfocytů a tím inhibují jejich aktivaci. V souvislosti se zvýšeným rizikem vzniku onemocnění byly zkoumány především dva jednonukleotidové polymorfismy (SNP) v genu pro IL-2R $\alpha$ , a to rs706778 a rs3118470 (Qu et al. 2007). Spojitost se vznikem diabetu má také gen *CTLA-4* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymfocytů, hrající opět roli v negativní regulaci T-lymfocytů (Momin et al. 2009).

Dalším non-HLA genem, jehož některé varianty byly vyhodnoceny jako rizikové pro vznik T1D, je gen *INS* kódující inzulín. V promotorové oblasti tohoto genu se nachází variabilní množství tandemových nukleotidových repetitiv (VNTR). Produkce inzulínu v medulárních epiteliálních buňkách a dendritických buňkách thymu je pod vlivem transkripčního faktoru AIRE a je důležitá pro selekci autoreaktivních lymfocytů. V dřevěné oblasti thymu tedy dochází k negativní selekci těch lymfocytů, které by na inzulín reagovaly. Délka VNTR oblasti v promotoru daná počtem opakování motivu pak ovlivňuje hladinu exprese inzulínu, přičemž jedinci s kratšími formami alel jsou více náchylní ke vzniku T1D, naopak jedinci s delšími VNTR produkují větší množství transkriptu a jsou více rezistentní k chorobě (Pugliese et al. 1997).

### 3.3.3 Environmentální faktory T1D

K nastartování autoimunitní reakce může dojít po prodělání některých onemocnění, například virových infekcí. Viry spojované se vznikem diabetu jsou například viry příušnic (Khakpour and Nikakhtar 1975), zarděnek (Forrest et al. 1971), cytomegaloviry (Pak et al.

1988) nebo virus Epstein-Barrové (Chikazawa et al. 1985). Faktorem prostředí může být i příjem proteinu kravského mléka (CMP) během dětství. Příjem CMP má pozitivní vliv na nastartování T1D, ale riziko je výrazně vyšší u jedinců s rizikovým haplotypem HLA-DR (Lamb et al. 2015). Zajímavostí také je, že CMP může zvyšovat expresi HLA-DR v epitelálních buňkách střevní sliznice a to zejména v průběhu střevní infekce, čímž zřejmě napomáhá ke spuštění buněčné imunitní odpovědi (Chung et al. 2003).

### 3.4 T2D

Diabetes mellitus druhého typu lze charakterizovat jako poruchu metabolismu sacharidů způsobenou zvýšeným množstvím hladiny inzulínu v krvi a následně vzniku inzulínové rezistence (Nolan et al. 2011). Jedná se o onemocnění s průměrným věkem manifestace nad 40 let, nejvíc riziková je skupina 55+ let (prevalence 16,39%). Ohroženější jsou zároveň jedinci ženského pohlaví a také osoby se zvýšeným body mass indexem (nad 25 kg/m<sup>2</sup>) (Liu et al. 2016). V dnešní době jím však trpí i mnoho mladých lidí. Vzrůstající incidence bývá často přičítána špatným stravovacím návykům (především nadměrné konzumaci sladkých potravin a nápojů) a nedostatku pohybu (Helmrich et al. 1991). To dokazuje i studie zabývající se pozitivním vlivem nízkokalorické diety u pacientů s diagnostikovaným T2D na produkci inzulínu (Lim et al. 2011).

#### 3.4.1 Genetika T2D

Ve více než 90 % případů se jedná o polygenně děděnou chorobu, v menší míře může být děděna i monogenně, jako je tomu například u takzvaných MODY (maturity onset diabetes of the young) typů (Tattersall and Fajans 1975). Výzkum v oblasti genetiky T2D odhalil kandidátní geny pro vznik tohoto onemocnění. Do roku 2006 byly známy pouze 3 takovéto geny, a to *PPAR $\gamma$*  (Altshuler et al. 2000), *KCNJ11/ABCC8* (Gloyn et al. 2003) a *TCF7L2* (Grant et al. 2006) (shrnutí v Kato 2013). V roce 2013 jich bylo již přibližně 70, mezi nimi geny *FTO* nebo *CDKAL1* (Kato 2013).

#### 3.4.2 Environmentální faktory T2D

Jak již bylo zmíněno, T2D se velmi často vyskytuje společně s obezitou či zvýšeným tělesným tukem. Mezi hlavní environmentální rizikové faktory řadíme především nezdravé stravování bohaté na tuky a sacharidy a sedavý způsob života. T2D se často vyskytuje u pacientů

s tzv. metabolickým syndromem zahrnujícím dysfunkci regulace glukózy či přímo inzulinovou rezistenci, zvýšený krevní tlak, zvýšení triglyceridů v krevní plazmě, obezitu a mikroalbuminurii (Alberti et al. 1998).

### 3.5 Ostatní typy diabetu

Kromě základních dvou typů se vyskytují méně často i další formy diabetu. Například gestační diabetes, který je definován jako karbohydrátová intolerance vedoucí k hyperglykémii s nástupem či první manifestací během těhotenství (Alberti et al. 1998). Další méně častý typ vyznačující se zejména pomalým nástupem a vyskytující se u dospělých jedinců je latentní autoimunitní diabetes dospělých (LADA), často řazen k T1D především kvůli autoimunitní reakci vedoucí ke spuštění onemocnění a také pro přítomnost stejných rizikových alel HLA, například DQB1\*0302 (Cervin et al. 2008).

### 3.6 Komplikace diabetu

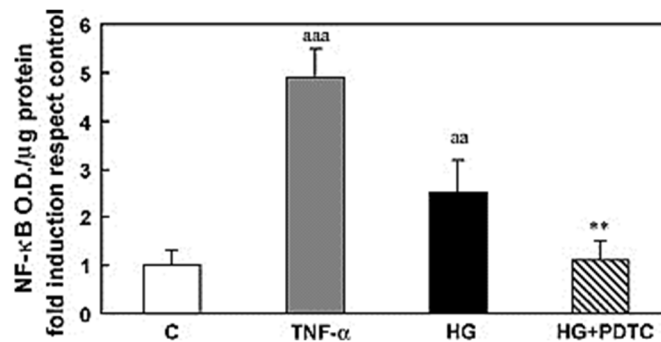
Mezi nejčastější akutní komplikace spojené s diabetem patří hypoglykémie a hyperglykémie. U neléčených diabetiků vznikají poruchou regulačních mechanismů glykémie, u léčených pacientů pak většinou neodhadnutím správné dávky inzulínu vzhledem k příjmu sacharidů a pohybu. Tyto akutní komplikace jsou příčinou mnohem závažnějších problémů, například kardiovaskulárních onemocnění (Kannel and McGee 1979), chronických onemocnění ledvin nebo diabetické retinopatie (Parving et al. 1988). Normoglykémie, nebo též euglykémie, se pohybuje u zdravého člověka kolem 5 mmol/l. Hranice mezi euglykemií a hypo- nebo hyperglykemií se zdroj od zdroje liší, nejčastěji je za hypoglykémii považována glykémie pod 4 mmol/l. Za hyperglykémii se většinou označuje stav, kdy je glykémie vyšší než 10 mmol/l.

## 4 Hyperglykémie

Mezi projevy počínajícího neléčeného diabetu, ať T1D nebo T2D, patří hyperglykémie. U T1D je tento jev způsoben snižující se produkcí inzulínu v důsledku poklesu počtu buněk jej produkujících, u T2D je příčina v poruše těchto buněk způsobené naopak jejich předchozí nadměrnou produkcí inzulínu v důsledku počínající inzulínové rezistence. U léčených diabetiků k ní dochází při špatně zvolené léčbě a nedodržování základních pravidel a vede k různým patofyziologickým stavům, jak již bylo zmíněno v kapitole o diabetu. Během hyperglykémie je organismus vystaven abnormálnímu množství glukózy a začne na tento stav reagovat. Jednou z těchto reakcí může být i nastartování imunitní odpovědi a stimulace buněk imunitního systému. Aktivace monocytů pak dále vede ke spuštění specifických signalizačních drah a specifické odpovědi jak na molekulární, tak na buněčné úrovni.

