

Diabetes mellitus 1. typu a autoimunita – editorial

Editorial: Vrlíková D, Mokáň M. Diabetes mellitus 1. typu a autoimunita. Vnitř Lék 2005; 51(11): 1297–1302.

J. Vavřínek

Pediatrická klinika 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha, přednosta prof. MUDr. Jan Vavřínek, DrSc.

Odlíšná dědičnost, rozdílný klinický průběh a různé riziko chronických komplikací nás nutí přesněji klasifikovat diabetický syndrom u dětí i dospělých. Etiopatogenetická klasifikace pak má zcela zásadní význam pro predikci a prevenci diabetes mellitus 1. typu (DM1). Výbor expertů pro klasifikaci a diagnózu diabetu Americké diabetologické společnosti (ADA) navrhl rozdělit DM1 do 2 podtypů: diabetes mellitus 1. typu A – autoimunitní typ diabetu a idiopatický (non-imunitní) diabetes typu B [10,11].

Pro potřeby praktické diabetologie je uvedené rozdělení určitým přínosem, podtyp B však není přesně definován a užívaná klasifikace se tak oprávněně stává předmětem kritiky řady diabetologů. Idiopatický typ je definován jako inzulinodependentní diabetes bez přítomnosti autoprotilátek. Autoprotilátky však nejsou u destruktivní inzulitidy hlavním efektorovým systémem, naprostá většina z detekovaných autoprotilátek není cytotoxická, a proto jejich nepřítomnost autoimunitní inzulitidu nevylučuje. I z těchto důvodů je uvedená ADA klasifikace především pro potřeby výzkumu nepostačující.

Zatímco u malých dětí je k manifestaci DM1 nezbytná destrukce 70–80 % β -buněk Langerhansových

ostrůvků, u starších dětí a mladých dospělých postačí destrukce 40–50 % β -buněk a u starších osob je při manifestaci DM1 ireverzibilně zničeno jen 30–40 % β -buněk. Tento známý fakt je způsoben vzestupem inzulinové rezistence v závislosti na věku postiženého jedince [13]. Provedené zahraniční pilotní studie ukazují, že u necelých 40 % osob s DM1 se onemocnění manifestuje před 20. rokem věku. Incidence DM1 se snižuje ve 4. dekádě života a znovu se zvyšuje v 5. až 7. dekádě, takže osoby s DM1 tvoří asi 10 % všech diabetických pacientů [4,12]. Protože však v incidenci DM1 existují značné rasové, ale i etnické a regionální rozdíly, nelze jednoduše tyto epidemiologické údaje aproximovat na naši populaci, ale je potřeba provést podobné studie i v našich zemích.

DM1 má převážně non-familiární výskyt a pouze 5–10 % nově manifestovaných pacientů jsou sourozenci diabetických pacientů či děti diabetických rodičů [16]. Riziko pro dítě **diabetického otce nebo matky, u které se objevil diabetes po těhotenství**, činí asi 6–7 %. Riziko dítěte **matky, u níž se diabetes manifestoval již před těhotenstvím**, se však snižuje na 1–2 %. Je tedy zřejmý vliv faktorů zevního prostředí na manifestaci a průběh autoimunitní

inzulitidy. Snížení genetického rizika u dětí matek s manifestací diabetu před těhotenstvím nepochybně svědčí pro významnou imunologickou interakci mezi matkou a plodem při prenatálním navozování imunologické tolerance vůči autoantigenům.

Prvostupňoví příbuzní diabetických pacientů však představují velmi nehomogenní skupinu, uvnitř které se geneticky podmíněné riziko liší o jeden až dva řády. Jako u všech polygenně vázaných onemocnění je i genetické riziko DM1 podmíněno polymorfizmy řady genů, které ovlivňují funkci systému získané imunity a jsou označovány jako IDDM geny. V současnosti je identifikována řada genetických markerů s pozitivní asociací s DM1 (IDDM1 až IDDM18 geny).

Největší část genetického rizika je vázána na polymorfizmy HLA molekul II. třídy (především na lokusy HLA-DQ a HLA-DR), které jsou součástí IDDM1 genu a hrají klíčovou roli při rekognoskaci sekvencí epitopů antigen prezentujícími buňkami [14]. V naší populaci jsou s DM1 **pozitivně asociovány** alely DQB1*0302, DQB1*0201 a DQA1*03, zatímco **negativně** alely DQB1*0602, DQB1*0301, DQB1*0603, DQB1*0503 + DQA1*01, DQA1*02. Z **genotypů**, které jsou v české

populaci signifikantně asociovány s DM1, přináší nejvyšší riziko DQB1*0201/0302. Frekvence jednotlivých genotypů a haplotypů se významně liší mezi rasami i etnickými skupinami, a proto bylo nezbytné stanovit míru genetického rizika i pro českou populaci [17].

