UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LEKÁRSKA FAKULTA

MUDr. Daniela Kantárová, Ph.D.

HABILITAČNÁ PRÁCA

SÚČASNÝ POHĽAD NA IMUNOPATOGENÉZU AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB SO ZAMERANÍM NA AUTOIMUNITNÝ DIABETES MELLITUS

MARTIN 2016

Moje poďakovanie za cenné rady a pripomienky patrí p. prof. MUDr. Milanovi Bucovi, DrSc.

OBSAH

ÚVOD 5

1. AUTOIMUNITNÉ CHOROBY 7
1.1 VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB 7
1.2. IMUNITNÁ TOLERANCIA 8
1.3. ETIOPATOGENÉZA AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB 9
1.3.1. Genetická predispozícia k vývoju autoimunitných chorôb 10
1.3.2. Environmentálne faktory v patogenéze autoimunitných chorôb 15
1.3.3. Imunitné reakcia v patogenéze autoimunitných chorôb 18
1.4. LIEČBA AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB 20

2. AUTOIMUNITNÝ DIABETES MELLITUS 22
2.1. DEFINÍCIA A KLASIFIKÁCIA DIABETES MELLITUS 22
2.2. EPIDEMIOLÓGIA AUTOIMUNITNÉHO DIABETES MELLITUS 23
2.3. ETIOPATOGENÉZA AUTOIMUNITNÉHO DIABETES MELLITUS 27
2.3.1. Genetická predispozícia k vývoju autoimunitného diabetes mellitus 28
2.3.2. Imunitné reakcie v patogenéze autoimunitného diabetes mellitus 33
2.3.3. Environmentálne faktory v patogenéze autoimunitného diabetes mellitus 38
2.4. KLINICKÝ OBRAZ A DIAGNOSTIKA DIABETES MELLITUS 1. TYPU 44
2.5. LIEČBA DIABETES MELLITUS 1. TYPU S DÔRAZOM NA AUTOIMUNITNÚ ETIOLÓGIU 44

3. ANALÝZA PRÍTOMNOSTI VYBRANÝCH HLA-ALIEL A POZITIVITY ŠPECIFICKÝCH AUTOPROTILÁTOK V SLOVENSKEJ POPULÁCII PACIENTOV S DIABETES MELLITUS 1. TYPU ... 47
3.1. CIELE PRÁCE 47
3.2. MATERIÁL A METODIKA 48
3.3. VÝSLEDKY 50
3.3.1. Analýza prítomnosti HLA-aliel druhej triedy 55
3.3.2. Väzba HLA-DP aliel na alely kódujúce HLA-DR a -DQ molekuly 60
3.3.3. Analýza pozitivity špecifických autoprotilátok 61
3.3.4. Vzťahy medzi HLA-alelami a pozitivitou autoprotilátok 65
3.4. DISKUSIA 69

4. ZÁVER 84

5. LITERATÚRA 86

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ADA	– Americká diabetologická spoločnosť *(American Diabetes Association)*
APC	– bunka prezentujúca antigén *(antigen presenting cell)*
CD	– diferenciačný znak *(cluster of designation)*
$CD4^+$	– pomocné T-lymfocyty
$CD8^+$	– cytotoxické T-lymfocyty
CMV	– cytomegalovírus
DM	– *diabetes mellitus*
DM1	– *diabetes mellitus* 1. typu
DM1A	– autoimunitný *diabetes mellitus*
DM2	– *diabetes mellitus* 2. typu
EBV	– vírus Epsteina-Barrovej
GAD	– glutamátdekarboxyláza
GADA	– protilátky proti glutamátdekarboxyláze *(glutamate-decarboxylase antibodies)*
HLA	– hlavný histokompatibilný komplex *(human leukocyte antigens)*
HSP	– proteín teplotného šoku *(heat shock protein)*
IDF	– *International Diabetes Federation*
IAA	– protilátky proti inzulínu *(anti-insulin antibodies)*
IA-2A	– protilátky proti tyrozínfosfatáze β-buniek pankreasu *(anti-tyrosinphosphatase IA-2 antibodies)*
ICA	– protilátky proti bunkám pankreatických ostrovčekov *(anti-islet cells antibodies)*
IFIH1	– *interferon induced with helicase C domain 1*
IFN-γ	– interferón γ
Ig	– imunoglobulín
IL	– interleukín
kb	– kilobáza
LADA	– latentný autoimunitný diabetes dospelých *(latent autoimmune diabetes of adults)*
LT-β	– lymfotoxín beta
mAb	– monoklonová protilátka *(monoclonal antibody)*
MDA5	– *melanoma differentiation associated gene 5*
MHC	– hlavný histokompatibilný systém *(major histocompatibility complex)*
MIF	– faktor inhibujúci makrofágy *(macrophage migration inhibitory factor)*
NK-bunky	– prirodzené zabíjače *(natural killer cells)*
nTreg	– prirodzené regulačné T-lymfocyty
PCR	– polymerázová reťazová reakcia (*polymerase chain reaction*)
SLE	– systémový *lupus erythematosus*
T_C	– cytotoxické T-lymfocyty *(T cytotoxic lymphocytes)*
TCR	– T-cell receptor
T_H	– pomocné T-lymfocyty *(T helper lymphocytes)*
TNF	– faktor nekrotizujúci nádory *(tumor necrosis factor)*
ZnT8	– zinkový transportér-8

ÚVOD

Autoimunitné choroby patria v súčasnosti medzi najčastejšie chronické choroby postihujúce stále mladšie vekové skupiny pacientov, ktoré značne znižujú kvalitu ich života a v neposlednom rade predstavujú aj obrovskú finančnú záťaž pre zdravotníctvo a celú spoločnosť. Postihujú 5 – 9 % populácie a podľa niektorých autorov sú celosvetovo treťou najčastejšou príčinou mortality a morbidity (po kardiovaskulárnych a nádorových chorobách).

Autoimunitná etiológia bolo doteraz dokázaná pri viac ako osemdesiatich chorobách, pričom v klinickej praxi *diabetes mellitus* 1. typu, reumatoidná artritída, Gravesova-Basedowova choroba, perniciózna anémia, systémový *lupus erythematosus* a *sclerosis multiplex* predstavujú viac ako polovicu všetkých pacientov postihnutých autoimunitnými chorobami.

Diabetes mellitus je chronická choroba, ktorej incidencia v ostatných rokoch na celom svete prudko narastá a nadobúda rozmery pandémie. Keby diabetici na celom svete vytvorili samostatný štát, bol by, podľa ostatných štatistických údajov, tretím najväčším štátom na svete (po Číne a Indii). Počet diabetikov sa dnes totiž odhaduje už na viac ako 370 miliónov. Približne 5 – 10 % všetkých diabetikov tvoria pritom pacienti s autoimunitným *diabetes mellitus* 1. typu. U prevažnej časti diabetikov 1. typu je choroba spôsobená autoimunitnou deštrukciou β-buniek pankreasu a následným absolútnym nedostatkom endogénneho inzulínu. Choroba má silnú genetickú predispozíciu (doteraz je známych viac ako 20 genetických oblastí, ktoré majú význam v genetickej predispozícii), avšak presná „genetická mapa“ ešte zďaleka nie je kompletná. Stanovenie genetického rizika a monitorovanie hladiny autoprotilátok ako markera deštruktívnej inzulitídy sa v súčasnosti javia ako jedna z možností aktívneho vyhľadávania pacientov s cieľom čím skôr začať liečbu a zmierniť tak klinický priebeh choroby a rozvoj mikro- a makrovaskulárnych komplikácií typických pre *diabetes mellitus*. Na základe najnovších poznatkov dostávame teda do rúk novú zbraň v boji s touto zákernou chorobou. Sme už totiž schopní nielen vyhľadávať potenciálnych pacientov, ale ich pravidelným sledovaním a začatím vhodnej liečby v čo najvčasnejších štádiách choroby aj zmierniť jej priebeh, predĺžiť zvyškovú sekréciu inzulínu, odstrániť bezprostredné následky jeho nedostatočnej sekrécie a spomaliť, resp. zastaviť progresiu obávaných komplikácií dlhotrvajúcej choroby.

Stále lepšie poznanie etiopatogenézy *diabetes mellitus* 1. typu teda z tejto chronickej choroby robí interdisciplinárny problém. Okrem diabetológa, resp. internistu možnosť

stanovenia genetického rizika prezentovaného prítomnosťou predispozičných aliel hlavného histokompatibilného systému vyžaduje spoluprácu s imunogenetikom, stanovenie špecifických autoprotilátok ako aj rodiace sa možnosti účinnej a bezpečnej kauzálnej imunosupresívnej liečby prinášajú priestor na spoluprácu s klinickým imunológom.

V predkladanej habilitačnej práci sa snažím o sumarizáciu súčasných vedomostí, ktoré o patogenéze *diabetes mellitus* 1. typu a autoimunitných chorôb vo všeobecnosti máme – aj napriek intenzívnemu výskumu v tejto oblasti totiž ešte stále ostáva množstvo nezodpovedaných otázok. Zároveň predkladám výsledky získané analýzou slovenskej populácie diabetikov 1. typu. V našej práci sme skúmali asociáciu choroby s génmi hlavného histokompatibilného komplexu človeka, analyzovali sme autoimunitný podklad choroby a skúmali vzťahy medzi HLA-alelami a prevalenciou špecifických autoprotilátok.

1. AUTOIMUNITNÉ CHOROBY

1.1 VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB

Autoimunitné choroby predstavujú v súčasnosti, najmä v civilizovaných krajinách, vážny medicínsky problém. Postihujú 5 – 9 % populácie, pričom ich prevalencia celosvetovo neustále stúpa a dnes sú už na nelichotivom treťom mieste medzi príčinami úmrtí (po kardiovaskulárnych a nádorových chorobách) (1, 2, 3, 4).

U jednotlivých chorôb sa v patogenéze v rôznej miere kombinuje komplexné pôsobenie viacerých faktorov (genetických, environmentálnych, imunitných, hormonálnych) – hovoríme o teórii mozaiky autoimunity (3, 5, 6).

Podľa toho, či sú autoimunitné procesy limitované na jeden cieľový orgán alebo tkanivo, resp. postihujú celý organizmus, bez orgánovej špecificity, delíme ich na:

1. Orgánovo-špecifické, pri ktorých je väčšinou známy cieľový autoantigén; klinicky sa najčastejšie jedná o autoimunitné endokrinopatie a cytopénie.
2. Orgánovo-nešpecifické (systémové), pri ktorých orgánovo-špecifický autoantigén nie je známy; imunopatologická reakcia je namierená voči ubikvitne prítomným autoantigénom (napr. v bunkovom jadre či cytoplazme) a postihnutý tak môže byť prakticky ktorýkoľvek orgán.

Samotná hranica medzi systémovými a orgánovo-špecifickými chorobami pritom nie je ostrá. Na ich rozhraní stoja totiž choroby s prevažujúcou manifestáciou v určitom orgáne, ktoré sú ale doprevádzané výskytom autoprotilátok proti orgánovo-nešpecifickým antigénom a tiež viacerými príznakmi poškodenia mimo cieľový orgán – niektorými autormi sú preto vyňaté spomedzi orgánovo-špecifických a sú označované ako tzv. orgánovo-lokalizované choroby (napr. ulcerózna kolitída, Crohnova choroba, autoimunitné choroby pečene) (5).

Z geografického hľadiska je v ich výskyte badateľný tzv. severo-južný gradient – najvyššia prevalencia je v krajinách severnej Európy a Ameriky (1), aj keď v ostatných rokoch je zaznamenávaný nárast aj v Afrike, Ázii, južnej Európe a v Latinskej Amerike (7).

Autoimunitné choroby sa môžu objaviť v akomkoľvek veku, najčastejšie však postihujú jedincov v mladom a strednom dospelom veku (8). V detskom veku je výskyt týchto chorôb nižší (aj keď aj tu je badateľný trend narastajúcej incidencie) – najčastejšími autoimunitnými chorobami sú celiakia, *diabetes mellitus* 1. typu a juvenilná idiopatická artritída (3). Naopak, pre starší dospelý vek je typický výskyt reumatoidnej atritídy a niektorých vaskulitíd (8).

U rodinných príslušníkov pacientov bol zaznamenaný zvýšený výskyt tak pôvodnej, ako aj iných autoimunitných chorôb alebo prítomnosť autoprotilátok (9). Pomerne často je

v príbuzenstve prítomná aj hypergamaglobulinémia (10, 11).

U väčšiny autoimunitných chorôb prevažujú medzi pacientmi ženy (podľa niektorých autorov pri chorobách ako systémový *lupus erythematosus*, autoimunitné tyreoiditídy alebo systémová skleróza predstavujú až 85 % postihnutých; u reumatodinej artritídy, *sclerosis multiplex* a *myastenia gravis* približne 60 %) (4, 8, 12). Opäť však existujú výnimky – napr. pri *diabetes mellitus* 1. typu je výskyt u oboch pohlaví približne rovnaký (13) a pri autoimunitných nefropatiách zaznamenávame predominantný výskyt u mužov (14).

1.2. IMUNITNÁ TOLERANCIA

Za fyziologických okolností imunitný systém zdravého jedinca toleruje autoantigény, teda molekuly vlastného organizmu. Schopnosť rozlišovať vlastné – „*self*“ a toto tolerovať a cudzie – „*non self*“ likvidovať špecifickými obrannými mechanizmami, patrí ku kľúčovým vlastnostiam imunitného systému (15).

Imunitná tolerancia je výsledkom diferenciácie imunokompetentných buniek, t. j. T- a B-lymfocytov, v primárnych lymfoidných orgánoch (týmus a kostná dreň), počas ktorej potencionálne autoreaktívne imunokompetentné bunky zanikajú. Tie, ktoré tomuto procesu unikli a nachádzajú sa v organizme, sú vo svojej aktivite blokované imunoregulačnými mechanizmami (5). Ak sa však narušia kontrolné a riadiace mechanizmy imunitného systému, ktoré zabezpečujú rozpoznávanie vlastného od cudzieho, môže vzniknúť imunitná reakcia spôsobujúca poškodenie vlastného tkaniva – autoimunizácia (autosenzibilizácia, autoagresia) (10).

Imunitná tolerancia sa vyvíja a prebieha na dvoch úrovniach – centrálnej (recesívnej) a periférnej (dominantnej).

Procesy centrálnej tolerancie T-lymfocytov sa odohrávajú v týmuse. Tu prebieha pozitívna selekcia, pri ktorej sú zachovávané tie T-lymfocyty, ktorých antigénové receptory sú schopné rozpoznávať HLA-molekuly prezentujúce vlastné peptidy organizmu s nízkou afinitou a negatívna selekcia s fyziologickou inaktiváciou a vyraďovaním klonov T-lymfocytov, ktoré rozpoznávajú komplexy „HLA + vlastný peptid“ so stredne vysokou alebo vysokou afinitou. Tým dôjde k vyradeniu takmer všetkých potenciálne autoreaktívnych T-lymfocytov, malá časť z nich však tomuto výberu uniká a dostáva sa do sekundárnych lymfoidných orgánov – tu môžu po vhodnej aktivácii spustiť autoimunitné reakcie (2, 15, 16).

Periférne T-lymfocyty na autoantigén nereagujú a to aj napriek tomu, že majú špecifický receptor pre jeho rozpoznanie (periférna tolerancia). Príčinou je obmedzená tkanivová distribúcia HLA-molekúl druhej triedy nevyhnutných pre prezentáciu antigénu, chýbanie

kostimulačných signálov nutných k plnej aktivácii T-lymfocytov (klonová anergia) (17), podprahové množstvo autoantigénu, ktoré neposkytuje dostatočný aktivačný signál – (klonová ignorácia), dysbalancia v populácii prirodzených regulačných T-lymfocytov a následné nedostatočné potlačenie aktivity potenciálne autoreaktívnych lymfocytov (16, 18). Najnovšie objavenou možnosťou vývoja periférnej tolerancie je suicídiová emperopoléza. Pri nej aktivované bunky imunitného systému vstupujú do lyzozómových oddielov iných buniek, kde sa následne degradujú (uvedené procesy boli opísané pri aktivovaných cytotoxických T-lymfocytov v pečeni, ktoré po vstupe do hepatocytu hynuli; tento mechanizmus môže sčasti vysvetliť aj tolerogénne vlastnosti pečene) (19, 20).

Podobne, ako pri T-lymfocytoch, sa vyvíja tolerancia na vlastné antigény aj pri B-lymfocytoch v kostnej dreni; malé množstvo potenciálne autoreaktívnych B-lymfocytov unikne negatívnej selekcii a dostáva sa do periférie. Pokiaľ však nezískajú potrebnú pomoc od T-lymfocytov, k ich aktivácii nedochádza. Avšak pri infekciách určitými mikroorganizmami, ako sú infekcie EBV a CMV, dôjde k ich aktivácii, pretože tieto sú polyklonovými aktivátormi B-lymfocytov (21).

Z patogenézy autoimunitných chorôb ďalej vyplýva, že na ich rozvoji sa môžu spolupodieľať aj gény regulujúce procesy apoptózy. Ich produkty (napr. Fas = CD95 na terčovej, apoptóze predurčenej bunke a FasL – *Fasligand;* CD95L na indukujúcej bunke – zväčša na aktivovanom T-lymfocyte alebo NK-bunke; inhibične pôsobiaci FLIP-proteín – *Flice-inhibitory protein*) totiž zodpovedajú za reguláciu vzniku antigénového repertoáru T-lymfocytov v týmuse a B-lymfocytov v kostnej dreni. Apoptotickými procesmi sa organizmus zbavuje aj tých lymfocytov, ktoré si už svoju úlohu v imunitnej odpovedi splnili a ich ďalšie pôsobenie nie je potrebné, dokonca ohrozujú organizmus možným poškodením vlastných tkanív (22, 23).

1.3. ETIOPATOGENÉZA AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB

Autoimunitné choroby sú výsledkom komplexných patologických procesov zahŕňajúcich genetickú predispozíciu, vplyv environmentálnych faktorov, hormonálne vplyvy, komplex imunitných reakcií. Kombináciou viacerých vyššie uvedených vonkajších a vnútorných faktorov môže teda za určitých okolností vzniknúť autoimunitná choroba. To však obvykle nevzniká naraz, ale ide o postupný proces, v ktorom sa naďalej uplatňujú rôzne regulačné mechanizmy, ktoré sa snažia zvrátiť narušenú rovnováhu do normálu.

1.3.1. Genetická predispozícia k vývoju autoimunitných chorôb

Genetický podklad autoimunitných chorôb je jednoznačne dokumentovaný ich familiárnym výskytom. Genetická predispozícia je zjavná u všetkých autoimunitných chorôb, aj keď podľa výsledkov dostupných štúdií sú choroby so silnejšou (*diabetes mellitus* 1. typu), aj s relatívne slabšou (reumatoidná artritída, sklerodermia) genetickou asociáciou (24).

Genetické pozadie chorôb má polygénový charakter, najsilnejšie sú však autoimunitné choroby asociované s molekulami hlavného histokompatibilného systému. Avšak na fenotypový prejav sú nevyhnutné aj environmentálne faktory, ich spoločný výskyt teda nie je 100 % ani u jednovaječných dvojčiat – u rôznych autoimunitných chorôb sa pohybuje v rozmedzí 12 – 70 % (tab. 1) (25).

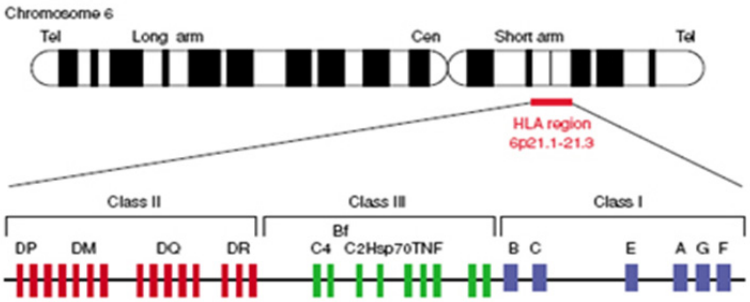
Tab. 1 Výskyt autoimunitných chorôb u monozygotných dvojčiat (upravené podľa 25)

Autoimunitná choroba	Výskyt u monozygotného dvojčaťa pacienta (%)
Reumatoidná artritída	12 – 15
Systémový *lupus erythematosus*	25 – 57
Gravesova-Basedowova choroba	20 – 35
Hashimotova tyreoiditída	38 – 55
Autoimunitný *diabetes mellitus*	13 – 67,7

Hlavný histokompatibilný komplex

Podrobnejšou analýzou vzťahu medzi genetickou predispozíciou a rozvojom autoimunity bola dokázaná výrazná asociácia medzi pravdepodobnosťou vzniku choroby a hlavným histokompatibilným komplexom (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) (tab. 2) (6, 17). Objavený bol na leukocytoch, preto sa u človeka dodnes označuje aj ako *Human Leucocyte Antigens* (HLA).

Obr. 1 Génová mapa hlavného histokompatibilného komplexu človeka (177)



Predstavuje skupinu génov na 6. chromozóme v oblasti 6p21.31 (obr. 1). Molekuly, ktoré tieto gény kódujú, zodpovedajú predovšetkým za prezentáciu peptidu pochádzajúceho z cudzorodého alebo telu vlastného antigénu proteínovej povahy (26).

K základným charakteristikám HLA-systému patrí jeho komplexnosť a polymorfnosť. Komplexnosť určuje existencia viacerých lokusov a polymorfnosť podmieňuje alelový charakter jednotlivých génov (2, 11, 27).

Tab. 2 Asociácia niektorých HLA-molekúl s autoimunitnými chorobami (upravené podľa 10)

Choroba	HLA-molekula	Relatívne riziko*
Bechterevova choroba	B27	87,4
Uveitída	B27	10,4
Psoriasis vulgaris	Cw6	13,3
Goodpasturov syndróm	DR2	15,9
Sclerosis multiplex	DR2	4,18
Sjőgrenov syndróm	DR3	9,7
Graves-Basedowova choroba	DR3	3,8
Systémový *lupus erythematosus*	DR3	5,8
Myastenia gravis	DR3	2,5
Dermatomyozitída	DR3	3,9
Pemphigus vulgaris	DR4	14,4
Reumatoidná artritída	DR4	4,0
Celiakia	DR3	10,8
	DR7	4,8
	DR7/DR3	60,0
	DQ2	38,5

Pozn.: * Relatívne riziko – RR – udáva, koľkokrát častejšie sa daná choroba vyskytuje u jedincov s identickou HLA- alelou ako u jedincov, ktorí túto alelu nenesú

HLA-molekuly a gény, ktoré ich určujú, sa delia do 3 skupín (2, 11, 28):

• HLA-gény a molekuly prvej triedy (HLA-I)

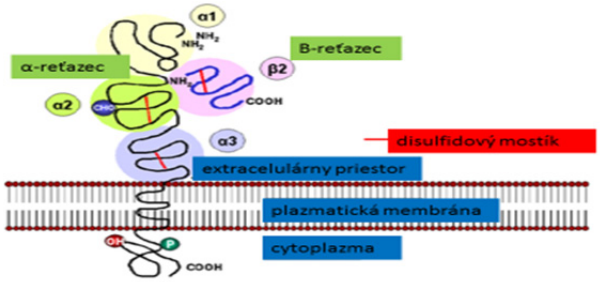
Funkčné gény tejto oblasti delíme na tzv. klasické a neklasické. Klasické (Ia) gény boli objavené najskôr a patria sem HLA-A, -B, -C. Medzi neklasické (Ib) gény zaraďujeme HLA-E, -F, -G. Opisovaná genetická oblasť je ohraničená centromerickým génom MICB (*MHC class I-chain related B*) a telomerickým pseudogénom HLA-F. K HLA génom prvej triedy zaraďujeme aj gény označované ako Ic – HFE gén (kódujúci proteín, ktorý sa viaže na receptor pre transferín a ovplyvňuje fyziologickú absorbciu železa) a gény kódujúce molekuly MICA (*MHC class I-chain related A*), MICB – ich produkty sú ligandmi pre aktivačné receptory NK-buniek. Triedu Id predstavujú gény pre proteíny CD1, α-2 glykoproteín viažuci zinok, neonatálny Fc-receptor, ktorý viaže IgG protilátky, albumín a MR1 (*MHC- related class I-like molecule*).

Klasické HLA-I molekuly prezentujú peptidy cytotoxickým T-lymfocytom ($CD8^+$). HLA-A, -B, -C sa nachádzajú na každej jadrovej bunke organizmu – po ich syntéze sú zabudované do membrány bunky. Najviac ich je v lymfatickom tkanive, slezine a týmuse, menej vo vnútorných orgánoch a svaloch.

Terciárna štruktúra HLA-molekúl prvej triedy je kombináciou alfa a beta štruktúry (obr.2). α3-doména a β2-mikroglobulín (β-reťazec) majú formu skladaného listu (β-štruktúra), kým domény α1 a α2 vo vzájomnej interakcii vytvárajú akýsi žliabok, ktorého spodnú časť tvorí 8 vláken (po 4 z každej domény) vo forme skladaného listu, ktoré prechádzajú do špirálovitej formy (α-štruktúra) a vytvárajú bočné steny žliabku. Toto priestorové usporiadanie umožňuje HLA-molekulám prijať a viazať cudzorodé antigény, resp. len časť z nich – tzv. imunogénny fragment s rozsahom 8 – 9 aminokyselinových jednotiek, potom ho prezentovať T-lymfocytom a tak začať procesy špecifickej imunitnej odpovede (2, 29).

Obr. 2 HLA-molekula prvej triedy (upravené podľa 11, 29)

HLA-molekuly prvej triedy sú heterodiméry tvorené ťažkým (α) a ľahkým (β) reťazcom. Ťažký reťazec sa skladá z troch domén: α1, α2 a α3, ľahký reťazec tvorí len jedna doména, ktorá sa zhoduje s β2-mikroglobulínom. V rámci molekuly rozoznávame 3 časti: extramembránovú, transmembránovú a cytoplazmovú. Karboxylový koniec molekuly je situovaný v cytoplazmovej časti bunky a aminoskupinový koniec naopak v extracelulárnej časti.



• HLA-gény a molekuly druhej triedy (HLA-II)

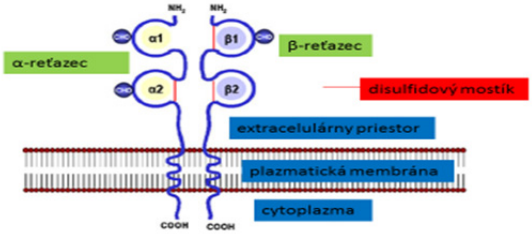
Táto oblasť sa označuje aj ako HLA-D s podoblasťami -DR, -DQ a -DP a predstavuje priestor zaberajúci 1 000 kb, s hustotou 1 gén na 25 kb, čo je o niečo nižšia početnosť génov ako v HLA oblasti prvej triedy.

Podobne, ako HLA-molekuly prvej triedy, patria HLA-molekuly druhej triedy tiež k transmembránovým glykoproteínom a skladajú sa rovnako z dvoch reťazcov (obr. 3) – ťažkého (α) a ľahkého (β). Extracelulárne časti oboch reťazcov sa skladajú z dvoch domén (α1, α2 a β1, β2). Proximálne domény obsahujú hypervariabilné úseky zodpovedné za väzbu peptidu (imunogénneho fragmentu). Oba reťazce sa spájajú s ďalším reťazcom – γ, ktorý sa

nazýva aj invariabilný a je determinovaný génom mimo HLA genetickej oblasti (na 5. chromozóme). Orientácia reťazcov v bunke je zhodná s molekulami prvej triedy (2, 29).

Obr. 3 HLA-molekula druhej triedy (upravené podľa 11, 29)

HLA-molekuly druhej triedy sa skladajú z jedného ťažkého (α) a jedného ľahkého (β) reťazca. Extracelulárna časť obidvoch reťazcov sa skladá z dvoch domén – α1, α2 a β1, β2.



Úlohou HLA-molekúl druhej triedy je predkladať peptidy pomocným T-lymfocytom ($CD4^+$). Nachádzajú sa predovšetkým na bunkách prezentujúcich antigén (*Antigen Presenting Cells,* APC) – ako napr. monocyty, makrofágy, dendritové bunky. Na pokojných T-lymfocytoch ich však nenájdeme, objavujú sa až po ich aktivácii antigénom. Ich expresiu na jednej strane indukujú IFN-γ, TNF, IL-4, na druhej strane potláčajú kortikoidy, prostaglandíny, IFN-α a -β.

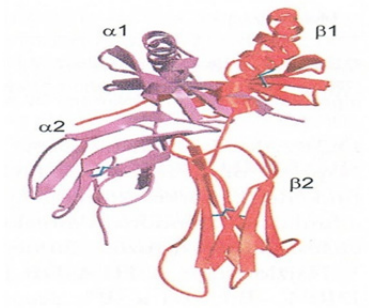
Terciárna štruktúra HLA-molekúl druhej triedy sa podobá štruktúre HLA-molekúl prvej triedy (obr. 4). Domény α2 a β2 majú štruktúru skladaného listu, kým domény α1 a β1 helikálnu.Vo vzájomnej interakcii vytvárajú tiež žliabok schopný do seba prijať imunogénny fragment a prezentovať ho T-lymfocytom. Tento je však o niečo väčší, skladá sa z 15 – 25 aminokyselinových jednotiek (2, 29).

• HLA-gény a molekuly tretej triedy (HLA-III)

Táto časť v strede HLA genetickej oblasti predstavuje najhustejšie obsadený úsek v ľudskom genóme (1 gén na 14,3 kb). Gény tejto oblasti sa štruktúrne ani funkčne nepodobajú HLA-molekulám; niektoré z nich sa podieľajú na regulácii imunitnej odpovede, funkciu ďalších však ešte v súčasnosti nepoznáme. Tieto gény kódujú niektoré zložky komplementovej dráhy (C2, C4, faktor B), proteíny teplotného šoku 70 (*Heat Shock Protein,* HSP70), faktor nekrotizujúci nádory (*Tumor Necrosis Factor,* TNF), lymfotoxíny a iné (2, 27,28).

Obr. 4 Schéma terciárnej štruktúry HLA-molekúl druhej triedy (11)

HLA-molekuly druhej triedy sa skladajú z jedného ťažkého α-reťazca (tvoreného doménami α1 a α2) a jedného ľahkého β-reťazca (tvoreného doménami β1 a β2). α2- a β2-domény majú štruktúru skladaného listu, kým α1- a β1-domény helikálnu. α1- a β1-domény vytvárajú žliabok, ktorého spodnú stenu tvorí 8 vláken (po 4 z každej domény) vo forme skladaného listu prechádzajúcich do špirálovej formy a tvoriacich bočné steny žliabku.



T-lymfocyty nedokážu rozpoznať natívny antigén, ale len antigén (resp. peptid, ktorý z neho pochádza) naviazaný na vlastné molekuly hlavného histokompatibilného komplexu. Proces, pri ktorom sa z pôvodného proteínového antigénu vytvára peptid, viaže sa na HLA-molekuly a zabudováva do membrány bunky, kde sa zviditeľňuje T-lymfocytom, sa označuje ako prezentácia antigénu (26, 30).

Exogénna dráha prezentácie začína pohltením antigénu pochádzajúceho z extracelulárneho prostredia bunkami špecializovanými na túto činnosť – bunkami prezentujúcimi antigén. Tieto bunky predstavujú najmä dendritové bunky, monocyty, makrofágy a B-lymfocyty.

Pohltený antigén „upravia“ a upravený ho prezentujú na povrchu v spojení s HLA-molekulami druhej triedy. Zabudovaním imunogénneho fragmentu antigénu do membrány bunky dochádza k jeho expozícii, čiže vlastnej prezentácii. HLA-molekuly druhej triedy držia peptid v stabilnej polohe, čo sa týka jeho orientácie ako aj konformácie a umožňujú jeho rozpoznanie pomocnými T-lymfocytmi ($CD4^+$, T_H, *T helper*) (18, 26).

Pri endogénnej dráhe prezentácie antigénu sú rozpoznávané proteínové antigény, ktoré sa objavujú vo vnútri bunky. Z neho pochádzajúce imunogénne fragmenty sa nadviažu do žliabku HLA-molekúl prvej triedy (26). Po väzbe sa komplex vezikulovým transportom presúva do membrány bunky a prezentuje sa takto cytotoxickým T-lymfocytom ($CD8^+$, T_C, *T cytotoxic*). Následne T-lymfocyty svojím receptorom (*T-cell receptor*, TCR) rozpoznávajú prezentované peptidy; navyše však rozpoznávajú aj vlastné, prezentačné HLA-molekuly prvej triedy. Tento jav sa označuje ako fenomén imunitnej reštrikcie. Po získaní kostimulačných signálov T-lymfocyt začne proliferovať a následne plniť svoje efektorové funkcie (2, 28).