### 4.1 Expese adhezních molekul

Řada studií se zabývala vlivem hyperglykémie na úroveň exprese leukocytárních i endoteliálních adhezních molekul. Například Altannavch et al. (2004) prokázali *in vitro* vyšší spontánní expresi ELAM-1, ICAM-1 a VCAM-1 skrz aktivaci PKC v lidských endoteliálních buňkách získaných z pupečnickové žíly (HUVEC) během krátkodobé hyperglykémie (v řádu hodin). Výrazně vyšších hodnot v počtu buněk produkujících adhezní molekuly bylo dosaženo, když byly buňky zároveň stimulovány TNF- $\alpha$ , čímž byl simulován zánětlivý stav (Altannavch et al. 2004). Stejných výsledků ohledně vyšší exprese VCAM-1 během krátce trvající hyperglykémie dosáhli i Piga et al. (2007) spolu s 3krát vyšší expresí MCP-1, pracovali s lidskými endoteliálními buňkami aorty (HAECs). Zároveň došlo ke zvýšení produkce ROS vedoucí k aktivaci NF- $\kappa$ B a expresi VCAM-1 a MCP-1. Po přidání PDTC, inhibitoru NF- $\kappa$ B, nebyla zaznamenána žádná přítomnost mRNA pro VCAM-1 ani pro MCP-1. Na obrázku 2 je znázorněna míra vazebné aktivity NF- $\kappa$ B, která byla u HAECs během hyperglykémie trvající 12 hodin zhruba 2,5krát vyšší než u kontrolních buněk (Piga et al. 2007).



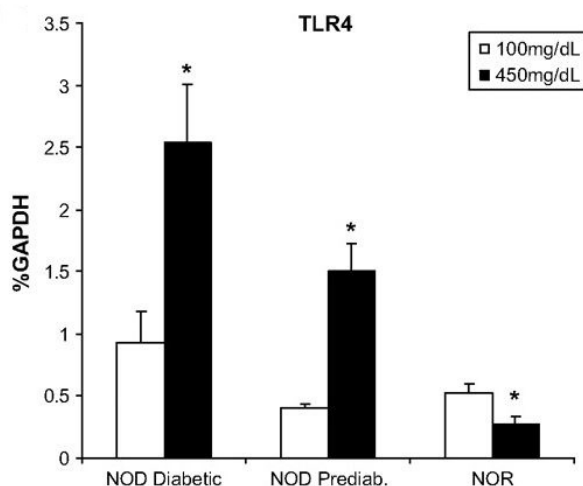
Obrázek 2 – Vliv hyperglykémie (černý sloupec) na aktivaci NF-κB. Převzato z Piga et al. 2007

Všechny výše zmíněné mechanismy byly studovány s ohledem na zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, které se ukázalo být výrazně vyšší u pacientů s diagnostikovaným diabetem; u mužů riziko vzrostlo přibližně dvojnásobně a u diabetických žen až trojnásobně oproti nediabetickým kontrolám (Kannel and McGee 1979). Většina studií se zabývá korelací mezi vznikem CVD a diagnostikovaným T2D. Dalším faktorem, který může hrát roli v aktivaci leukocytů a následném vzniku CVD, je kombinovaná familiární hyperlipidémie (FCH), často v koincidenci s T2D (Veerkamp et al. 2005). U pacientů s T2D byl během hyperglykémie výrazně vyšší počet monocytárních adhezních molekul CD11b a neutrofilních CD66b, u pacientů s FCH byl počet menší, ovšem nikoli ve srovnání se zdravými kontrolami, oproti kterým byl stále výrazně vyšší (de Vries et al. 2015). Dalšími povrchovými markery, jejichž zvýšený počet lze u T2D pacientů zaznamenat i během euglykémie, jsou podle Fogelstrand et al. (2004) monocytární CD14 a CD18. Jejich nárůst byl pozorován u žen s T2D, a kromě CD14 a CD18 byla patrná i vyšší exprese dalších prozánětlivých molekul a mediátorů, například CRP, VCAM-1, E-selektinu a IL-6 (Fogelstrand et al. 2004). I studie *in vivo* na potkaních nediabetických modelech potvrdily zvýšenou adhezi leukocytů na cévní endotel během krátkodobé hyperglykémie, konkrétně u endotelových buněk aorty (Otsuka et al. 2005). Už jenom samotné zvýšení počtu zánětlivých molekul a leukocytů jako takových v těle diabetických pacientů během euglykémie zvyšuje riziko vzniku CVD, ovšem působením hyperglykémie se toto riziko ještě dále násobí, jak lze vyvodit z výsledků popsaných studií.



## 4.2 Expresse TLRs

Vliv zánětlivých mechanismů v patogenezi T2D je dobře znám, v posledních letech byl prokázán i u T1D (Brauner et al. 2014). S tím souvisí i navýšení monocytární aktivity, které může být manifestováno různými způsoby. Tato podkapitola se bude zabývat konkrétně expresí specifických receptorů na povrchu monocytů a jejich derivátů. Nadprodukce TLRs u diabetických myší již byla prokázána Mohammad et al. (2006), pro tento výzkum byly jako zvířecí model T1D použity neobézní diabetické (NOD) myši a jako kontrola sloužily myši k diabetu rezistentní (NOR). Z jejich kostní dřeně byly vyzolovány myeloidní progenitorové buňky, které byly stimulovány k diferenciaci na makrofágy. Abnormální exprese TLR2 a TLR4 na makrofázích během hyperglykémie byla zaznamenána jak u prediabetických 6 týdnů starých myší, tak především u diabetických NOD myší starých 16-20 týdnů. U kontrolních NOR myší tento trend nebyl patrný, dokonce u mRNA pro TLR4 byl zaznamenán mírný pokles (Mohammad et al. 2006), což je patrné na obrázku 3. Oproti tomu na hladinu mRNA pro TLR3 a TLR5 neměla hyperglykémie žádný výrazný vliv, ovšem je důležité zmínit, že u NOD myší diabetických i prediabetických je při euglykémii exprese těchto molekul vyšší než u kontrol.

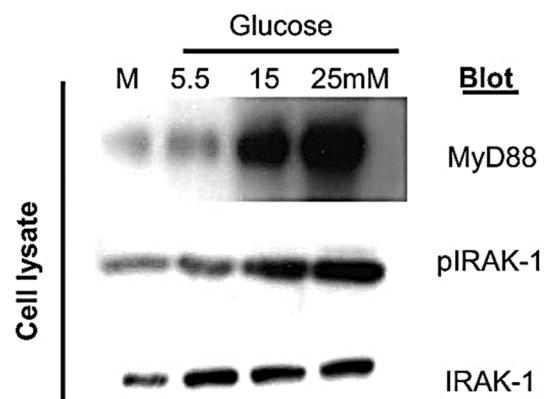


Obrázek 3 – Ovlivnění exprese TLR4 během hyperglykémie (tmavé sloupce) u diabetických, prediabetických a kontrolních myší. Převzato z Mohammad et al. 2006

U myšího modelu pro T2D byla podle Mohammad et al. (2006) při euglykémii exprese mRNA pro TLR4 10krát vyšší oproti kontrolním jedincům. Pokud byly buňky dále stimulovány bakteriálním LPS, došlo taktéž ke zvýšené odpovědi skrze TLRs na buněčném povrchu. Konkrétně byla měřena míra aktivace NF- $\kappa$ B skrze množství fosforylovaných molekul I- $\kappa$ B.

V makrofázích z NOR myši nebyla po stimulaci LPS v podmínkách hyperglykémie znatelná žádná změna, ovšem u diabetických NOD myši bylo množství fosforylovaných I- $\kappa$ B 6,5krát vyšší a u prediabetických NOD 1,1násobně vyšší (Mohammad et al. 2006). Stejně výsledky během euglykémie zaznamenali i Devaraj et al. 2008, ti ovšem již pracovali s lidskými monocyty vyizolovanými z periferní krve pacientů s T1D. Expres povrchových TLR2 a TLR4 byla oproti kontrolám zvýšená, a to jak v klidovém stavu, tak i po indukci bakteriálním LPS. S tím souvisela i abnormálně navýšená aktivita (měřená mírou fosforylace jednotlivých proteinů) dalších signalizačních molekul. Mezi ně patřil TRIF a adaptorový protein MyD88, který aktivoval receptorovou kinázou IRAK-1 a dále NF- $\kappa$ B (Devaraj et al. 2008). U monocytů získaných od pacientů nově diagnostikovaných T2D byl dle Dasu et al. (2010) nárůst taktéž signifikantní, navíc koreloval s BMI a také zvyšující se hladinou glukózy. To stejné platilo i pro aktivaci MyD88-NF- $\kappa$ B dráhy vedoucí přes IRAK-1 a TRIF (Dasu et al. 2010).