Vliv **DR4 pozitivitu** byl po zavedení genotypizace na DQB1 objasněn tím, že u diabetických pacientů se na haplotypu s DR4 nachází převážně (až v 95 %) riziková alela DQB1*0302, kdežto u nediabetických kontrol je poměr populačních frekvencí mezi DR4-DQB1*0302 a DR4-DQB1*0301 vyvážen. Riziková alela DQB1*0302 se liší od protektivní alely DQB1*0301 nepřítomností aspartátu na 57. pozici aminokyselinového řetězce, a proto byla negativita pro tuto aminokyselinu dlouho považována za molekulární vysvětlení rizika pro diabetes 1. typu [2,9].

S rozvojem molekulární genetiky však byla tato hypotéza opuštěna, protože mezirasové studie v asijských populacích neprokázaly signifikantní protektivitu alel DQB1 s aspartátem na 57. pozici pro DM1. Hlubší analýza DQA1 a DRB1 vázaných s DQB1 57nonAsp alelami rovněž přispěla k nové formulaci výše uvedené hypotézy. Kupříkladu DQA1*02-DQB1*0201/DQA1*03-DQB1*0302 či DQA1*05-DQB1*0201/DQA1*05-DQB1*0201 přináší nižší riziko DM1 než DQA1*05-DQB1*0201/DQA1*03-DQB1*0302, přestože všechny ze jmenovaných genotypů jsou homozygotní pro DQB1 57nonAsp. K objasnění těchto rozporů byl navržen rozšířený model, jenž zahrnuje mimo DQB1 57nonAsp další aminokyselinu jako prediktor rizika: přítomnost argininu na DQA1 v pozici 52 [3].

S postupujícím poznáním se však i tento model ukázal nevyhovujícím. Z fyzikálně-chemických studií i ze statistických výpočtů založených na rozsáhlých molekulárně epidemiologických studiích je zřejmé, že se na

riziku DM1 podílí **celá molekula HLA-DQ** jako heterodimer obsahující DQA1 a DQB1 řetězce. Oba tyto řetězce mají několik variabilních míst, jimiž se navzájem liší a jež přispívají k míře rizika DM1 [8]. Vyšetřování alel nesoucích DQB1 57nonAsp či DQA1 52Arg pro stanovení genetického rizika lze **jen zčásti** využít u homozygotů, protože v těchto případech není třeba zvažovat protektivní či rizikový vliv druhé alely [15]. Nové molekulárně genetické metody, které umožňují přesnější odlišení jednotlivých polymorfismů HLA molekul, však již odsunuly zmíněný diagnostický postup do pozadí.

V našem souboru 158 diabetických dětí a 44 non-diabetických kontrol jsme na DQB1*0302 haplotypech našli 5 subtypů HLA-DRB1*04 z těch, které mohly být naší metodou identifikovány. Alela DRB1*0403 byla silně negativně asociována s DM1, zatímco ostatní subtypy asociaci nevykazovaly.

Asociace **inzulinového genu** s DM1 byla poprvé prokázána roku 1984 ve studii, která navrhovala oblast VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) jako potenciální etiologický polymorfismus. Inzulinový gen obsahuje ale řadu polymorfismů a po vyloučení dialektických polymorfismů byla skutečně primární etiologická role potvrzena pro VNTR v oblasti IDDM2 genu [1,5]. Rizikovost tohoto genu se projevuje zejména v populacích s méně rizikovými HLA genotypy [6].

Metodou Southern blotu mohou být alely inzulínového genu rozčleněny do 3 tříd podle délky VNTR. V kavkazské populaci je nejkratší třída I pozitivně asociována s DM1, střední třída II se téměř nevyskytuje (je častější u afroamerické populace) a nejdelší alely III. třídy jsou negativně asociovány s diabetem. Protektivní efekt alel III. třídy se zdá být dominantní nad rizikem přinášeným alelami I. třídy. Nedávné studie

ukazují, že úroveň rizika alely není dána pouze její délkou, ale i druhem, počtem a uspořádáním rozdílných elementů v ní a důležitou roli může hrát i fenomén tzv. parentálního imprintingu. Vliv rizikové či protektivní alely se totiž může lišit v závislosti na pohlaví rodiče, který zmíněnou alelu přenesl. Biologická úloha VNTR polymorfismu spočívá v modulaci genové exprese inzulínového genu v dendritických buňkách v thymu v průběhu ontogenetického vývoje, která je v recipročním vztahu s postnatální genovou expresí v β -buňkách ostrůvků. VNTR polymorfismus ovlivňuje transkripci inzulínového genu prenatálně v thymu regulací exprese jedné ze dvou rodičovských alel, a tím zároveň ovlivňuje negativní selekci autoreaktivních T lymfocytů při navozování centrální imunologické tolerance vůči proinzulinu/inzulinu [7].