Dedičnosť HLA-génov sa riadi mendelovským typom dedičnosti. Celá genetická

oblasť – označovaná ako haplotyp – sa dedí z rodiča na potomka vcelku. Súrodenci teda môžu byť HLA identickí, haploidentickí alebo sa môžu odlišovať obomi haplotypmi (pochopiteľne, rodič je voči svojmu dieťaťu vždy haploidentický).

Pravdepodobne aj vďaka selekčným tlakom, ale aj istému stupňu homogenizácie (zapríčinenej životom v izolácii vďaka geografickým bariéram v minulosti) dochádza k vzniku tzv. väzbovej nerovnováhy (*linkage disequilibrium*), teda k rozdielom medzi očakávanou a pozorovanou frekvenciou sledovanej alely v populácii. Určitá kombinácia aliel dvoch susedných lokusov sa totiž (najmä ak sú alely od seba vzdialené menej ako 1 cM) prenáša z generácie na generáciu. Ak populácia ostáva izolovaná, nerovnováha sa prehlbuje. Naopak, ak dochádza k náhodnému kríženiu, niektoré nerovnováhy zoslabnú a druhé vznikajú *de novo* (a to pre rozdielnu frekvenciu génov) (2, 11, 31).

Hlavný histokompatibilný komplex patrí ku genetickým systémom, pri ktorých sa dá dokázať pôsobenie tzv. prirodzenej selekcie. Príkladom je existencia väzbovej nerovnováhy medzi alelami determinujúcimi molekuly HLA-A1, -B8, -DR3, -DQ2. Tento haplotyp, označovaný aj ako „autoimunitný“, vlastní vďaka zvýšenému selekčnému tlaku v európskom podnebí (výrazne odlišnom napr. od toho afrického nižším rizikom infekcie pri nižších teplotách) viac ako 10 miliónov obyvateľov Európy. Spája sa s vnímavosťou na viaceré autoimunitné choroby, ako je systémový *lupus erythematosus*, sklerodermia, celiakia, *myastenia gravis*, ale aj autoimunitný *diabetes mellitus*. Selekcia je vo všeobecnosti namierená proti homozygótnosti v prospech heterozygótnosti, ktorá je pre jedinca, resp. živočíšny druh výhodnejšia (2, 32, 33).

1.3.2. Environmentálne faktory v patogenéze autoimunitných chorôb

Samotné predispozičné gény vnímavosti k autoimunitným chorobám nie sú však ešte „zárukou“ vzniku choroby a na rozvinutie autoimunitných reakcií a klinických prejavov sú nevyhnutné aj environmentálne faktory. V tejto súvislosti sa uznáva existencia tzv. spúšťacieho stimulu. Tento buď naštartuje autoimunitné deje v organizme alebo spôsobí, že pôvodne obranné imunitné reakcie sa zmenia na patologické, autoimunitné (15, 34).

Následkom pôsobenia chemických látok (najčastejšie liečivami a xenobiotikami) dochádza k modifikácii vlastných antigénov, ktoré imunitný systém následne vníma ako cudzie. Takýto potenciál majú napr. α-metyldopa, D-penicilamín, nitrofurantoin, prokainamid, hydralazín, ortuť, bleomycín, 5-hydroxytryptofán, heparín (35).

Medzi príčiny vzniku autoimunitných chorôb patria aj viaceré ďalšie procesy. Vplyvom

infekcie alebo traumy môže dôjsť k vzájomnému kontaktu medzi imunitným systémom a sekvestrovaným autoantigénom, teda takým antigénom, na ktorý sa nemohla vyvinúť tolerancia, pretože buď vo fetálnom živote ešte neexistoval (napr. spermie) alebo ho od imunitného systému izolujú fyziologické bariéry (napr. šošovka, rohovka, zásaditý proteín myelínu, kolagén chrupky). Ak dôjde k ich kontaktu s imunitným systémom, jedinec sa senzibilizuje a začnú sa rozvíjať autoimunitné procesy (napr. autoimunitná orchitída po prekonanej parotitíde alebo vazektómii; sympatická oftalmia po úraze alebo infekcii oka). Imunitná reakcia proti primárnemu autoantigénu však nielen spôsobuje, resp. prehlbuje lokálny zápal, ale následne spôsobí aj odhalenie ďalších, doposiaľ kryptických autoantigénov, ktoré môžu opäť vyvolávať ďalšie autoimunitné reakcie – ide o tzv. šírenie determinánt (*determinant spreading*) (2, 5, 35).

Na základe podobnosti medzi mikrobiálnym antigénom a autoantigénom môže dôjsť ku krížovej reakcii. Imunitná odpoveď indukovaná krížovo-reagujúcim antigénom mikroorganizmu sa namieri proti vlastným molekulám organizmu (napr. reumatická horúčka, hemolytická anémia pri infekcii *Mycoplasma pneumoniae*).

Krížová reaktivita zahrňuje v sebe aj fenomén molekulového mimikri, ktorý sa považuje za principiálny faktor indukcie značnej časti (ak nie väčšiny) autoimunitných chorôb a ktorý znamená zhodu determinantov vlastných antigénov s epitopmi antigénov mikroorganizmov (napr. zhodná sekvencia 18 aminokyselín v ľudskom enzýme glutamátdekarboxyláza a proteínu P2C Coxsackie vírusu; pozri aj kap. 2.3.3) (35, 36).

Existuje aj skupina antigénov proteínového charakteru – tzv. superantigény (napr. stafylokokové enterotoxíny, M-proteín streptokokov), ktoré stimulujú T-lymfocyty nešpecificky. Dochádza pritom k uvoľneniu veľkého množstva cytokínov (IL-2, IFN-γ, TNF), ktoré ďalej aktivujú početné imunokompetentné bunky. Pri takejto nešpecifickej stimulácii sa môžu následne aktivovať aj tzv. „zakázané“, potenciálne autoreaktívne klony T-lymfocytov.

Infekcie sú vo všeobecnosti považované za kľúčové v patogenéze autoimunitných chorôb. Podľa súčasného stavu poznatkov sa však správajú ambivalente. Na jednej strane je prekonanie určitých (najmä vírusových) infekcií (predovšetkým v ranom detstve) prospešné a „edukuje“ imunitný systém, na druhej strane dokážu infekcie (minimálne u časti pacientov) indukovať, resp. akcelerovať autoimunitné procesy. Moment, ktorý rozhodne o tom, či bude infekcia prospešná alebo nie, je stále nejasný. Diskutuje sa samozrejme aj o vplyve genetickej predispozície, druhu mikroorganizmu, veku jedinca, ako aj stave organizmu v čase infekcie (37, 38).

Skutočnosť, že v civilizovaných krajinách v súčasnosti pozorujeme výrazný nárast incidencie chorôb s autoimunitnou patogenézou, pričom výskyt vírusových infekcií tu vo všeobecnosti klesá, však naznačuje, že problém vplyvu vírusovej infekcie na rozvoj autoimunitných chorôb bude omnoho komplexnejší. V tejto súvislosti sa v súčasnosti často diskutuje aj o teórii prílišnej čistoty prostredia (tzv. hygienická teória). Snaha o čo najúčinnejšie vyhýbanie sa expozícii mikrobiálnym agensom totiž narúša fyziologický vývoj imunitného systému u detí. Ako prvá sa táto súvislosť opísala pri alergických chorobách, platnosť však zrejme nestráca ani pri autoimunitných chorobách. V ostatných rokoch došlo totiž, vďaka zvýšeniu hygienického štandardu, rozsiahlemu a častému používaniu antibiotík a vakcinačným programom k poklesu infekčných chorôb, zatiaľ čo výskyt autoimunitných chorôb v populácii prudko rastie (39, 40).

Vplyv hormonálnych faktorov sa začal študovať na základe skutočnosti, že autoimunitné choroby sú väčšinou výsadou žien (pri chorobách ako systémový *lupus erythematosus*, autoimunitné tyreoiditídy alebo systémová skleróza predstavujú až 85 % postihnutých) (pozri kap. 1.1). Najpravdepodobnejším vysvetlením týchto rozdielov je vplyv pohlavných hormónov na imunitné procesy – estrogény majú vo všeobecnosti stimulačný účinok na imunitnú odpoveď (naopak progesterón a androgény imunitnú odpoveď oslabujú). Estrogény zvyšujú syntézu IL-1 a tým podporujú zápalové procesy, zvyšujú expresiu adhezívnych molekúl v membránach endotelových buniek, a uľahčujú tak prechod zápalových buniek z krvi do tkaniva. Ovplyvňujú aj procesy maturácie, aktivácie a prežívania buniek imunitného systému, prezentáciu antigénu a produkciu protilátok (u žien zachytávame aj vyššie hladiny $CD4^+$ subpopulácie T-lymfocytov a IgM) (4, 12).

Jedným z mechanizmov, ktorý tiež prispieva k preferenčnému vývinu autoimunitných procesov u žien, je aj vyššia hladina leptínu, ktorý stimuluje T_H1-imunitnú odpoveď. Jeho zvýšenou produkciou adipocytmi sa vysvetľuje aj zvýšený výskyt autoimunity u obéznych (2).

Ďalším dôležitým momentom v patogenéze autoimunitných chorôb, ktorý je pravdepodobne jedným z vysvetlení tzv. severo-južného gradientu vo výskyte autoimunitných chorôb, je hypovitaminóza D. Celosvetovo je relatívne častým nálezom a bola už opísaná jej asociácia s viacerými autoimunitnými chorobami (reumatoidnou artritídou, sklerodermiou, psoriázou, *sclerosis multiplex*, autoimunitným *diabetes mellitus*) (41). Ukazuje sa, že tento vitamín má, okrem vplyvu na kostný metabolizmus a hladiny kalcia, aj antiproliferačný a imunomodulačný účinok. Receptor pre vitamín D sa nachádza na viacerých bunkách imunitného systému, napr. na aktivovaných T-lymfocytoch, antigén prezentujúcich bunkách (42).

Na rozvoji autoimunitných procesov sa môže podielať aj lymfopénia – u ľudí sa pozoruje napr. pri autoimunitnom *diabetes mellitus*, reumatoidnej artritíde, systémovom *lupus erythematosus* a Sjögrenovom syndróme. Aj menej závažná, avšak chronická, resp. opakovaná nízka hladina lymfocytov totiž automaticky spustí proces tzv. akútnej homeostatickej proliferácie s cieľom dosiahnuť pôvodný stav. Počas tejto expanzie vznikajú však aj T-lymfocyty s vyššou afinitou pre vlastné antigény (2, 11).

V súčasnosti pribúdajú dôkazy o možnom vplyve environmentálnych faktorov na expresiu génov a tým aj na fenotypové prejavy prostredníctvom tzv. epigenetických mechanizmov – teda nie priamo zmenou sekvencie DNA. Ide teda o výnimku zo všeobecne platného pravidla, že dedičné fenotypové zmeny sú spôsobené iba zmenami na úrovni DNA. Tieto epigenetické zmeny sa však dedia z bunky na bunku a z generácie na generáciu. Prispievajú tiež k vysvetleniu skutočnosti, prečo výskyt autoimunitných chorôb medzi monozygotnými dvojčatami nikdy nedosahuje 100 % (tab. 1) (25, 43).

Doteraz najlepšie charakterizovanými epigenetickými mechanizmami, ktoré buď „zapínajú“ alebo „vypínajú“ expresiu génov, sú metylácia a acetylácia DNA a modifikácia histónových proteínov DNA. Environmentálne faktory môžu ovplvňovať príslušné enzýmy a tak modifikovať rôzne, aj imunitné, procesy (25, 44). Zmeny v metylácii DNA už boli opísané u systémového *lupus erythematosus*, reumatoidnej artritídy systémovej sklerózy, ulceróznej kolitídy, *diabetes mellitus* 1. typu aj psoriázy (43).

1.3.3. Imunitné reakcia v patogenéze autoimunitných chorôb

Kľúčovým momentom v patogenéze autoimunitných chorôb je prelomenie tolerancie, ktorého príčina nie je stále ešte úplne jasná. K poruche môže dôjsť na ktoromkoľvek stupni v procese spracovania a prezentácie antigénu, kooperácie medzi bunkami imunitného systému alebo v efektorovej fáze imunitných reakcií.

Autoimunitná reakcia môže byť tak humorálneho, ako aj bunkového typu. V prípade humorálnych reakcií dochádza k tvorbe autoprotilátok, väčšinou triedy IgG, ktoré sa na poškodení tkaniva podieľajú aktiváciou komplementu (napr. pri Goodpasturovom syndróme) alebo tvorbou a ukladaním imunokomplexov do tkanív (napr. pri systémovom *lupus erythematosus*, *polyarteritis nodosa*). Bunkami sprostredkovaná autoimunitná reakcia je zase charakterizovaná poškodzujúcim zápalom tkaniva sprostredkovaným predovšetkým cytotoxickými a pomocnými T-lymfocytmi, ich cytokínovými produktmi a aktivovanými makrofágmi – napr. pri *diabetes mellitus* 1. typu, primárnej biliárnej cirhóze a pod. Pri

Gravesovej-Basedowovej chorobe a *myastenia gravis* sa uplatňuje V. typ imunopatologických reakcií spôsobený autoprotilátkami, ktoré tkanivo priamo nepoškodzujú, ale majú na jeho činnosť stimulačný, resp. inhibičný vplyv (5, 10).

Odhaduje sa, že v organizme človeka je približne 10 000 molekúl, ktoré môže imunitný systém potenciálne rozpoznávať ako autoantigény. Napriek tomu sa však doteraz podarilo potvrdiť len necelých 100, ktoré sú naozaj terčom autoprotilátok alebo autoreaktívnych T-lymfocytov (11).

T-lymfocytová odpoveď

Základom T-lymfocytovej odpovede je rozpoznanie antigénu antigénovo-špecifickými T_H1-lymfocytmi. Monocyty sa v zápalovom ložisku diferencujú na makrofágy. Interferón γ (IFN-γ) – principiálny cytokín, ktorý syntetizujú T_H1-lymfocyty, aktivuje makrofágy, čo sa prejaví ich zvýšenou mikrobicídnou aktivitou spôsobujúcou lýzu baktérií, ktoré pohltili. Aktivované makrofágy získajú aj zvýšenú tumoricídnu aktivitu. IFN-γ, spolu s IL-2 (ďalším T_H1 cytokínom), veľmi účinne aktivujú aj cytotoxické T-lymfocyty a NK-bunky, čím sa výber cytotoxických mechanizmov rozširuje.

Aktivované makrofágy poškodzujú terčové bunky jednak svojím priamym cytotoxickým pôsobením (produkciou a uvoľňovaním intermediárnych produktov kyslíka a dusíka) a jednak nepriamo produkciou cytokínov (najmä TNF), ktoré v terčových bunkách indukujú apoptózu. Pri prvotnom poškodení vlastných tkanív dôjde k uvoľneniu ďalších autoantigénov, ktoré boli dovtedy skryté a T-lymfocyty ich nerozpoznávali, čo ďalej akceleruje naštartované reakcie (tzv. *epitope spreading*). Na rozvoji autoimunitného procesu sa súčasne podieľa aj porucha regulačných mechanizmov, nerovnováha v cytokínovej sieti, ktorá sa mení v prospech proinflamačných (IL-1, IL-2, TNF, IFN-γ) na úkor antiinflamačných faktorov (IL-4, IL-10) (11). T-lymfocyty však súčasne produkujú MIF (faktor inhibujúci makrofágy), ktorý bráni makrofágom vycestovať mimo zápalového ložiska. Ak vo svojej aktivite pokračujú, produkujú IL-12 a IL-18, ktoré stimulujú T_H1-lymfocyty, aby produkovali IFN-γ a ten následne spätne stimuluje makrofágy; vyvíja sa chronická infekcia (2, 5).

T_H1-lymfocyty poskytujú tiež pomoc B-lymfocytom pri produkcii protilátok – vznikajú najmä protilátky podtried IgG1 a IgG3, ktoré aktivujú komplement, a tak sa zúčastňujú na cytotoxických reakciách (5).

V rámci T-lymfocytovej odpovede je však pre rozvoj choroby nevyhnutné aj chýbanie

alebo „nečinnosť“ prirodzených regulačných T-lymfocytov, ktoré za fyziologických okolností bránia rozvoju autoimunitných procesov (18, 45).

B-lymfocytová odpoveď

Aj v sére zdravých jedincov nachádzame tzv. fyziologické autoprotilátky. Na rozdiel od patologických sú prítomné v nízkych koncentráciách, voči antigénom sú nízkoafinitné, polyreaktívne a najčastejšie majú izotyp IgM (ale aj IgG a IgA) (5). Ich výskyt sa zvyšuje s vekom. Samotný laboratórny nález autoprotilátok teda ešte automaticky neznamená, že sa jedná o autoimunitnú chorobu.

Patologické autoprotilátky (najčastejšie IgG a IgA) sú spravidla prítomné vo vyšších titroch – zvýšenie koncentrácie môže odrážať aktivitu choroby, aj keď v mnohých prípadoch nemusí nález autoprotilátok a aktivita choroby jednoznačne korelovať. V priebehu choroby (aj vplyvom liečby) dochádza k zníženiu až spontánnemu vymiznutiu autoprotilátok (5, 10).

1.4. LIEČBA AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB

Imunomodulačnú liečbu s cieľom potlačiť prebiehajúce imunopatologické procesy u autoimunitných chorôb predstavuje imunosupresívna liečba, ktorá potláča abnormálnu aktivitu imunitného systému. Pravdepodobne najmä pomerne časté a nezanedbateľné nežiaduce účinky imunosupresív sú príčinou faktu, že mnohé autoimunitné choroby sú v súčasnosti ešte stále liečené skôr substitučnou terapiou exogénnymi preparátmi (napr. liečba inzulínom u diabetikov 1. typu, podávanie vitamínu B_{12} pri pernicióznej anémii, substitúcia hormónov štítnej žľazy pri autoimunitnej tyreoiditíde) ako kauzálnou imunosupresívnou liečbou. Situácia sa však mení, keďže tejto liekovej skupine a eliminácii nežiaducich účinkov sa v súčasnosti venuje veľká pozornosť.

Za podobný miľník v kauzálnej liečbe autoimunitných chorôb, akým bolo v minulom storočí použitie kortikoidov, je v klinickej praxi v súčasnosti považované zavedenie biologickej liečby s imunomodulačným účinkom. Táto liečba totiž cielene zasahuje do imunopatologických procesov, priamo ovplyvňuje vlastnú progresiu choroby a nielen klinické symptómy ako tomu bolo pri veľkej väčšine doteraz používaných liečiv; táto skupina je označovaná aj ako BRM – *biological response modifiers*.

Ako biologický liek môžeme označiť preparát pripravený biotechnologickými postupmi, teda produkciou v biologickom vektore (46). Od „klasických“ liekov (pripravených najčastejšie organickou syntézou) sa okrem technicky omnoho náročnejšieho spôsobu prípravy líšia veľkosťou a stabilitou molekuly (molekuly biologických liečiv sú väčšie

a náchylnejšie k degradácii) a ďalej aj selektivitou, ktorá klasickým liekom často chýba a cieleným, regulačným zásahom do biologických (etiopatogenetických) procesov (47).

V liečbe autoimunitných chorôb majú samozrejme najdôležitejšie postavenie biologické lieky s imunomodulačným účinkom – monoklonové protilátky a fúzne proteíny. Ich základné mechanizmy účinku sú najmä neutralizácia cieľového cytokínu, resp. jeho receptora, blokáda kostimulačných molekúl, navodenie apoptózy alebo zníženie proliferácie cieľovej bunky. Majú výrazný protizápalový účinok a rovnako dokážu spomaliť progresiu štrukturálneho a funkčného postihnutia (48).

Prvé monoklonové protilátky (mAb) boli vyvinuté už v sedemdesiatych rokoch minulého storočia a dodnes sa v tejto liekovej skupine používa pomerne zložité názvoslovie s príponou –mab (*monoclonal antibody*) (tab. 3).

Tab. 3 Názvoslovie monoklonových protilátok (upravené podľa 11, 49)

Indikácia na podanie monoklonovej autoprotilátky		Označenie pôvodu		Koncovka
–bac –	bakteriálne choroby	o (*–omab*)	myšie	***–mab***
–lim–	autoimunitné choroby	i (*–imab*)	z primátov	
–les–	zápalové lézie	u (*–umab*)	humánne	
–cit–	choroby cirkulačného systému	xi (*–ximab*)	chimérové	
–tu–	onkologické choroby	a (*–amab*)	potkanie	
–ki(n)–	interleukín	e (*–emab*)	zo škrečkov	

Mechanizmus účinku mAb na bunkovej úrovni môžeme rozdeliť na účinok priamy a nepriamy:

- priame pôsobenie vedie k neutralizácii solubilného antigénu, resp. k interakcii s povrchovým receptorom a následnej zmene vnútrobunkovej signálnej dráhy,
- nepriame pôsobenie predstavuje cytotoxicita závislá od komplement fixačnej reakcie alebo bunkami sprostredkovaná cytotoxicita; v prvom prípade sa po väzbe protilátky na cieľovú bunku klasickou cestou aktivuje komplement, následne dochádza k narušeniu bunkovej membrány a usmrteniu bunky; pri bunkami sprostredkovanej cytotoxicite sú cieľové bunky po opsonizácii fagocytované (opsonizáciu umožňuje expresia Fc receptorov niektorými populáciami leukocytov) (47, 48).

Fúzne proteíny, ktoré sú najčastejšie na báze Fc-fragmentu IgG1 protilátky a receptora pre niektorý cytokín, majú koncovku –cept. Na rozdiel od mAb nie sú schopné viazať komplement a aktivovať lýzu buniek (48).

Dnes sa biologická liečba využíva najmä v terapii reumatoidnej artritídy, nešpecifických črevných zápalov, psoriázy, psoriatickej artritídy a *sclerosis multiplex*, ďalej k prevencii akútnej rejekcie po transplantácii obličky a v neposlednom rade v onkológii (47, 49).

2. AUTOIMUNITNÝ DIABETES MELLITUS

Jednou z najčastejších autoimunitných chorôb a zároveň jednou z najčastejších chronických chorôb detského a mladého dospelého veku je autoimunitný *diabetes mellitus* 1. typu. Jeho incidencia je v ostatných desaťročiach vo svete a aj na Slovensku pomerne vysoká a má neustále stúpajúci trend – v súčasnosti choroba predstavuje nielen zdravotnícky, ale aj vážny ekonomický problém, nehovoriac o kvalite života pacientov odkázaných na exogénny prívod inzulínu. Celosvetovo sa preto kladie čoraz väčší dôraz na oblasť prevencie a na skoré vyhľadávanie potenciálnych diabetikov s cieľom predísť vývoju choroby alebo aspoň eliminovať možné komplikácie spojené s jej dlhotrvajúcim priebehom.

2.1. DEFINÍCIA A KLASIFIKÁCIA DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM) je chronická metabolická porucha spôsobená chýbajúcou alebo nedostatočnou sekréciou inzulínu, alebo jeho nedostatočným účinkom na úrovni buniek (50). Vzniká teda komplexná metabolická porucha, ktorá sa v období plne rozvinutého klinického obrazu prejavuje hyperglykémiou, glykozúriou, zvýšeným katabolizmom bielkovín a ketoacidózou (35, 51).

Najnovšia klasifikácia Americkej diabetologickej spoločnosti (*American Diabetes Association*, ADA) je založená najmä na etiológii choroby a rozlišuje tieto hlavné skupiny:

- *diabetes mellitus* 1. typu (DM1) – vzniká primárne následkom deštrukcie β-buniek pankreasu a nedostatočnej sekrécie inzulínu. Podľa príčiny ich deštrukcie sa ďalej delí na 2 podtypy:
  - DM1A – autoimunitný DM, ktorý vzniká na podklade autoimunitnej deštrukcie β-buniek pankreasu (predstavuje až 95 % pacientov),
  - DM1B – idiopatický DM, pri ktorom príčinu deštrukcie buniek pankreasu nepoznáme (5 %),
- *diabetes mellitus* 2. typu (DM2) – je podmienený hlavne inzulínovou rezistenciou v kombinácii s poruchou sekrécie inzulínu,
- špecifické typy *diabetes mellitus* – DM ako súčasť iných chorôb alebo syndrómov (súčasť genetických porúch, chorôb pankreasu, iných endokrinných chorôb, diabetes indukovaný účinkom liekov, hormónov alebo iných chemikálií),
- gestačný diabetes – vzniká v tehotenstve, najčastejšie v 24. až 28. týždni, jeho vznik

súvisí s antiinzulínovým pôsobením niektorých hormónov produkovaných placentou (napr. humánny placentárny laktogén, kortizol) (50).

2.2. EPIDEMIOLÓGIA AUTOIMUNITNÉHO DIABETES MELLITUS

Celosvetovo podľa Medzinárodnej diabetologickej federácie (*International Diabetes Federation*, IDF) trpí diabetom viac ako 371 miliónov ľudí. Podľa odhadov tejto uznávanej organizácie bude pritom v roku 2030 počet diabetikov už presahovať 550 miliónov (52, 53). Podľa súčasných štatistických údajov DM 1. typu tvorí až 5 – 10 % všetkých diabetikov (35, 53).

Celosvetovo sa počet diabetikov 1. typu u detí vo veku 1 – 14 rokov v roku 2003 odhadoval na 430 000 pacientov, v roku 2011 to však už bolo až 490 100. Ukazuje sa, že počet diabetikov 1. typu v populácii stúpa ročne priemerne o 3,9 % (tab. 4) (52, 54-57) a ich počet vo vekovej skupine do 5 rokov by sa mohol takto do roku 2020 zdvojnásobiť (55). *Diabetes mellitus* sa teda v celosvetovom meradle stáva pandémiou. Nárast incidencie sa však medzi populáciami mierne odlišuje: od 3,2 % v Európe, 4,0 % v Ázii až po 5,3 % v Severnej Amerike (56).

Diabetes mellitus 1. typu v SR postihuje 3,97 % obyvateľov (58), prevalencia v populácii detí do 14 rokov sa odhaduje na 0,1 % a incidencia v tejto vekovej skupine podľa údajov IDF z roku 2011 na 13,6/100 000 detí (52). Podľa údajov Národného centra zdravotníckych informácií bolo v roku 2012 v sledovaní diabetologických ambulancií približne 1900 diabetikov vo veku do 19 rokov, z čoho viac ako 370 pacientov bolo pritom novodiagnostikovaných. Medziročne počet novodiagnostikovaných pacientov v tejto vekovej skupine narástol o 50 prípadov (58).

Tab. 4 Porovnanie celosvetového výskytu DM 1. typu u detí vo veku 0 – 14 rokov v roku 2003 a 2011 (upravené podľa 52)

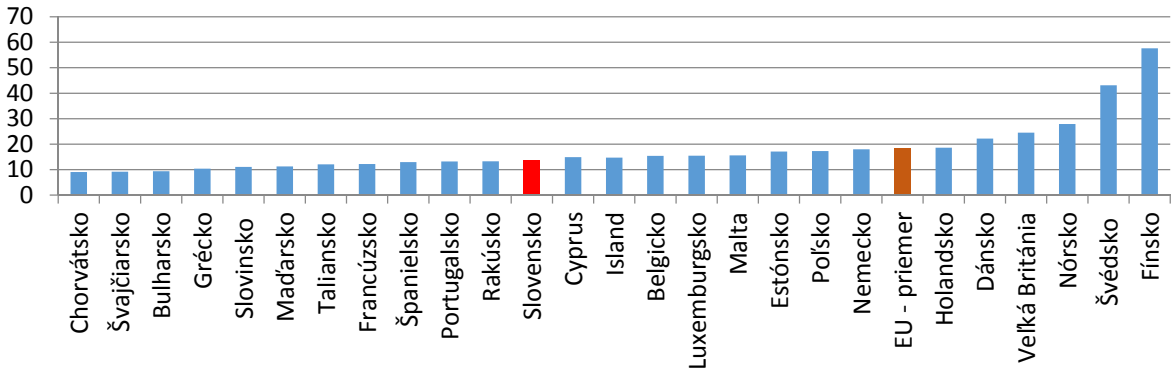
DIABETES MELLITUS 1.TYPU	2003	2011
Celosvetová detská populácia	1,8 miliardy	1,9 miliardy
Počet detí s DM 1. typu	430 000	490 100
Ročný nárast incidencie	+ 3,0 %	+ 3,9 %
Odhadované novodiagnostikované prípady ročne	65 000	77 800

Geografická variabilita: Jednou z charakteristík DM 1. typu je pomerne široká geografická variabilita vo výskyte choroby (obr. 5). DM 1. typu je typický najmä pre

kaukazoidnú a černošskú populáciu, v ázijských populáciách sa vyskytuje len zriedka (53).

Krajinami s najnižším výskytom DM 1. typu sú Venezuela, Peru, Pakistan a Čína, naopak najvyššia incidencia choroby je vo Fínsku, Sardínii, Švédsku, Kanade a Veľkej Británii (13, 57, 59). Existujú odhady, že u dieťaťa vo Fínsku je asi 400-krát väčšia pravdepodobnosť, že ochorie na DM1 ako u dieťaťa v Číne. Vo Fínsku sa od roku 1953 populácia diabetikov strojnásobila, ročne tu pribúda približne 2,4 % nových pacientov (57, 60).

Obr. 5 Porovnanie incidencie DM1 u detí do 14 rokov (na 100 000 obyvateľov) v krajinách Európskej únie v roku 2011 (52)



Podľa výsledkov štúdie *Diabetes Mondale* (*DiaMond*) je najvyššia incidenia choroby v populácii detí vo veku 10 – 14 rokov (56, 61). Zaujímavým faktom pritom je skutočnosť, že v uvedenej štúdii sa u detí diagnostikoval takmer výhradne *diabetes mellitus* 1. typu, avšak v podobnej štúdii SEARCH (*Search for Diabetes in Youth*) realizovanej v americkej populácii bol v tejto vekovej skupine zaznamenaný aj výskyt *diabetes mellitus* 2. typu (v kaukazoidnej populácii 6 % a u amerických Indiánov dokonca až u 76 % respondentov) (62).

Podľa štúdie EURODIAB je v rámci Európy najvyšší nárast incidencie v stredovýchodnej Európe (Slovensko, Maďarsko, Rumunsko, Poľsko) – relatívny nárast sa odhaduje na 5,3 % (zatiaľ čo v západnej Európe iba na 3,9 %) a vo vekovej skupine 1 – 4 roky 6,3 % (tab. 5). V rámci Európy je podľa tejto štúdie najnižší výskyt v Macedónsku – 3,2/100 000/rok (54, 63).

Tab. 5 Rozdiely v náraste incidencie choroby v rozdielnych vekových skupinách (štúdia EURODIAB) (54, 63).

Vek	Ročný nárast incidencie
0 – 4 roky	6,3 %
5 – 9 rokov	3,1 %
10 – 14 rokov	2,4 %

Veková závislosť: Choroba je veľmi zriedkavá pred 9. mesiacom života a vrcholí medzi 5. – 15. rokom, s pribúdajúcim vekom incidencia klesá (64). Všeobecne akceptovaným názorom je, že DM 1. typu je predovšetkým chorobou detí a mladých dospelých (vo veku do 20 rokov veku je diagnostikovaných viac ako 85 % pacientov), avšak objaviť sa môže v akomkoľvek období života (13). V súčasnosti zachytávame najvyšší nárast počtu pacientov práve v najmladších vekových skupinách. U dospelých má choroba spravidla menej akútny začiatok a pomalší priebeh inzulitídy, ale aj nižšiu frekvenciu genetických rizikových faktorov (13, 57, 65).

V detstve sú vznikom autoimunitného DM ohrozené obidve pohlavia približne rovnako, neskôr sú v incidencii choroby viditeľné dva vrcholy zodpovedajúce puberte dievčat a chlapcov, kedy je v organizme zvýšená potreba inzulínu (u dievčat priemerne o 1 – 2 roky skôr) (17). U pacientov s *diabetes mellitus* 1. typu sa teda nestretávame s výraznou prevahou žien tak, ako je tomu pri iných autoimunitných chorobách. Vo všeobecnosti platí, že v populáciách s vysokým výskytom DM 1. typu ľahko prevažujú muži, naopak v populáciách s nízkym výskytom choroby prevažujú ženy (66). V kaukazoidnej populácii sa v dospelosti pomer žien a mužov odhaduje na 1 : 1,3 až 1 : 2,15, v európskej populácii diabetikov 1. typu vo veku 15 – 40 rokov bol pomer mužov a žien 3 : 2 (27, 57, 66).