Stejně signalizační dráhy s využitím lidských monocytárních buněk THP-1 zkoumali již dříve Dasu et al. (2008), avšak zabývali se pouze vlivem zvýšené glykémie. Buňky pěstovali na médiu s 10-25 mM glukózou, zatímco kontrolní buňky rostly na médiu s 5mM glukózou. Množství mRNA pro TLR4 a TLR2 se během hyperglykemických podmínek oproti kontrolním buňkám na euglykemickém médiu zvýšilo. Pro navrácení hladiny TLR2 mRNA do hodnot typických pro normální hladinu glykémie bylo zapotřebí 48 hodin po přenesení buněk z hyperglykemických podmínek, kde byly kultivovány po 24 hodin, na 5mM médium, pro TLR4 mRNA až 72 hodin. Indukce exprese TLR2 a 4 měla za následek také navýšení aktivity MyD88, následnou fosforylaci IRAK-1 a aktivaci NF- $\kappa$ B ve srovnání s kontrolními buňkami, jak je znázorněno na obrázku 4 (Dasu et al. 2008).



Obrázek 4 – Western blot zobrazující nárůst exprese MyD88 se stoupající glykemií spolu s nárůstem množství fosforylované IRAK-1 (pIRAK-1), sloupec M značí kontrolní médium osmotických podmínek s manitolem. Upraveno podle Dasu et al. 2008

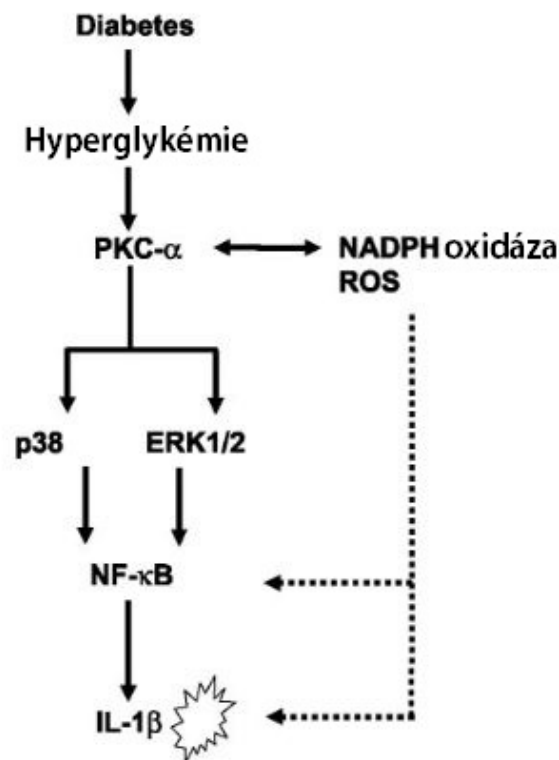
V dalším kroku se autoři zabývali účinkem PKC na expresi TLRs pod vlivem hyperglykémie. Inhibice PKC za hyperglykemických podmínek vedla k poklesu množství exprimovaných receptorů TLR2 a TLR4 oproti buňkám pěstovaným na 5mM médiu (Dasu et al. 2008). K inhibici byly využívány jak specifické inhibitory, tak i metoda malých interferujících RNA (siRNA), díky které byl zjištěn vliv různých izoform PKC na jednotlivé TLRs. Inhibice PKC- $\alpha$  totiž za použití siRNA vedla k 60% poklesu množství jak mRNA, tak samotného proteinu TLR2, zatímco inhibice PKC- $\delta$  měla za následek snížení exprese TLR4 až o 63 %. I zvýšená aktivita NADPH oxidázy za hyperglykemických podmínek vedla k navýšení hladiny exprese TLRs, měření proběhlo za použití inhibitoru jedné z komponent NADPH oxidázy a došlo k poklesu exprese o 45 % u TLR2 a o 50 % u TLR4. Podstatné je také zmínit, že TLR2 a 4 nejsou jedinými receptory monocytů, jejichž míra exprese se během hyperglykémie zvýšila. K nárůstu v porovnání s euglykemickým stavem došlo i u TLR3, TLR6 nebo TLR7 (Dasu et al. 2008).

### 4.3 Hladiny specifických cytokinů a dalších mediátorů

Jestliže dochází k nárůstu počtu TLRs a jejich prostřednictvím ke zvýšené signalizaci, celý tento mechanismus by měl vyústit také v odpověď na úrovni genové exprese. Tou může být i exprese cytokinů v monocytárních buňkách. Jedním z nejdůležitějších prozánětlivých cytokinů je IL-1 $\beta$ , který dále může působit na celou řadu buněk a také ovlivňovat expresi dalších cytokinů, například TNF- $\alpha$  a IL-6. Jedná se též o molekulu stimulující vývoj neutrofilních granulocytů z progenitorové buňky kostní dřeně, tedy vyšší hladina tohoto cytokinu vede k navýšení počtu neutrofilů v krvi – neutrofílii (Dinarello 2005).

Podle Dasu et al. (2007) za hyperglykemických podmínek produkovaly lidské monocytární buňky THP-1 zvýšené množství IL-1 $\beta$ . Množství proteinu IL-1 $\beta$  se zvyšovalo současně s rostoucí koncentrací glukózy v médiu oproti kontrolním buňkám, které byly na médiu s 5 mmol/l glukózy. Narůstalo i se zvyšující se dobou kultivace buněk na médiu s koncentrací glukózy 15 mmol/l, přičemž maximálního množství proteinu bylo dosaženo po 48 hodinách kultivace; po 72 hodinách se již opět začalo snižovat. Vyšší množství proteinu IL-1 $\beta$  v monocytech v průběhu hyperglykémie oproti kontrolním monocytům podporovalo vznik a průběh zánětlivé reakce. Vliv PKC na výlev IL-1 $\beta$  byl prokázán za pomoci použitých inhibitorů PKC, výsledky ukázaly výrazný pokles hladiny IL-1 $\beta$  během hyperglykémie při použití inhibitoru PKC. Použité inhibitory byly specifické pro dvě izoformy PKC – pro PKC- $\alpha$

a PKC- $\beta$ . Inhibice PKC- $\alpha$  vedla k poklesu množství IL-1 $\beta$ , jehož uvolňování bylo vyvolané hyperglykemií (15 mM), zatímco inhibice PKC- $\beta$  neměla na množství proteinu IL-1 $\beta$  žádný patrný vliv v porovnání s kontrolními buňkami na 5mM médiu. PKC- $\alpha$  v signalizační kaskádě dále fosforyluje p38 MAPK nebo kinázy regulované extracelulární signálem 1/2 (ERK1/2), což v konečném důsledku vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a transkripci genu pro IL-1 $\beta$ . Zvyšující se koncentrace glukózy v médiu měla za následek vyšší množství fosforylovaného proteinu, a to jak p38 MAP kinázy, tak i ERK1/2 MAPK. Jak již bylo zmíněno výše, během hyperglykémie bylo možno pozorovat také zvýšenou aktivitu NADPH oxidázy, tedy navýšené množství produkce superoxidového radikálu. Podstatné je, že NADPH oxidáza může také prostřednictvím své aktivity spouštět expresi NF- $\kappa$ B, tudíž může také ovlivňovat cytokinovou produkci (Dasu et al. 2007). Souvislost s diabetem je patrná z obrázku 5.



Obrázek 5 – Schéma vlivu hyperglykémie na transkripci genu pro IL-1 $\beta$ . Upraveno podle Dasu et al. 2007

IL-1 $\beta$  může mít dále vliv na ostatní buňky imunitního systému, ale také na celkový metabolismus glukózy. Pokud byly myši makrofágy vystaveny abnormální hladině tohoto cytokinu současně s hyperglykemií, vedlo to ke zvýšenému příjmu glukózy těmito buňkami. Zvýšený příjem glukózy vlivem IL-1 $\beta$  byl zaznamenán také v kolujících krevních leukocytech,

buňkách sleziny a tukové tkáni. Injekčně podaný IL-1 $\beta$  myším vedl postupně ke zvýšené produkci inzulínu  $\beta$  buňkami pankreatu a snížení glykémie, což odpovídá i fyziologickému postprandiálnímu stavu organismu (Dror et al. 2017).

Aktivace NF- $\kappa$ B může být zprostředkována také zvýšenou hladinou TNF- $\alpha$ . Podstatný je zde fakt, že při chronické hyperglykémii dochází k nadprodukci ROS. ROS pak aktivují monocyty, což se odrazí ve zvýšené hladině TNF- $\alpha$  v monocytech, nebo v míře aktivace NF- $\kappa$ B. Při použití antioxidantů dochází naopak k inhibici aktivity NF- $\kappa$ B, a to konkrétně blokáci translokace jeho p65 podjednotky do jádra, a to nejen během hyperglykémie, ale i během euglykémie (Guha et al. 2000). To jen potvrzuje fakt, že aktivace NF- $\kappa$ B během chronické hyperglykémie je alespoň z části ovlivněna právě ROS.