V oblasti inzulínového genu se nachází deset polymorfismů asociovaných s DM1. Etiologický polymorfismus VNTR v pozici -365 je velmi náročný na vyšetřování, protože jeho oblast nelze amplifikovat pomocí PCR. K odhadu rizika přinášeného inzulínovým genem je však možné využít bodových polymorfismů (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), které jsou s primárním VNTR vázány. Nejtěsněji jsou vázány polymorfismy **-23 HphI a +1127 PstI**, které jsme vybrali i pro naši studii u 166 diabetických dětí a 143 kontrol.

Jak -23 HphI, tak +1127 PstI polymorfismy inzulínového genu přináší v naší populaci signifikantní riziko DM1. Polymorfismus -23 HphI přináší vyšší riziko (OR, odds ratio = 3,2) než polymorfismus +1127 PstI (OR = 2,4). Riziko přinášené -23 HphI je srovnatelné s rizikem přinášeným například DQB1*0201 pozitivitou. Polymorfismů inzulínového genu je tedy možné využít i ke genetické predikci DM1.

V naší studii jsme stanovili normy dětského věku pro 3 nejčastěji vyšetřované **autoprotilátky** proti molekulárně definovaným ostrůvkovým antigenům: IAA, anti-IA2 a anti-GAD65. U našeho souboru 105 nově manifestovaných dětí byla alespoň jedna z autoprotilátek přítomna u 94 % dětí a u 67 % dětí byly pozitivní nejméně dvě autoprotilátky. Naopak u 6 % nově manifestovaných pacientů nebyla zjištěna přítomnost žádné z vyšetřovaných protilátek. Autoprotilátky proti inzulinu byly prokázány především u dětí s manifestací DM1 před pátým rokem věku, a to u 87 % pacientů.

Zatímco ve skupině 50 prvostupňových příbuzných s nejvyšším genetickým rizikem DM1 byla pozitivita jedné nebo více protilátek zjištěna u 24 % jedinců, byla ve skupině 72 příbuzných s nejnižším genetickým rizikem protilátková pozitivita prokázána jen u 5,6 % vyšetřených a na rozdíl od první skupiny se u žádného z této skupiny diabetes dosud nemanifestoval. Vyšetřování kombinace protilátkových markerů umožňuje detekci střednědobého a krátkodobého rizika DM1 u jedinců se zvýšeným genetickým rizikem.

Dnes již dokážeme s vysokou pravděpodobností predikovat DM1, a to především u rizikové populace. Proto dalším krokem, který logicky následuje, je testování postupů a metod **primární, sekundární i terciální prevence** diabetu u ohrožených jedinců.

V rámci probíhajících projektů primární prevence, tedy před manifestací DM1, se Česká republika podílí na řešení tzv. „World wide research“ projektu **TRIGR** (Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk), který je koordinován NIH (National Institutes of Health).

Cílem tohoto mezinárodního projektu je objasnění vlivu hovězích bílkovin na manifestaci diabetu u novorozenců s definovaným genetickým rizikem a s výskytem DM1

u některého z prvostupňových příbuzných. Ve studii budou screenovány více než 4 000 novorozenců a po stanovení genetického rizika bude randomizováno asi 2 000 dětí. Do prospektivní, zaslepené studie jsou zařazováni novorozenci s rizikovými genotypy pro DM1 (HLA-DQB1*0302 a/nebo -DQB*02). Zařazené děti dostávají při nedostatečném nebo nemožném kojení místo běžných kojeneckých přípravků vysoce hydrolyzovaný nutriční přípravek do 6 až 8 měsíců věku. V 7 participujících centrech ČR bylo dosud screenováno 227 novorozenců a do studie bylo zařazeno 90 dětí. Studie je dvojitě zaslepená a předpokládaná doba jejího trvání je 10 let. První výsledky budou zveřejněny v *New England Journal of Medicine*, až nejmladší dítě zařazené do studie dosáhne věku 6 let.