Sezónna variabilita: Z literatúry je tiež známa tzv. sezónna variabilita v incidencii DM 1. typu (13, 27). Najviac nových prípadov tohto druhu DM totiž pozorujeme v obdobiach, kedy je organizmus prirodzene náchylnejší k vírusovým infekciám – skorá jar, jeseň, zima (67). Pri infekcii, rovnako ako pri strese alebo traume, sú totiž v organizme vo zvýšenej miere vyplavované kontraregulačné hormóny inzulínu (katecholamíny, glukokortikoidy, glukagón), čo za fyziologických okolností organizmus kompenzuje vyplavením väčšieho množstva inzulínu. Avšak pacient s dovtedy latentným *diabetes mellitus* 1. typu takéhoto zvýšenia hladiny inzulínu nie je schopný. Infekcia ešte urýchli už dlhšie trvajúci proces deštrukcie β-buniek pankreasu a choroba sa manifestuje (68). O variabilite viazanej na ročné obdobia a o infekcii ako rizikovom faktore sa však začína pochybovať u najmladších pacientov, u ktorých je inzulitída spravidla agresívnejšia a deštrukcia β-buniek

prebieha príliš rýchlo na to, aby mohla byť výraznejšie akcelerovaná infekciou (65).

Podľa novších zistení môže výskyt choroby ovplyvňovať aj mesiac, resp. ročné obdobie, v ktorom sa pacient narodil. Vo viacerých krajinách (USA, Nový Zéland, Izrael, Ukrajina, Holandsko, Švédsko) bol pozorovaný vyšší výskyt choroby u detí narodených v jarných mesiacoch (apríl – jún až júl) a naopak menej pacientov s dátumom narodenia v jesenných, resp. zimných mesiacoch (november – február). Jedným z vysvetlení tohto faktu môže byť rozdiel v hladine materského vitamínu D v rôznych ročných obdobiach a jeho následný vplyv na pankreatické bunky a na bunky imunitného systému (56).

Vplyv pozitívnej rodinnej anamnézy: Postihnuté sú častejšie deti diabetických otcov, ktoré majú 7 % riziko objavenia sa choroby (deti diabetických matiek len 2 %), pri oboch rodičoch diabetikoch je riziko asi 30 % (53, 57). Rovnako je u týchto detí vyššia prevalencia autoprotilátok proti antigénovým štruktúram β-buniek pankreatických ostrovčekov (tab. 6). Vysvetlením by mohla byť buď vyššia paternálna transmisia predispozičných HLA- génov alebo ochrana navodená interakciou medzi matkou diabetičkou a plodom (27, 35).

Tab. 6 Pozitivita autoprotilátok u detí diabetických rodičov (27)

Autoprotilátka namierené proti autoantigénom	**Deti otcov – diabetikov**	**Deti matiek – diabetičiek**
Dekarboxyláza kyseliny glutámovej (GADA)	11,5 %	2,1 %
Tyrozínfosfatáza (IA-2A)	8,1 %	2,8 %
Inzulín (IAA)	10,8 %	1,4 %

Perinatálnymi rizikovými faktormi rozvoja autoimunitných procesov sú pôrodná hmotnosť, predčasný pôrod, pôrod cisárskym rezom, nízke hodnoty Apgar-skóre a vek matky v dobe pôrodu. Úlohu pravdepodobne zohráva aj hodnota glykovaného hemoglobínu matky – diabetičky. V štúdii BABYDIAB sa totiž hodnoty viac ako 7 % spájali s častejším výskytom špecifických autoprotilátok (64). U 86 % detí zaznamenali v tejto štúdii hneď po narodení prítomnosť protilátok voči exogénnemu inzulínu a až u 66 % boli pozitívne protilátky proti glutamátdekarboxyláze kyseliny glutámovej (GADA) alebo proti tyrozínfosfatáze β-buniek pankreasu (IA-2A). Ďalším sledovaním sa však ukázalo, že fetálna expozícia autoprotilátkam má neskôr u detí, u ktorých sa zachytila pozitivita autoprotilátok už pri narodení, ochranný vplyv na rozvoj autoimunitného postihnutia pankreasu. Výsledky týchto sledovaní opätovne prispievajú k vysvetleniu faktu, prečo sú častejšie postihnuté deti otcov – diabetikov. Prítomnosť DM u matky sa spája aj s vyššou pôrodnou hmotnosťou a nižším gestačným vekom (69).

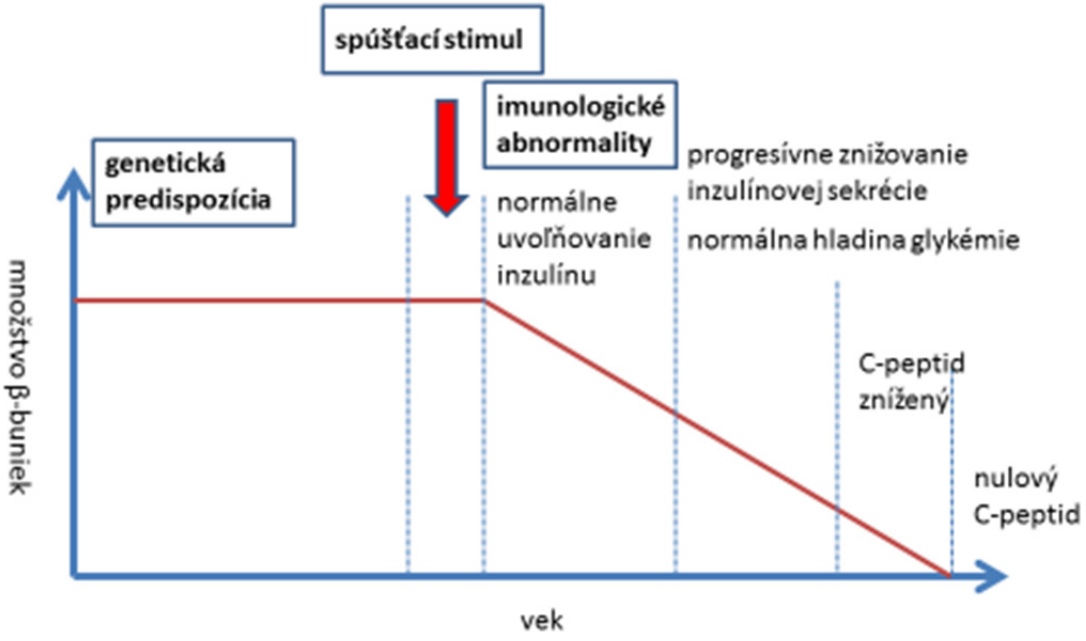
Frekvencia výskytu autoprotilátok sa medzi chlapcami a dievčatami nelíši. Zaujímavé sú výsledky pozorovaní, že ak matka nemá DM, riziko vzniku choroby pre dieťa stúpa s jej vekom, naopak, ak je matka diabetička, riziko pre dieťa s jej vekom klesá (27).

2.3. ETIOPATOGENÉZA AUTOIMUNITNÉHO DIABETES MELLITUS

Vznik autoimunitného *diabetes mellitus* podmieňujú genetické, environmentálne a imunitné faktory. Autoimunitná reakcia spôsobujúca inzulitídu, tvorba autoprotilátok a následná deštrukcia β-buniek pankreasu sa spúšťa zatiaľ nie presne definovaným environmentálnym stimulom. K opisovanému priebehu dochádza najčastejšie u geneticky predisponovaných jedincov. Výsledkom je deštrukcia β-buniek Langerhansových ostrovčekov pankreasu a následný absolútny nedostatok endogénneho inzulínu, čo pre pacienta v súčasnosti znamená doživotnú závislosť od exogénneho prívodu tohto hormónu (51, 70, 71).

Autoimunitnú teóriu vzniku *diabetes mellitus* 1. typu zobrazuje schéma podľa Eisenbartha (obr. 6), ktorá napriek tomu, že bola vypracovaná už pred 30 rokmi, nestratila nič zo svojej výpovednej hodnoty (72, 73):

Obr. 6 Schéma etiopatogenézy autoimunitného DM (72)



• 1. štádium – genetická susceptibilita: Určití jedinci majú genetickú predispozíciu k rozvoju autoimunitného DM danú prítomnosťou určitých aliel hlavného histokompatibilného systému a iných predispozičných génov.

• 2. štádium – spúšťací mechanizmus: Podľa súčasných výskumov je ním najpravdepodobnejšie vírusová infekcia. Spúšťací mechanizmus sa zrejme odohrá aj niekoľko rokov pred prvou klinickou manifestáciou choroby.

• 3. štádium – počínajúca inzulitída: Infiltrácia Langerhansových ostrovčekov pankreasu bunkami imunitného systému (predovšetkým makrofágmi a T-lymfocytmi), v periférnej krvi pozitivita špecifických autoprotilátok proti antigénom β-buniek pankreasu (najčastejšie proti dekarboxyláze kyseliny glutámovej – GADA, proti tyrozínfosfatáze – IA-2A, proti inzulínu – IAA, proti zinkovému transportéru 8 – ZnT8A).

• 4. štádium – plne vyvinutá inzulitída: Zápal tkaniva so zatiaľ ešte dostatočnou, ale postupne klesajúcou sekréciou inzulínu.

• 5. štádium – manifestný *diabetes mellitus*: Príznaky choroby sa prejavia až vtedy, keď je zničených viac ako 80 % všetkých β-buniek pankreasu. K manifestácii dochádza za typických klinických príznakov buď pozvoľna alebo častejšie akútne, najmä pri väčšej fyzickej alebo psychickej záťaži (typicky pri infekcii – angína, viróza, pri traume alebo v súvislosti s dlhotrvajúcim stresom). Tieto udalosti diabetes rozhodne nevyvolávajú, len uľahčujú jeho manifestáciu pri zvýšenej potrebe inzulínu, resp. pri súčasnej, s chorobou spojenej inzulínovej rezistencii. Po ich odoznení môže zvyšková sekrécia pretrvávať ešte niekoľko mesiacov (vzácne aj rokov) a klinické príznaky môžu počas tejto doby ustúpiť (tzv. *honey-moon period*).

• 6. štádium – štádium nulovej sekrécie vlastného inzulínu: Postupujúci imunopatologický proces vedie k úplnej deštrukcii všetkých β-buniek pankreasu, jedinec je teda plne závislý od exogénneho prívodu inzulínu (72, 73).

2.3.1. Genetická predispozícia k vývoju autoimunitného diabetes mellitus

Úloha genetických faktorov v patogenéze choroby bola potvrdená najmä rodinnými štúdiami o konkordantnosti vývoja choroby u súrodencov (tab. 7) – pre jednovaječné dvojčatá je pravdepodobnosť vývoja choroby u druhého z dvojčiat približne 40 %, u dvojvaječných sa znižuje na 5 % (aj toto riziko je však asi 25 – 50 krát vyššie ako všeobecné populačné riziko, ktoré sa odhaduje na 0,1 – 0,3 %) (6, 26, 74). Prvostupňového príbuzného s touto chorobou má v rodine asi 10 % pacientov s DM 1. typu (27, 75). Podiel

familiárneho výskytu sa podľa výsledkov štúdie EURODIAB pohyboval od 2,7 % v Rumunsku po 17,2 % vo Fínsku (54, 63).

U jednovaječných dvojčiat vyrastajúcich v rozdielnom prostredí sa pravdepodobnosť výskytu znižuje s dĺžkou doby odlúčenia, avšak diabetes sa môže u druhého z dvojčiat objaviť aj po viac ako 40-ich rokoch trvania choroby u jedného z nich (26), rovnako je u nich vyššia aj pozitivita protilátok proti β-bunkám pankreasu. U väčšiny jednovaječných dvojčiat pacientov s DM 1. typu, u ktorých sa nachádzajú protilátky proti β-bunkám pankreasu, sa neskôr diabetes aj vyvinie (75).

Genetický základ tejto choroby je, rovnako ako u iných autoimunitných chorôb, polygénový – v súčasnosti bolo identifikovaných približne 70 génov, ktoré rôznou mierou vplývajú na rozvoj DM 1A (6, 76). Najsilnejšie je choroba asociovaná s génmi hlavného histokompatibilného systému – relatívne riziko jednotlivých MHC predisponujúcich haplotypov sa pohybuje medzi hodnotami 3 až 50 v porovnaní s menej ako 3 pre non-MHC gény (40, 77).

Tab. 7 Riziko DM1 podľa príbuzenského vzťahu (upravené podľa 27, 53)

Príbuzenský vzťah	**Riziko probanda**
Bežná populácia	0,1 – 0,4 %
Súrodenec - - HLA – monozygotné dvojča pacienta s DM1 - - HLA – identický súrodenec pacienta s DM1 - - HLA – haploidentický súrodenec pacienta s DM1 - - HLA – neidentický súrodenec	 30 – 50 % 12 – 24 % 4 – 7 % 1 – 2 %
Deti - - DM1 má otec - - matka vo veku do 25 rokov - - matka vo veku nad 25 rokov - - DM1 majú obidvaja rodičia	 4 – 6 % 4 % 1 % 25 – 30 %

Idiopatický DM1B je, na rozdiel od DM1A, podľa niekoľko málo prác venovaných tejto problematike, typický pre africkú a ázijskú populáciu a nie je príliš významne asociovaný s HLA-molekulami (13).

Molekuly HLA komplexu a autoimunitný diabetes mellitus

Vo vzťahu k autoimunitnému DM 1. typu sú známe významné asociácie s HLA-antigénmi prvej a druhej triedy. Ako prvý bol už v začiatkoch hľadania vzťahov medzi chorobami a HLA-molekulami opísaný jeho vzťah k molekulám HLA-B8, HLA-B15 a HLA-B18, ktoré sa však neskôr ukázali ako menej významné (30). Najvýznamnejšie je autoimunitný DM asociovaný s HLA-molekulami, resp. alelami druhej triedy (tab. 8). V predikcii geneticky podmienenej vnímavosti je dokázaná výrazná pozitívna asociácia s **HLA-DR3** a **HLA-DR4**, ktoré kódujú alely *HLA-DRB1*03:01*, resp. *HLA-DRB1*04:01*. Uvedené HLA-molekuly sa vyskytujú u približne 95 % pacientov s DM 1. typu. Ešte významnejšie je autoimunitný DM asociovaný s molekulami **HLA-DQ2** a **HLA-DQ8**, ktoré determinujú alely *DQA1*05:01* a *DQB1*02:01*, resp. alely *DQA1*03:01* a *DQB1*03:02* (HLA-DQ sú heterodiméry s α-reťazcom kódovaným DQA1- a β-reťazcom kódovaným DQB1-génom) (6, 26, 71, 78, 79).

Za najvýznamnejší rizikový faktor v patogenéze *diabetes mellitus* 1. typu sa však považujú alely ***HLA-DQB1*** (6, 71, 74). Najdôležitejším predispozičným haplotypom je *DQA1*05:01/-DQB1*02:01* (tieto alely determinujú molekulu HLA-DQ2), ktorý sa takmer vždy spája spolu s alelou *DRB1*03:01* (HLA-DR3) a haplotyp *DQA1*03:01/-DQB1*03:02* (tieto alely determinujú molekulu HLA-DQ8), ktorý sa obyčajne spája s alelou *DRB1*04:01* alebo *DRB1*04:02* (obe alely determinujú molekulu HLA-DR4) (26, 80, 81, 82). Takýchto jedincov označujeme ako heterozygotov DR3/DR4 alebo DQ2/DQ8. Absolútne riziko vývoja autoimunitného DM pre jedincov s uvedenými HLA-DQ haplotypmi predstavuje hodnotu približne 5 %. Ak však ide o rodiny s diabetickou záťažou, tak prítomnosť uvedených haplotypov zvyšuje toto absolútne riziko až na 20 %. Najrizikovejšie zoskupenie predispozičných aliel kódujúcich antigény HLA-DR3, -DQ2/HLA-DR4, -DQ8 sa vyskytuje asi u 30 – 40 % diabetikov a v 7 – 12 % u detí diabetikov, čo ostro kontrastuje s jeho len 2 % výskytom v zdravej populácii (tab. 9) (26, 80). Štúdia *Human Biological Data Interchange* odhalila, že alely *DQA1*05:01/-DQB1*02:01* a *DQA1*03:01/ -DQBl*03:02* pritom zdedí po rodičoch viac ako 80 % detí s DM1. typu (83).

Tretí lokus v rámci HLA druhej triedy, HLA-DP, má tiež svoje postavenie v patogenéze, aj keď pravdepodobne slabšie ako uvádzané DR- a DQ-alely. Ako predispozičné sa javia alely *HLA-DPB1*03:01* a *DPB1*02:02*, ktoré sú však vo väzobnej nerovnováhe s ostatnými predispozičnými DR- a DQ-alelami (40, 74, 77, 84, 85, 86).

Tab. 8 Predispozičné a protektívne HLA haplotypy v patogenéze autoimunitného DM (upravené podľa 79, 84, 86)

RIZIKOVÉ HAPLOTYPY			
Vysoké riziko			
DR3	*DRB1*03:01*	*DQA1*05:01*	*DQB1*02:01*
DR4	*DRB1*04:01*	*DQA1*03:01*	*DQB1*03:02*
	*DRB1*04:02*	*DQA1*03:01*	*DQB1*03:02*
	*DRB1*04:05*	*DQA1*03:01*	*DQB1*03:02*
Stredné riziko			
DR1	*DRB1*01*	*DQA1*01:01*	*DQB1*05:01*
DR8	*DRB1*08:01*	*DQA1*04:01*	*DQB1*04:02*
DR9	*DRB1*09:01*	*DQA1*03:01*	*DQB1*03:03*
PROTEKTÍVNE HAPLOTYPY			
Vysoká ochrana			
DR2	*DRB1*15:01*	*DQA1*01:02*	*DQB1*06:02*
DR6	*DRB1*14:01*	*DQA1*01:01*	*DQB1*05:03*
DR7	*DRB1*07:01*	*DQA1*02:01*	*DQB1*03:03*
Stredne silná ochrana			
DR5	*DRB1*11:01*	*DQA1*05:01*	*DQB1*03:01*
Slabá ochrana			
DR4	*DRB1*04:01*	*DQA1*03:01*	*DQB1*03:01*
	*DRB1*04:03*	*DQA1*03:01*	*DQB1*03:02*
DR7	*DRB1*07:01*	*DQA1*02:01*	*DQB1*02:01*

Okrem týchto, tzv. susceptibilných (predispozičných) génov, sa v etiopatogenéze autoimunitného DM uplatňujú aj tzv. protektívne gény (tab. 8). Medzi tieto zaraďujeme najmä molekulu **HLA-DR2** (determinuje ju alela *HLA-DRB1*15:01*) a **HLA-DQ6** (*DQB1*06:02*) (26, 80, 81, 82). Tieto molekuly sa považujú za faktor rezistencie – u diabetikov 1. typu sa vyskytujú len v 1 %, kým v zdravej populácii až v 20 %. Z HLA-DP aliel možno ako protektívnu označiť najmä alelu *DPB1*04:02* (26, 74, 84-86, 88).

Tab. 9 Prítomnosť niektorých HLA aliel a riziko vývoja DM1A v bežnej populácii v porovnaní s rodinnými príslušníkmi diabetika 87 (28)

	Bežná populácia	**Rodina diabetika**
DQ8/ DQ2	1:4	1:25
DQ8/ DQ8	1:10	1:60
DQ8/ DQx	1:10	1:60
DQ2/ DQ2	1:10	1:350
DQ2/ DQx	1:20	1:400

Pozn.: x = existencia viacerých izoforiem

Vplyv na predispozíciu k vzniku choroby majú však okrem už spomenutých susceptibilných a protektívnych génov aj iné, tzv. neutrálne HLA gény. Ukazuje sa totiž, že určitá špecifická kombinácia HLA-aliel modifikuje pôvodné riziko vnímavosti k chorobe

určované základnou predispozičnou alelou – hovoríme o tzv. fenoméne epistázy, ktorý spôsobuje, že relatívne riziko sa pohybuje v rozmedzí od 2 do 10 (89).

V ostatných rokoch sa však ukazuje, že vplyv genetických faktorov sa oslabil – na to, aby pacient ochorel na DM1 je v súčasnosti treba menej genetických predispozičných faktorov ako v minulosti a DM dostávajú vo zvýšenej miere aj pacienti so slabou alebo dokonca žiadnou genetickou predispozíciou (13). Ukazuje sa tiež, že so stúpajúcim vekom v čase manifestácie choroby (najmä po 55. roku života) sa predispozičný, resp. protektívny vplyv HLA-molekúl taktiež vytráca (90). Svedčí o tom aj závislosť výskytu choroby u monozygotných dvojčiat v závislosti od ich veku. Najvyšší výskyt choroby bol totiž zaznamenaný u súrodencov pacientov, u ktorých sa choroba diagnostikovala do 10. roku života – u súrodencov sa vyskytla až u 50 %, v porovnaní s 23 % súrodencov pacientov, ktorí boli v čase stanovenia diagnózy starší ako 10 rokov. Rovnako tak u monozygotných dvojčiat pacientov s diagnózou stanovenou vo veku viac ako 25 rokov sa choroba vyskytla len u 6 % v porovnaní s 38 % u súrodencov pacientov, ktorí boli pri stanovení diagnózy mladší ako 25 rokov (tab. 10) (91).

Tab. 10 Výskyt autoimunitného DM u monozygotných dvojčiat pacientov v závislosti od ich veku pri stanovení diagnózy (upravené podľa 91)

Vek (roky)	viac ako 10 rokov	menej ako 10 rokov
Výskyt choroby	23 %	50 %
Vek (roky)	viac ako 15 rokov	menej ako 15 rokov
Výskyt choroby	13 %	44 %
Vek (roky)	viac ako 25 rokov	menej ako 25 rokov
Výskyt choroby	6 %	38 %

Medzi predispozičnými a protektívnymi HLA-molekulami existujú určité štrukturálne a funkčné odlišnosti, z ktorých najvýznamnejšia je 57. pozícia β-reťazca DQ molekúl, ktorá rozhoduje o tom, či sa patognomický peptid do žliabku nadviaže alebo nie (18).

Ak je totiž v tejto pozícii nenabitá aminokyselinová jednotka, napr. alanín alebo serín, ako je tomu pri predispozičnej DQ8-molekule, peptid sa do vrecka môže naviazať a jeho ukotvenie je pevné, lebo negatívne nabitá aminokyselinová jednotka peptidu v 9. pozícii vytvára silnú iónovú väzbu s kladne nabitým arginínom (Arg) na 79. pozícii α-reťazca. Pevná väzba zároveň predĺži dobu expozície peptidu autoreaktívnym T-lymfocytom s následným rozvojom autoimunitnej odpovede. Peptidy, ktoré sa viažu do žliabku DQ8

molekúl, sa už podarilo identifikovať – ide o peptid SHLVEALYLVCGERG pochádzajúci z pozícií 9 - 23 β-reťazca inzulínu a peptid IARFKMFPEVKEK z dekarboxylázy kyseliny glutámovej (skratky označujú jednopísmenové označenie aminokyselín). Ak je však 57. pozícia β-reťazca obsadená kyselinou asparágovou, ako je tomu napr. pri molekule DQ7, peptid sa do vrecka nemôže naviazať pre sterickú zábranu, ktorá sa vytvára pri iónovej interakcii medzi kyselinou asparágovou v β-reťazci a arginínom v α-reťazci žliabku. Aminokyselinová jednotka v 57. pozícii takto slúži ako „molekulový vrátnik“, ktorý v konečnom dôsledku bráni rozvoju autoimunitnej odpovede u konkrétneho jedinca (18, 92).

V rámci sledovania vzťahov medzi HLA-molekulami, resp. alelami sa okrem predispozičného alebo protektívneho vplyvu na vznik choroby dokázal aj vplyv na jej klinický priebeh. Niektoré HLA-molekuly či alely, resp. ich špecifická kombinácia, môžu totiž ovplyvňovať rýchlosť progresie inzulitídy a teda aj dobu zachovania zvyškovej sekrécie inzulínu, ako aj vek pri nástupe choroby, jej metabolickú stabilitu, príp. asociáciu s inými autoimunitnými chorobami (27).

U pacientov s haplotypom *HLA-DRB1*03:0x/DQB1*02:01/DQA1*05:01* je spravidla klinický obraz choroby miernejší, prebieha pomalšie, častejšie začína až v dospelom veku a je metabolicky stabilnejšia. Uvedená kombinácia aliel sa častejšie združuje s pozitivitou autoprotilátok GADA. U týchto pacientov je však častejší aj výskyt iných autoimunitných chorôb (najmä autoimunitnej tyreopatie) (26, 27, 74).

Naopak u pacientov s haplotypom *HLA-DRB1*04:0x/DQB1*03:02/DQA1*03:01* je častejšie pozorovaná pozitivita autoprotilátok IA-2 a IAA, priebeh choroby je rýchlejší a agresívnejší, začína v mladšom veku a je metabolicky labilnejšia. Najťažší priebeh choroby pozorujeme u pacientov so vzájomnou kombináciou aliel *HLA-DRB1*03:0x, *04:0x/ DQB1*02:01, *03:02* (26, 27, 74).

V štúdii BABYDIAB sa uvádza, že riziko objavenia sa niektorej z autoprotilátok do 2. roka života u detí rodičov – diabetikov, ktorí nesú najrizikovejšie HLA-alely, je 20 % v porovnaní s deťmi, ktoré tieto alely nemajú (64). V ďalšej štúdii DAISY až polovica detí, ktoré mali typické „diabetické“ autoprotilátky, vlastnilo haplotypy *HLA-DR3, -DQ2 / HLA-DR4, -DQ8* (27, 93).

2.3.2. Imunitné reakcie v patogenéze autoimunitného diabetes mellitus

Všeobecnou charakteristikou vzniku choroby je genetická vnímavosť k jej vývoju, zatiaľ však nie je presne definovaný spúšťací stimul, ktorý spúšťa kaskádu autoimunitných reakcií.

Ich výsledkom je v prípade autoimunitného *diabetes mellitus* deštrukcia β-buniek Langerhansových ostrovčekov pankreasu a následný absolútny nedostatok endogénneho inzulínu (15). Chronický deštruktívny proces zahŕňa tak mechanizmy bunkovej, ako aj humorálnej imunity (pozri aj kap. 1.3.3).

T-lymfocytová odpoveď

Zásadnú úlohu v procese autoimunitnej deštrukcie β-buniek pankreasu zohráva T_H1 subpopulácia $CD4^+$ lymfocytov, ktorá koordinuje imunitnú odpoveď a prostredníctvom interleukínu-2 a interferónu gama indukuje a akceleruje deštrukciu β-buniek. Efektorovou populáciou v procese autoimunitnej deštrukcie sú cytotoxické $CD8^+$ bunky (aktivované IL-2 a IFN-γ), ktoré priamo deštruujú β-bunky pankreasu svojimi cytotoxickými molekulami (granulyzín, perforíny vytvárajúce kanál, cez ktorý prechádzajú granzýmy, ktoré indukujú apoptózu) alebo indukciou apoptózy. Sú najpočetnejšou populáciou imunitných buniek, ktoré infiltrujú tkanivo pankreasu (18, 82). IFN-γ ďalej stimuluje makrofágy, ktoré ďalej poškodzujú tkanivo pankreasu cytotoxickými procesmi (2, 13, 98).

Rovnováha v cytokínovej sieti sa mení v prospech proinflamačných (IL-1β, TNF-α) a cytokínov T_H1 (IL-2, IL-12, IFN-γ, LT- β) na úkor regulačných (IL-4, IL-10, TGF- β). T_H2 subpopulácia $CD4^+$ lymfocytov „súťaží“ s T_H1 subpopuláciou a predstavuje takto protektívny faktor v patogenéze DM 1. typu. Choroba teda vzniká v prostredí dysbalancie obidvoch subpopulácií (11, 94). Podľa súčasných poznatkov sú $CD8^+$ T-lymfocyty nevyhnutné na naštartovanie autoimunitných procesov, zatiaľ čo $CD4^+$ T-lymfocyty budú v ďalších fázach prispievať k udržaniu a pretrvávaniu započatých reakcií (45).

Histologicky v iniciálnej fáze choroby pozorujeme periduktálnu a perivaskulárnu infiltráciu prevažne mononukleárnymi bunkami (periinzulitída). Zápalová infiltrácia začína v oblasti tesného susedstva Langerhansových ostrovčekov, v okolí malých pankreatických vývodných duktulov a krvných ciev. Až po určitom čase sa infiltrácia rozširuje a napadá vlastné Langerhansove ostrovčeky. Nasleduje invazívna inzulitída – histologická štruktúra Langerhansových ostrovčekov sa mení a dostáva tvar typický pre lymfatické uzliny. Na tejto prestavbe tkaniva sa zúčastňuje predovšetkým lymfotoxín beta (LT-β), ktorý je za fyziologických okolností nevyhnutný pre vývoj charakteristickej štruktúry lymfatických uzlín. Význam bunkovej imunity v patogenéze autoimunitného DM dokazuje aj skutočnosť, že inzulitída sa dá experimentálne preniesť prenosom T_H1 buniek (95, 96).

B-lymfocytová odpoveď

V plazme chorých s autoimunitným DM sa nachádzajú početné protilátky produkované B-lymfocytmi, z ktorých väčšina sa ale na deštrukcii β-buniek priamo nezúčastňuje, aspoň nie v počiatočných fázach choroby a sú len odrazom deštruktívnej inzulitídy (98). Najčastejšie sa jedná o protilátky triedy IgG1. Ich praktický význam spočíva v tom, že sú u pacientov detekovateľné aj niekoľko rokov pred objavením sa diabetu v tzv. prediabetickej fáze, rovnako ako aj u príbuzných diabetikov, čo umožňuje aktívne vyhľadávanie potenciálnych pacientov a včasný začiatok liečby s cieľom čo najviac spomaliť deštrukciu β-buniek a oddialiť vyhasnutie endogénnej tvorby inzulínu (15, 17, 97, 98).

Podávaním exogénneho inzulínu v čo najskorších štádiách choroby sa uvoľní metabolický stres, β-bunky pankreasu môžeme týmto uviesť do „pokojného“ štádia (*cell rest*). Redukujú sa tým nároky na β-bunky, čo môže spomaliť prebiehajúci deštruktívny proces, predĺžiť obdobie zvyškovej sekrécie endogénneho inzulínu a spomaliť progresiu mikro- aj makrovaskulárnych komplikácií DM. Nenapraviteľné škody by v tomto období mohla u pacientov, chybne diagnostikovaných ako DM2, spôsobiť liečba perorálnymi antidiabetikami, ktorých mechanizmom účinku je stimulácia β-buniek a ktorá by len ďalej akcelerovala autoimunitnú deštrukciu (99, 100).

V čase klinického stanovenia diagnózy je jedna alebo viac protilátok prítomná u 80 – 90 % pacientov, v priebehu choroby však pozitivita protilátok u väčšiny pacientov postupne klesá. Len málokedy sú prítomné pred 6. mesiacom veku (vzhľadom na vývoj imunitného systému v tomto veku totiž humorálnu imunitu zabezpečujú materské protilátky). Najčastejšie sa diagnostikujú vo veku 1 – 2 rokov, ďalší nárast pozorujeme v puberte (13, 64, 101, 102).

Ako prvé boli v krvi pacientov s autoimunitným DM opísané protilátky proti bunkám Langerhansových ostrovčekov (*islet cell antibodies*, ICA), ktoré reagujú proti membránovým a cytoplazmovým antigénom prítomným nielen v β-bunkách (produkujúcich inzulín), ale aj v α-bunkách (produkujúcich glukagón) a δ-bunkách (produkujúcich somatostatín). Práve heterogenita antigénových štruktúr, voči ktorým sú ICA namierené, zložitosť ich stanovovania a rýchle vymiznutie limitujú ich využitie v praxi (27, 35). U novodiagnostikovaných diabetikov sa nachádzajú v 70 – 80 %, v bežnej populácii však len u 0,1 – 3 % (98, 103).

Pre autoimunitný DM sú ďalej typické protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutámovej (*glutamic acid decarboxylase antibodies*, GADA). Rozoznávame dve izoformy tohto enzýmu (s približne 65 % homológiou, obe kódované rozdielnymi génmi), ktoré sa podľa

molekulovej hmotnosti označujú ako GAD65 – glutamátdekarboxyláza zložená z 585 aminokyselinových jednotiek a GAD67 zložená z 594 aminokyselinových jednotiek. V patogenéze DM 1. typu je významnejšia GAD65, ktorá je omnoho častejšou izoformou v bunkách Langerhansových ostrovčekov človeka (27, 104).