Dalším cytokinem, jehož hladina se během hyperglykémie mění, je IL-6. Spuštění transkripce pro jeho gen je opět propojeno s PKC. Množství vylučovaného i intracelulárního IL-6 se během hyperglykémie ukázalo zvýšené oproti kontrolním THP-1 buňkám, přičemž hyperglykémie byla navozena kultivací buněk po 2 dny v médiu s koncentrací glukózy 15 mM, zatímco kontrolní buňky měly 5mM médium (Devaraj et al. 2005). Pomocí specifických inhibitorů i použitím siRNA se sledovalo, která izoforma PKC má vliv na zvýšenou produkci IL-6 během hyperglykémie. Vyšlo najevo, že se jedná nejen o  $\alpha$  izoformu jako v případě IL-1 $\beta$ , ale i o  $\beta$  izoformu, jež jsou obě zodpovědné za aktivaci NF- $\kappa$ B skrze MAP kinázovou kaskádu a následné nasedání transkripčního aparátu na promotorovou oblast genu pro IL-6 (Devaraj et al. 2005). Důležité je zmínit, že všechny tyto změny byly pozorovány během chronické hyperglykémie, tedy trvající v řádu dní. V nedávno zveřejněné publikaci Spindler et al. (2016) byl testován vliv akutní krátkodobé hyperglykémie (maximálně 2 hodiny) na expresi IL-6. Studie byla prováděna s monocyty izolovanými z krve jedinců bez protilátek proti ostrůvkům pankreatu a bez výskytu diabetu v rodině. Bylo zjištěno *in vitro*, že působení akutní hyperglykémie vede ke snížení intracelulární hladiny IL-6 v lidských monocytech, přičemž pokles byl nejvýraznější u přechodných CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytů v porovnání s euglykemickými podmínkami. Z výsledků také plyne, že molekulární mechanismus redukce produkce IL-6 je ve snížení míry exprese genu p38 proteinu MAPK *MAPK11* a nikoli ve snížení množství fosforylovaného proteinu (Spindler et al. 2016).

Existuje mnoho dalších studií potvrzujících výsledky výše zmíněných, či zkoumajících další cytokiny a zánětlivé markery pod vlivem hyperglykemických stavů. Mezi těmi markery, u kterých došlo k signifikantnímu nárůstu exprese v buňkách THP-1 během hyperglykémie (15mM médium), jsou například faktory TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , interleukiny IL-1 $\beta$  i IL-1 $\alpha$ , chemokiny MCP-1 a interferonem  $\gamma$  indukovaný protein 10 (IP-10). Spolu s nimi bylo zaznamenáno i navýšení exprese jejich receptorů v porovnání s expresí v kontrolních buňkách (Shanmugam et al. 2003). IP-10 se ukázal být důležitým chemoatraktantem monocytů a je zodpovědný také za jejich transmigraci do místa zánětu (Taub et al. 1993). V návaznosti na předchozí podkapitolu lze na příkladu IP-10 uvést souvislost se signalizací skrze TLRs. U pacientů s T1D koreluje zvýšená exprese TLR2 a TLR4 na monocytech během hyperglykémie s aktivací NF- $\kappa$ B. Výsledkem pak může být zvýšená exprese genu právě pro IP-10. Množství proteinu vzrostlo jak intracelulárně u monocytů na médiu s 15 mmol/l glukózy po 2 dny, tak i v séru pacientů s T1D v porovnání k nediabetickým kontrolám (Devaraj and Jialal 2009).

Diabetes je spojován se vznikem CVD. Mezi nejčastější příčiny smrti jak u pacientů s T1D, tak i u těch s T2D, patří právě CVD (Haffner et al. 1998). Zároveň bylo prokázáno, že intenzivní terapie onemocnění vede ke snížení tohoto rizika, a to až o 57 % (Nathan et al. 2005). Hyperglykémie je mimo jiné jedním z příznaků diabetu a také jednou z nejčastějších komplikací pacientů s diabetem. Samotný diabetes je považován za prozánětlivý stav charakteristický zvýšením prozánětlivých markerů i během euglykémie v kontrastu s kontrolními nediabetickými subjekty. Důkazem může být navýšená hladina CRP, IL-6, IL-1 $\beta$  a superoxidového radikálu v séru pacientů s diabetem (Devaraj et al. 2006). Právě to jsou také zároveň rizikové faktory pro vznik dalších patologií spojených s diabetem, například diabetické retinopatie či dalších poruch sítnice, jejichž vznik má spojitost se zvýšenou hladinou IP-10 a MCP-1 (Abu El-Asrar et al. 2006). Další patologií jsou CVD vznikající především díky rekrutování monocytů/makrofágů a jejich adhezí na cévní endotel. Tím dochází ke vzniku plaků, které se následnou adhezí dalších monocytů/makrofágů dále zvětšují a rozvíjí se ateroskleróza (Duplaa et al. 1996). Když se k tomu připočte ještě vliv hyperglykémie, riziko vzniku těchto onemocnění se dále mnohonásobně zvyšuje.

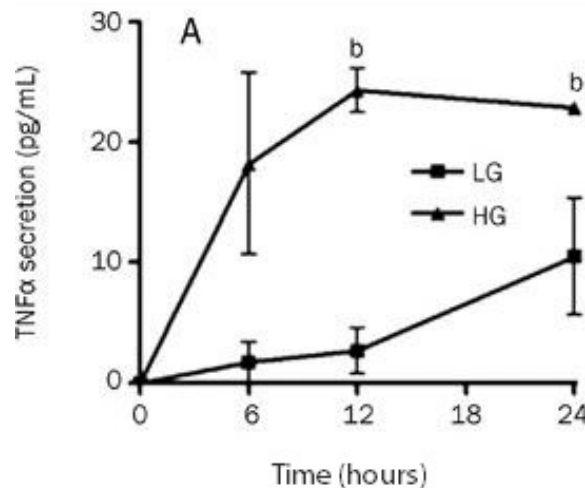
## 4.4 Osteoklasty

Již bylo zmíněno, že monocyty se mohou diferencovat v osteoklasty. Xu et al. (2013) prováděli *in vitro* studii za účelem zjištění vlivu hyperglykémie na osteoklasty získané diferenciací z monocytů. Monocyty byly vyizolovány z kostní dřeně nediabetických myší a poté byla indukována jejich přeměna na osteoklasty. Pokud byly buňky dále vystaveny zvýšené hladině glukózy, která činila 33,6 mmol/l, byl počet maturovaných osteoklastů o více jak polovinu nižší než v normoglykemických podmínkách. Dále byla zkoumána míra transkripce genů typických pro osteoklasty. Ta byla pro všechny studované geny až o 2/3 nižší oproti buňkám na médiu s nezvýšenou hladinou glukózy. Stejně tak byla snižena i resorpční schopnost osteoklastů (Xu et al. 2013). Výstupy této studie tak naznačují, že u pacientů s T2D, který je s hyperglykémií asociovaný, jsou výrazně narušeny procesy metabolismu kostní tkáně zprostředkované osteoklasty. Obdobná studie byla provedena s využitím myších monocytárních buněk RAW264.7. Během vystavení buněk zvýšené hladině glukózy na médiu s koncentrací glukózy 25 mmol/l se schopnost diferenciaci monocytů na osteoklasty oproti kontrolám bez přídavku glukózy snížila a poklesla také jejich aktivita (Wittrant et al. 2008).

## 4.5 Mikroglie

Rezidentní tkáňové makrofágy v mozku se nazývají mikroglie. Jejich hlavní úlohou je zajištění obranyschopnosti nervové soustavy. Využívají mechanismů stejných či podobných jako ostatní makrofágy v těle – tedy fagocytózu, vylučování mediátorů a prezentaci antigenu. Quan et al. (2007) se jako první snažili zjistit, jaký má hyperglykémie vliv právě na tento typ buněk. Hyperglykemické podmínky stanovili jako 35 mmol/l a porovnávali je s výsledky při glykémii 10 mmol/l. V kultuře potkaních mikroglíí měřili sekreci GRO, proteinu podobného lidskému IL-8. Sekrece se u buněk pěstovaných po 24 hodin na hyperglykemickém médiu zvýšila až trojnásobně. Exprese mRNA pro GRO protein se dokonce zvýšila 4krát už po pouhých 3 hodinách inkubace v hyperglykemických podmínkách. V souvislosti s nadprodukcí GRO proteinu byly zkoumány také cesty, které k ní vedou. Ukázalo se, že během hyperglykémie je zvýšená produkce ROS v mikroglíích. ROS aktivují PKC, která následně spouští transkripci genu pro GRO skrze NF- $\kappa$ B transkripční faktor (Quan et al. 2007).