V rámci **sekundární prevence**, jejímž cílem je prodloužení postiniční remise pacientů u s DM1, probíhá v současnosti multicentrická, randomizovaná, dvojitě zaslepená a placebem kontrolovaná studie zaměřená na sekundární prevenci DM1. Do studie, která byla schválena FDA (U.S. Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv), je zařazeno 188 pacientů s nově diagnostikovaným DM1 ve věku 12–35 let z 9 států, zařazeno bylo také 26 českých dětí (Praha, Olomouc).

Studie sleduje vliv aplikace tzv. „**alterované peptidické ligandy** – APL“ na průběh autoimunitní inzulitidy po manifestaci DM1. APL je modifikovaná část β -řetězce inzulinové molekuly. Epitop, obsahující 9. až 23. aminokyselinu β -řetězce, je hlavním sekvenčním epitopem inzulinové molekuly. Alterovaná liganda má zaměněnou 16. a 19. aminokyselinu peptidického řetězce a po její rekognoskaci systémem získané imunity dochází k inkompletní aktivaci T-lymfocytů. Lymfocyty aktivované APL totiž neprocházejí restričním

bodem v pozdní G_0 proliferační fázi a podléhají apoptóze. Výsledky budou publikovány po ukončení studie v časopisu *Diabetes*.

Predikce a prevence DM1 otevírá nové možnosti a dává naději řadě ohrožených jedinců. Rozvoj nových diagnostických i terapeutických možností posouvá preventivní diabetologii z oblasti snů do světa reality.

Literatura

1. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 1995; 9: 284–292.
2. Dorman JS, La Porte RE, Stone RA et al. Worldwide differences in the incidences of type I diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ β chain. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 7370–7374.
3. Gutierrez-Lopez MD, Bertera S, Chartres MT et al. Susceptibility to Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Spanish patients correlates quantitatively with expression of HLA-DA α Arg 52 and HLA-DQ β non-Asp 57 alleles. *Diabetologia* 1992; 35: 583–588.
4. Libman I, Songer T, LaPorte R. How many people in the U.S. have IDDM? *Diabetes Care* 1993; 16: 841–842.
5. Lucassen AM, Julier C et al. Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nat Genet* 1993; 4: 305–310.
6. Metcalfe KA, Hitman GA, Fennessy MJ et al. In Finland insulin gene region encoded susceptibility to IDDM exerts maximum effect when there is low HLA-DR associated risk. *Diabetologia* 1995; 38: 1223–1229.
7. Miceli D, Zeller M, Dogra R. Insulin gene expression and imprinting in pancreas and lymphoid organs. *Diabetes* 1999; 48(Suppl 1): A 824.
8. Mijovic CH, Jenkins D, Jacobs KH et al. HLA-DQA1 and -DQB1 alleles associated with genetic susceptibility to IDDM in a black population. *Diabetes* 1991; 40: 748–753.
9. Morel PA, Dorman JS, Todd JA et al. Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against Type 1

diabetes. Proc Natl Acad Sci 1988; 85: 8111–8116.

10. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997; 20: 1183–1197.

11. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1999; 22: 5–19.

12. Rewers M. The changing face of the epidemiology of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM): Research designs and models of disease causation. Ann Med 1991; 23: 419–426.

13. Rewers M, Norris J, Dabelea D. Epidemiology of type I diabetes. In: Eisenbarth GS. Type I diabetes: Molecular, cellular, and clinical immunology.

Barbara Davis Center for Childhood Diabetes, Online Edition Version, Second Edition 2004: 56–87.

14. Rönningen K, Spurkland A. HLA class II associations in insulin-dependent diabetes mellitus among black, Caucasoids and Japanese. In: Tsuji K, Aizawa H. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. Oxford: Oxford University Press 1993: 713–722.

15. Undlien DE, Friede T et al. HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. Diabetes 1997; 46: 143–149.

16. Vavřinec J, Cinek O. Autoimunitní inzulitida a diabetes mellitus 1. typu. In:

Perušičová J. Trendy soudobé diabetologie. Praha: Galén 2000; 4: 129–158.

17. Vavřinec J, Cinek O, Šumník Z. Genetické a imunologické aspekty diabetu I. typu v dětském věku. Čes Slov Pediat 2000; 55: 707–711.

prof. MUDr. Jan Vavřinec, DrSc.

Pediatrická klinika 2. LF UK

a FN Motol, Praha

www.fnmotol.cz

e-mail: jan.vavrinec@lfmotol.cuni.cz

Doručeno do redakce: 7. 3. 2005

www.vnitrnilekarstvi.cz