GADA sú v čase diagnózy prítomné približne u 80 % pacientov. V porovnaní s ostatnými autoprotilátkami ich prítomnosť aj koncentrácie pretrvávajú dlhšie, senzitivita presahuje 70 – 80 % a špecifita je viac ako 90 % (87, 98). Výskyt GADA u prvostupňových príbuzných pacientov s autoimunitným DM je 5 – 9 %, v bežnej populácii je ich pozitivita menšia ako 2 %. Prítomnosť GADA sa najčastejšie združuje s prítomnosťou aliel *HLA- DRB1*03, -DQA1*05:01 a -DQB1*02:01* a z hľadiska klinického priebehu odráža pomalší a menej agresívny priebeh choroby (sú najčastejšou protilátkou zisťovanou u pacientov so začiatkom choroby vo vyššom veku) (17, 105-110).

Najlepšie charakterizované antigény (IA-2) sú dve štrukturálne príbuzné proteínové tyrozínfosfatázy β-buniek – IA-2α je transmembránový proteín s tyrozínfosfatázovou aktivitou zložený z 979 aminokyselinových jednotiek a IA-2β je proteín zložený z 986 aminokyselinových jednotiek. Protilátky proti IA-2 (*IA-2 antibodies*, IA-2A) sa zisťujú u 60 – 80 % pacientov s novodiagnostikovaným DM1, u prvostupňových príbuzných diabetikov v 1,5 – 2,5 %, zatiaľ čo v zdravej populácii sú prítomné v 1 – 2 % (27). Sú častejšie detekovateľné u pacientov, u ktorých sa DM1 objavil v mladšom veku. Častejšie sa tiež združujú s prítomnosťou *HLA-DRB1*04, -DQB1*03:02 a -DQA1*03:01* (17, 107, 108). Z hľadiska klinického priebehu sú charakteristické pre agresívnejšiu formu autoimunitnej inzulitídy a rýchlejší priebeh choroby (27, 110).

Ďalšími protilátkami, ktoré sa vyskytujú v čase stanovenia diagnózy u takmer 50 – 60 % pacientov, sú protilátky proti inzulínu (*insulin autoantibodies*, IAA). V nižších titroch sú prítomné už v asymptomatickej fáze, v zdravej populácii sú detekovateľné u menej ako 1 % (35). Ich antigén – inzulín, je ako vlastný produkt β-buniek najšpecifickejším autoantigénom. Rovnako, ako pri IA-2A, je ich výskyt typickejší pre nižšie vekové kategórie. Po započatí substitučnej liečby inzulínom sa dajú dokázať u väčšiny pacientov, čo však limituje ich praktické využitie. IAA protilátky môžu výnimočne obmedzovať aj terapeutické podávanie inzulínu. V porovnaní s predchádzajúcimi autoprotilátkami sa vyskytujú najčastejšie u najmladších pacientov, s vekom pozitivita výrazne klesá (17, 98, 105). Združujú sa s alelami *HLA-DRB1*04*, *-DQB1*03:02* (17, 107, 108).

Ako najnovší autoantigén významný v patogenéze autoimunitného DM bol opísaný transmembránový proteín inzulínových sekrečných granúl – zinkový transportér-8 (ZnT8).

Protilátky proti nemu (ZnT8A) sa vyskytujú u 60 – 80 % pacientov s novodiagnostikovanou chorobou v porovnaní s len 2 % výskytom v bežnej populácii (111). Vo všeobecnosti sa tieto autoprotilátky vyskytujú neskôr ako GADA alebo IAA a preto je vhodnejšie ich vyšetrenie u starších pacientov (112, 113, 114). Rozšírenie spektra vyšetrovaných autoprotilátok o ZnT8A výrazne zvýši záchyt pozitivity pacientov, u ktorých sa doteraz vyšetrením GADA, IA-2A a IAA nezistila protilátková pozitivita. Vyšetrenie panelu autoprotilátok GADA, IA-2A, IAA spolu s ZnT8A zvyšujú možnosti dôkazu autoimunitných dejov až na 98 % (111).

Sumárne možno teda konštatovať, že podľa literárnych údajov sa GADA vyskytujú u pacientov s autoimunitným DM častejšie ako IA-2A a ZnT8A (60 – 80 % pacientov) a IAA (50 – 60 % pacientov) (17). Jednotlivé autoprotilátky sa v periférnej krvi pacientov spravidla neobjavujú naraz, ako prvé sa u starších pacientov vyskytujú GADA a u najmladších IAA (17, 45, 112).

U prvostupňových príbuzných diabetikov sú autoprotilátky pozitívne od 5 – 9 % u GADA, 3 – 9 % u ICA, 3,7 – 5 % u IAA až po 1,5 – 2,5 % u IA-2A. Najvyššia prediktívna hodnota u prvostupňových príbuzných sa však uvádza práve pri IAA (až okolo 80 % pri 5-ročnom sledovaní, u monozygotných dvojčiat až viac ako 87 %) (98, 115).

Krátko po objasnení úlohy protilátok v etiopatogenéze autoimunitného DM sa zistilo, že tieto sa dajú zachytiť aj v sére od niektorých pacientov s DM2. Pre túto skupinu pacientov bol okrem protilátkovej pozitivity typický vek viac ako 35 rokov a hmotnostný úbytok. Ďalej sa dokázalo, že u nich dochádza oveľa skôr k „zlyhaniu“ liečby perorálnymi antidiabetikami – stávajú sa závislými od inzulínu skôr ako pacienti bez protilátkovej pozitivity (priemerne za 3 roky od začiatku liečby). Tento typ DM sa preto pomenoval LADA (*Latent Autoimmune Diabetes of Adults*), *diabetes mellitus* typu 1,5, alebo sa podľa niektorých autorov jedná o pomaly progredujúci autoimunitný *diabetes mellitus* 1. typu. Trpí ním až 10 % pacientov, ktorých pôvodne diagnostikovali ako diabetikov 2. typu (56, 116, 117).

Diagnostickými kritériami pre LADA sú teda okrem veku aj prítomnosť autorotilátok (tento autoimunitný marker odlišuje LADA od DM2) a potreba inzulínoterapie po minimálne 6 mesiacoch od diagnózy (čím sa LADA odlišuje od DM1). Asociácia s HLA-komplexom je u LADA slabšia ako u pacientov s DM 1. typu (13, 116-118).

2.3.3. Environmentálne faktory v patogenéze autoimunitného diabetes mellitus

Ak by bola choroba determinovaná výhradne genetickou výbavou pacienta, výskyt autoimunitných chorôb u jednovaječných dvojčiat by sme očakávali na úrovni 100 %. Rodinné štúdie však udávajú vznik *diabetes mellitus* 1. typu aj u mnohých pacientov s negatívnou rodinnou anamnézou a len u 40 % jednovaječných dvojčiat (výskyt choroby u jednovaječného dvojčaťa sa pohybuje okolo 12 – 70 % (tab. 1). V neposlednom rade tiež výskyt predispozičných HLA-aliel v populácii niekoľkonásobne prevyšuje prevalenciu samotného DM 1. typu (25, 27).

Za najpravdepodobnejší spúšťací stimul sú považované vírusové infekcie, aj keď pohľad na ich postavenie v patogenéze sa v ostatných rokoch čiastočne mení (rovnako, ako pri iných autoimunitných chorobách, sa diskutuje aj o diétnych faktoroch a hormonálnych vplyvoch).

Vírusové infekcie

Vzťahu vírusovej infekcie a vývoja *diabetes mellitus* 1. typu sa venovala a stále sa venuje veľká pozornosť. Avšak ani intenzívnym výskumom v tejto oblasti neboli ešte zďaleka zodpovedané všetky otázky a vírusová infekcia je v súčasnosti stále označovaná „len“ ako najpravdepodobnejšia príčina vzniku choroby. Nepoznáme totiž presný mechanizmus, akým vírusová infekcia poškodzuje pankreatické β-bunky, zatiaľ nie je ani presne jasné, či vírusová infekcia samotná naštartuje autoimunitné procesy alebo len zintenzívni subklinicky prebiehajúcu inzulitídu (34, 38). Analýzu významu vírusovej infekcie v patogenéze choroby obmedzuje (okrem limitovaných možností biopsie pankreatického tkaniva) aj fakt, že „podozrivá“ vírusová infekcia môže prebehnúť aj niekoľko mesiacov pred objavením sa prvých klinických príznakov (34, 51, 101).

V súčasnosti existuje viacero teórií o tom, akým spôsobom vírusy zasahujú do patogenézy DM 1. typu. Môže ísť o priame poškodenie β-buniek pankreasu, poruchu regulačných mechanizmov kontroly aktivity autoreaktívnych T-lymfocytov alebo nešpecifickú aktiváciu T-lymfocytov. Uvažuje sa tiež o možnom „pankreatogénnom“ kmeni, ktorý útočí priamo na β-bunky pankreasu a pri ich poškodení zviditeľní dovtedy ukryté antigény (tzv. *epitope spreading*). Takýto scenár sa predpokladá najmä pri ojedinelých rýchloprogredujúcich, fulminantných formách DM1 (39, 119). Vírusy môžu poškodzovať pankreatické tkanivo aj na podklade fenoménu molekulového mimikri, teda na základe zhody medzi determinantami mikróbneho antigénu a autoantigénu (36). Najpresnejšie je v súčasnosti opísaná zhodná sekvencia 18 aminokyselín v ľudskom enzýme glutamátdekarboxylázy (GAD) a proteínu P2C Coxsackie vírusu kmeňa B4 (zhoda v pozícii 35 – 43 P2C proteínu a v pozícii 258 –

266 GAD, obr. 7) (pozri aj kap. 1.3.2) (35). Pri imunitnej odpovedi na daný patogén dochádza k aktivácii a následnej proliferácii klonov T-lymfocytov, ktoré na jednej strane zlikvidujú infekčný agens, ale na druhej strane sa súčasne obrátia aj proti vlastným tkanivám a menia tak pôvodne obrannú imunitnú reakciu na autoimunitnú. Ďalším príkladom molekulového mimikri je podobnosť medzi proteínom rotavírusov a tyrozínfosfatázou β-buniek pankreasu (IA-2). Epitop IA-2 v pozíciách 805 – 820 vykazuje sekvenčnú zhodu s 9 aminokyselinovými jednotkami proteínu VP7 rotavírusu (35). Tento antigénový determinant prejavuje navyše podobnosť aj s aminokyselinovými sekvenciami cytomegalovírusu, vírusu hepatitídy C a osýpok.

Obr. 7 Zhodná sekvencia aminokyselín v štruktúre enzýmu glutamátdekarboxylázy (GAD65) a Coxsackie vírusu (P2C) (upravené podľa 35, 120)

GAD65:	...NMYAMMIARFKMFPEVKEK...
P2C:	...KMFPEVKEK...

Podľa teórie tzv. *bystander* aktivácie imunitného systému pri postupujúcom zápale pankreatického tkaniva dochádza k uvoľneniu zápalových mediátorov a cytokínov, ktoré ďalej poškodzujú zdravé bunky. Uvoľnenie sekvestrovaných antigénov z buniek pankreatických ostrovčekov a ich prezentácia bunkami prezentujúcimi antigén následne aktivujú autoreaktívne T-lymfocyty (121, 122, 123). Tzv. *fertile-field* hypotéza zas predpokladá, že prebehnutá vírusová infekcia vytvorí v pankrease vhodnú živnú pôdu pre naštartovanie autoimunitných dejov. Napokon ďalšou možnosťou je, že pri chronickom zápale tkaniva pankreatických ostrovčekov môžu byť β-bunky zničené vplyvom voľných radikálov (70, 119).

Vírusová infekcia zanecháva na pankreatickom tkanive tzv. vírusový podpis (*virus signature*). V tkanive pankreasu získaného u novodiagnostikovaných diabetikov 1. typu nachádzame typicky zvýšenú expresiu HLA-molekúl prvej triedy, ktorá robí pankreatické β-bunky „lepšie viditeľnými“ pre imunitný systém, IFN-α a v neposlednom rade infiltráciu pankreatického tkaniva aktivovanými cytotoxickými $CD8^+$ lymfocytmi, ktoré sa priamo podieľajú na rozvoji inzulitídy a deštrukcii pankreatického tkaniva (11, 119). Produkcia IFN v rámci odpovede na vírusovú infekciu je pod kontrolou IFIH1 génu a jeho produktu MDA5 (*melanoma-associated differentiation 5*). Enterovírusová infekcia dokáže totiž aktivovať tvorbu MDA5 a tým indukovať sekréciu IFN 1. typu, ktorý zvyšuje expresiu

HLA-molekúl prvej triedy na pankreatických β-bunkách, čo následne uľahčuje ich rozpoznávanie cytotoxickými $CD8^+$ T-lymfocytmi. Dokázalo sa, že určité varianty tohto génu sa spájajú s nižším výskytom autoimunitného DM (37, 39). Naopak, iné mutácie v tomto géne môžu spôsobiť, že jedinec s nedostatočnou antivírusovou imunitnou odpoveďou sa nedokáže vysporiadať ani s „bežnou“ vírusovou infekciou a zvyšuje sa tým pravdepodobnosť naštartovania autoimunitných procesov (pozri aj kap. 1.3.2) (124).

Vzťah infekcie a následnej deštrukcie pankreatického tkaniva sa študoval aj s ohľadom na anatomickú lokalizáciu pankreasu. Teóriu, že imunopatologické reakcie začínajú v čreve a aktivované lymfocyty až následne napádajú tkanivo pankreasu, podporujú analýzy vzoriek čreva (*in situ* hybridizáciou aj imunohistochemicky) diabetických pacientov, ktoré až u polovice z nich potvrdili prítomnosť perzistentnej enterovírusovej infekcie (125).

„Podozrivé“ sú stále viaceré druhy infekcií – najmä tie, spôsobené enterovírusmi (Coxsackie, poliovírusy), vírusom rubeoly, parotitídy, ďalej cytomegalovírusom, picornavírusmi a rotavírusmi, ako aj herpesvírusmi (51, 87).

Snáď najlepšie je preskúmaný vzťah medzi DM1 a infekciou enterovírusmi, avšak ani v tomto prípade jednoznačnú odpoveď na otázku, či ide o kauzálny vzťah infekcie a výskytu choroby, ešte stále nepoznáme (74, 119). Tento druh infekcie je v populácii pomerne častý a veľká časť pritom prebehne klinicky asymptomaticky (39). U geneticky predisponovaných jedincov je však vyššia pravdepodobnosť manifestnej infekcie s následným rozvojom skríženej reaktivity (126), vo fínskej populácii sa tento druh infekcie (Coxsackie) signifikantne častejšie vyskytoval už aj u pacientov v prediabetickej fáze (teda s pozitivitou autoprotilátok). Vírusy Coxsackie B4 sa však našli aj v tkanive pankreasu pacientov, ktorí zomreli tesne po manifestácii DM1 (127).

Kongenitálne infekcie vírusom rubeoly alebo vírusom parotitídy naproti tomu spôsobujú DM1 skôr narušením normálneho vývoja pankreatických β-buniek alebo ich priamou lýzou (37) ako indukciou autoimunitných procesov. Infekcia vírusom rubeoly sa spája s pre DM1 typickými HLA-molekulami: -DR3 a -DQ2. Vďaka účinnému očkovaniu sa výskyt týchto vírusov výrazne eliminoval, takže ich vplyv na súčasný nárast incidencie autoimunitného DM je nepravdepodobný.

Existujú tiež dôkazy o tom, že prekonanie bežných detských chorôb v prvých rokoch života znižuje pravdepodobnosť rozvoja DM1 vo vyššom veku. Avšak stále platí, že ťažké infekcie v perinatálnom období k vzniku DM predisponujú (101, 128).

Súhrne teda možno konštatovať, že odpoveď na otázku, či sú vírusy zodpovedné za vývoj autoimunitného DM, nie je, tak ako ani u iných autoimunitných chorôb, vôbec jednoduchá.

Podľa súčasného stavu poznatkov sa dá tvrdiť, že určitý druh infekcie, v určitom čase a stave organizmu môže u geneticky predisponovaného jedinca naštartovať autoimunitné reakcie namierené voči tkanivu pankreasu, naopak za iných okolností môže byť vírusová infekcia osožná a pôsobiť skôr protektívne (38).

Vitamín D

Vzťah choroby k vírusovej infekcii podčiarkuje aj typický nárast incidencie *diabetes mellitus* 1. typu v závislosti od ročného obdobia: zvýšený výskyt choroby pozorujeme najmä v jeseni a v zime, čo pravdepodobne zapríčiňuje vyšší výskyt vírusových infekcií v tomto období (56).

Jedným z možných vysvetlení tejto sezónnej variability vo výskyte DM1 sú však aj rozdiely v hladine vitamínu D (1,25-dihydroxyvitamín D3; 1,25(OH)2D3) v priebehu roka. Hypovitaminóza D je pomerne častým nálezom, vo Švajčiarsku sa deficiencia vitamínu D v populácii diabetikov 1. typu pohybovala okolo 70 % a bola vyššia oproti bežnej populácii (129). Iba na Floride (USA), čo je však jeden z najslnečnejších regiónov sveta, zatiaľ neboli nájdené významnejšie rozdiely medzi diabetikmi a zdravou populáciou (130).

Vitamín D znižuje syntézu proinflamačných cytokínov, spomaľuje diferenciáciu a maturáciu dendritových buniek ako účinných buniek prezentujúcich antigén a urýchľuje ich apoptózu. Na úrovni pankreatických β-buniek má cytoprotektívny efekt – ochraňuje ich pred apoptózou, znižuje hladinu voľných radikálov a oxidu dusného, ktorý spôsobuje dysfunkciu β-buniek (42).

Pri jeho podávaní jedincom s pozitivitou diabetických autoprotilátok dochádza k redukcii infiltrácie pankreatického tkaniva T-lymfocytmi, zvyšuje sa počet regulačných T-lymfocytov s tlmivým účinkom na imunitnú odpoveď a nerovnováha v cytokínovej sieti sa posúva v prospech T_H2-lymfocytov. Vitamín D rovnako znižuje expresiu HLA-molekúl prvej triedy, čím ďalej ochraňuje pankreatické β-bunky pred útokom cytotoxických T-lymfocytov (56, 131).

Hladina vitamínu D samozrejme úzko súvisí so zemepisnou šírkou, čo môže byť tiež jedným z vysvetlení faktu, že Fínsko je krajinou s najvyššou incidenciou DM1 na svete. Celkovo je výskyt choroby vyšší v severnejších krajinách s menším množstvom slnečného žiarenia (snáď len s výnimkou Sardínie, ktorá, aj napriek geografickej lokalizácii, patrí medzi krajiny s vysokým výskytom tejto choroby).

Diétne faktory

Z faktorov prostredia je často diskutovaným problémom aj predčasné ukončenie dojčenia a následné kŕmenie detí kravským mliekom. Postavenie proteínov kravského mlieka v indukcii autoimunitného DM je však stále nejasné. V sére od diabetických detí sa dokazujú početné protilátky proti viacerým proteínom kravského mlieka. Vysvetlením by mohlo byť, že u geneticky predisponovaných detí sa tolerancia na antigény mlieka, na rozdiel od zdravých, nevytvára.

Viaceré retrospektívne štúdie z minulých rokov tiež opisujú vzťah medzi skorým príjmom mlieka a vývojom DM1, avšak vo väčšine týchto štúdií bolo zvýšené riziko choroby relatívne nízke (napr. štúdia TRIGR – *Trial to Reduce Diabetes in the Genetically at Risk*) (55). Navyše, prospektívne štúdie, ktoré sledovali pacientov až po objavenie sa autoimunitných reakcií, tiež nedokázali jednoznačný vzťah medzi príjmom mlieka a autoimunitnou reakciou voči bunkám pankreatických ostrovčekov (DAISY, BABYDIAB) (64, 93). Závery štúdie BABYDIAB opätovne podčiarkujú fakt, že markery autoimunitných procesov sa začínajú objavovať už v rannom detstve – najvyšší výskyt autoprotilátok zachytili v skupine pacientov vo veku 9 mesiacov až dvoch rokov (132).

Význam má pravdepodobne aj nedostatok protektívne pôsobiaceho materského mlieka, ktorý môže viesť k nedostatočnej funkcii slizničného imunitného systému a poruche tzv. orálnej tolerancie (teda navodenia supresie solubilnými potravinovými antigénmi) (133).

K poškodeniu pankreatického tkaniva dochádza pravdepodobne na podklade fenoménu molekulového mimikri napr. medzi molekulami bovinného sérového albumínu a proteínu p69 na povrchu β-buniek. Niektoré proteíny kravského mlieka poškodzujú slizničnú imunitu inhibíciou proliferácie črevných T-lymfocytov (β-kazeín). V neposlednom rade môžu vírusové infekcie meniť permeabilitu črevnej sliznice a tým modifikovať imunitnú reakciu voči potravinovým antigénom (35, 134, 135).

Ďalšími „podozrivými“ potravinami sú teda aj glutén a obilniny. Istú súvislosť naznačujú pozorovania, že u diabetikov 1. typu a ich prvostupňových príbuzných je omnoho častejší aj výskyt celiakie. V štúdii BABYDIAB sa opísal častejší nález špecifických diabetických autoprotilátok u rizikových detí, ktoré dostávali obilninové proteíny, vrátane gluténu, vo veku menej ako 3 mesiace v porovnaní s deťmi, ktoré sa s nimi po prvýkrát stretli vo veku 3 – 6 mesiacov (55, 69). Čo je však zaujímavé, skorá expozícia gluténu u týchto detí signifikantne nezvyšovala riziko celiakie (69). Redukcia výskytu autoimunitných markerov sa pozorovala aj pri diéte bez obsahu gluténu.

U geneticky predisponovaných jedincov (HLA-DR3/DR4 a HLA-DQ8) došlo pri

skorej expozícii gluténu k rozvoju autoimunitných procesov u takmer všetkých detí. Rizikovú skupinu prvostupňových príbuzných diabetikov 1. typu sledovala aj štúdia BABYDIET, ktorá na druhej strane dokázala, že ani oddialenie expozície (po 12. mesiaci života) neprinieslo signifikantnú redukciu vývoja autoimunintných procesov (55, 64).

Odpoveď na otázku, ako eliminovať možný vplyv diétnych faktorov na rozvoj choroby, dostaneme, ak budeme rešpektovať prirodzený vývoj imunitného systému človeka. Po narodení dieťaťa sa mení reaktivita jeho imunitného systému a vymedzuje sa optimálna doba pre stretnutie sa s potravinovými alergénmi. V tomto období tzv. „tolerogénneho (imunitného) okna“ stretnutie s antigénom spôsobí skôr vývoj tolerancie ako senzibilizáciu imunitného systému. V prípade potravinových antigénov sa za najvhodnejšie obdobie expozície dieťaťa považuje vek 4 – 6 mesiacov (resp. 17. – 26. týždeň). Skoršie, ale aj neodôvodnené neskoršie stretnutie organizmu s nimi, zvyšuje pravdepodobnosť aberantnej reakcie imunitného systému (133).

Autoimunitný diabetes mellitus a očkovanie

V ostatných rokoch sa mimoriadne živo diskutuje aj o možnej súvislosti medzi očkovaním a rozvojom DM1 u detí. Výsledky doteraz realizovaných klinických štúdií však zatiaľ jednoznačný kauzálny vzťah nepreukázali (135, 136, 137).

Naopak, ukazuje sa, že napríklad prekonanie parotitídy alebo čierneho kašľa sa spája s vyšším rizikom vzniku DM1 ako samotné očkovanie. Rovnako, MMR vakcína (morbilli, mumps, rubeola) nielenže nezvyšovala riziko výskytu DM1, ale naopak, u vakcinovaných detí bol jeho výskyt nižší v porovnaní s deťmi, ktoré očkované neboli (138, 139). Za bezpečnú z hľadiska vývoja DM1 možno považovať aj tzv. hexavakcínu (140).

Ak teda dôjde k rozvoju choroby v nadväznosti na predchádzajúce očkovanie, vakcinácia samotná pravdepodobne nebude samostatným spúšťacím mechanizmom, spolupôsobiť môže len ako časť celého spektra environmentálnych faktorov a väčšie riziko pre dieťa predstavuje prekonanie infekcie samotnej ako samotné očkovanie proti nej (34, 137, 138).

Pri očkovaní pacienta s autoimunitným *diabetes mellitus* by sme však mali uprednostňovať acelulárne, subjednotkové a konjugované vakcíny navodzujúce optimálne celoživotnú ochranu, pričom je nutné medzi očkovaniami dodržiavať maximálne možné odstupy, najmenej však 1 mesiac (pri akútne dekompenzovanom DM, samozrejme, očkovanie odkladáme do stabilizácie choroby). Nie je však dôvod vynechávať u týchto pacientov akékoľvek z povinných očkovaní (136).

2.4. KLINICKÝ OBRAZ A DIAGNOSTIKA DIABETES MELLITUS 1. TYPU

V klinickej praxi k stanoveniu diagnózy DM spravidla stačí výrazná hyperglykémia a ketoacidóza. Podľa smernice WHO je však exaktné stanovenie diagnózy autoimunitného DM možné len na základe typického klinického obrazu, zníženej až nulovej koncentrácie plazmatického C-peptidu (*connecting peptide*, proteín spájajúci reťazce inzulínu) a pozitivity špecifických autoprotilátok proti antigénovým štruktúram β-buniek pankreasu ako markera autoimunitnej inzulitídy (GADA, IAA, IA-2A, ZnT8A) (50). Diabetici 1. typu často trpia aj iným autoimunitnými chorobami (napr. autoimunitnou tyreopatiou alebo celiakiou).

2.5. LIEČBA DIABETES MELLITUS 1. TYPU S DÔRAZOM NA AUTOIMUNITNÚ ETIOLÓGIU

Diabetes mellitus 1. typu, tak ako väčšina autoimunitných chorôb, nemá v súčasnosti kauzálnu liečbu. Základným liečebným postupom je substitučná terapia exogénnym inzulínom. Táto je však pre pacientov pomerne náročná a značne znižuje kvalitu života, preto sa v súčasnosti celosvetovo upriamuje pozornosť nielen na maximálne zjednodušenie samotnej aplikácie inzulínu, ale aj na nové liečebné postupy.

Vychádzajúc z autoimunitnej patogenézy DM1 kauzálnou, resp. kuratívnou by mala byť liečba imunosupresívami s cieľom tlmiť prebiehajúci autoimunitný proces. Skoré podávanie imunosupresívnej liečby totiž spomalí deštruktívny proces, zmierni oxidačný stres a šetrí β-bunky, čím môže významne predĺžiť obdobie vlastnej zvyškovej sekrécie inzulínu. Tým sa znížia terapeutické dávky inzulínu, zlepší sa kompenzácia DM, spomalí sa rozvoj mikro- aj makrovaskulárnych komplikácií a zlepší sa prognóza pacienta (141-145).

Pôvodne sa deštrukcia β-buniek považovala za ireverzibilný proces. Dnes sa však ukazuje, že adekvátnou, cielenou a najmä rýchlou liečbou možno tento proces spomaliť, zastaviť, ba dokonca aj zvrátiť (13). Dôraz však treba klásť na to, aby sa liečba podala vo veľmi skorých štádiách choroby. V súčasnosti sa totiž reziduálna kapacita pankreatických β-buniek v čase stanovenia diagnózy odhaduje len na menej ako 10 – 20 % pôvodnej produkcie (145). Z uvedeného vyplýva, že ak chceme odvrátiť autoimunitný atak, mali by sme zlepšiť aktívne vyhľadávanie potenciálnych pacientov. Jednou z možností je stanovenie už spomínaného genetického rizika – teda zistenie prítomnosti predispozičných HLA-aliel druhej triedy, napr. u prvostupňových príbuzných pacientov s DM 1. typu – pozri kap. 2.3.1; ďalšou možnosťou je určenie pozitivity typických „diabetických“ autoprotilátok – pozri kap. 2.3.2. Tieto sa u potenciálnych pacientov objavia aj niekoľko rokov pred určením diagnózy a u 60 – 80 % pacientov, u ktorých sa zachytila pozitivita aspoň dvoch autoprotilátok, dôjde do 5 – 7 rokov aj ku klinickej manifestácii choroby (97, 98, 111).

Súhrnne možno konštatovať, že jedinci s pozitívnou rodinnou anamnézou, genetickou predispozíciou a pozitivitou autoprotilátok sú vysokorizikovou skupinou populácie. Aj na dnešnej úrovni poznatkov už teda dokážeme týchto pacientov identifikovať a ak pacientov pravidelne sledujeme, môžeme chorobu odhaliť už v jej počiatočných štádiách. To z nich robí ideálnych adeptov na podanie imunosupresívnej liečby, keďže jej výsledky v značnej miere závisia od rýchlosti podania (99, 100).

K najčastejšie používaným imunosupresívnym liečivám v súčasnosti jednoznačne zaraďujeme monoklonové protilátky (mAb) – ich klinické využitie sa už rozšírilo aj na liečbu autoimunitných chorôb, vrátane autoimunitného *diabetes mellitus*. Jeho liečbu monoklonovými protilátkami odštartovalo podávanie mAb proti membránovému antigénu T-lymfocytov CD3, konkrétne jeho ε-reťazcu (*Orthoclone OKT3; muronomab*). CD3-molekuly sú súčasťou antigénového receptora T-lymfocytov a ich blokádou sa bráni aktivácii T-lymfocytov (143, 144).

Jedným z najčastejších nežiaducich účinkov, ktorý značne komplikoval liečbu, bola indukcia presakujúceho vaskulárneho syndrómu (*vascular leak syndrome*) podmieneného mitogénnou aktivitou monoklonových protilátok, ktorá spôsobí masívne uvoľnenie viacerých cytokínov. Vzhľadom na uvedené komplikácie sa hľadali cesty na zníženie týchto nepriaznivých vedľajších účinkov. Očakávaný efekt priniesla modifikácia štruktúry anti-CD3 protilátok – ide o monoklonové protilátky ChAglyCD3, teplizumab (hOKTγ1Ala-Ala) a visilizumab (143, 146, 147, 148).

Pri aplikácii modifikovaných monoklonových protilátok sa u diabetikov 1. typu pozorovala indukcia antiidiotopových protilátok, ktoré sa vyvinuli až u 40 % liečených pacientov. U väčšiny z nich tieto protilátky vymizli do 6 mesiacov po skončení terapie. Napriek ich potenciálnej neutralizačnej kapacite nepredstavovali pre liečbu nijaký problém. Objavili sa totiž až po 2 – 3 týždňoch po poslednej dávke. Mohli by však komplikovať prípadnú nasledujúcu liečbu tými istými protilátkami (149).

Liečbu modifikovanými monoklonovými anti-CD3 protilátkami možno teda na základe súčasných poznatkov považovať za bezpečnú. V neposlednom rade je dôležité pripomenúť aj fakt, že pri podávaní monoklonových protilátok odpadá potreba dlhodobej kontinuálnej imunosupresívnej liečby so všetkými jej sprievodnými nežiaducimi vedľajšími účinkami (51, 99, 100, 150).

Ďalšou monoklonovou protilátkou, ktorá sa začína používať v liečbe autoimunitného DM je anti-CD20 – *rituximab*, ktorá znížením počtu B-lymfocytov zmenší syntézu autoprotilátok; navyše sa zabráni B-lymfocytom v ich antigénovo-prezentačnej funkcii

a tým ďalšej aktivácii imunitných procesov (151).

Ďalšou sľubnou terapeutickou alternatívou je v súčasnosti transplantácia pankreatických ostrovčekov, resp. celého pankreasu (najčastejšie spolu s transplantáciou obličiek). U pacientov po transplantácii dochádza k zlepšeniu glykemickej kontroly, spomaleniu rozvoja orgánových komplikácií a redukcii dávky exogénneho inzulínu. Zároveň sa redukuje výskyt hypoglykémií, čo je mimoriadne prínosné najmä u pacientov s fenoménom neuvedomenia si hypoglykémie.

Približne 60 % pacientov dosiahlo nezávislosť od inzulínu (definovanú ako najmenej 14 dní trvajúce obdobie bez nutnosti aplikácie inzulínu) do jedného roka po transplantácii, aj keď vylúčiť potrebu inzulínu natrvalo sa zatiaľ úplne nepodarilo. Zaznamenané bolo tiež zvýšenie hladiny C-peptidu (pretrvávajúce u viac ako 50 % pacientov aj 5 rokov po transplantácii) a zníženie hodnôt glykovaného hemoglobínu, ktoré ani po 5-ročnom sledovaní nedosiahli hodnoty pred transplantáciou (51, 152).

3. ANALÝZA PRÍTOMNOSTI VYBRANÝCH HLA-ALIEL A POZITIVITY ŠPECIFICKÝCH AUTOPROTILÁTOK V SLOVENSKEJ POPULÁCII PACIENTOV S DIABETES MELLITUS 1. TYPU

3.1. CIELE PRÁCE

V ostatných rokoch sa dosiahol výrazný pokrok v chápaní podstaty choroby a zdokonaľuje sa tiež jej liečba. V súčasnej diabetológii sa však venuje veľká pozornosť aj možnej predikcii a prevencii tejto choroby, keďže sa ukázalo, že striktná kontrola hladín glykémie môže síce významne znížiť frekvenciu aj stupeň chronických komplikácií *diabetes mellitus*, ale týmto spôsobom sa ich vývoju nedá úplne zabrániť.