Ve studii Quan et al. (2011) se skupina věnovala vlivu hyperglykémie na expresi dalších mediátorů. Při zvýšené hladině glukózy, 35 mmol/l, vykazovaly potkaní mikroglie až 2krát vyšší sekreci TNF- $\alpha$  a 1,5krát vyšší sekreci MCP-1 oproti podmínkám s koncentrací glukózy 10 mmol/l. Zvýšená byla i exprese mRNA – 3krát vyšší pro TNF- $\alpha$  a 2krát vyšší pro MCP-1. Zvýšená sekrece TNF- $\alpha$  je patrná z obrázku 6.



Obrázek 6 - Zvýšená sekrece TNF- $\alpha$  během hyperglykémie v čase. LG – 10 mmol/l, HG – 35 mmol/l. Upraveno podle Quan et al. 2011

Zvýšená exprese mRNA pro TNF- $\alpha$  i MCP-1 souvisí s nadprodukcí ROS během hyperglykémie a aktivací NF- $\kappa$ B. Z těchto studií lze vyvodit, že patologické změny nervové soustavy u diabetiků lze přičítat právě vlivu hyperglykémie, která spouští expresi prozánětlivých mediátorů a může v konečném důsledku vést k poškození mozku při diabetické encefalopatii (Quan et al. 2011).



## 5 Hypoglykémie

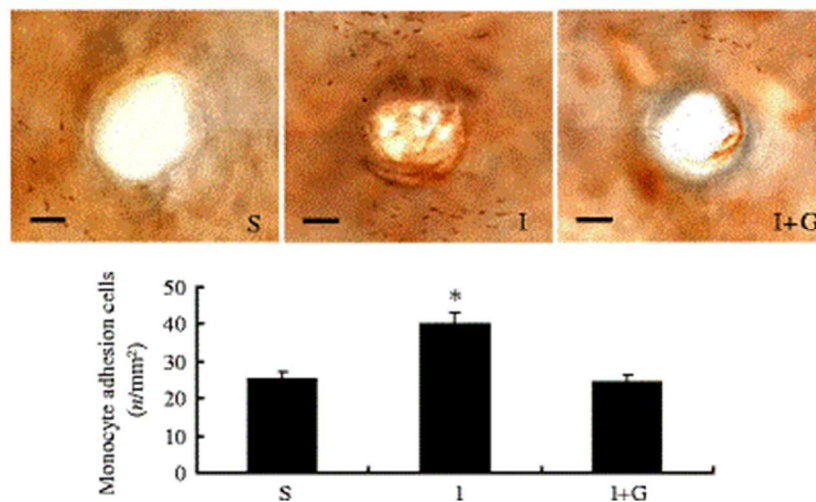
U pacientů s T1D je nejčastějším problémem hypoglykémie. Pokud je dávka podaného inzulínu vyšší, než by měla být (s ohledem na nutriční hodnoty přijímané potravy, její časový odstup od podání dávky inzulínu a fyzický výdej), dochází k poklesu hladiny glukózy v krvi pod určitou hranici, nejčastěji je tato mezní hladina uváděná jako glykémie 3,3 mmol/l. Většinou se projevuje pouze celkovou slabostí, v krajních případech ovšem může dojít až ke ztrátě vědomí a tzv. hypoglykemickému kómatu, kdy je život pacienta již velmi ohrožen. U zdravých jedinců dochází k hypoglykemickým příhodám jen velmi zřídka, a to například po dlouhodobém hladovění. Na rozdíl od hyperglykémie, kde existují desítky studií zabývajících se jejím vlivem na buňky imunitního systému, není hypoglykémii věnována taková pozornost. V této kapitole podobně jako v té předchozí budou shrnuty dosavadní poznatky z této oblasti.

### 5.1 Exprese adhezních molekul

Studie zabývající se hladinou markerů aktivovaných monocytů a ostatních buněk imunitního systému srovnávala rozdíly mezi monocyty nediabetických kontrolních subjektů a monocyty pacientů s T1D během akutní krátkodobé hypoglykémie. Euglykemické podmínky byly stanoveny jako  $5,2 \pm 0,1$  mmol/l glukózy, hypoglykemické pak  $2,9 \pm 0,1$  mmol/l po hladovění 10 hodin přes noc. Měření probíhalo 120 minut. Z průběžně odebírané krve (každou hodinu) byly měřeny hladiny solubilních adhezních molekul sVCAM-1 a sICAM-1. Dalšími molekulami zájmu byly P-selektin a E-selektin. Vzestup hladin všech výše zmíněných markerů byl během hypoglykémie signifikantní u obou studovaných skupin – jak u nediabetických kontrol, tak i u těch s T1D, přičemž hodnoty výchozích hladin byly pro obě skupiny velmi podobné (Gogitidze Joy et al. 2010). Zvýšení hladin molekul VCAM-1, ICAM-1, P-selektinu a E-selektinu u nediabetických jedinců během krátkodobé (v řádu hodin) hypoglykémie bylo potvrzeno i studií skupiny Joy et al. (2015). Nárůst hladin zmiňovaných molekul se navíc projevil také během hypoglykémie dlouhodobé, tedy v řádu dní (Joy et al. 2015).

Další studie využila neobézní Goto-Kakizaki (GK) potkaní model pro studium exprese adhezních molekul u jedinců s T2D. Potkani byli rozděleni do 3 skupin: první skupině byl podáván v infuzích fyziologický roztok, druhé pouze infuze s inzulínem a třetí skupina

dostávala injekčně glukózu spolu s inzulínem, všechny skupiny dostávaly infuze shodně každý třetí den po dobu 5 pěti týdnů. V průběhu celých pěti týdnů měli modeloví potkani přístup k potravě a vodě. Na obrázku 7 je nejlépe patrný výsledek, totiž že dlouhodobě se opakující hypoglykemické stavy vedou ke zvýšené adhezi monocytů na cévní endotel aorty. Z jejich výsledků je také patrné, že samotná aplikace inzulínu u diabetiků ke zvýšené adhezi monocytů na endotel nevede, pokud je u těchto jedinců dodržována fyziologická hladina glukózy (Jin et al. 2011).



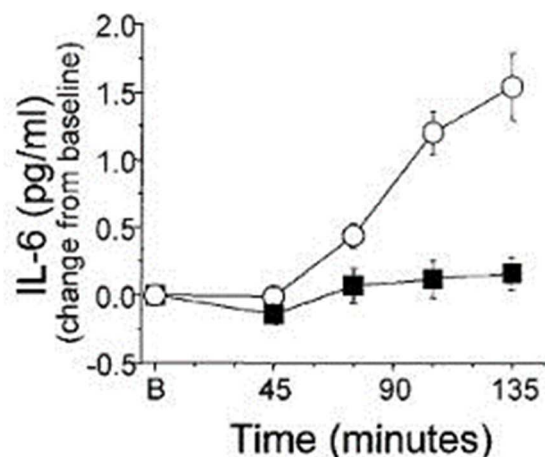
Obrázek 7 - Adheze monocytů na cévní endotel aorty při opakovaných hypoglykemiích u potkanů. Sloupce: S – fyziologický roztok, I – inzulín, I+G – inzulín + glukóza. Upraveno podle Jin et al. 2011

Během *in vitro* experimentů s lidskými endoteliálními buňkami získanými z pupečnickové žíly HUVEC byla snaha vyšetřit příčinu vlivu hypoglykémie na expresi E-selektinu, VCAM-1 a ICAM-1 v souvislosti se zvýšenou hladinou adrenalinu v krvi během hypoglykémie. U GK potkanů totiž při hypoglykémii výrazně vzrostla hladina adrenalinu. Vyšší hladina adrenalinu v médiu potom vedla u HUVEC ke zvýšené expresi mRNA pro E-selektin, VCAM-1 a ICAM-1 skrze zvýšenou aktivaci NF-κB. Aktivace NF-κB byla vyvolaná intracelulárním nárůstem cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), jehož hladina stoupla vlivem adrenalinu. Abnormální exprese adhezních molekul byla zaznamenána při koncentracích adrenalinu 10 a 100 μmol/l, zatímco při hodnotě 1 μmol/l byla hladina mRNA pro dané molekuly podobná hodnotám buněk na médiu bez přidaného adrenalinu (Jin et al. 2011). Díky této studii lze získat komplexnější pohled na propojení hypoglykémie a exprese adhezních molekul. Hypoglykémie zapříčiňuje vzestup adrenalinu, s tím je spojen nárůst intracelulární hladiny

cAMP a ten následně vede k translokaci NF- $\kappa$ B do jádra, kde spouští expresi genů pro adhezní molekuly.

## 5.2 Hladiny specifických cytokinů a dalších mediátorů

Kromě exprese adhezních molekul byla zkoumána také hladina exprese prozánětlivých cytokinů. Výchozí hladina zkoumaných markerů, kterými byly IL-6 a TNF- $\alpha$ , byla na začátku měření stejná pro pacienty s T1D i pro kontrolní nediabetické jedince. Hodnoty IL-6 a TNF- $\alpha$  v krvi se během 2hodinového měření významně zvýšily u obou sledovaných skupin. Nárůst byl ovšem výraznější u diabetických pacientů oproti kontrolám (Gogitidze Joy et al. 2010). Kromě těchto prozánětlivých cytokinů se podle Galloway et al. (2000) během hypoglykémie zvýšila hladina i dalšího zánětlivého markeru, CRP. Tento růst byl zachycen jak u zdravých kontrol, tak i u pacientů s T1D, byť výchozí hodnoty tohoto markeru byly pro obě skupiny odlišné. U diabetických pacientů byla bazální hladina CRP vyšší (0,77 mg/l), u kontrolních jedinců se pohybovala okolo 0,32 mg/l. Měření bylo prováděno po 24 hodin a nejvyšší nárůst byl právě po 24 hodinách (Galloway et al. 2000). Nárůst hladiny IL-6 u zdravých jedinců během hypoglykémie prokázali také Dotson et al. (2008). Hypoglykemické podmínky byly nastaveny na hodnoty 2,7 mmol/l glukózy, pro srovnání byla použita normoglykémie 5 mmol/l. Z obrázku 8 je patrné zvýšení hladiny IL-6 u nediabetických pacientů během hypoglykémie trvající 135 minut (Dotson et al. 2008).



Obrázek 8 - Vzestup hladiny IL-6 v krvi nediabetických jedinců během krátkodobé hypoglykémie (prázdná kolečka) oproti normoglykémii (černé čtverečky). Převzato z Dotson et al. 2008

Zvýšenou hladinu mRNA pro IL-6 v hypoglykemických podmínkách zaznamenali i Choi et al. (2013) a to v lidských monocytárních buňkách THP-1. Kromě nich exprese IL-6 mohutně vzrostla i na modelu myších monocytárních buněk RAW264.7. Během hypoglykémie byla také patrná zvýšená aktivace NF- $\kappa$ B a to přes vyšší množství fosforylovaných p38 MAPK, ale nikoli ERK jako v případě hyperglykémie (Choi et al. 2013). Během hypoglykémie navozené injekčně podaným inzulínem zdravým jedincům výzkumným týmem Nematollahi et al. (2009) byla v krvi probandů zvýšená hladina i pro další mediátory a to IL-8 a IL-1 $\beta$ . Vzestup byl také u již výše zmíněných IL-6 a TNF- $\alpha$  (Nematollahi et al. 2009).

Zajímavé poznatky přinesla recentní studie, která se zaměřila na změny v monocytech během akutní hypoglykémie u pacientů s T1D v porovnání se zdravými kontrolami. Pacienti s T1D byli rozděleni do dvou skupin – první s normální schopností rozpoznat nastupující hypoglykémii (NAH) a druhou se sníženou schopností rozpoznat hypoglykémii (IAH). Pro porovnání byli použiti zdraví nediabetičtí jedinci. Hypoglykémie byla nastavena jako  $2,6 \pm 0,1$  mmol/l, normoglykémie pak  $5,0 \pm 0,2$  mmol/l. Oproti normoglykemickým podmínkám se během hypoglykémie zvýšil celkový počet leukocytů v krvi jak u kontrolních jedinců, tak i u NAH pacientů, ale nikoli u pacientů s IAH. Zvýšená byla během hypoglykémie produkce prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 v monocytech kolujících v periferní krvi, a to po stimulaci LPS. Nárůst byl výrazný u zdravých jedinců a NAH pacientů, ale nikoliv u IAH pacientů (Ratter et al. 2017). Z toho lze vyvodit, že opakující se hypoglykemické příhody, jež jsou typické pro pacienty s IAH, mohou být protektivním faktorem proti přidruženým komplikacím při hypoglykémii, například proti neuronálnímu poškození mozku (Puente et al. 2010).

Během hypoglykémie tedy dochází k výraznému nárůstu prozánětlivých cytokinů produkovaných leukocyty oproti normoglykemickému stavu organismu, a to jak u pacientů s diabetem, tak i u zdravých kontrol. To je důsledek aktivace imunitních buněk a jejich funkčních změn způsobených hypoglykemickými podmínkami.

## 6 Závěr

Monocyty jsou jednou z klíčových komponent neadaptivních imunitních mechanismů. U zdravých jedinců dochází k jejich aktivaci, pokud je organismus daného jedince napaden nějakým patogenem nebo je jinak narušena integrita organismu. Pro zdravé jedince zároveň platí, že během dne kolísá hladina glukózy v krvi jen málo, a to především když se postprandiálně zvyšuje a následným vlivem uvolňovaného inzulínu zase snižuje. Nedochozí u nich tak k náhlým či dlouhodobým výkyvům, ať už směrem nahoru nebo dolů. Pokud ovšem k takovýmto výkyvům dojde, mohou působit jako aktivátor imunitního systému, tedy jako signál, že se v těle děje něco abnormálního.

Oba dva druhy nefyziologické glykémie, hyperglykémie i hypoglykémie, vedou podobnými mechanismy k aktivaci monocytů a spuštění jejich diferenciaci. Zároveň spouští i další imunitní odpovědi. Je pro ně typická především abnormální syntéza adhezních molekul na povrchu monocytů i na povrchu endoteliálních buněk, čímž dochází k zvýšené monocytární adhezi právě na cévní stěny. Mezi těmito molekulami společnými pro oba stavy jsou ICAM-1, VCAM-1 a E-selektin. Další abnormalitu vykazuje i syntéza prozánětlivých mediátorů monocytů, společné jsou IL-6, TNF- $\alpha$  nebo IL-1 $\beta$ . Tyto mediátory poté působí na další buňky, můžou to být další buňky imunitního systému, endotelové buňky nebo třeba trombocyty. To vede v těchto buňkách ke spuštění signalizačních drah a specifických odpovědí, často je molekulární podstatou aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Navíc u hyperglykémie je také typická zvýšená exprese TLR2 a TLR4, u hypoglykémie zatím žádná souvislost s abnormální expresí TLRs nebyla zkoumána.

Podstatné je, že tyto imunitní mechanismy spuštěné hypo- nebo hyperglykemií se ve vyšším procentu případů vyskytují u pacientů s diabetem, jejichž organismus není schopen si hladinu glukózy regulovat dobře sám. To má za následek vznik nejrůznějších patologií, jakými jsou diabetická encefalopatie, porucha ledvin či porucha remodelace kostní tkáně. Tyto stavy jsou považovány za příčiny vzniku kardiovaskulárních onemocnění, nejčastější příčinu smrti u pacientů jak s T2D, tak i s T1D.