Podnetom pre skúmanie významu genetickej predispozície v etiopatogenéze autoimunitného *diabetes mellitus* bol celosvetovo vzrastajúci záujem o význam genetických faktorov v patogenéze viacerých chorôb. Výskum sa totiž v súčasnosti u mnohých chorôb zameriava na ich genetický podklad s cieľom lepšie pochopiť patogenézu choroby a tým zlepšiť prevenciu a vyhľadávanie potenciálnych pacientov, diferenciálnu diagnostiku, umožniť začatie liečby v skorých štádiách a v budúcnosti snáď zlepšiť aj terapeutické postupy. Po presnom stanovení „genetickej mapy“ choroby môžu poznatky napomôcť vyhľadávaniu potenciálnych pacientov napr. v rodinách pacientov s DM1A, ale aj v bežnej populácii.

Do popredia pri mnohých chorobách vystupujú molekuly HLA-komplexu, ktoré sú významným genetickým rizikom aj u pacientov s *diabetes mellitus* 1.typu. Na základe HLA-typizácie je už v súčasnosti možné vykonávať primárnu prevenciu a aktívne vyhľadávať jedincov ohrozených vyšším rizikom rozvoja DM1A. Na základe pôsobenia rizikových a protektívnych génov sa dá stanoviť individuálne imunogenetické riziko rozvoja inzulitídy a následne *diabetes mellitus* 1.typu.

V rámci HLA molekúl druhej triedy poznáme viacero predispozičných aliel lokusov HLA-DQA1, -DQB1 a HLA-DRB1, avšak v literatúre existuje len málo údajov o význame aliel posledného z lokusov druhej triedy – HLA-DPB1. V rámci Slovenska tento údaj absentuje tak v rámci bežnej populácie, ako aj u pacientov s DM1A.

Z literatúry je tiež známe, že genetická predispozícia vykazuje určité geografické rozdiely. Preto bolo cieľom našej práce aj overenie doteraz známych výsledkov genetických analýz v slovenskej populácii a ich porovnanie s literárnymi údajmi, ktoré už boli publikované.

V nadväznosti na vyššie uvedené cieľmi práce bolo:

1. na základe HLA typizácie zistiť a štatisticky zhodnotiť výskyt HLA-DPB1 aliel u pacientov s diagnózou *diabetes mellitus* 1. typu a ich frekvenciu výskytu porovnať so

zdravou populáciou,

2. určiť výskyt HLA-DRB1, HLA-DQB1 a -DQA1 aliel u pacientov s *diabetes mellitus* 1. typu i v zdravej populácii v rámci Slovenska a výsledky porovnať s celosvetovými literárnymi údajmi,

3. analyzovať prítomnosť autoprotilátok typických pre *diabetes mellitus* typu 1A v čase stanovenia diagnózy a sledovať ich vzťah s prítomnosťou jednotlivých HLA molekúl.

3.2. MATERIÁL A METODIKA

Vyšetrovaný súbor tvorilo 89 pacientov (43 mužov a 46 žien) vo veku 4 – 24,5 roka s diagnózou *diabetes mellitus* 1. typu stanovenou do 19. roka života na základe medzinárodne akceptovaných kritérií: typický klinický obraz s hyperglykémiou, osmotickou polyúriou a polydypsiou, stratou hmotnosti, poruchami acidobázickej rovnováhy, zníženou až nulovou koncentráciou plazmového C-peptidu. U pacientov s DM1A bola naviac prítomná pozitivita autoprotilátok ako markera autoimunitnej inzulitídy (50). Pochádzali z viacerých regiónov Slovenska (Bratislava, Martin, Košice, Prievidza).

Zdravú populáciu reprezentovala kontrolná skupina tvorená 53 dobrovoľnými darcami (29 mužov a 24 žien) vo veku 26 – 69 rokov: nediabetici, bez príbuzenských vzťahov, s negatívnou rodinnou anamnézou na výskyt DM 1. aj 2. typu.

Projekt bol schválený Etickou komisiou Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine. Pacienti, resp. ich zákonní zástupcovia boli poučení a podpísali informovaný súhlas.

Na základe anamnézy a zo zdravotnej dokumentácie bol u všetkých pacientov zhodnotený vek, pohlavie, vek pri stanovení diagnózy a dĺžka trvania choroby, hodnoty C-peptidu v čase stanovenia diagnózy.

U pacientov bola vykonaný odber venóznej krvi do skúmaviek obsahujúcich antikoagulačné činidlo EDTA. DNA bola izolovaná fenol – chloroformovou metódou. DNA bola spracovaná PCR-reakciou a následne bola vykonaná typizácia jednotlivých HLA aliel PCR – SSP metódou primermi GenoVision (Olerup SSP^{TM} AB Sweden) (153, 154,141,142).

Polymerázová reťazová reakcia (PCR, *polymerase chain reaction*) sa využíva na získanie dostatočného množstva DNA pre potrebné analýzy. Princípom PCR je amplifikácia špecifických úsekov DNA *in vitro* polymerizáciou pri využití katalytického účinku špecifického enzýmu DNA-polymerázy. Následne sa použijú synteticky pripravené primery, ktoré majú sekvenciu komplementárnu k sekvenciám na 3´-konci oboch vlákien rozmnožovaného úseku.

Proces ďalej pokračuje syntézou chýbajúceho komplementárneho úseku DNA. Vlastná syntéza sa odvíja od primerov pripájaním jednotlivých komplementárnych nukleotidov pomocou DNA – polymerázy (termostabilný enzým, ktorý znesie aj vysoké teploty; izolovaný z baktérie *Thermus aquaticus* žijúcej v horúcich prameňoch, preto aj označenie *Taq* – polymeráza). Pri opakujúcich sa cykloch novosyntetizované vlákna slúžia ako materiál pre ďalšiu syntézu v nasledujúcich cykloch; množstvo získanej DNA teda rastie exponenciálnym radom. Po skončení PCR reakcií sa ich produkty nanesú na agarózový gél zafarbený etídiumbromidom a po prebehnutí elektroforézy sa výsledky vyhodnotia na UV-transluminátore (155).

Určovali sme frekvenciu výskytu HLA aliel druhej triedy – v celom súbore boli typizované HLA-DQB1 alely (u 89 diabetikov a 53 darcov v kontrolnej skupine), ďalej HLA-DQA1 u 51 diabetikov a 49 darcov v kontrolnej skupine, HLA-DRB1 u 76 diabetikov a 53 darcov v kontrolnej skupine, HLA-DPB1 u 79 diabetikov a 45 darcov v kontrolnej skupine.

Najneskôr do jedného roka od stanovenia diagnózy bola u väčšiny diabetikov po HLA-typizácii zistená prítomnosť autoprotilátok: proti dekarboxyláze kyseliny glutámovej (GADA) u 70 pacientov, proti tyrozínfosfatáze (IA-2A) u 57 pacientov a proti inzulínu (IAA) u 19 pacientov s diagnózou DM1A. Protilátky boli stanovované metódou ELISA (*Enzyme - Linked Immunosorbent Assay*), použité boli kity „GADA ELISA kits“ a „IAA ELISA kits“ (Immunotech, France) a „Diaplets Anti-IA-2" (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

Pri tejto metóde sa na nosič nadviaže protilátka a pridá sa analyzovaný antigén, ktorý sa viaže so špecifickou protilátkou. Vytvorený komplex antigén – protilátka sa deteguje antiimunoglobulínmi, resp. antiprotilátkami (t. j. protilátkou proti príslušnej triede imunoglobulínov), ktoré obsahujú enzým. Tento enzým, prítomný v komplexe „antigén – protilátka – antiprotilátka“ substrát rozštiepi, čím sa zmení farba indikátora. Kvantitatívne vyhodnotenie je založené na fotometrickom meraní intenzity tohto sfarbenia (155, 156).

ŠTATISTICKÉ SPRACOVANIE

Výsledky boli štatisticky spracované nasledovne:

- na zistenie vzťahu medzi prítomnosťou príslušnej alely, príp. kombinácie aliel a prítomnosťou choroby sme použili Pearsonov Chí – kvadrátový test,
- Fisherov exaktný test v prípade, že bola nízka frekvencia výskytu sledovaného znaku,
- pri sledovaní vzťahov medzi kvantitatívnymi premennými a prítomnosťou určitej alely sme použili Mann – Whitneyov U test,

▪ za štatisticky signifikantné sme považovali výsledky s hladinou štatistickej významnosti rovnou alebo menšou ako 5 % ($p \leq 0,05$), pre prehľadnosť sme v tabuľkách a obrázkoch štatisticky významné výsledky odlíšili farebne nasledovne:

● štatisticky významné parametre s predispozičným vplyvom na vývoj DM 1A,

● štatisticky významné parametre s protektívnym vplyvom na vývoj DM 1A,

● štatisticky významné parametre s neutrálnym vplyvom na vývoj DM 1A, resp. bez súvisu s predispozíciou, resp. protektivitou k vývoju choroby,

▪ hodnoty kvantitatívnych premenných udávame ako priemer ± štandardná odchýlka, resp. interkvartilný rozsah.

Všetky číselné údaje získaných výsledkov uvádzame s presnosťou na jedno desatinné miesto (s výnimkou hladín štatistickej významnosti).

3.3. VÝSLEDKY

Charakteristika súboru:

V súbore 89 pacientov s diagnózou diabetes mellitus 1. typu s priemerným vekom 15,5 ± 4,7 roka bolo 43 (48,3 %) chlapcov a 46 (51,7 %) dievčat vo veku 4 – 24,5 rokov (tab. 11). Najpočetnejšia bola skupina pacientov vo veku 15 – 18 rokov (33 pacientov, 37,1 %). Pre väčšiu prehľadnosť je rozdelenie súboru podľa vekových pásiem uvedené aj v tab. 12 a na obr. 8.

Pri delení súboru do vekových pásiem sme použili rozdelenie podľa WHO kategorizácie (143) na pacientov vo veku 0 – 3 roky (0 – 36 mesiacov), 4 – 6 rokov (37 – 72 mesiacov), 7 – 10 rokov (73 – 120 mesiacov), 11 – 14 rokov (121 – 168 mesiacov), 15 – 18 rokov (169 – 216 mesiacov) a viac ako 18 rokov (viac ako 217 mesiacov).

Priemerná dĺžka trvania choroby bola 7,2 ± 3,8 rokov (0,7 – 20,3 roka) – tab. 13 a priemerný vek pacientov s DM 1. typu pri stanovení diagnózy bol 8,3 ± 4,8 rokov (tab. 14, obr. 9).

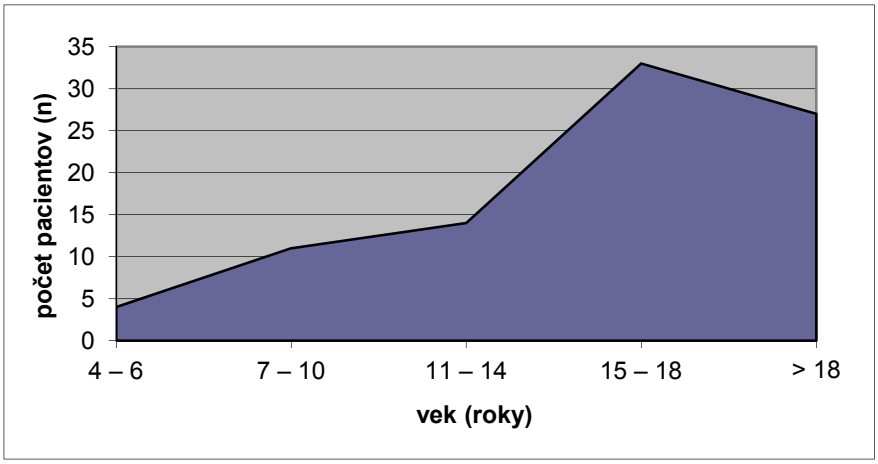
Tab. 11 Vekové zloženie súboru diabetikov

		Spolu	Pohlavie	
			Dievčatá	Chlapci
Počet	N	89	46	43
	%	100	51,7	48,3
Vek (roky)	Priemerný	15,5 ± 4,7	15,7 ± 4,3	15,3 ± 5,3
	Minimálny	0,6	6,9	0,6
	Maximálny	24,5	24,5	20,3

Tab. 12 Rozdelenie súboru diabetikov do vekových pásiem

		Vekové pásma (roky)					**Spolu** (N)
		4 – 6	7 – 10	11 – 14	15 – 18	> 18	
Dievčatá	N	0	6	10	18	12	46
Chlapci	N	4	5	4	15	15	43
Spolu	N	4	11	14	33	27	89
	%	4,5	12,4	15,7	37,1	30,3	100,0

Obr. 8 Rozdelenie súboru diabetikov do vekových pásiem



Tab. 13 Priemerná dĺžka trvania choroby

		Spolu	**Pohlavie**	
			Dievčatá	**Chlapci**
Trvanie choroby (roky)	Priemerné	7,2 ± 3,8	8,5 ± 4,1	7,4 ± 3,6
	Minimálne	0,7	0,9	0,7
	Maximálne	20,3	20,3	19,8

Tab. 14 Priemerný vek pacientov pri stanovení diagnózy

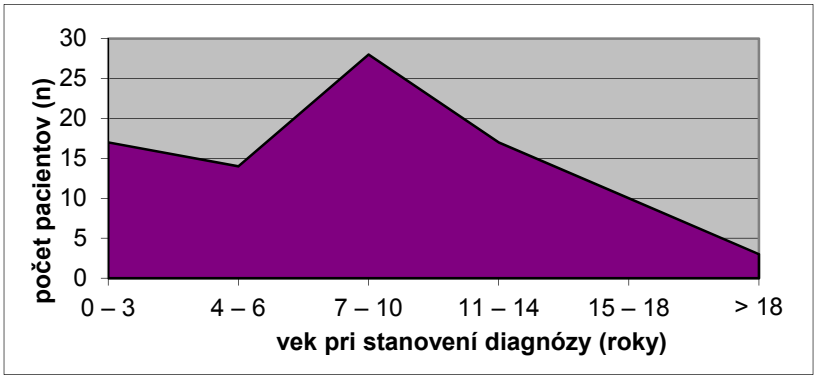
		Spolu	**Pohlavie**	
			Dievčatá	**Chlapci**
Vek pri stanovení dg (roky)	Priemerný	8, ± 4,8	8,2 ± 4,6	8,4 ± 5,1
	Minimálny	0,8	0,9	0,8
	Maximálny	18,8	18,8	18,6

Rozdelenie celého súboru diabetikov podľa veku pri stanovení diagnózy ako aj pomerné zastúpenie dievčat a chlapcov je uvedené v tab. 15a, podobne ako pri samostatnej analýze jednotlivých pohlaví v tab. 15b, c.

U dievčat bol priemerný vek pri stanovení diagnózy 8,2 ± 4,6 rokov, najviac diagnostikovaných prípadov bolo vo vekovej skupine 7 – 10 rokov (17 pacientiek, 36,9 %), 11 – 14 rokov (9 pacientiek, 19,6 %) ako aj 0 – 3 rokov (8 pacientiek, 17,4 %) - tab. 15b, obr. 10.

U chlapcov bol priemerný vek pri stanovení diagnózy takmer zhodný – 8,4 ± 5,1 rokov, pričom najčastejšie, čo znamená, že až u štvrtiny z nich bola choroba rovnako ako u dievčat diagnostikovaná vo veku 7 – 10 rokov (11 pacientov, 25,6 %); ďalej tu dominovalo vekové pásmo 0 – 3 ročných (9 pacientov, 20,9 %) - tab. 15c, obr. 10.

Obr. 9 Rozdelenie súboru diabetikov do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy



Tab. 15a Rozdelenie súboru diabetikov do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy

		Vekové pásma (roky)						**Spolu**	N %
		0 – 3	4 – 6	7 – 10	11 – 14	15 – 18	> 18		
Dievčatá	N	8	6	17	9	5	1	46	
	%	9,0	6,7	19,1	10,1	5,6	1,2	51,7	
Chlapci	N	9	8	11	8	5	2	43	
	%	10,1	9,0	12,4	9,0	5,6	2,2	48,3	
Spolu	N	17	14	28	17	10	3	89	
	%	19,1	15,7	31,5	19,1	11,2	3,4	100,0	

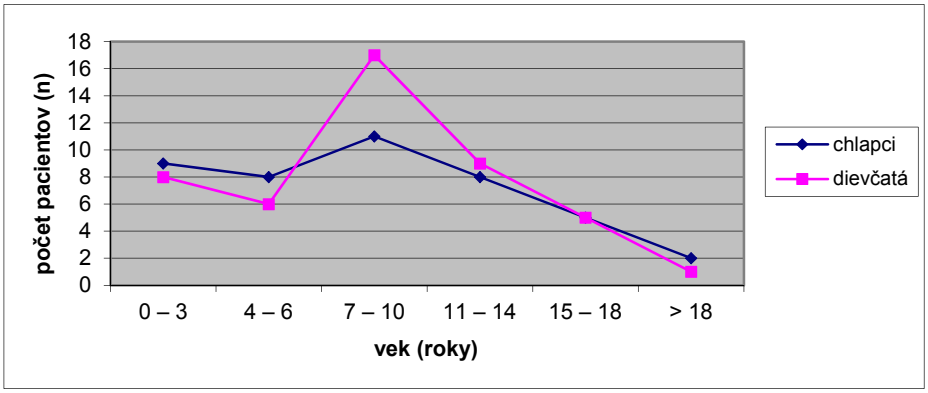
Tab. 15b Rozdelenie súboru diabetikov (dievčat) do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy

		Vekové pásma (roky)						**Spolu**	N %
		0 – 3	4 – 6	7 – 10	11 – 14	15 – 18	> 18		
Dievčatá	N	8	6	17	9	5	1	46	
	%	17,4	13,1	36,9	19,6	10,9	2,1	100,0	

Tab. 15c Rozdelenie súboru diabetikov (chlapcov) do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy

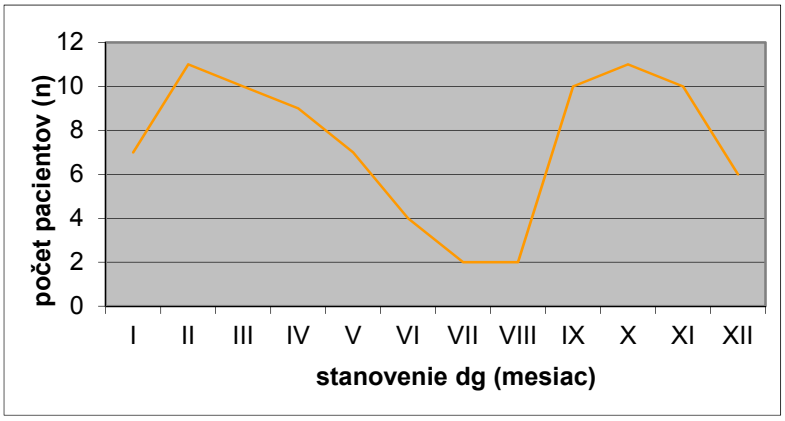
		Vekové pásma (roky)						**Spolu**	N
		0 – 3	4 – 6	7 – 10	11 – 14	15 – 18	> 18		%
Chlapci	N	9	8	11	8	5	2	43	
	%	20,9	18,6	25,6	18,6	11,6	4,7	100,0	

Obr. 10 Rozdelenie súboru diabetikov (dievčat a chlapcov) do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy

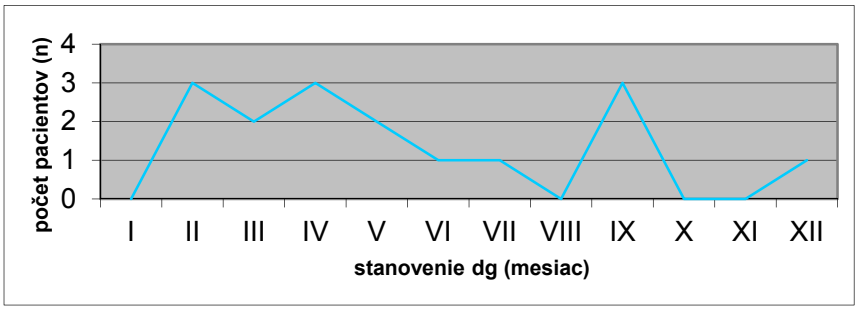


Vzhľadom na to, že pre manifestáciu DM1A je v literatúre udávaná sezónna variabilita, sledovali sme u pacientov aj mesiac, v ktorom bola stanovená diagnóza. V nami sledovanom súbore to bolo najčastejšie vo februári a septembri (zhodne 12,4 %), naopak, najmenej novodiagnostikovaných pacientov bolo v júli a auguste (zhodne 2,3 %). Osobitne sme analyzovali skupinu pacientov s vekom do 3 rokov pri stanovení diagnózy – najviac nových prípadov bolo podobne vo februári a septembri, rovnako ako aj v apríli (tab. 16, obr. 11 a,b).

Obr. 11a Rozdelenie celého súboru diabetikov podľa mesiaca, v ktorom bola stanovená diagnóza



Obr. 11b Rozdelenie súboru diabetikov do 3 rokov veku v čase stanovenia diagnózy podľa mesiaca, v ktorom bola stanovená diagnóza



Tab. 16 Rozdelenie súboru diabetikov podľa mesiaca, v ktorom bola stanovená diagnóza, hodnotené u všetkých pacientov spolu a osobitne u pacientov do veku 3 rokov v čase stanovenia diagnózy

Mesiac stanovenia diagnózy	**Pacienti**			
	Spolu		**Do 3 rokov**	
	N	%	N	%
Január	7	7,9	0	0,0
Február	11	12,4	3	17,6
Marec	10	11,2	2	11,8
Apríl	9	10,1	3	17,6
Máj	7	7,8	2	11,8
Jún	4	4,5	1	5,9
Júl	2	2,3	1	5,9
August	2	2,3	0	0,0
September	10	11,2	3	17,6
Október	11	12,4	1	5,9
November	10	11,2	0	0
December	6	6,7	1	5,9
Spolu	89	100,0	17	100,0

Zdravú populáciu zastupovala kontrolná skupina 53 dobrovoľných darcov: nediabetikov, bez príbuzenského vzťahu, s negatívnou rodinnou anamnézou na výskyt diabetes mellitus 1. aj 2. typu, vo veku 26,1 – 69,1 rokov (priemerný vek 45,1 ± 10,6), pochádzajúcich rovnako z viacerých regiónov SR. V súbore bolo 29 (54,7 %) mužov a 24 (45,3 %) žien (tab. 17).

Tab. 17 Vekové zloženie kontrolnej skupiny

		Spolu	**Pohlavie**	
			Ženy	**Muži**
Počet	N	53	24	29
	%	100,0	45,3	54,7
Priemerný vek	Roky	45,1 ± 10,6	43,6 ± 7,1	46,4 ± 5,6

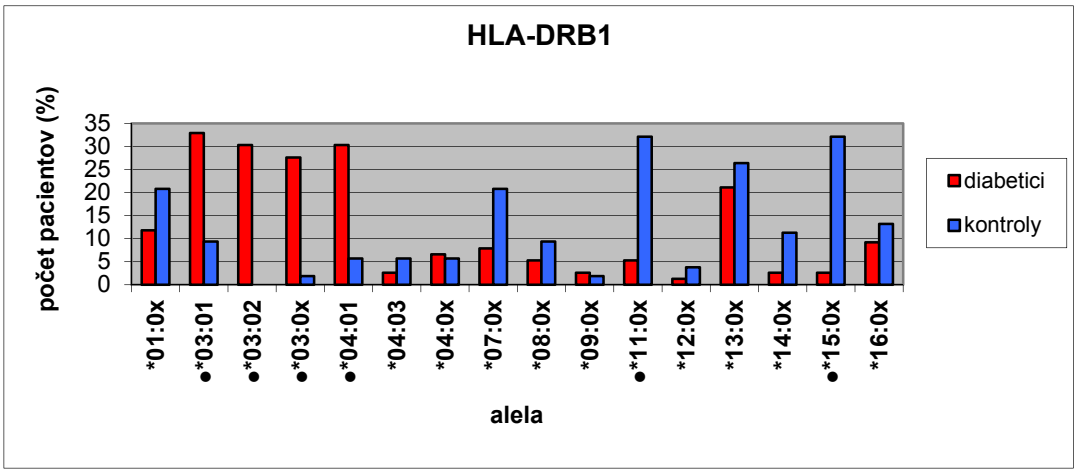
3.3.1. Analýza prítomnosti HLA-aliel druhej triedy

HLA typizáciu sme realizovali tak v súbore pacientov s *diabetes mellitus* 1. typu, ako aj v kontrolnej skupine. Určovali sme prítomnosť HLA aliel druhej triedy, t.j. *HLA-DRB1*, -*DQA1*, -*DQB1* a -*DPB1*. Získané výsledky sme publikovali vo viacerých prácach (51, 85, 86, 157).

HLA-DRB1 alely sme určili u 76 diabetikov a v kontrolnej skupine 53 dobrovoľných darcov (tab. 18, obr. 12).

Najfrekventovanejšími štatisticky významne častejšími alelami v súbore diabetikov boli ***HLA-DRB1*03*** a ****04*** (tab. 25). Alela ***HLA-DRB1*03*** sa vyskytovala u 90,8 % diabetikov v porovnaní s iba 11,4 % v kontrolnej skupine ($p < 0,0001$). Najvyššiu frekvenciu spomedzi DR3 aliel vo vyšetrovanom súbore mali alely ***DRB1*03:01*** a ***DRB1*03:02*** (32,9 % u diabetikov vs. 9,4 %, $p = 0,0007$, resp. 30,3 % vs. 0 %, $p < 0,0001$). Alely ***DRB1*03:0x*** sa vyskytovali u 27,6 % diabetikov v porovnaní s len 1,9 % v kontrolnej skupine ($p < 0,0001$). ***HLA-DRB1*04*** alely sa vyskytovali v súbore diabetikov v 39,5 % (bez *DRB1*04:03* v 36,9 %), v kontrolnej skupine u 11,4 % ($p < 0,0001$). Z nich sa štatisticky signifikantne častejšie v skupine diabetikov vyskytovala alela ***DRB1*04:01*** (30,3 % vs. 5,7 % v kontrolnej skupine, $p = 0,0006$). V kontrolnej skupine sa naproti tomu signifikantne častejšie vyskytovali alely ***DRB1*11:0x*** – 5,3 % v súbore diabetikov vs. 32,1 % v kontrolnom súbore ($p = 0,0006$) a ***DRB1*15:0x*** – 2,6 % u diabetikov vs. 32,1 % ($p < 0,0001$). Výsledky ostatných sledovaných aliel nedosiahli štatistickú významnosť.

Obr. 12 Frekvencia výskytu HLA-DRB1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine



Pozn.: Štatistická signifikantnosť znázornená bodkou.

Tab. 18 Frekvencia výskytu HLA-DRB1 aliel u pacientov s DM 1. typu a v kontrolnej skupine

HLA-	**Diabetici** (n = 76)		**Kontroly** (n = 53)		**Štatistická významnosť** (p ≤)	
	N	%	N	%	**Chí-kvadrát test**	**Fisherov test**
DRB1*01:0x	9	11,8	11	20,8	0,5911	0,6066
DRB1*03:01	25	32,9	5	9,4	**0,0007**	**0,0006**
DRB1*03:02	23	30,3	0	0	**< 0,0001**	**< 0,0001**
DRB1*03:0x	21	27,6	1	1,9	**< 0,0001**	**< 0,0001**
DRB1*04:01	23	30,3	3	5,7	**0,0006**	**0,0006**
DRB1*04:03	2	2,6	3	5,7	0,7824	1,0000
DRB1*04:0x	5	6,6	3	5,7	0,1065	0,1237
DRB1*07:0x	6	7,9	11	20,8	0,3051	0,4038
DRB1*08:0x	4	5,3	5	9,4	0,7581	0,7594
DRB1*09:0x	2	2,6	1	1,9	0,5065	0,6433
DRB1*11:0x	4	5,3	17	32,1	**0,0006**	**0,0013**
DRB1*12:0x	1	1,3	2	3,8	0,8036	1,0000
DRB1*13:0x	16	21,1	14	26,4	0,3381	0,4219
DRB1*14:0x	2	2,6	6	11,3	0,1921	0,2275
DRB1*15:0x	2	2,6	17	32,1	**< 0,0001**	**< 0,0001**
DRB1*16:0x	7	9,2	7	13,2	0,3929	0,4314

Pozn.: „x“ znamená existenciu viacerých izoforiem

Tab. 19 Frekvencia výskytu najčastejších HLA-DRB1 aliel – DR3, DR4 u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine

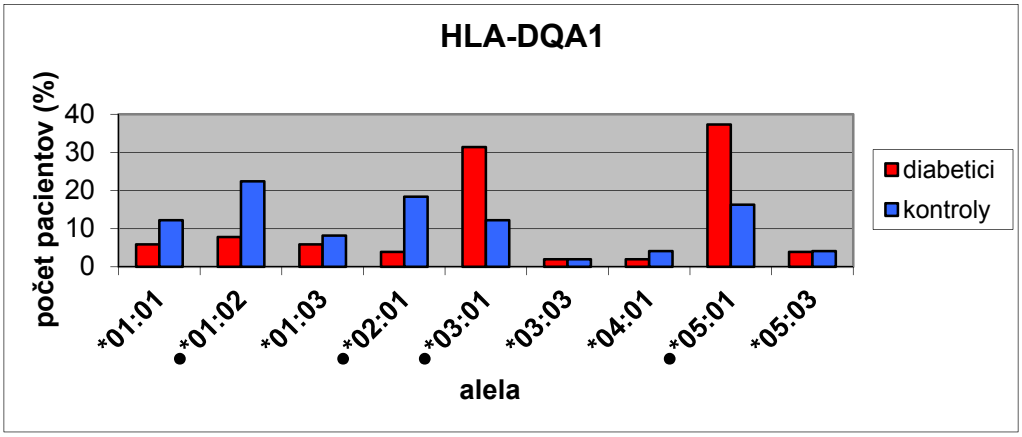
HLA-	**Diabetici** (N = 76)		**Kontroly** (N = 53)		**Štatistická významnosť** (p ≤)
	N	%	N	**%**	
DRB1*03	69	90,8	6	11,4	**< 0,0001**
DRB1*04 (okrem *04:03)	28	36,9	6	11,4	**< 0,0001**

Alely **HLA-DQA1** sme určovali u 51 diabetikov a u 49 jedincov v kontrolnej skupine (tab. 20, obr. 13). Najpočetnejšou a zároveň signifikantne častejšou v súbore diabetikov bola alela ***DQA1*05:01*** (37,3 % vs. 16,3 % v kontrolnej skupine, p = 0,0184), nasledovala alela ***DQA1*03:01*** (31,4 % vs. 12,2 %, p = 0,0210). Naopak vyšší a signifikantne častejší výskyt v kontrolnej skupine sme zaznamenali u aliel ***DQA1*02:01*** (3,9 % u diabetikov vs. 18,4 %, p = 0,0210) a ***DQA1*01:02*** (7,8 % vs. 22,4 %, p = 0,0409). Výsledky ostatných sledovaných aliel nedosiahli štatistickú významnosť.

Tab. 20 Frekvencia výskytu HLA-DQA1 aliel u pacientov s DM 1. typu a v kontrolnej skupine

HLA-	**Diabetici** (n = 51)		**Kontroly** (n = 49)		**Štatistická významnosť** (p ≤)	
	N	%	N	%	**Chí-kvadrát test**	**Fisherov test**
DQA1*01:01	3	5,9	6	12,2	0,2664	0,3134
DQA1*01:02	4	7,8	11	22,4	**0,0409**	0,0518
DQA1*01:03	3	5,9	4	8,2	0,6550	0,7124
DQA1*02:01	2	3,9	9	18,4	**0,0210**	**0,0264**
DQA1*03:01	16	31,4	6	12,2	**0,0210**	**0,0292**
DQA1*03:03	1	2,0	1	2,0	0,9772	1,0000
DQA1*04:01	1	2,0	2	4,1	0,5343	0,6136
DQA1*05:01	19	37,3	8	16,3	**0,0184**	**0,0243**
DQA1*05:03	2	3,9	2	4,1	0,9674	1,0000

Obr. 13 Frekvencia výskytu HLA-DQA1 aliel u pacientov s DM 1. typu a v kontrolnej skupine



Pozn.: Štatistická signifikantnosť znázornená bodkou.