## 7 Seznam zkratek

AIRE	Autoimmune regulator
APC	Antigen presenting cell
CARD	Caspase recruitment domain
CMP	Cow's milk protein
CRP	C-reactive protein
CVD	Cardiovascular diseases
DC	Dendritic cell
ECAM-1	Epithelial cell adhesion molecule-1
ELAM-1	Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
GK	Goto-Kakizaki mouse
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAEC	Human aortic endothelial cells
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IAH	Impaired awareness of hypoglycemia
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IKK	I- $\kappa$ B kinase
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
IRAK-1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRF3	Interferon regulatory factor 3
I- $\kappa$ B	Inhibitor of $\kappa$ B
JAK	Janus kinase
LADA	Latent autoimmune diabetes of adults

LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NAH	Normal awareness of hypoglycemia
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	NOD-like receptor
NO	Nitric oxide
NOD	Non-obese diabetic mouse
NOR	Non-obese diabetic resistant
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PDTC	Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (inhibitor of NF-κB)
PKC	Protein kinase C
PRR	Pattern recognition receptors
RIP1	Receptor-interacting protein 1
RLR	RIG-I-like receptors
ROS	Reactive oxygen species
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAK-1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TBK1	TANK-binding kinase 1
TGF-β	Transforming growth factor β
TIR	The Toll/interleukin-1 receptor homology domain
TLR	Toll like receptor

TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VNTR	Variable number tandem repeat



## 8 Seznam použité literatury

- Abu El-Asrar AM, Struyf S, Kangave D, Geboes K, and Van Damme J. 2006. Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *European Cytokine Network* 17(3):155-165.
- Alberti K, Zimmet PZ, and Consultation WHO. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine* 15(7):539-553.
- Altannavch TS, Roubalova K, Kucera P, and Andel M. 2004. Effect of high glucose concentrations on expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without cytokine activation. *Physiological Research* 53(1):77-82.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C et al. . 2000. The common PPAR gamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 26(1):76-80.
- Brauner H, Luthje P, Grunler J, Ekberg NR, Dallner G, Brismar K, and Brauner A. 2014. Markers of innate immune activity in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the effect of the anti-oxidant coenzyme Q10 on inflammatory activity. *Clinical and Experimental Immunology* 177(2):478-482.
- Brehm M, Schiller E, and Zeller WJ. 1996. Quantification of reactive oxygen species generated by alveolar macrophages using lucigenin-enhanced chemiluminescence - Methodical aspects. *Toxicology Letters* 87(2-3):131-138.
- Cantor J, and Haskins K. 2007. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: Evidence for involvement of CCR8 and CCL1. *Journal of Immunology* 179(9):5760-5767.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, and Colonna M. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine* 5(8):919-923.
- Cervin C, Lyssenko V, Bakhtadze E, Lindholm E, Nilsson P, Tuomi T, Cilio CM, and Groop L. 2008. Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes* 57(5):1433-1437.
- Chikazawa K, Okusa H, Minakami H, Kimura K, Araki S, and Tamada T. 1985. Acute onset of insulin-dependent diabetes mellitus caused by Epstein-Barr virus infection. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 37(3):453-456.
- Choi SJ, Shin IJ, Je KH, Min EK, Kim EJ, Kim HS, Choe S, Kim DE, and Lee DK. 2013. Hypoxia Antagonizes Glucose Deprivation on Interleukin 6 Expression in an Akt Dependent, but HIF-1/2 alpha Independent Manner. *Plos One* 8(3):10.
- Chung HL, Lee JJ, and Kim SG. 2003. Cow's milk protein induced changes in the expression of HLA-DR antigens on colonic epithelial cells. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 90(3):348-350.
- Clarkson SB, and Ory PA. 1988. CD16 - Developmentally regulated IGG FC-receptors on cultured human-monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 167(2):408-417.
- Corbett JA, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, and McDaniel ML. 1992. Interleukin-1-beta induces the formation of nitric-oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans - evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric-oxide. *Journal of Clinical Investigation* 90(6):2384-2391.
- Cottam DR, Schaefer PA, Fahmy D, Shaftan GW, and Angus LDG. 2002. The effect of obesity on neutrophil Fc receptors and adhesion molecules (CD16, CD11b, CD62L). *Obesity Surgery* 12(2):230-235.
- Dasu MR, Devaraj S, and Jialal I. 2007. High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(1):E337-346.

- Dasu MR, Devaraj S, Park S, and Jialal I. 2010. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33(4):861-868.
- Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, and Jialal I. 2008. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes* 57(11):3090-3098.
- de Vries MA, Alipour A, Klop B, van de Geijn GJ, Janssen HW, Njo TL, van der Meulen N, Rietveld AP, Liem AH, Westerman EM et al. . 2015. Glucose-dependent leukocyte activation in patients with type 2 diabetes mellitus, familial combined hyperlipidemia and healthy controls. *Metabolism* 64(2):213-217.
- Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, and Jialal I. 2008. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab* 93(2):578-583.
- Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, and Jialal I. 2006. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 55(3):774-779.
- Devaraj S, and Jialal I. 2009. Increased secretion of IP-10 from monocytes under hyperglycemia is via the TLR2 and TLR4 pathway. *Cytokine* 47(1):6-10.
- Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, and Jialal I. 2005. Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase C-alpha and -beta. *Diabetes* 54(1):85-91.
- Dimitriadis G, Maratou E, Boutati E, Psarra K, Papasteriades C, and Raptis SA. 2005. Evaluation of glucose transport and its regulation by insulin in human monocytes using flow cytometry. *Cytometry Part A* 64A(1):27-33.
- Dinareello CA. 2005. Interleukin-1 beta. *Critical Care Medicine* 33(12):S460-S462.
- Dotson S, Freeman R, Failing HJ, and Adler GK. 2008. Hypoglycemia increases serum interleukin-6 levels in healthy men and women. *Diabetes Care* 31(6):1222-1223.
- Dror E, Dalmas E, Meier DT, Wueest S, Thévenet J, Thienel C, Timper K, Nordmann TM, Traub S, Schulze F et al. . 2017. Postprandial macrophage-derived IL-1 $\beta$  stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation. *Nature Immunology* 18(3):283-292.
- Duplaa C, Couffignal T, Labat L, Moreau C, PetitJean ME, Doutre MS, Lamaziere JMD, and Bonnet J. 1996. Monocyte/macrophage recruitment and expression of endothelial adhesion proteins in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 121(2):253-266.
- Elenkov IJ, and Chrousos GP. 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Neuroendocrine Immune Basis of the Rheumatic Diseases II, Proceedings* 966:290-303.
- Erllich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL et al. . 2008. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium families. *Diabetes* 57(4):1084-1092.
- Fogelstrand L, Hulthe J, Hulten LM, Wiklund O, and Fagerberg B. 2004. Monocytic expression of CD14 and CD18, circulating adhesion molecules and inflammatory markers in women with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 47(11):1948-1952.
- Forrest JM, Menser MA, and Burgess JA. 1971. High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. *Lancet* 2(7720):332-&.
- Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, and ZieglerHeitbrock HWL. 1996. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: A polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87(1):373-377.
- Funk JL, Feingold KR, Moser AH, and Grunfeld C. 1993. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 makrophages induced lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis* 98(1):67-82.
- Galloway PJ, Thomson GA, Fisher BM, and Semple CG. 2000. Insulin-induced hypoglycemia induces a rise in C-reactive protein. *Diabetes Care* 23(6):861-862.

- Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Luster AD, Luscinskas FW, and Rosenzweig A. 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398(6729):718-723.
- Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S et al. . 2003. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell K-ATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(2):568-572.
- Gogitidze Joy N, Hedrington MS, Briscoe VJ, Tate DB, Ertl AC, and Davis SN. 2010. Effects of acute hypoglycemia on inflammatory and pro-atherothrombotic biomarkers in individuals with type 1 diabetes and healthy individuals. *Diabetes Care* 33(7):1529-1535.
- Grant SFA, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A et al. . 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 38(3):320-323.
- Guha M, Bai W, Nadler JL, and Natarajan R. 2000. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 275(23):17728-17739.
- Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, and Laakso M. 1998. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 339(4):229-234.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, and Wright SD. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *Journal of Experimental Medicine* 179(1):269-277.
- Hashimoto C, Hudson KL, and Anderson KV. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52(2):269-279.
- Helmrich SP, Ragland DR, Leung RW, and Paffenbarger RS. 1991. Physical-activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes-mellitus. *New England Journal of Medicine* 325(3):147-152.
- Hirasawa K, Jun HS, Maeda K, Kawaguchi Y, Itagaki S, Mikami T, Baek HS, Doi K, and Yoon JW. 1997. Possible role of macrophage-derived soluble mediators in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice. *Journal of Virology* 71(5):4024-4031.
- Horvath P, Oliver SR, Zaldivar FP, Radom-Aizik S, and Galassetti PR. 2015. Effects of intravenous glucose and lipids on innate immune cell activation in healthy, obese, and type 2 diabetic subjects. *Physiol Rep* 3(2).
- Ihle JN. 1995. Cytokine receptor signaling. *Nature* 377(6550):591-594.
- Jin WL, Azuma K, Mita T, Goto H, Kanazawa A, Shimizu T, Ikeda F, Fujitani Y, Hirose T, Kawamori R et al. . 2011. Repetitive hypoglycaemia increases serum adrenaline and induces monocyte adhesion to the endothelium in rat thoracic aorta. *Diabetologia* 54(7):1921-1929.
- Jin YL, Sharma A, Bai S, Davis C, Liu H, Hopkins D, Barriga K, Rewers M, and She JX. 2014. Risk of Type 1 Diabetes Progression in Islet Autoantibody-Positive Children Can Be Further Stratified Using Expression Patterns of Multiple Genes Implicated in Peripheral Blood Lymphocyte Activation and Function. *Diabetes* 63(7):2506-2515.
- Joy NG, Tate DB, Younk LM, and Davis SN. 2015. Effects of Acute and Antecedent Hypoglycemia on Endothelial Function and Markers of Atherothrombotic Balance in Healthy Humans. *Diabetes* 64(7):2571-2580.
- Kannel WB, and McGee DL. 1979. Diabetes and cardiovascular-disease - Framingham-study. *Jama-Journal of the American Medical Association* 241(19):2035-2038.
- Kato N. 2013. Insights into the genetic basis of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation* 4(3):233-244.
- Khakpour M, and Nikakhtar B. 1975. Diabetes mellitus following a mumps epidemic. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78(12):262-263.

- Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, and Ghosh S. 2013. Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38(1):119-130.
- Koblas T, Leontovyc I, Loukotova S, Kosinova L, and Saudek F. 2016. Reprogramming of pancreatic exocrine cells AR42J Into Insulin-producing Cells Using mRNAs for Pdx1, Ngn3, and MafA Transcription Factors. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 5:12.
- Lamb MM, Miller M, Seifert JA, Frederiksen B, Kroehl M, Rewers M, and Norris JM. 2015. The effect of childhood cow's milk intake and HLA-DR genotype on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Pediatric Diabetes* 16(1):31-38.
- Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, Chen MJ, Mathers JC, and Taylor R. 2011. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia* 54(10):2506-2514.
- Liu XT, Li YQ, Li LL, Zhang LN, Ren YC, Zhou H, Cui LL, Mao ZX, Hu DS, and Wang CJ. 2016. Prevalence, awareness, treatment, control of type 2 diabetes mellitus and risk factors in Chinese rural population: the RuralDiab study. *Scientific Reports* 6:9.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, and Janeway CA. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640):394-397.
- Mohammad MK, Morran M, Slotterbeck B, Leaman DW, Sun YP, von Grafenstein H, Hong SC, and McInerney MF. 2006. Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *International Immunology* 18(7):1101-1113.
- Momin S, Flores S, Angel B, Codner E, Carrasco E, and Petez-Bravo F. 2009. Interactions between programmed death 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 83(3):289-294.
- Mosconi L, Pupi A, and De Leon MJ. 2008. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1147:180-195.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JYC, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B, and Grp DESR. 2005. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *New England Journal of Medicine* 353(25):2643-2653.
- Nematollahi LR, Kitabchi AE, Stentz FB, Wan JY, Larijani BA, Tehrani MM, Gozashti MH, Omidfar K, and Taheri E. 2009. Proinflammatory cytokines in response to insulin-induced hypoglycemic stress in healthy subjects. *Metabolism-Clinical and Experimental* 58(4):443-448.
- Nolan CJ, Damm P, and Prentki M. 2011. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 378(9786):169-181.
- Otsuka A, Azuma K, Iesaki T, Sato F, Hirose T, Shimizu T, Tanaka Y, Daida H, Kawamori R, and Watada H. 2005. Temporary hyperglycaemia provokes monocyte adhesion to endothelial cells in rat thoracic aorta. *Diabetologia* 48(12):2667-2674.
- Pak CY, McArthur RG, Eun HM, and Yoon JW. 1988. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 2(8601):1-4.
- Parving HH, Hommel E, Mathiesen E, Skott P, Edsberg B, Bahnsen M, Lauritzen M, Hougaard P, and Lauritzen E. 1988. Prevalence of microalbuminuria, arterial-hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin dependent diabetes. *British Medical Journal* 296(6616):156-160.
- Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, and Adorini L. 2002. Cutting edge: Differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology* 169(12):6673-6676.
- Piga R, Naito Y, Kokura S, Handa O, and Yoshikawa T. 2007. Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 193(2):328-334.
- Puente EC, Silverstein J, Bree AJ, Musikantow DR, Wozniak DF, Maloney S, Daphna-Iken D, and Fisher SJ. 2010. Recurrent Moderate Hypoglycemia Ameliorates Brain Damage and Cognitive Dysfunction Induced by Severe Hypoglycemia. *Diabetes* 59(4):1055-1062.

- Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Zalberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, and Patel DD. 1997. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDD2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nature Genetics* 15(3):293-297.
- Qu HQ, Montpetit A, Ge B, Hudson TJ, and Polychronakos C. 2007. Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes. *Diabetes* 56(4):1174-1176.
- Quan Y, Du JH, and Wang X. 2007. High glucose stimulates GRO secretion from rat microglia via ROS, PKC, and NF-kappa B pathways. *Journal of Neuroscience Research* 85(14):3150-3159.
- Quan Y, Jiang CT, Xue B, Zhu SG, and Wang X. 2011. High glucose stimulates TNF alpha and MCP-1 expression in rat microglia via ROS and NF-kappa B pathways. *Acta Pharmacologica Sinica* 32(2):188-193.
- Ratter JM, Rooijackers HMM, Tack CJ, Hijmans AGM, Netea MG, De Galan BE, and Stienstra R. 2017. Proinflammatory Effects of Hypoglycemia in Humans With or Without Diabetes. *Diabetes* 66(4):1052-1061.
- Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, and Aderem A. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(27):9577-9582.
- Salamon H, Klitz W, Easteal S, Gao XJ, Erlich HA, Fernandez-Vina M, Trachtenberg EA, McWeeney SK, Nelson MP, and Thomson G. 1999. Evolution of HLA class II molecules: Allelic and amino acid site variability across populations. *Genetics* 152(1):393-400.
- Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, and Natarajan R. 2003. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 52(5):1256-1264.
- Shi ZC, Cai ZY, Sanchez A, Zhang TT, Wen S, Wang J, Yang JH, Fu SB, and Zhang DK. 2011. A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus. *Journal of Biological Chemistry* 286(6):4517-4524.
- Spindler MP, Ho AM, Tridgell D, McCulloch-Olson M, Gersuk V, Ni C, Greenbaum C, and Sanda S. 2016. Acute hyperglycemia impairs IL-6 expression in humans. *Immun Inflamm Dis* 4(1):91-97.
- Tattersall RB, and Fajans SS. 1975. Difference between inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young-people. *Diabetes* 24(1):44-53.
- Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, and Oppenheim JJ. 1993. Recombinant human interferon-inducible protein-10 is a chemoattractant for human monocytes and T-lymphocytes and promotes T-cell adhesion to endothelial-cells. *Journal of Experimental Medicine* 177(6):1809-1814.
- Tillett WS, and Francis T. 1930. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 52(4):561-571.
- Tillil H, and Kobberling J. 1987. Age-corrected empirical genetic risk estimates for 1st-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 36(1):93-99.
- Uematsu S, and Akira S. 2006. Toll-like receptors and innate immunity. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 84(9):712-725.
- Vanfurth R, and Cohn ZA. 1968. Origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *Journal of Experimental Medicine* 128(3):415-424.
- Veerkamp MJ, de Graaf J, and Stalenhoef AFH. 2005. Role of insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 25(5):1026-1031.
- Wang SS, Hu SW, Zhang QH, Xia AX, Jiang ZX, and Chen XM. 2015. Mesenchymal Stem Cells Stabilize Atherosclerotic Vulnerable Plaque by Anti-Inflammatory Properties. *Plos One* 10(8):17.
- Willerford DM, Chen JZ, Ferry JA, Davidson L, Ma A, and Alt FW. 1995. Interleukin-2 receptor-alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3(4):521-530.

- Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K, Horn D, Abboud HE, Mohan S, and Abboud-Werner SL. 2008. High D(+)-glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone* 42(6):1122-1130.
- Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, and Wong SC. 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic Research* 53(1-3):41-57.
- Xu F, Ye YP, Dong YH, Guo FJ, Chen AM, and Huang SL. 2013. Inhibitory effects of high glucose/insulin environment on osteoclast formation and resorption in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences* 33(2):244-249.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ et al. . 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116(16):E74-E80.
- Zieglerheitbrock HWL, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, and Pforte A. 1993. The novel subset of CD14+ CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European Journal of Immunology* 23(9):2053-2058.

#### Reviews:

- Kato N. 2013. Insights into the genetic basis of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation* 4(3):233-244.
- Uematsu S, and Akira S. 2006. Toll-like receptors and innate immunity. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 84(9):712-725.