Typizáciu **HLA-DQB1** aliel sme urobili u 89 pacientov s diagnózou DM 1. typu a u 53 dobrovoľných darcov (tab. 21, obr. 14).

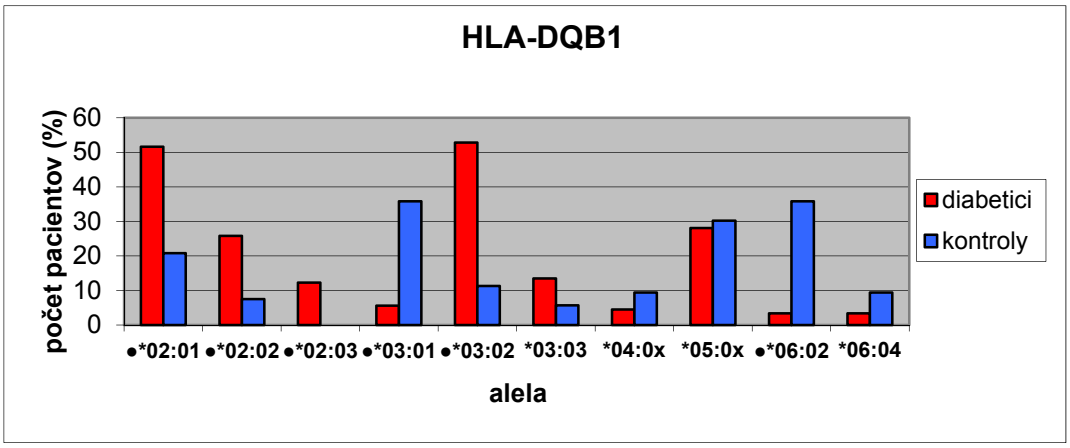
Alelami s najvyššou frekvenciou výskytu v rámci HLA-DQB1 boli ***DQB1*03:02*** (52,8 % u diabetikov vs. 11,3 % v kontrolnom súbore, p < 0,0001) a ***DQB1*02:01*** (51,6 % u diabetikov vs. 20,8 % v kontrolnej skupine, p = 0,0003). Signifikantne častejšie sa ďalej v súbore diabetikov vyskytovali aj alely ***DQB1*02:02*** a ***DQB1*02:03*** (25,8 % u diabetikov vs. 7,5 %, p = 0,0072; resp. 12,3 % vs. 0 %, p = 0,0077). Pri alele ***DQB1*03:01*** sme naopak zaznamenali vyššiu frekvenciu výskytu v kontrolnej skupine (5,6 % u diabetikov vs. 35,8 %, p < 0,0001), rovnako ako u ***DQB1*06:02*** (3,4 % u diabetikov vs. 35,8 % v kontrolnej skupine, p < 0,0001). Výsledky ostatných sledovaných aliel nedosiahli štatistickú významnosť.

Tab. 21 Frekvencia výskytu HLA-DQB1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine

HLA-	**Diabetici** (n = 89)		**Kontroly** (n = 53)		**Štatistická významnosť** (p ≤)	
	N	%	N	%	**Chí-kvadrát test**	**Fisherov test**
DQB1*02:01	46	51,6	11	20,8	**0,0003**	**0,0004**
DQB1*02:02	23	25,8	4	7,5	**0,0072**	**0,0076**
DQB1*02:03	11	12,3	0	0	**0,0077**	**0,0070**
DQB1*03:01	5	5,6	19	35,8	**< 0,0001**	**< 0,0001**
DQB1*03:02	47	52,8	6	11,3	**< 0,0001**	**< 0,0001**
DQB1*03:03	12	13,5	3	5,7	0,1424	0,1688
DQB1*04:0x	4	4,5	5	9,4	0,2426	0,2939
DQB1*05:0x	25	28,1	16	30,2	0,9851	1,0000
DQB1*06:02	3	3,4	19	35,8	**< 0,0001**	**< 0,0001**
DQB1*06:04	3	3,4	5	9,4	0,1296	0,1494

Pozn.: x znamená existenciu viacerých izoforiem

Obr. 14 Frekvencia výskytu HLA-DQB1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine



Pozn.: Štatistická signifikantnosť znázornená bodkou.

Frekvencie aliel lokusu **HLA-DP** boli v porovnaní s vyššie uvedenými lokusmi *-DR* a *-DQ* analyzované omnoho menej často a v slovenskej populácii vôbec. Náš súbor tvorilo 79 diabetikov a 45 dobrovoľníkov (tab. 22, obr. 15).

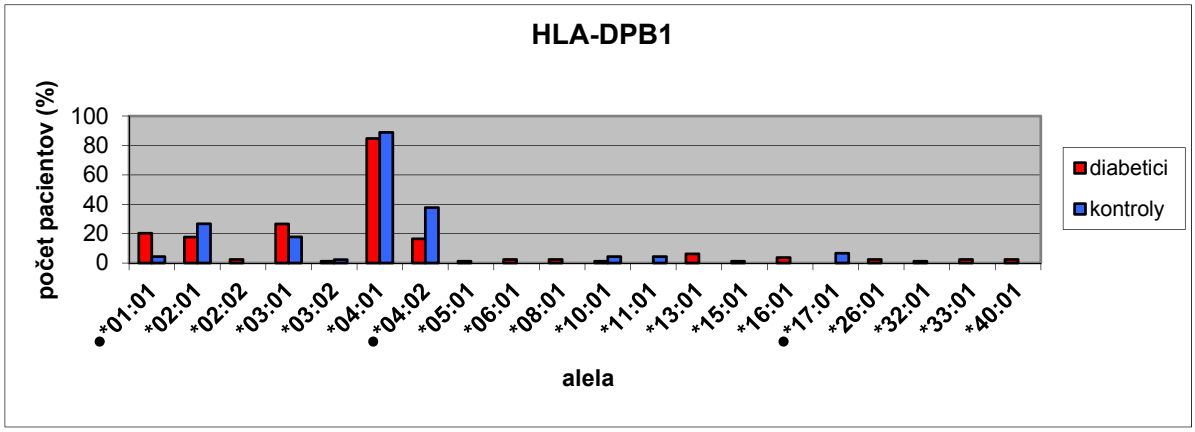
Alela ***DPB1*01:01*** sa vyskytovala u 20,3 % diabetikov a v kontrolnej skupine len u 4,4 %, pričom tento rozdiel bol štatisticky významný (p = 0,0236). Naopak vyššiu a štatisticky významne častejšiu frekvenciu výskytu v kontrolnej skupine sme zaznamenali pri alelách ***DPB1*04:02*** (16,5 % u diabetikov vs. 37,7 % v kontrolnej skupine, p = 0,0077) a ***DPB1*17:01***, ktorá sa vyskytovala výlučne len u 3 jedincov v kontrolnej skupine (0,0 % u diabetikov vs. 6,7 %, p = 0,0202).

Najpočetnejšou bola síce v oboch súboroch alela ***DPB1*04:01*** (84,8 % u diabetikov vs. 88,9 %), rozdiely medzi sledovanými súbormi však nedosiahli štatistickú signifikantnosť (p = 0,1828), rovnako ako ani u ostatných sledovaných aliel.

Tab. 22 Frekvencia výskytu HLA-DPB1 aliel u pacientov s DM 1. typu a v kontrolnej skupine

	Diabetici (n = 79)		**Kontroly** (n = 45)		**Štatistická významnosť** (p ≤)	
HLA-	N	%	N	%	**Chí-kvadrát test**	**Fisherov test**
DPB1*01:01	16	20,3	2	4,4	**0,0236**	**0,0289**
DPB1*02:01	14	17,7	12	26,7	0,2394	0,2584
DPB1*02:02	2	2,5	0	0	0,2819	0,5338
DPB1*03:01	21	26,6	8	17,8	0,5102	0,6476
DPB1*03:02	1	1,3	1	2,3	0,6844	1,0000
DPB1*04:01	67	84,8	40	88,9	0,1828	0,2391
DPB1*04:02	13	16,5	20	37,7	**0,0077**	**0,0096**
DPB1*05:01	1	1,3	0	0	0,4486	1,0000
DPB1*06:01	2	2,5	0	0	0,2819	0,5338
DPB1*08:01	2	2,5	0	0	0,2819	0,5338
DPB1*10:01	1	1,3	2	4,4	0,2680	0,2979
DPB1*11:01	0	0	2	4,4	0,0589	0,1298
DPB1*13:01	5	6,3	0	0	0,0849	0,1578
DPB1*15:01	1	1,3	0	0	0,4486	1,0000
DPB1*16:01	3	3,8	0	0	0,1857	0,5529
DPB1*17:01	0	0	3	6,7	**0,0202**	**0,0458**
DPB1*26:01	2	2,5	0	0	0,2819	0,5338
DPB1*32:01	1	1,3	0	0	0,4486	1,0000
DPB1*33:01	2	2,5	0	0	0,2819	0,5338
DPB1*40:01	2	2,5	0	0	0,2819	0,5338

Obr. 15 Frekvencia výskytu HLA-DPB1 aliel u pacientov s DM 1. typu a v kontrolnej skupine



Pozn.: Štatistická signifikantnosť znázornená bodkou.

3.3.2. Väzba HLA-DP aliel na alely kódujúce HLA-DR a -DQ molekuly

Sledovali sme aj prípadnú väzbu predispozičných, resp. protektívnych HLA-DP aliel s alelami, ktoré determinujú DR a DQ molekuly (tab. 23, 24). Predispozičná HLA-alela ***DPB1*01:01*** sa signifikantne častejšie vyskytovala u pacientov, ktorý boli zároveň nositeľmi ***DRB1*03*** (z 12 pacientov s DPB1*0101 malo 11 zároveň DRB1*03, 91,7 % vs. 8,3 %, p = 0,0030) alebo alely ***DRB1*04*** (83,3 % vs. 16,7 %, p = 0,0304). Podobne sa alela ***DPB1*01:01*** signifikantne častejšie združovala s alelou ***DQB1*02:01*** (86,7 % vs. 13,3 %, p = 0,0039). Väzbu alely ***DPB1*01:01*** s alelami ***DQB1*03:02***, ***DQA1*05:01***, resp. ***DQA1*03:01*** sme v našom súbore diabetikov neprekázali.

Protektívna alela ***DPB1*04:02*** sa štatisticky signifikantne častejšie nevyskytovala so žiadnou zo sledovaných protektívnych DR a DQ aliel (tab. 24).

Tab. 23 Väzby predispozičnej alely *HLA-DPB1*01:01* s predispozičnými DR a DQ alelami v súbore diabetikov

HLA-	***HLA-DPB1*01:01***		***non – HLA-DPB1*01:01***		**(p ≤)**
	N	%	N	%	
DRB1*03	11	91,7	1	8,3	**0,0030**
DRB1*04	10	83,3	2	16,7	**0,0304**
DQB1*02:01	13	86,7	2	13,3	**0,0039**
DQB1*03:02	5	33,4	10	66,6	0,1098
DQA1*05:01	7	77,8	2	22,2	0,1505
DQA1*03:01	3	33,4	6	66,6	0,0844

Tab. 24 Väzby protektívnej alely *HLA-DPB1*04:02* s protektívnymi DR a DQ alelami v kontrolnej skupine

HLA-	***HLA-DPB1*04:02***		***non – HLA-DPB1*04:02***		**(p ≤)**
	N	%	N	%	
DRB1*15:0x	3	25,0	9	75,0	0,2863
DRB1*11:0x	5	45,5	6	54,5	0,5457
DQB1*06:02	4	23,5	13	76,5	0,1245
DQB1*03:01	10	52,6	9	47,4	0,0789
DQA1*01:02	8	50,0	8	50,0	0,8542
DQA1*02:01	7	43,8	9	56,2	0,6521

Vzťah HLA aliel a veku pri stanovení diagnózy

Sledovali sme aj vzťah medzi prítomnosťou predispozičných HLA-aliel a vekom pri stanovení diagnózy (tab. 25). U jednotlivých predispozičných HLA-aliel sme vypočítali priemerný vek pri stanovení diagnózy pre nositeľov určitej alely a porovnali sme ho

s pacientmi, ktorý uvedenú alelu nemali. Štatisticky signifikantné rozdiely sme zaznamenali u pacientov s alelou ***DQB1*02:01***, ktorí boli mladší v porovnaní s pacientmi, ktorí alelu nemali (priemerný vek 7,9 rokov u nositeľov alely *DQB1*02:01* v porovnaní s 8,3 rokmi u pacientov bez nej, p = 0,0219). Podobne bol priemerný vek signifikantne nižší u pacientov s alelou ***DQB1*03:02*** (7,8 rokov vs. 9,0 rokov, p = 0,0001) a ***DQA1*03:01*** (8,2 rokov vs. 8,5 rokov, p = 0,0001). Naopak pacienti s alelou ***DPB1*01:01*** boli signifikantne starší (9,4 rokov u nositeľov alely vs. 8,1 rokov, p = 0,0316). Vekovú závislosť pri alelách ***DRB1*03***, ***DRB1*04*** a ***DQA1*05:01*** sme naproti tomu v našom súbore nezistili.

Tab. 25 Porovnanie priemerného veku pri stanovení diagnózy u pacientov s jednotlivými predispozičnými HLA alelami a bez nich

HLA-	Pacienti s HLA-		Pacienti bez HLA-		(p ≤)
	Priemerný vek (roky)	Interkvartilný rozsah (roky)	Priemerný vek (roky)	Interkvartilný rozsah (roky)	
DRB1*03	6,9	2,8 – 10,9	8,3	6,3 – 13,5	0,0921
DRB1*04	7,9	3,4 – 9,8	8,3	3,6 – 13,3	0,4488
DQB1*02:01	7,9	3,6 – 11,3	8,3	5,2 – 12,0	**0,0219**
DQB1*03:02	7,8	3,6 – 9,4	9,0	5,7 – 14,3	**0,0001**
DQA1*05:01	8,2	4,75 – 11,2	8,3	3,4 – 11,4	0,9685
DQA1*03:01	8,2	5,1 – 9,2	8,5	3,6 – 12,3	**0,0001**
DPB1*01:01	9,4	6,5 – 11,1	8,1	4,5 – 12,4	**0,0316**

3.3.3. Analýza pozitivity špecifických autoprotilátok

V súbore diabetikov sme ďalej sledovali výskyt a pozitivitu nasledovných autoprotilátok zistenú najneskôr do jedného roka po stanovení diagnózy: protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutámovej (GADA), tyrozínfosfatáze β-buniek pankreasu (IA-2A) a proti inzulínu (IAA) (tab. 26). Za pozitívne sme považovali hodnoty > 1 $IU.ml^{-1}$ pri GADA aj IA-2A a > 10 $IU.\ ml^{-1}$ pri IAA.

Vzhľadom k tomu, že nie všetci pacienti mali vyšetrené všetky autoprotilátky, resp. niektorí nemali vyšetrenú žiadnu a tiež pre väčšiu prehľadnosť, uvádzame v tab. 27 hodnoty jednotlivých parametrov. Okrem iného z nej vyplýva, že u 19 pacientov s poradovými číslami 1 – 19 (21,4 %) sa nevyšetrovali nijaké protilátky. Aspoň jednu autoprotilátku (vždy pritom išlo o GADA) malo vyšetrených 70 diabetikov (poradové čísla 20 – 89, 78,6 %), 57 z nich (poradové čísla 33 – 89, 64,1 %) malo vyšetrenú aj protilátku proti tyrozínfosfatáze β-buniek pankreasu (IA-2A) a z nich malo 19 pacientov (poradové čísla 71 – 89, 21,4 %) vyšetrenú aj protilátku proti inzulínu (IAA) – t. j. všetky tri sledované autoprotilátky.

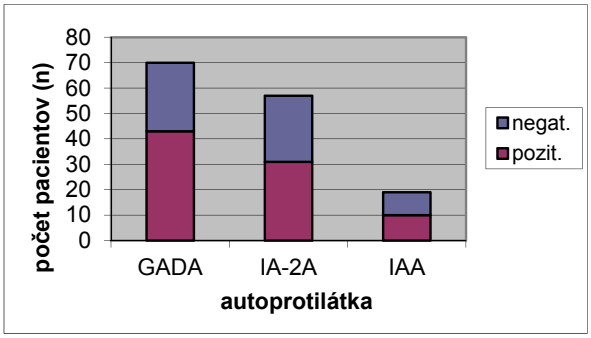
Tab. 26 Rozdelenie súboru diabetikov podľa vyšetrenej autoprotilátky

		GADA			Nijaká autoprotilátka	Spolu
		Iba GADA	+ IA-2A	+IA-2A + IAA		
Počet	N	13	38	19	19	89
	%	14,5	42,7	21,4	21,4	100,0

Počty pacientov podľa typu vyšetrenej autoprotilátky, resp. ich kombinácie sú uvedené v tab. 26. Takmer rovnaké zastúpenie (zhodne po 1/5) predstavujú pacienti, ktorí majú vyšetrenú len GADA, ako aj tí, ktorí majú vyšetrené všetky tri, resp. žiadnu zo sledovaných protilátok. Zvyšné 2/5 predstavujú pacienti, ktorí majú vyšetrenú kombináciu GADA + IA-2A.

Pozitivita jednotlivých protilátok sa prakticky nelíšila (tab. 28, obr. 16) a pohybovala sa od 52,6 % (IAA) do 61,4 % (GADA).

Obr. 16 Pozitivita autoprotilátok v súbore diabetikov pri ich hodnotení jednotlivo



Pri analýze týchto nálezov vzhľadom k pohlaviu (tab. 29) sme zistili, že pri IA-2A štatisticky signifikantne prevažovali dievčatá (19 vs. 12 chlapcov, p = 0,0215), kým pri GADA, resp. IAA sme tento rozdiel vo výskyte medzi pohlaviami nepozorovali.

Tab. 27 Hodnota vyšetrených autoprotilátok u diabetikov

č.	Pohl.	GADA	IA-2A	IAA	č.	Pohl.	GADA	IA-2A	IAA	č.	Pohl.	GADA	IA-2A	IAA
1	♂	–	–	–	31	♂	**1,95**	–	–	61	♀	0,9	0,6	–
2	♀	–	–	–	32	♀	0,1	–	–	62	♂	0,1	0,2	–
3	♂	–	–	–	33	♂	0,1	0,2	–	63	♀	0,7	**3,5**	–
4	♀	–	–	–	34	♀	0,45	**18,2**	–	64	♂	**8,0**	**9,1**	–
5	♂	–	–	–	35	♂	**6,5**	0,2	–	65	♀	**4,4**	**10,2**	–
6	♀	–	–	–	36	♂	**2,4**	0,29	–	66	♀	0,5	0,4	–
7	♂	–	–	–	37	♂	0,1	0,6	–	67	♀	0,1	**7,6**	–
8	♀	–	–	–	38	♀	**6,7**	**18,9**	–	68	♀	**5,4**	0,1	–
9	♀	–	–	–	39	♂	0,1	0,2	–	69	♀	0,5	**7,9**	–
10	♀	–	–	–	40	♀	0,1	**18,0**	–	70	♀	**3,3**	**20,7**	–
11	♀	–	–	–	41	♂	**12,3**	0,2	–	71	♀	**1,52**	**1,71**	**12,1**
12	♂	–	–	–	42	♂	**5,8**	0,2	–	72	♀	**2,84**	**33,21**	1,72
13	♂	–	–	–	43	♀	0,1	**6,2**	–	73	♀	**21,12**	**1,38**	0,57
14	♀	–	–	–	44	♂	**18,5**	0,2	–	74	♀	**16,92**	**8,28**	**18,33**
15	♀	–	–	–	45	♂	**3,6**	**4,5**	–	75	♂	**2,55**	**8,79**	2,87
16	♂	–	–	–	46	♀	0,1	**12,7**	–	76	♂	**1,01**	**24,42**	**17,95**
17	♂	–	–	–	47	♂	0,3	0,21	–	77	♂	0,16	0,22	7,84
18	♂	–	–	–	48	♂	**7,4**	**5,0**	–	78	♀	**2,95**	0,75	**20,32**
19	♀	–	–	–	49	♀	**24,8**	**2,4**	–	79	♂	0,69	**2,71**	**30,12**
20	♀	**8,32**	–	–	50	♂	0,5	**2,0**	–	80	♂	0,54	**6,07**	**36,1**
21	♂	**3,1**	–	–	51	♂	**5,2**	0,2	–	81	♀	**17,07**	**12,45**	0,59
22	♂	**4,61**	–	–	52	♂	**7,5**	0,2	–	82	♂	0,44	0,22	0,77
23	♀	**1,33**	–	–	53	♀	0,1	**26,9**	–	83	♀	**1,7**	0,41	**30,84**
24	♂	0,7	–	–	54	♂	**1,5**	0,6	–	84	♂	**1,01**	**1,73**	**44,57**
25	♀	**11,42**	–	–	55	♂	**3,5**	0,2	–	85	♂	**1,54**	**4,35**	**61,54**
26	♀	**8,8**	–	–	56	♀	0,2	0,7	–	86	♂	**1,51**	0,12	5,13
27	♀	0,1	–	–	57	♂	0,1	0,2	–	87	♂	**1,49**	**5,02**	2,2
28	♀	**20,55**	–	–	58	♀	**5,5**	0,8	–	88	♂	**6,71**	**25,79**	0,19
29	♀	**3,15**	–	–	59	♀	0,3	0,2	–	89	♀	**2,65**	**7,26**	**17,85**
30	♀	0,37	–	–	60	♀	**1,3**	**2,5**	–					

Pozn.: Pozitivita je zvýraznená tučným písmom.

Tab.28 Pozitivita autoprotilátok v súbore diabetikov pri ich hodnotení jednotlivo

		GADA	**IA-2A**	**IAA**
Pozitívne	N	43	31	10
	%	61,4	54,4	52,6
Negatívne	N	27	26	9
	%	38,6	45,6	47,4
Spolu	N	70	57	19
	%	100,0	100,0	100,0

Všetky sledované autoprotilátky boli najčastejšie pozitívne u pacientov, u ktorých bola diagnóza stanovená vo veku 7 – 10 rokov. GADA boli pozitívne u pacientov s priemerným vekom pri stanovení diagnózy 8,3 rokov, IA-2A u 8,2-ročných a IAA u najmladších, 7,6-ročných (tab. 30). S pribúdajúcim vekom pri stanovení diagnózy u pacientov výrazne klesala

pozitivita protilátok, v skupine nad 15 rokov boli len 5 pacienti s pozitivitou GADA (11,6 %), 4 s pozitívnou IA-2A (12,9 %) a IAA bola pozitívna len u 1 pacienta (10 %) (tab. 31, obr. 17).

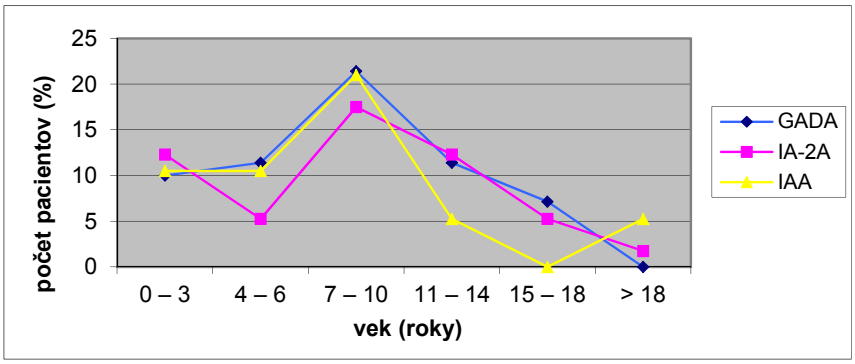
Tab. 29 Pozitivita autoprotilátok v súbore diabetikov (dievčatá a chlapci) pri ich hodnotení jednotlivo

		GADA	**IA-2A**	**IAA**
Dievčatá	N	21	19	5
	%	48,8	61,3	50,0
Chlapci	N	22	12	5
	%	51,2	38,7	50,0
Spolu	N	43	31	10
	%	100,0	100,0	100,0
	P	0,5841	**0,0215**	0,4625

Tab. 30 Priemerný vek pacientov s pozitivitou jednotlivých autoprotilátok pri stanovení diagnózy

Autoprotilátka	**Priemerný vek pri stanovení diagnózy** (roky)
GADA	8,3 ± 3,1
IA-2A	8,2 ± 4,3
IAA	7,6 ± 4,2

Obr. 17 Rozdelenie pacientov s pozitivitou jednotlivých autoprotilátok do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy



V tab. 32 uvádzame prítomnosť pozitivity aspoň jednej autoprotilátky (GADA a/alebo IA-2A a/alebo IAA), ak sa tieto vyšetrili a následne hodnotili nie jednotlivo, ale v kombináciách. Zatiaľ čo pri ich samostatnom hodnotení tak, ako sme to už uviedli v tab. 31, resp. obr. 17, sa ich pozitivita pohybovala od 52,6 % (IAA) do 61,4 % (GADA), pri súbežnom vyšetrení viacerých typov autoprotilátok nález ich pozitivity výrazne vzrástol. Pozitivita sa pohybovala

od 78,9 % (GADA + IA-2A) až do 89,8 % (GADA + IAA, resp. GADA + IA-2A + IAA). Na druhej strane v skupine pacientov, ktorí mali vyšetrené všetky tri sledované autoprotilátky (N = 19) boli tieto súčasne pozitívne len u 6 (pacienti s poradovým číslom 71, 74, 76, 84, 85 a 89), t.j. približne u 1/3 (31,6 %) a všetky sledované autoprotilátky negatívne mali len 2 z nich (poradové číslo 77 a 82, tab. 27), čo predstavuje len 10,5 %.

Tab. 31 Rozdelenie pacientov s pozitivitou jednotlivých autoprotilátok do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy

Vek pri stanovení dg (roky)	**GADA**		**IA-2A**		**IAA**	
	N	%	N	%	N	%
0 – 3	7	16,3	7	22,6	2	20,0
4 – 6	8	18,6	3	9,7	2	20,0
7 – 10	15	34,9	10	32,2	4	40,0
11 – 14	8	18,6	7	22,6	1	10,0
15 – 18	5	11,6	3	9,7	0	0
> 18	0	0	1	3,2	1	10,0
Spolu	43	100,0	31	100,0	10	100,0

Tab. 32 Pozitivita aspoň jednej autoprotilátky v súbore diabetikov pri ich vyšetrení v kombinácii

		Kombinácie autoprotilátok			
		GADA + IA-2A	**GADA + IAA**	**IA-2A + IAA**	**GADA + IA-2A + IAA**
Pozitivita	N	45	17	16	17
	%	78,9	89,5	84,2	89,5
Negativita	N	12	2	3	2
	%	21,1	10,5	15,8	10,5
Spolu	N	57	19	19	19
	%	100,0	100,0	100,0	100,0

3.3.4. Vzťahy medzi HLA-alelami a pozitivitou autoprotilátok

Prítomnosť pozitivity autoprotilátok sme porovnali s výskytom jednotlivých predispozičných HLA-aliel tak, ako je znázornené v tab. 33 (*HLA-DRB1*03* a *DRB1*04*), tab. 34 (*HLA-DQA1*05:01* a *DQA1*03:01*), tab. 35 (*HLA-DQB1*02:01* a *DQB1*03:02*) a tab. 36 (*HLA-DPB1*01:01*).

Protilátka GADA sa vyskytovala signifikantne častejšie u nositeľov alely ***HLA-***

DQB1*02:01 (40 % vs. 10 %, p = 0,0014). U pacientov s ***HLA-DRB1*03*** a ***HLA-DRB1*04*** sa GADA vyskytovala častejšie (38,9 % vs. 16,9 %, p = 0,0676, resp. 23,7% vs. 13,5 %, p = 0,6029), avšak štatisticky nesignifikantne – rovnako ako u ostatných sledovaných predispozičných aliel.

Asociácia protilátky IA-2A s niektorou z predispozičných HLA aliel dosiahla štatistickú významnosť u nositeľov alely (35,1 % vs. 14 %, p = 0,0111), naopak u nositeľov alely ***DRB1*03*** bola častejšia negativita IA-2A (35, 3% vs. 23,5 %, p = 0,0269).

Protilátka IAA bola podľa výsledkov v nami sledovanom súbore negatívne asociovaná s prítomnosťou ***HLA-DRB1*03*** (bola prítomná u 7,7 % vs. 38,5 % u pacientov bez *DRB1*03*, p = 0,0483) a ***HLA-DQB1*02:01*** (10,5 % vs. 31,5 %, p = 0,0397).

U predispozičných HLA-DQA1, resp. HLA-DPB1 aliel sme na rozdiel od vyššie uvedeného nezistili vzťah s pozitivitou žiadnej zo sledovaných autoprotilátok.

Tab. 33 Vzťah medzi pozitivitou autoprotilátok a prítomnosťou predispozičných HLA-DRB1 aliel

Autoprotilátka		***HLA-DRB1*03*** N (%)	***HLA-DRB1*04*** N (%)
GADA	Pozit.	23 (38,9 %)	14 (23,7 %)
	Negat.	10 (16,9 %)	8 (13,5 %)
	(p =)	0,0676	0,6029
IA-2A	Pozit.	12 (23,5 %)	13 (25,5 %)
	Negat.	18 (35,3 %)	6 (11,7 %)
	(p =)	**0,0269**	0,0879
IAA	Pozit.	1 (7,7 %)	4(30,7 %)
	Negat.	5 (38,5 %)	4 (30,7 %)
	(p =)	**0,0483**	0,7249

Tab. 34 Vzťah medzi pozitivitou autoprotilátok a prítomnosťou predispozičných HLA-DQA1 aliel

Autoprotilátka		***HLA-DQA1*05:01*** N (%)	***HLA-DQA1*03:01*** N (%)
GADA	Pozit.	8 (80,0)	11 (84,6)
	Negat.	2 (20,0)	2 (15,4)
	(p =)	1,0000	0,5482
IA-2A	Pozit.	2 (50,0)	8 (80,0)
	Negat.	2 (50,0)	2 (20,0)
	(p =)	0,8760	1,000
IAA	Pozit.	2 (50,0)	4 (40,0)
	Negat.	2 (50,0)	6 (60,0)
	(p =)	0,8760	0,4642

Tab. 35 Vzťah medzi pozitivitou autoprotilátok a prítomnosťou predispozičných HLA-DQB1 aliel

Autoprotilátka		***HLA-DQB1*02:01*** N (%)	***HLA-DQB1*03:02*** N (%)
GADA	Pozit.	28 (40 %)	23 (32,8 %)
	Negat.	7 (10 %)	12 (17,1 %)
	(p =)	**0,0014**	0,4613
IA-2A	Pozit.	13 (22,8 %)	20 (35,1 %)
	Negat.	15 (26,3 %)	8 (14 %)
	(p =)	0,2359	**0,0111**
IAA	Pozit.	2 (10,5 %)	7 (36,8 %)
	Negat.	6 (31,5%)	7 (36,8 %)
	(p =)	**0,0397**	0,7007

Tab. 36 Vzťah medzi pozitivitou autoprotilátok a prítomnosťou predispozičnej HLA-DPB1 alely

Autoprotilátka		***HLA-DPB1*01:01*** N (%)
GADA	Pozit.	8 (80,0)
	Negat.	2 (20,0)
	(p =)	0,1654
IA-2A	Pozit.	2 (25,0)
	Negat.	6 (75,0)
	(p =)	0,1554
IAA	Pozit.	1 (33,3)
	Negat.	2 (66,7)
	(p =)	0,7353

Najrizikovejšie HLA haplotypy *HLA-DRB1*03:0x*, *-DQA1*05:01*, *-DQB1*02:01* a *HLA-DRB1*04:0x*, *-DQA1*03:01*, -DQB1*03:02 malo v našom súbore 15, resp. 18 z 51 diabetikov (29,4 %, resp. 35,3 %), u ktorých boli naraz typizované *DRB1*, *DQA1* aj *DQB1* alely.

U pacientov s haplotypom *HLA-DRB1*03:0x*, *-DQA1*05:01*, *-DQB1*02:01* je popisovaná častejšia asociácia s GADA (26). V našom súbore sme pozitivitu GADA zaznamenali len u 5 pacientov s uvedeným rizikovým haplotypom. Tento výskyt nedosiahol štatistickú významnosť (p = 0,8073) – tab. 37a.

U pacientov s haplotypom *HLA-DRB1*04:0x*, *-DQA1*03:01*, *-DQB1*03:02* sa udáva častejšia asociácia s IA-2 a IAA (27). V našom súbore sme pozitivitu IA-2 zaznamenali u 6 pacientov s uvedeným rizikovým haplotypom (p = 0,4164) a pozitivitu IAA len u 3 pacientov (p = 0,7968) – tab. 37b, t. j. u oboch autoprotilátok bez štatistickej významnosti.

V tab. 38 a tab. 39 uvádzame HLA alely pacientov, u ktorých sa zistila prítomnosť všetkých troch sledovaných autoprotilátok, alebo naopak, nemali ani jednu z nich. Napriek očakávaniu sme medzi týmito skupinami nezistili prakticky žiadne rozdiely vo výskyte predispozičných ani protektívnych aliel.

Tab. 37a Asociácia rizikového haplotypu a výskyt autoprotilátok GADA

	Haplotyp *HLA-DRB1*03:0x / -DQA1*05:01 / -DQB1*02:01*
N	15
%	29,4
Pozitivita GADA	5
(p =)	0,8073

Tab. 37b Asociácia rizikového haplotypu a výskyt autoprotilátok IA-2A, IAA

	Haplotyp *HLA-DRB1*04:0x / -DQA1*03:01 / -DQB1*03:02*
N	18
%	35,3
Pozitivita IA-2A	6
(p =)	0,4164
Pozitivita IAA	3
(p =)	0,7968

Tab. 38 HLA alely u pacientov s pozitivitou všetkých troch sledovaných autoprotilátok

č.	**HLA-alela**							
	DQA1		***DQB1***		***DRB1***		***DPB1***	
71	**03:01*	**03:01*	**03:02*	**03:02*	**04:01*	**08:0x*	-	-
74	**03:03*	**05:03*	**03:02*	**03:02*	**04:01*	**11:0x*	**03:01*	**16:01*
76	**03:01*	**05:01*	**03:02*	**03:02*	**04:01*	**12:0x*	**26:01*	**33:01*
84	-	-	**02:01*	**03:02*	-	-	-	-
85	**01:01*	**03:01*	**03:02*	**05:0x*	**01:0x*	**04:01*	**03:01*	**04:01*
89	**01:02*	**03:01*	**03:02*	**06:04*	-	-	-	-

Tab. 39 HLA alely u pacientov s negativitou všetkých troch sledovaných autoprotilátok

č.	**HLA-alela**							
	DQA1		***DQB1***		***DRB1***		***DPB1***	
77.	**03:01*	**05:01*	**02:01*	**03:02*	**03:01*	**04:01*	**04:01*	**32:01*
82.	**02:01*	**03:01*	**02:02*	**03:02*	**07:0x*	**08:0x*	**03:01*	**04:01*

3.4. DISKUSIA

Autoimunitné choroby v súčasnosti postihujú 5 – 9 % populácie a podľa niektorých autorov sú celosvetovo treťou najčastejšou príčinou mortality a morbidity (po kardiovaskulárnych a nádorových chorobách) (1, 3, 6). Podľa existencie, resp. vlastností autoantigénu ich môžeme rozdeliť na orgánovo-špecifické a orgánovo-nešpecifické (systémové) choroby. Na ich rozhraní, podľa niektorých autorov, stoja choroby s prevažujúcou manifestáciou v určitom orgáne, ktoré sú ale doprevádzané výskytom autoprotilátok proti orgánovo-nešpecifickým antigénom a tiež viacerými príznakmi poškodenia mimo cieľový orgán – tzv. orgánovo-lokalizované choroby (4, 5).

V každodennej klinickej praxi sa najčastejšie stretávame s *diabetes mellitus* 1. typu, reumatoidnou artritídou, Gravesovou-Basedowovovou chorobou, pernicióznou anémiou, systémovým *lupus erythematosus* a *sclerosis multiplex*. Tieto predstavujú viac ako polovicu všetkých pacientov postihnutých autoimunitnými chorobami (autoimunitná etiológia bola doteraz dokázaná pri viac ako osemdesiatich chorobách) (24).

Diabetes mellitus 1. typu môže byť v mnohých ohľadoch považovaný za „prototyp“ orgánovo-špecifickej autoimunitnej choroby. Táto komplexná, multifaktoriálna choroba, ktorej prevalencia v ostatných rokoch rastie, sa stáva nielen zdravotníckym, ale vzhľadom k nákladnosti liečby pacientov, najmä v štádiu orgánových komplikácií, aj celospoločenským a ekonomickým problémom.

Celosvetovo sa počet diabetikov 1. typu u detí vo veku 1 – 14 rokov v roku 2011 odhadoval na 490 100 pacientov. Ukazuje sa, že počet diabetikov 1. typu v populácii stúpa ročne priemerne o 3,9 % (tab. 6) (55, 56, 57)

Zvýšený výskyt sa v súčasnosti pozoruje najmä v západných krajinách, kde choroba postihuje stále nižšie vekové skupiny obyvateľstva (53). Pre výskyt autoimunitných chorôb vo všeobecnosti, ako aj autoimunitného DM, je ďalej typický tzv. severo-južný gradient (jednou z krajín s najvyšším výskytom DM1A je dlhodobo Fínsko). Slovensko patrí spolu s ostatnými štátmi v stredovýchodnej Európe medzi krajiny s najvyšším nárastom incidencie – relatívny nárast sa odhaduje na 5,3 %. V Slovenskej republike postihuje v súčasnosti asi 3,97 % obyvateľov, prevalencia tejto choroby sa v populácii detí do 14 rokov odhaduje na 0,1 % obyvateľov a v tejto vekovej skupine podľa údajov IDF z roku 2011 na 13,6/100 000 detí (52, 54, 58).

Všeobecne akceptovaným názorom je, že DM 1. typu je predovšetkým chorobou detí a mladých dospelých, avšak objaviť sa môže v akomkoľvek veku. Choroba je veľmi zriedkavá pred 9. mesiacom života a vrcholí medzi 5. – 15. rokom, s pribúdajúcim vekom

incidencia klesá (13, 64). Choroba patrí medzi najčastejšie chronické choroby detského a mladého dospelého veku (spolu s celiakiou a juvenilnou idiopatickou artritídou sú najčastejšími autoimunitnými chorobami detského veku) (3). Do dvadsiateho roku veku je diagnostikovaných až 85 % pacientov, čo je o niečo skôr ako tomu býva u väčšiny iných autoimunitných chorôb, ktoré sú spravidla diagnostikované v dospelom veku (13, 57).

Ďalšou „odchýlkou“ od všeobecných vlastností autoimunitných chorôb je , že u diabetikov 1. typu nepozorujeme prevahu ženského pohlavia, ako tomu býva u väčšiny autoimunitných chorôb. V detstve sú vznikom DM1A ohrozené obidve pohlavia približne rovnako. Neskôr sú v incidencii choroby viditeľné dva menšie vrcholy, ktoré zodpovedajú puberte dievčat a chlapcov, kedy je v organizme zvýšená potreba inzulínu – u dievčat priemerne o 1 – 2 roky skôr (17, 57, 66).

V našej práci sme analyzovali súbor 89 pacientov s diagnózou *diabetes mellitus* 1.typu stanovenou podľa medzinárodných kritérií (50). V súbore boli porovnateľné počty dievčat a chlapcov, pacienti boli vybraní tak, aby reprezentovali západné, stredné aj východné Slovensko. Súbor pacientov s DM 1. typu bol porovnateľný s kontrolnou skupinou čo do počtu pacientov, rovnako ako zastúpením oboch pohlaví (tab. 11, 17). Vyšší vek darcov v kontrolnej skupine nebol rozhodujúci, nakoľko sme ich výsledky použili na porovnanie so súborom diabetikov pri analýze frekvencií HLA-aliel nezávislých od veku.

V našom súbore sa priemerný vek stanovenia diagnózy u dievčat a chlapcov nelíšil (tab. 14), najviac diagnostikovaných pacientov bolo rovnako u oboch pohlaví vo vekovej skupine 7 – 10 rokov, druhým najpočetnejším vekovým pásmom bol vek 11 – 14 rokov, resp. 0 – 3 roky, kedy sa rozdiely medzi pohlaviami ešte viac stierali (tab. 15 a, b, c). Rovnako bol u oboch pohlaví viditeľný trend k znižovaniu počtu pacientov s novoobjaveným DM 1. typu s pribúdajúcim vekom, čo zodpovedá už uvedeným celosvetovým trendom v incidencii choroby. Medzi pohlaviami sme významnejšie rozdiely vo veku pacientov pri stanovení diagnózy nezaznamenali, čo bude pravdepodobne spôsobené veľkosťou súboru. Rozdiely medzi pohlaviami nie sú totiž až také nápadné a výrazné ani v iných prácach (17, 57).

Pomaly progredujúca forma DM, ktorá sa prejaví až v dospelom veku, sa nazýva LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*), ktorý sa niekedy označuje aj ako diabetes mellitus typu 1,5. Diagnostickými kritériami pre LADA sú okrem dospelého veku v čase manifestácie choroby a prítomnosti autoprotilátok aj potreba inzulinoterapie najneskôr po šiestich mesiacoch od stanovenia diagnózy (56, 118). Prítomnosť autoprotilátok odlišuje LADA od DM 2, avšak vzhľadom k tomu, že neexistuje jasne definovaná črta, ktorá by LADA odlišovala od DM1A, niektorí autori považujú LADA len za pomaly progredujúci DM1A

(116, 117). V našom súbore bola diagnóza u všetkých pacientov stanovená do 19. roku ich života, takže LADA neprichádzala do úvahy.

Z literatúry je tiež známa tzv. sezónna variabilita v incidencii DM 1. typu (13). Najviac nových prípadov tohto druhu DM pozorujeme v obdobiach, kedy je organizmus prirodzene náchylnejší k vírusovým infekciám – skorá jar, jeseň, zima (67). Pri infekcii, rovnako ako pri strese alebo traume, sú v organizme vo zvýšenej miere vyplavované kontraregulačné hormóny inzulínu (katecholamíny, glukokortikoidy, glukagón), čo za fyziologických okolností organizmus kompenzuje vyplavením väčšieho množstva inzulínu. Avšak pacient s dovtedy latentným diabetes mellitus 1.typu takéhoto zvýšenie hladiny inzulínu nedokáže zvládnuť. Infekcia ešte urýchli už dlhšie trvajúci proces deštrukcie β-buniek pankreasu a choroba sa manifestuje (68). O variabilite viazanej na ročné obdobia a vyššie riziko infekcie sa začína pochybovať u najmladších pacientov, u ktorých je inzulitída spravidla agresívnejšia a deštrukcia β-buniek prebieha príliš rýchlo na to, aby mohla byť výraznejšie akcelerovaná infekciou (65).

V nami sledovanom súbore bolo v zhode s vyššie uvedeným najviac novodiagnostikovaných pacientov vo februári a októbri, ďalej v marci, septembri a novembri – teda podľa očakávania na jar a v jeseni. Naopak najmenej nových pacientov pribúdalo v júli a auguste (tab. 16, obr. 11a).

V skupine najmladších pacientov – do 3 rokov veku v čase stanovenia diagnózy, boli však tiež najpočetnejšími mesiacmi február, apríl a september. V januári, auguste a novembri sa nevyskytli žiadni pacienti. Aj po zohľadnení veľkosti súboru (mesačný výskyt sa pohyboval len od 0 do 3 pacientov) teda badať tendenciu k opisovanej variabilite (v jarných a jesenných mesiacoch boli diagnostikované viac ako dve tretiny najmladších pacientov) i v tejto vekovej skupine (tab. 16, obr. 11b).

Etiopatogenéza DM1A však takmer v plnom rozsahu kopíruje všeobecný scenár vývoja autoimunitných chorôb (pozri kap. 1.3 a 2.3). Dnes je už, najmä na základe sledovania familiárneho výskytu a konkordantnosti vo výskyte u dvojčiat, jednoznačne dokázané, že k vzniku choroby dochádza predovšetkým u geneticky predisponovaného jedinca, u ktorého dôjde vplyvom spúšťacieho stimulu k rozvoju (auto)imunitných reakcií, ktorých výsledkom je deštrukcia pankreatických β-buniek a absolútny nedostatok endogénneho inzulínu (6, 73).

Genetická predispozícia je polygénová a je zjavná pri všetkých autoimunitných chorobách, aj keď podľa výsledkov dostupných štúdií sú choroby so silnejšou (*diabetes mellitus* 1. typu), aj s relatívne slabšou (reumatoidná artritída, sklerodermia) genetickou asociáciou (24).

Najsilnejšie sú autoimunitné choroby asociované s génmi hlavného histokompatibilného komplexu (u človeka označované aj ako HLA-gény – *Human Leukocyte Antigens*). Táto skupina génov na 6. chromozóme, ktorých hlavnou úlohou je prezentácia antigénu, predstavujú u diabetikov 1. typu až 40 – 50 % genetického rizika (6, 26, 70).

Pôvodne uvádzané asociácie DM1A s HLA molekulami prvej triedy, t.j. *HLA-B8*, *-B15* a *-B18* (30) sa ukázali ako menej významné a omnoho silnejšia závislosť sa zistila medzi DM1A a HLA alelami, resp. molekulami druhej triedy. Najprv bola opísaná asociácia s molekulami HLA-DR3 a HLA-DR4, ktoré determinujú alely *DRB1*03* a *DRB1*04*, neskôr sa našli výraznejšie asociácie s molekulami HLA-DQ2 a HLA-DQ8, ktoré kódujú alely *DQB1*02:01* a *DQA1*05:01*, resp. *DQB1*03:02* a *DQA1*03:01*. Naopak protektívny vplyv pre pacienta majú molekuly HLA-DQ6 (determinované alelami *DQB1*06:02* a *DQA1*01:02*), HLA-DR2 (*DRB1*15:01*) a pravdepodobne aj niektoré z aliel, ktoré kódujú HLA-DR4 (*DRB1*04:03* a *DRB1*04:06*) (6, 26, 81, 82). Vo všeobecnosti sa protektívne alely v zdravej populácii vyskytujú v 20 %, kým u diabetikov približne len v 1 %. Alely *HLA-DQA1*01:02/-DQB1*06:02* sú vysoko protektívne aj u jedincov s dokázanou pozitivitou autoprotilátok (35).

Na rozdiel od asociácie DM1A s alelami lokusov HLA-DQ a -DR je vo svetovej literatúre omnoho menej údajov o jeho asociácii s alelami lokusu HLA-DP, publikované údaje navyše nie sú vždy v úplnej zhode. Prvé zmienky o tejto problematike v slovenskej populácii sú pritom len z posledných rokov a súvisia s prípravou tejto práce (85, 51, 86, 157). Dnes je vo všeobecnosti prijímaný názor, že vnímavosť k DM1A ovplyvňujú aj *HLA-DP* molekuly, hoci ich presnú úlohu je mimoriadne zložité definovať vzhľadom k silnej asociácii DM1A s molekulami HLA-DR a -DQ, resp. alelami, ktoré ich determinujú. Za predispozičné sa považujú najmä alely *HLA-DPB1*01:01* (DPw1), **02:02* (DPw2) a *DPB1*03:01* (DPw3) a ako protektívna sa javí *HLA-DPB1*04:02* (DPw4), podľa niektorých prác aj *DPB1*04:01* a *DPB1*11:01* (28,34,55,60,146-151,154-156) (26, 40, 77, 84, 85).

Vplyv HLA aliel na rozvoj choroby dnes už vieme u autoimunitného DM vysvetliť aj na molekulovej úrovni na základe štrukturálnych odlišností predispozičných a protektívnych aliel – napr. prítomnosť nenabitej aminokyselinovej jednotky na 57. pozícia β-reťazca DQ molekúl (ako je tomu pri predispozičnej DQ8 molekule) umožní naviazanie patognomického peptidu do žliabka HLA molekuly, jeho následnú prezentáciu HLA-molekulám a rozvoj autoimunitnej odpovede (aminokyselinová jednotka v 57. pozícii takto slúži ako „molekulový vrátnik“) (2, 18, 51).

V nami vyšetrovanom súbore sme určovali prítomnosť aliel DRB1, DQA1, DQB1

a DPB1, ktoré sú s vývojom DM1A asociované najsilnejšie.

HLA-DR: V našom súbore (tab. 18) boli s prítomnosťou DM 1. typu vysoko signifikantne pozitívne asociované alely *DRB1*03:01*, **03:02* a *DRB1*04:01*, čím sme potvrdili literárne údaje (6, 26, 78, 81, 82, 162). Alela *DRB1*04:03*, považovaná v rámci skupiny *DRB1*04* aliel za protektívnu, sa v našom súbore nachádzala len u 5 pacientov bez výraznejších rozdielov medzi sledovanými populáciami. Za protektívnu však môžeme označiť alelu *DRB1*15:01* (DR2), ktorá sa štatisticky signifikantne častejšie vyskytovala v kontrolnej skupine. Takou bola v našom súbore aj alela *DRB1*11:0x*, ktorá je podľa niektorých autorov pomerne zriedkavou u diabetikov aj nediabetikov, jej negatívna asociácia s DM 1. typu však pritom už bola opísaná v niekoľkých ďalších prácach (158, 159, 160).

HLA-DQ: HLA-DQ podoblasť sa skladá z viacerých lokusov, z nich lokusy DQA1 a DQB1 sú sídlom funkčných génov, ktoré kódujú α- a β-glykoproteínové reťazce, ktoré sa nekovalentne spájajú a vytvárajú funkčný heterodimér (161).

V rámci skupiny HLA-DQA1 aliel sa v nami sledovanom súbore diabetikov štatisticky signifikantne častejšie vyskytovali alely *DQA1*03:01* a *DQA1*05:01* (tab. 20). S výskytom DM1A sú najsilnejšie pozitívne asociované tie alely, ktoré majú v 52. pozícii peptidového reťazca arginín. Hoci existujú niekoľko takýchto *DQA1*-aliel, za jednoznačne predispozičnú je vo väčšine populácií považovaná *DQA1*03:01* a v kaukazoidnej populácii aj *DQA1*05:01* (161). Naše výsledky sú v súlade s literárnymi údajmi (6, 26, 78, 81, 82).

Naopak, výrazne menej často sa u diabetikov v porovnaní s kontrolnou skupinou, tak ako v podobných štúdiách v kaukazoidnej populácii, vyskytovala alela *DQA1*01:02* (DQ6) (32,153,173). O asociácii *DQA1*02:01* s DM1A je v literatúre menej informácií. V našom súbore sa vyskytovala štatisticky signifikantne menej často u diabetikov. Podobné údaje boli publikované aj v práci Cinka a spol. (2001), ktorí analyzovali českú populáciu (162) a v kaukazoidnej populácii je súčasťou protekítvneho haplotypu *DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03* (26).

Z *HLA-DQB1* aliel sa v literatúre za predispozičné považujú najmä *DQB1*02:01* a *DQB1*03:02* (6, 26, 78, 81, 82, 162). V nami sledovanom súbore sme predispozičný vplyv aliel *DQB1*02:01* a *DQB1*03:02* potvrdili s vysokou štatistickou signifikantnosťou (tab. 21). Ako predispozičné sa ďalej javili aj ďalšie DQB1*02 alely: *DQB1*02:02* a *DQB1*02:03*. O ich predispozičnom vplyve rovnako už existujú literárne údaje (26, 81, 82).

Významne vyššie frekvencie výskytu v kontrolnej skupine sme podľa očakávania zaznamenali pri alele *DQB1*06:02* (6, 78, 81, 162). V niektorých prácach (153, 161) sa ako protektívne javili aj alely *DQB1*06:01* a *DQB1*06:03*, tieto sa však v našom súbore takmer

vôbec nevyskytovali. Ako ďalšia protektívna alela sa na základe štatisticky vysoko signifikantných výsledkov dá označiť aj alela *DQB1*03:01*. Vo viacerých štúdiách sa táto javí tiež ako ďalšia z protektívnych aliel (162, 163).

Uvedenými výsledkami (tab. 40a, b, c) sme teda jednoznačne, v súlade s inými podobnými štúdiami v kaukazoidnej populácii, potvrdili úlohu HLA-DQ2 molekuly, ktorú kódujú alely *DQB1*02:01* alebo **02:02* alebo **02:03* v spojení s *DQA1*05:01* ako aj molekuly *HLA-DQ8*, ktorú kódujú alely *DQB1*03:02* a *DQA1*03:01* v genetickej determinácii DM1A.

HLA-DP: Úloha HLA-DP aliel v etiopatogenéze DM 1. typu je v súčasnosti predmetom skúmania vo viacerých populáciách, keďže aj tieto alely, rovnako ako HLA-DR a -DQ, jednoznačne ovplyvňujú vnímavosť k vývoju choroby. Zatiaľ však nie je celkom jasné, či alely DP vplývajú na vznik choroby priamo alebo len v rámci spojitosti s alelami lokusov DR a DQ (26, 40, 74, 77, 84, 86, 88). Všeobecne sa predpokladá, že predispozičný, resp. protektívny vplyv DPB1-aliel bude výraznejší u tých pacientov, ktorí nie sú nositeľmi vysoko rizikových genotypov DR3 či DR4 (164).

V našom súbore sme zisťovali frekvenciu výskytu HLA-DPB1 aliel (tab. 22) a podrobili sme analýze aj vzťahy medzi jednotlivými predispozičnými a protektívnymi alelami lokusov DR a DQ (tab. 23, 24). Štatisticky signifikantne častejšie sa vyskytovala alela *DPB1*01:01*, ktorá bola ako predispozičná označená už vo viacerých prácach (26, 40, 77, 84, 88). Táto alela sa vo viac ako 90 % vyskytovala u pacientov, ktorí boli zároveň nositeľmi *DRB1*03* alebo *DRB1*04* (tab. 23). *DPB1*01:01* sa mimoriadne často združuje s *DRB1*03* aj v iných štúdiách (84, 88, 164). Rovnako sa štatisticky signifikantne častejšie táto alela vyskytovala u pacientov s *DQB1*02:01*. Z uvedeného možno usudzovať, že predispozičný účinok alely *DPB1*01:01* nemusí byť veľmi silný, jej zvýšenie môže byť len sekundárne v dôsledku väzbovej nerovnováhy s alelami *DRB1*03*, *DRB1*04*, resp. *DQB1*02:01*. Väzbovú nerovnováhu definujeme ako rozdiel medzi očakávanou a pozorovanou frekvenciou sledovanej alely v populácii, ktorá je výsledkom selekčného tlaku, ale aj istého stupňa homogenzácie určitej populácie. Určitá kombinácia aliel dvoch susedných lokusov sa totiž (najmä ak sú alely od seba vzdialené menej ako 1 cM) prenáša z generácie na generáciu. Ak populácia ostáva izolovaná, nerovnováha sa prehlbuje. Naopak, ak dochádza k náhodnému kríženiu, niektoré nerovnováhy zoslabnú a druhé vznikajú nanovo (a to pre rozdielnu frekvenciu génov) (11).

Zaujímavý je aj fakt, že prenos haplotypu *DRB1*03:01/-DPB1*01:01* z rodičov na deti sa dvakrát častejšie pozoruje, ak tento haplotyp vlastnia matky – diabetičky ako diabetickí otcovia, zatiaľ čo prenos iných *HLA-DRB1/-DPB1* haplotypov takéto odlišnosti nevykazuje

a u oboch pohlaví je približne rovnaký (26). K uvedenej závislosti sa v našom súbore nemôžeme vyjadriť, keďže sme nemali k dispozícii kompletnú rodinnú anamnézu pacientov.

Situáciu okolo alely *DPB1*01:01* ešte viac komplikujú výsledky štúdie *Type 1 Diabetes Genetic Consortium*, ktorá analyzovala alely DPA1 a DPB1 v kaukazoidnej populácii a v ktorej bola alela *DPB1*01:01* označená za protektívnu, ale len v prípade, že sa vyskytovala u pacientov spolu s alelou *DPA1*0103* (84).

V literatúre sa za predispozičnú považuje aj alela *DPB1*02:02* (26, 88, 165), avšak vzhľadom k tomu, že sa rovnako veľmi často združuje s *DRB1*03*, nedá sa s istotou tvrdiť, či tento predispozičný vplyv nejde práve na jej vrub. Zaujímavé je, že v nami sledovanom súbore sa alela *DPB1*02:02* takmer vôbec nevyskytovala, čo je v súlade aj s našimi predchádzajúcimi výsledkami (51, 85, 86). K zodpovedaniu otázky, či ide o chybu spôsobenú relatívne malým súborom pacientov, alebo o špecifikum slovenskej populácie, bude potrebné urobiť ďalšie vyšetrenia na väčšom súbore. Podobný trend bol však zaznamenaný aj v štúdii na Sardínii, kde sa táto alela, napriek tomu, že ide o krajinu s vysokou prevalenciou DM 1. typu, vyskytovala tiež len veľmi ojedinele (88).

Alela *DPB1*03:01* sa rovnako považuje za predispozičnú (26, 84, 171). Podľa štúdie Cucca a spol. (2001) sa pomerne často vyskytuje spolu s *DRB1*03*, ale aj s ostatnými alelami haplotypu *HLA-DRB1*03/-DQA1*05:01/-DQB1*02:01* (88), v iných prácach sa združuje s DR4 (164), čiže pozorovaná zvýšená frekvencia ide pravdepodobne na úkor väzbovej nerovnováhy. V našom súbore sa táto alela vyskytovala u diabetikov častejšie, rozdiel vo frekvencii výskytu medzi sledovanými populáciami však nedosiahol štatistickú signifikantnosť.

Balducci-Silano a spol. (1995) považujú za predispozičnú tiež alelu *DPB1*13:01*; zvýšený výskyt v populácii diabetikov mala táto alela aj v práci Cruza z roku 2004 (165, 166). Rozdiely vo frekvencii výskytu však v rámci nami sledovaných súboroch nedosiahli štatistickú významnosť. Medzi diabetikmi sa alela vyskytovala pomerne málo, v kontrolnej skupine vôbec nie.

*DPB1*04:02* sa považuje za protektívnu alelu (26, 84). V našom súbore bola táto protektivita potvrdená štatisticky signifikantnými rozdielmi vo výskyte medzi diabetikmi a kontrolnou skupinou (tab. 22). Podľa literatúry sa táto alela pomerne často združuje s *DRB1*03* (menej často s alelami *DRB1*04*) (164, 167). V našom súbore sa táto alela štatisticky signifikantne neasociovala so žiadnou z protektívnych *HLA-DR* a *-DQ* alel (tab. 24).

Alela *DPB1*11:01* sa v niekoľkých prácach považuje tiež za protektívnu (84, 163), avšak

s najväčšou pravdepodobnosťou bude jej protektívny vplyv z veľkej časti spôsobený častou väzbou na protektívne DR/DQ haplotypy (164, 168). V našom súbore sa táto alela v súbore diabetikov nevyskytovala vôbec, porovnanie s kontrolnou skupinou neprinieslo štatistickú významnosť.

Rovnako ako v iných štúdiách v kaukazoidnej populácii aj v našom súbore diabetikov sa signifikantne menej často vyskytovala alela *DPB1*17:01* (84, 164, 165), čo naznačuje jej možný protektívny vplyv. V tejto súvislosti je však potrebné uviesť, že v mexickej populácii bola táto alela s DM1A asociovaná pozitívne, čo poukazuje na rozdielnosť interakcie medzi genetickým pozadím jedinca a environmentálnymi podmienkami v rozdielnych populáciách (165).

Najpočetnejšou alelou v skupine diabetikov bola v našom súbore *DPB1*04:01*, ktorá sa však vo vysokom percente nachádzala aj v kontrolnej skupine, rozdiely teda nedosiahli štatistickú významnosť. Vplyv tejto alely v genetickej determinácii DM1A zatiaľ nie je celkom jasný (26, 84). Existujú práce, v ktorých má, rovnako ako v našom súbore, neutrálny vplyv na rozvoj DM1A (169), v iných má protektívny vplyv (88, 170). Al-Hussein a spol. (2003) publikovali prácu, v ktorej *DPB1*04:01* poskytovala vo vyšetrovanom súbore ochranu pred vývojom choroby dokonca aj u pacientov s predispozičnou *DQB1*02* (170). Podľa ďalších výsledkov poskytuje ochranu len homozygotom pre *DPB1*04:01*, prípadne v kombinácii s *DPB1*04:02* (164).

Vplyv HLA-DP aliel v rámci predispozície k autoimunitnému diabetu je pravdepodobne slabší ako pri alelách DRB1 a DQB1 či DQA1. Podľa niektorých autorov majú, ako sme už spomenuli, len modifikujúci, nie samostatný predispozičný, resp. protektívny efekt na vývoj choroby (169,171), aj keď sa stále nedá jednoznačne vylúčiť ani ich samostatné pôsobenie (166,172).

Pre lepšiu prehľadnosť uvádzame v tab. 40 a, b, c a tab. 41 zhrnutie výsledkov HLA-typizácie a ich porovnanie s vyššie uvedenými literárnymi údajmi.

Pri alelách, ktoré determinujú molekuly DR a DQ (tab. 40a, b, c) sme dosiahli zhodu s literárnymi údajmi celkom u 16 z 19 najvýznamnejších aliel u DM 1. typu. Nepotvrdili sme len prítomnosť protektívnych aliel *DRB1*04:03*, *DQB1*06:01* a *DQB1*06:03*.

Z tab. 41 vyplýva, že pri alelách HLA-DPB1 táto zhoda nebola až taká výrazná. Nepotvrdili sme totiž nielen prítomnosť protektívnej alely *DPB1*11:01* (pri *DPB1*04:01* názor na protektivitu v literatúre nie je jednotný), ale ani predispozičný vplyv aliel *DPB1*02:02*, *DPB1*03:01* a *DPB1*13:01*.

HLA-alely u pacientov pravdepodobne ovplyvňujú aj rýchlosť nástupu choroby.

V literatúre existujú údaje o častejšej prítomnosti aliel *DRB1*03, DQB1*02:01/ DQA1*05:01* u pacientov s menej agresívnym priebehom inzulitídy a teda vyšším vekom pri stanovení diagnózy a naopak aliel *DRB1*04, DQB1*03:02/DQA1*03:01* u mladších pacientov s agresívnejším deštruktívnym procesom v pankrease (27, 35).

Tab. 40a Porovnanie získaných výsledkov týkajúcich sa predispozičného, protektívneho, resp. neutrálneho účinku aliel *DRB1* na vývoj DM 1. typu s literárnymi údajmi o kaukazoidnej populácii

	HLA-DRB1						
	**03:01*	**03:02*	**03:0x*	**04:01*	**04:03*	**11:0x*	**15:01*
literatúra	●	●	●	●	●	● ●	●
naše výsledky	●	●	●	●	●	●	●

Tab. 40b Porovnanie získaných výsledkov týkajúcich sa predispozičného, protektívneho, resp. neutrálneho účinku aliel *DQA1* na vývoj DM 1. typu s literárnymi údajmi o kaukazoidnej populácii

	HLA-DQA1			
	**01:02*	**02:01*	**03:01*	**05:01*
Literatúra	●	●	●	●
naše výsledky	●	●	●	●

Tab. 40c Porovnanie získaných výsledkov týkajúcich sa predispozičného, protektívneho, resp. neutrálneho účinku aliel *DQB1* na vývoj DM 1. typu s literárnymi údajmi o kaukazoidnej populácii

	HLA-DQB1							
	**02:01*	**02:02*	**02:03*	**03:01*	**03:02*	**06:01*	**06:02*	**06:03*
literatúra	●	●	●	●	●	●	●	●
naše výsledky	●	●	●	●	●	●	●	●

Tab. 41 Porovnanie získaných výsledkov týkajúcich sa predispozičného, protektívneho, resp. neutrálneho účinku *DPB1* aliel na vývoj DM 1. typu s literárnymi údajmi o kaukazoidnej populácii

	HLA-DPB1							
	**01:01*	**02:02*	**03:01*	**04:01*	**04:02*	**11:01*	**13:01*	**17:01*
literatúra	●	●	●	● ●	●	●	●	●
naše výsledky	●	●	●	●	●	●	●	●

V nadväznosti na uvedené sme sledovali aj vzťah medzi prítomnosťou predispozičných HLA aliel, ktoré sa v nami sledovanom súbore diabetikov vyskytovali signifikantne častejšie a vekom pri stanovení diagnózy. Najnižší priemerný vek pri stanovení diagnózy mali pacienti s alelou *HLA-DRB1*03*. Rozdiely vo veku pri stanovení diagnózy u pacientov s určitou alelou

v porovnaní s pacientmi, ktorí túto alelu nemajú, dosiahol štatistickú významnosť pri alelách *DQB1*02:01, DQB1*03:02* a *DQA1*03:01* – jej nositelia boli mladší, naopak pacienti s alelou *DPB1*01:01* boli signifikantne starší (tab. 25). Naše výsledky teda potvrdili literárne údaje len v prípade aliel *DQB1*03:02* a *DQA1*03:01*, ktoré sa signifikantne častejšie vyskytovali u mladších pacientov. Pri alelách *DRB1*03* a **04* rozdiely nedosiahli štatistickú významnosť, alela *DQB1*02:01* sa na rozdiel od literárnych údajov v našom súbore vyskytovala častejšie u pacientov s nižším vekom v čase stanovenia diagnózy.

Zaujímavým zistením je tiež fakt, že alela *DPB1*01:01* sa signifikantne častejšie vyskytuje u starších pacientov. S touto závislosťou sme sa zatiaľ v literatúre nestretli, je však možné, že alela *DPB1*01:01* bude, podobne ako *DRB1*03*, *DQB1*02:01*/ *DQA1*05:01* asociovaná s menej agresívnym priebehom inzulitídy a teda vyšším vekom pri stanovení. V ďalšom bude potrebné platnosť tejto teórie overiť na väčšom súbore pacientov.

Analýza vzťahov medzi jednotlivými alelami je však mimoriadne zložitá aj vzhľadom k tomu, že existuje obrovské množstvo aliel a tým aj množstvo kombinácií a haplotypov (164, 165).

Z hľadiska hodnotenia genetického rizika je tiež zaujímavé, že v kaukazoidnej populácii je pravdepodobnosť vývoja DM1A vyššia pre heterozygotov ako pre homozygotov. Za najrizikovejšie haplotypy sa považujú HLA-DR3/-DQ2 *(DRB1*03, DQB1*03:02, DQA1*03:01*), HLA-DR4/-DQ8 (*DRB1*04, DQB1*02:01, DQA1*05:01*) (26). Uvedený genotyp nachádzame približne u 30 – 40 % diabetikov, kým v zdravej populácii sa vyskytuje len v 2 %. Prevalencia vysokorizikových haplotypov je v literatúre nepriamo úmerná veku diagnostikovania DM1A (11, 27, 167).

Molekuly -DR3 a -DQ2 sú súčasťou tzv. „autoimunitného“ haplotypu, ktorý vlastní vďaka zvýšenému selekčnému tlaku v európskom podnebí (výrazne odlišnom napr. od toho afrického s nižším rizikom infekcie pri nižších teplotách) viac ako 10 miliónov obyvateľov Európy. Spája sa s vnímavosťou na viaceré autoimunitné choroby, ako je systémový *lupus erythematosus*, sklerodermia, celiakia, *myastenia gravis*, ale aj autoimunitný *diabetes mellitus* (32, 33).

V rozličných populáciách sa teda vyskytujú aj rozličné predispozičné haplotypy – u afroameričanov *DQA1*03:01/DQB1*02:01*, v japonskej populácii *DQA1*03:01/ DQB1*03:03* a v Číne *DQA1*03:01/DQB1*04:01* (26,52). Zaujímavý je však pritom fakt, že protektívny haplotyp *DQA1*01:02/DQB1*06:02* sa spája s ochranou pred chorobou vo väčšine študovaných populácií (13, 161).

Najrizikovejšie HLA-haplotypy *HLA-DRB1*030x/-DQA1*03:01/-DQB1*03:02* a *HLA-*

*DRB1*04:0x/-DQA1*05:01/-DQB1*02:01* malo v našom súbore 15, resp. 18 diabetikov (29,4 %, resp. 35,3 %), čo sa zhoduje s už vyššie uvedenými literárnymi údajmi (27, 35, 167).

Výskyt predispozičných HLA aliel v populácii však niekoľkonásobne prevyšuje prevalenciu samotného DM 1. typu. Rovnako rodinné štúdie dokázali vznik DM1A „len“ asi u 40 % jednovaječných dvojčiat a vo vysokom percente aj u pacientov, kde sa DM1A v rodinnej anamnéze nevyskytoval (6, 13). V etiopatogenéze choroby teda jednoznačne existuje ďalší významný činiteľ, ktorý genetickú predispozíciu premení na klinicky manifestnú chorobu. Ide o tzv. spúšťací stimul, za ktorý sa v súčasnosti považujú najmä vírusové infekcie (skôr výnimočne sa pri poškodení β-buniek uplatňujú toxíny, lieky, chemické látky a pod.) (35, 173). Tento stimul zatiaľ stále nie presne objasneným mechanizmom naštartuje autoimunitné procesy. Vysoko suspektnou je okrem iného (pozri kap. 2.3.3) krížová reakcia medzi podobnými mikrobiálnymi antigénmi a autoantigénmi, resp. fenomén molekulového mimikri (174). V prípade autoimunitného *diabetes mellitus* je dokonca známa presná zhodná sekvencia aminokyselín ľudského enzýmu glutamátdekarboxyláza a proteínu P2C Coxsackie vírusu (18 aminokyselín, pozri obr. 7) a tyrozínfosfatázy β-buniek pankreasu a proteínu VP7 rotavírusu (9 aminokyselín) (35, 36).

Patomorfologickým podkladom DM1A je autoimunitná deštrukcia β-buniek pankreasu sprostredkovaná T-lymfocytmi. Proti uvoľneným antigénom sa rozbieha B-lymfocytová odpoveď s tvorbou špecifických autoprotilátok. Autoimunitná inzulitída začína aj niekoľko rokov pred diagnostikovaním choroby. Tento proces vyústi do úplného zničenia pankreatických β-buniek a endogénnej produkcie inzulínu (13). Imunitne podmienený diabetes je najčastejšou formou DM 1. typu v našej populácii. Pre autoimunitný pôvod choroby svedčí prítomnosť cirkulujúcich autoprotilátok proti celej rade autoantigénov (175). V súčasnosti je známych viac ako 20 autoantigénov s desiatkami epitopov, na ktoré sa môžu viazať príslušné, proti nim namierené autoprotilátky (2).

V praxi sú u nás najčastejšie vyšetrované autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutámovej (GADA), tyrozínfosfatáze β-buniek pankreasu (IA-2A) a autoprotilátky proti inzulínu (IAA).

V čase stanovenia diagnózy sa jedna alebo viac autoprotilátok (ako marker prebiehajúcej autoimunitnej inzulitídy) vyskytuje u 70 – 90 % pacientov (13, 64). Najčastejšie u pacientov s DM1A nachádzame GADA (80 – 90 % pacientov), ďalej IA-2A (60 – 80 % pacientov) a IAA (50 – 60 % pacientov). Jednotlivé autoprotilátky sa v periférnej krvi pacientov spravidla neobjavujú naraz. Ako prvé sa u starších pacientov vyskytujú GADA, u najmladších IAA (98). S dĺžkou trvania choroby u pacientov klesá pozitivita všetkých

autoprotilátok, pričom s vekom najrýchlejšie klesá prevalencia protilátok IAA (vo veku pri manifestácii choroby do 5 rokov sú podľa niektorých autorov prítomné až u 90 % pacientov, vo veku 5 – 10 rokov u 71 % a u 50 % vo veku 10 – 15 rokov) (17, 35, 105).

V našom súbore pacientov (tab. 27) boli autoprotilátky vyšetrené najneskôr do jedného roka od stanovenia diagnózy. GADA sa vyskytovali u 61,4 % diabetikov, IA-2A u 54,4 % a IAA u 52,6 % pacientov, čo je o niečo menej ako priemerné počty citované v literatúre (tab. 28) (98, 112), aj keď ich poradie podľa výskytu zostalo zachované aj v našom súbore. Ak sa však autoprotilátky vyšetrili a následne hodnotili nie jednotlivo, ale v kombináciách (tab. 32), pozitivita aspoň jednej autoprotilátky (GADA a/alebo IA-2A a/alebo IAA) výrazne vzrástla a pohybovala sa aj v našom súbore už v rozmedzí 78,9 % – 89,8 % , čo je v súlade s uvádzanými literárnymi údajmi.

Poznanie autoimunitnej patogenézy je pritom nesmierne dôležité i z hľadiska prognózy choroby (*prognosis quoad sanationem et vitam*). Autoprotilátky môžu byť totiž preukázateľné už v predklinickom štádiu choroby (45, 105). Vyšetrenie panelu protilátok (t.j. minimálne GADA + IA-2A + IAA) by teda malo byť, aj vzhľadom k uvedenej negatívnej asociácii ich výskytu s dĺžkou trvania choroby, vykonané už v prípade podozrenia, resp. čo najskôr po stanovení diagnózy. Skorý záchyt DM totiž umožňuje cielenou imunosupresívnou liečbou zasiahnuť do prebiehajúcich imunopatologických procesov a priebeh choroby a rozvoj orgánových komplikácií minimálne spomaliť.

V štádiu klinických štúdií u ľudí sú viaceré modifikované anti-CD3 monoklonové protilátky. Ich aplikácia má za následok zvýšenú produkciu C-peptidu ako odraz reziduálnej produkcie inzulínu a zníženie množstva exogénneho inzulínu potrebného k uspokojivej kompenzácii DM (v štúdii s použitím teplizumabu dokonca 5 % pacientov po prvom roku liečby nevyžadovalo žiadnu exogénnu substitúciu inzulínu). Zaznamenaný bol pokles glykovaného hemoglobínu ako markera metabolickej kompenzácie a nižšia variabilita hodnôt glykémií. Tieto sľubné výsledky naznačujú, že zostávajúce β-bunky pankreatických ostrovčekov mohli autoimunitnému ataku T-lymfocytov aspoň čiastočne odolať. Pri aplikácii modifikovaných monoklonových protilátok u diabetikov 1. typu sa zaznamenali len mierne nežiaduce účinky – najčastejšie rash, mierna horúčka, bolesti hlavy a gastrointestinálne ťažkosti. Všetky boli dočasné, zvládnuteľné bežnou liečbou a nevyžadovali prerušenie liečby (143, 144, 149).

Pravdepodobne ekonomická situácia slovenského zdravotníctva má zrejme tiež na svedomí fakt, že vyšetrenie autoprotilátok nebolo realizované u 1/5 našich pacientov, ktorých teda nemôžeme jednoznačne označiť ako pacientov s autoimunitným DM, aj keď je táto forma DM 1. typu najčastejšou v našej populácii a tzv. idiopatický DM 1B je omnoho častejší

v africkej a ázijskej populácii (13). U ďalších pacientov, ktorí mali vyšetrenú len niektorú zo sledovaných autoprotilátok a táto bola negatívna, by sme diagnózu DM1A mohli rovnako spochybniť. Avšak v prípade, že by pacienti mali vyšetrené aspoň základné spektrum autoprotilátok, reálny výskyt DM1A by zrejme stúpol. Ako sme už uviedli, záchyt pozitivity aspoň jednej z autoprotilátok v súbore diabetikov totiž pri vyšetrení panelu autoprotilátok vzrástol z približne 60 % až na 89,5 %, čím teda stúpol aj počet pacientov, u ktorých je možné DM 1. typu exaktne označiť ako autoimunitný a náš súbor sa vyrovnal literárnym údajom o zastúpení autoimunitného DM v rámci diabetes mellitus 1. typu (6, 50, 98).

Rozšírenie spektra vyšetrovaných autoprotilátok by, samozrejme, pravdepodobnosť záchytu ich pozitivity ešte zvýšilo. Ako najnovší autoantigén významný v patogenéze autoimunitného DM bol opísaný transmembránový proteín inzulínových sekrečných granúl – zinkový transportér-8 (ZnT8). Protilátky proti nemu (ZnT8A) sa vyskytujú u 60 – 80 % pacientov s novodiagnostikovanou chorobou v porovnaní s len 2 % výskytom v bežnej populácii (111). Vo všeobecnosti sa tieto autoprotilátky vyskytujú neskôr ako GADA alebo IAA, a preto je vhodnejšie ich vyšetrenie u starších pacientov (112, 113, 114). Rozšírenie spektra vyšetrovaných autoprotilátok o ZnT8A výrazne zvýši záchyt pozitivity pacientov, u ktorých sa doteraz vyšetrením GADA, IA-2A a IAA nezistila protilátková pozitivita. Vyšetrenie panelu autoprotilátok GADA, IA-2A, IAA spolu s ZnT8A zvyšujú možnosti dôkazu autoimunitných dejov až na 98 % (98, 111).

Skutočnosť, že rozliční pacienti mali rozdielne spektrum pozitivity vyšetrených autoprotilátok nie je celkom prekvapujúci a nemožno ho vysvetliť len vekom pacienta pri stanovení diagnózy DM 1. typu. S podobnou situáciou (t.j. prítomnosťou nehomogénneho spektra autoprotilátok) sa stretávame nielen pri systémových ale aj orgánovo-špecifických autoimunitných chorobách (napr. pri autoimunitných tyreopatiách) (12). *Diabetes mellitus* 1A sa tiež pomerne často združuje s viacerými autoimunitnými chorobami (41), čo iba potvrdzuje opodstatnenie zaradiť vyšetrenie základného spektra autoprotilátok do rutinného diagnostického algoritmu.

Najnižší priemerný vek v čase stanovenia diagnózy mali pacienti s pozitivitou IAA, ďalej nasledovali pacienti s pozitivitou IA-2A a najstarší boli v čase stanovenia diagnózy pacienti s pozitivitou GADA (tab. 30). Rozdiely medzi priemernými vekmi sú minimálne, čiastočne však kopírujú trend uvádzaný v literatúre (45, 98, 112) a to, že protilátky IA-2 a IAA nachádzame častejšie u mladších pacientov, zatiaľ čo protilátky GADA sú pozitívne u pacientov, ktorí sú v čase stanovenia diagnózy starší (často aj s postpubertálnym, resp. začiatkom v dospelom veku) (110, 115, 118).

Podľa väčšiny literárnych údajov neexistuje výraznejšia závislosť medzi pozitivitou autoprotilátok a pohlavím (27, 35). V nami sledovanom súbore však u pacientov s pozitivitou IA-2A neočakávane signifikantne prevažovali dievčatá (tab. 29). Jedným z vysvetlení by snáď mohla byť v ostatných rokoch diskutovaná otázka vzťahu environmentálnych faktorov a pozitivity autoprotilátok. Napríklad pacienti mužského pohlavia, ktorých matka trpí celiakiou alebo diabetom 2. typu, majú vyššie hodnoty IA-2A, skorá konzumácia kravského mlieka a naopak neskorý kontakt s gluténom sú asociované s vyššími hladinami GADA (176). U našich pacientov sme však potrebné anamnestické údaje nemali k dispozícii a preto sme si uvedené teórie nemohli overiť.

Prítomnosť určitých predispozičných HLA aliel môže súvisieť s pozitivitou jednotlivých autoprotilátok. Pozitivita GADA sa najčastejšie združuje s prítomnosťou aliel *HLA-DRB1*03*, *-DQA1*05:01* a *-DQB1*02:01* a z hľadiska klinického priebehu odráža pomalší a menej agresívny priebeh choroby. Je najčastejšou protilátkou zisťovanou u pacientov so začiatkom choroby vo vyššom veku (17, 105-108, 110). Celulárna a humorálna časť imunitnej odpovede, teda autoreaktívne T-lymfocyty a autoprotilátky, sú namierené voči odlišným determinantom v rámci molekuly glutamátdekarboxylázy (GAD). Autoprotilátky rozoznávajú determinanty v molekule GAD v rozsahu aminokyselinových jednotiek 244 – 435 a 451 – 570, autoreaktívne T-lymfocyty reagujú s aminokyselinovými úsekmi v strede molekuly, ktoré sú prezentované bunkami prezentujúcimi antigén práve v kontexte s HLA-DR3 (35).

IA-2A sa, podobne ako IAA, častejšie detegujú u pacientov, u ktorých bol DM1A diagnostikovaný v mladšom veku a častejšie sa združujú s prítomnosťou *HLA-DRB1*04*, *-DQB1*03:02, -DQA1*03:01*. Z hľadiska klinického priebehu sú charakteristické pre agresívnejšiu formu autoimunitnej inzulitídy a rýchlejší priebeh choroby (17, 107, 108, 110).

Aj v nami sledovanom súbore sú viditeľné uvedené trendy potvrdzujúce pozitívnu, resp. negatívnu asociáciu HLA-aliel s pozitivitou určitých autoprotilátok. V súbore diabetikov sa alela *HLA-DRB1*03* (podľa literárnych údajov častejšie združená s GADA) signifikantne menej často vyskytovala v súbore pacientov s pozitívnymi protilátkami IA-2A a IAA, jej očakávaný zvýšený výskyt v skupine pacientov s pozitivitou GADA bol v našom súbore na hranici štatistickej významnosti (tab. 33). Naše výsledky čiastočne potvrdili vyššie uvedené literárne údaje aj v rámci HLA-DQB1 aliel. Alela *DQB1*02:01* sa štatisticky vysoko signifikantne častejšie vyskytovala u pacientov s pozitivitou GADA a naopak menej často u pacientov s pozitivitou IAA. U pacientov s *HLA-DQB1*03:02* sme zaznamenali signifikantne vyšší výskyt autoprotilátok IA-2A (tab. 35).

Pri sledovaní HLA-DQA1 hranicu štatistickej signifikantnosti nedosiahli výsledky korelácie ani s jednou zo sledovaných protilátok, čo bude pravdepodobne spôsobené aj menším počtom pacientov s typizovanými HLA-DQA1 alelami v porovnaní s predchádzajúcimi alelami DRB1 a DQB1 (51 vs. 76, resp. 89 diabetikov).

Ako sme už uviedli, vzťah medzi DM1A a HLA-DP alelami nie je natoľko preskúmaný, ako s ostatnými alelami HLA druhej triedy a o vzťahu HLA-DP aliel a pozitivite autoprotilátok existuje v literatúre tiež len veľmi málo údajov. V našom súbore sa ako predispozičná javila alela *HLA-DPB1*01:01*, preto sme skúmali vzťah jej prítomnosti u pacientov s pozitivitou autoprotilátok. U pacientov s GADA-pozitivitou sa alela *DPB1*01:01* vyskytovala častejšie, naopak menej často sa vyskytovala u IA-2A a IAA pozitívnych pacientov, avšak bez štatistickej významnosti (tab. 36). K potvrdeniu týchto trendov bude potrebné overenie na väčšom súbore pacientov.

U pacientov s haplotypom *HLA-DRB1*03:0x/-DQA1*05:01/-DQB1*02:01* sa opisuje častejšia asociácia s autoprotilátkou GADA a u pacientov s haplotypom *HLA-DRB1*04:0x/-DQA1*03:01/-DQB1*03:02* s autoprotilátkami IA-2 a IAA (17, 107, 108). V našom súbore sa nám uvedenú závislosť nepodarilo potvrdiť ani pri jednej zo sledovaných autoprotilátok, čo pravdepodobne súvisí s malým počtom pacientov, ktorí vlastnili uvedené haplotypy (tab. 37a, 37b).

4. ZÁVER

V úvode nezriedka aj niekoľkoročné bezpríznakové obdobie, počas ktorého v organizme prebiehajú imunopatologické procesy, nešpecifické klinické príznaky, ale určite aj naše nedostatky v diagnostike autoimunitných chorôb sú príčinou toho, že aj na začiatku 21. storočia sú tieto často diagnostikované až vtedy, keď sú postihnuté orgány ireverzibilne poškodené. Aj preto táto skupina chorôb zastáva vrchné priečky morbidity aj mortality, rovnako ako aj v náraste incidencie; čo je mimoriadne znepokojujúce, týka sa to najmä u pacientov v strednom veku. Snaha o čo najúčinnejšie preventívne opatrenia je preto absolútne opodstatnená. So zdokonaľujúcim sa poznaním etiopatogenézy sa mierne zlepšujú aj naše vyhliadky do budúcnosti.

Príkladom je autoimunnitný *diabetes mellitus* ako „prototyp“ orgánovo-špecifickej autoimunitnej choroby. Táto komplexná metabolická porucha so sebou prináša akútne aj chronické mikro- a a makrovaskulárne komplikácie, skracuje dĺžku života a v neposlednom rade značne znižuje kvalitu života pacientov. Všetky naše snahy by teda mali smerovať k preventívnym opatreniam, ku čo najvýraznejšiemu zmierneniu enormného nárastu incidencie tejto choroby a k aktívnemu vyhľadávaniu potenciálnych pacientov, aby sa nestávalo, že v dobe stanovenia diagnózy sú už prítomné orgánové komplikácie a ďalší managment pacientov je potom mimoriadne náročný (nielen po finančnej stránke). Na druhej strane by sme sa však mali snažiť aj o zlepšenie terapeutických možností a tým aj kvality života pacientov trpiacich touto chronickou chorobou.

Autoimunitný *diabetes mellitus* je choroba, ktorá sa vyvíja u geneticky predisponovaných jedincov. Najväčšiu časť genetického rizika predstavujú gény hlavného histokompatibilného systému druhej triedy. V súčasnosti poznáme viaceré predispozičné aj protektívne HLA-alely, ktoré majú význam v patogenéze choroby. Aj v nami sledovanom súbore diabetikov 1. typu v rámci slovenskej populácie môžeme na základe rozdielov vo výskyte u diabetikov a v kontrolnej skupine viaceré HLA-alely druhej triedy označiť za predispozičné, resp. protektívne. Na základe analýzy HLA-DP aliel usudzujeme, že ich vplyv bude pravdepodobne slabší, ako u aliel DR a DQ, a bude pomerne výrazne ovplyvnený väzbovou nerovnováhou. Takže pre skríning genetického rizika v rizikových populáciách budú alely DR a DQ vhodnejšie.

Jedným z prejavov prebiehajúcich autoimunitných procesov je prítomnosť špecifických autoprotilátok v sére pacientov. Z praktického hľadiska, ak chceme skutočne dokázať autoimunitnú etiológiu choroby, mali by sme trvať na vyšetrení celého spektra

autoprotilátok, keďže svoj význam v patogenéze choroby má hneď niekoľko autoantigénov. V nami sledovanom súbore sa pri vyšetrení spektra troch autoprotilátok (proti glutamátdekarboxyláze, tyrozínfosfatáze pankretických β-buniek a proti inzulínu) záchyt pozitivity pohyboval nad 80 %, pri vyšetrení len jednej z protilátok to bolo 50 – 60 %.

Edukácia najrizikovejších skupín populácie o možnostiach odhadu genetického rizika a sledovania „stavu“ autoimunity by mala byť súčasťou základných preventívnych opatrení. Práve stanovením HLA-aliel a pozitivity špecifických autoprotilátok u prvostupňových príbuzných pacientov sme schopní v rámci tejto rizikovej populácie vyhľadávať jedincov, ktorí sú najviac ohrození rozvojom choroby. Ich pravidelným sledovaním je potom možné zachytiť skorý nástup choroby, zabrániť rozvoju nebezpečných akútnych komplikácií, ale aj oddialiť rozvoj obávaných chronických orgánových komplikácií, ktoré k tejto chorobe neoddeliteľne patria.

Tak z pohľadu lekárov, ako aj pacientov, je však mimoriadne dôležité, ako dokážeme poznatky o patogenéze choroby využiť v zlepšení nielen diagnostických, ale aj terapeutických postupov.

Skoré vyhľadávanie potenciálnych pacientov a dôkaz autoimunitnej etiológie začína nadobúdať význam aj s ohľadom na nové terapeutické možnosti. Doteraz nám totiž výsledky intenzívneho výskumu nepriniesli inú spoľahlivú terapeutickú modalitu ako len exogénnu substitúciu inzulínu. U diabetikov 1. typu samozrejme hovoríme o intenzifikovanom inzulínovom režime, ktorý musí plne nahradiť nefunkčné pankreatické β-bunky a pre pacienta predstavuje značné zníženie kvality života. Situácia sa však mení a ako sľubné sa už javí aj využitie monoklonových protilátok. Podmienkou je však začatie tejto liečby v čo najskorších štádiách choroby, kedy ešte nie je deštruovaná väčšina pankreatických β-buniek a tým je šanca na čo najdlhšie zachovanie endogénnej sekrécie inzulínu. So zdokonaľovaním imunomodulačnej liečby si svoje miesto v liečbe postupne nachádza aj transplantácia pankreasu, resp. pankreatických ostrovčekov.

Samotné predispozičné gény vnímavosti k autoimunitným chorobám však nie sú „zárukou“ vzniku choroby a na rozvinutie sa klinických prejavov sú nevyhnutné aj environmentálne faktory. V patogenéze autoimunitného DM je mimoriadne diskutovanou problematika vírusovej infekcie a jej postavenia v patogenéze choroby. Stále presne nevieme, ako vlastne vírusy poškodzujú pankreatické β-bunky, ako infekcia spustí autoimunitné procesy alebo ktoré vírusy sú najnebezpečnejšie.

Aj napriek intenzívnemu výskumu ostáva teda veľa nezodpovedaných otázok.

5. LITERATÚRA

1. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. Journal of Autoimmunity 2010; 34 (3): J168–J177.
2. Buc M. Autoimunita a autoimunitné choroby (2. vydanie). Bratislava: Veda 2016; 567s.
3. Šedivá A. Autoimunitní onemocnení. In.: Petru V. (ed) Dětská alergologie. Praha: Mladá fronta 2012; 475-492.
4. Moroni L, Bianchi I, Lleo A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. Autoimmunity Reviews 2012; 11 (6-7): A386-392.
5. Bartůňková J. Imunologicky podmíněná onemocnění. In: Klener P. (ed) Vňitřní lékařství – 4. vydanie. Praha: Galén 2011; 525-562.
6. Michels A, Zhang L, Khadra A, Kushner JA, Redondo MJ, Pietropaolo M. Prediction and prevention of type 1 diabetes: update on success of prediction and struggles at prevention. Pediatr Diabetes 2015; 16 (7): 465-484.
7. Carmi G, Amital H. The Geoepidemiology of Autoimmunity: Capsules from the 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 2010. IMAJ 2011; 13: 121-127.
8. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2003; 2 (3): 119-25.
9. Cooper GS, Bynum MLK, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. Journal of Autoimmunity 2009; 33 (3-4): 197-207.
10. Hořejší V, Bartunková J. Základy imunologie (2.vydanie). Praha: Triton 2002; 260s.
11. Buc M. Základná a klinická imunológia. Bratislava: Veda 2012; 831s.
12. Shoenfeld Y. Sex gender and autoimmunity. Journal of Autoimmunity 2012; 38 (2): J71-J73.
13. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. Lancet. 2014; 383 (9911): 69-82.
14. Beeson PB. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. American Journal of Medicine 1994; 96 (5): 457-462.
15. Marinković T, Sysi-Aho M, Orešič M. Integrated Model of Metabolism and Autoimmune Response in β-Cell Death and Progression to Type 1 Diabetes. PLoS One 2012; 7 (12): e51909.
16. Xing Y, Hogquist KA. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012; 4(6): a006957.
17. Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. Immunity 2010; 32 (4): 468-478.
18. Santamaria P. The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. Immunity. 2010; 32 (4): 437-45.
19. Miao Q, Bian Z, Tang R, Zhang H, Wang Q, Huang S, et al. Emperipolesis mediated by CD8 T cells is a characteristic histopathologic feature of autoimmune hepatitis. Clin Rev Allergy Immunol. 2015; 48(2-3): 226-235.
20. Larrubia JR, Lokhande MU, Garcia-Garzón S, Miquel J, Subirá D, Sanz-de-Villalobos E. Role of T cell death in maintaining immune tolerance during persistent viral hepatitis. World J Gastroenterol. 2013; 19(12): 1877-1889.
21. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas A, de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. Nature 2005; 435: 590-597.
22. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. Mol. Cell. Biol. 2001; 21 (24): 8247-8254.
23. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity 2009; 30 (2): 180-192.
24. Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Sakkas LI, Shoenfeld Y. Infectomics and autoinfectomics: a tool to study infectious-induced autoimmunity. Lupus. 2015; 24 (4-5): 364-373.
25. Dang MN, Buzzetti R, Pozzilli P. Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 2013; 29 (1): 8-18.
26. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. Curr Diab Rep. 2011; 11(6): 533-42.
27. Martinka E. Úskalia klasifikácie diabetes mellitus. Bratislava: Lufema 1999, 176s.
28. Buc M. A review: The major histocompatibility complex in man. Folia Biol (Prague) 1993; 39: 223-242.
29. Mayer G, Nyland J. Major Histocompatibility Complex (MHC) and T-cell receptors – role in immune responses. In: Male D., Brostoff J, Roth D, Roitt I. (eds), Immunology 7th edition. London: Mosby 2006, 544s.
30. Noble JA, Valdes AM, Thomson G, Erlich HA. The HLA class II locus DPB1 can influence susceptibility to type 1 diabetes. Diabetes 2009; 49 (1): 121-125.

31. Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, et al. Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. The Journal of Immunology 1992; 148 (1): 249-258
32. Kaur G, Kumar N, Szilagyi A, Blasko B, Fust G, Rajczy K, et al. Autoimmune-associated HLA-B8-DR3 haplotypes in Asian Indians are unique in C4 complement gene copy numbers and HSP-2 1267A/G. Hum Immunol. 2008; 69 (9): 580-7.
33. Aly TA, Eller E, Ide A, Gowan K, Babu SR, Erlich HA, et al. Multi-SNP analysis of MHC region: remarkable conservation of HLA-A1-B8-DR3 haplotype. Diabetes. 2006; 55 (5): 1265-9.
34. Lightfoot YL, Chen J, Mathews CE. Immune-mediated β-cell death in type 1 diabetes: lessons from human β-cell lines. Eur J Clin Invest. 2012; 42 (11): 1244-1251.
35. Martinka E. Patogenéza diabetes mellitus 1. typu. In: Mokáň M, Martinka E, Galajda P. (eds), Diabetes mellitus a vybrané metabolické ochorenia. Martin: Vydavateľstvo P+M 2008; 125-151.
36. Coppieters KT, Wiberg A, von Herrath MG. Viral infections and molecular mimicry in type 1 diabetes. APMIS 2012;120 (12): 941-949.
37. Filippi CM, von Herrath MG. Viral Trigger for Type 1 Diabetes. Pros and Cons. Diabetes. 2008; 57 (11): 2863-2871.
38. Bergamin CS, Dib SA. Enterovirus and type 1 diabetes: What is the matter? World J Diabetes. 2015; 6 (6): 828-839.
39. Boettler T, von Herrath M. Protection against or triggering of Type 1 diabetes? Different roles for viral infections. Expert Rev ClinImmunol. 2011; 7 (1): 45-53.
40. Steck A, Rewers MJ. Genetics of Type 1 Diabetes. Clinical Chemistry. 2011; 57 (2): 176-185.
41. Setty-Shah N, Maranda L, Nwosu BU. Increased Risk for Vitamin D Deficiency in Obese Children with Both Celiac Disease and Type 1 Diabetes. Gastroenterology Research and Practice 2014; Article ID 561351, 7s.
42. Chakhtoura M, Azar ST. The Role of Vitamin D Deficiency in the Incidence, Progression, and Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. International Journal of Endocrinology 2013; Article ID 148673, 10 s.
43. Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. Discov Med. 2011; 12(67): 535-45.
44. MacFarlane AJ, Strom A, Scott FW. Epigenetics: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes. Mammalian Genome 2009; 20 (9-10): 624-632.
45. Stadinski B, Kappler J, Eisenbarth GS. Molecular targeting of islet autoantigens. Immunity 2010; 32 (4): 446-456.
46. Zima T, Vítek L. Teoretické a preklinické aspekty vývoje biologických léčiv. In: Pavelka K, Arenberger P, Lukáš M, Zima T, Doležal T, Olejárová M, Cetkovská P (eds) Biologická léčba zánětlivých autoimunitních onemocnění. Praha: Grada Publishing 2014; 3-8.
47. Bruchatá K, Heinz P. Biologické liečivá z pohľadu farmácie. Prakt. lekarn., 2014; 4 (4): 120-122.
48. Šenolt L. Úvod do problematiky biologických léčiv v revmatologii. In: Pavelka K, Arenberger P, Lukáš M, Zima T, Doležal T, Olejárová M, Cetkovská P (eds) Biologická léčba zánětlivých autoimunitních onemocnění. Praha: Grada Publishing 2014; 17-22.
49. Zadražil J, Horák P, Karásek D. Moderní farmakoterapie autoimunitních chorob. Praha: Maxdorf 2015; 529s.
50. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2014; 37 (Suppl 1): S81-90.
51. Kantárová D, Mokáň M. Autoimunitný diabetes mellitus. Martin: [s.n.], 2014; 111s.
52. International Diabetes Federation. IDF Diabetes, 7 ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015. http://www.diabetesatlas.org
53. Groop L, Pociot F. Genetics of diabetes - are we missing the genes or the disease? Mol Cell Endocrinol. 2014; 382 (1): 726-39.
54. EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. Lancet 2000; 355: 873-876.
55. Hummel S, Pflüger M, Hummel M, Bonifacio E, Ziegler AG. Primary Dietary Intervention Study to Reduce the Risk of Islet Autoimmunity in Children at Increased Risk for Type 1 Diabetes. Diabetes Care 2011; 34: 1301-1305.
56. Maahs DA, Haller MJ, Atkinson MA. Epidemiology of Type 1 Diabetes. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 2010; 39 (3): 481-498.
57. Tuomilehto J. The emerging global epidemic of type 1 diabetes. Curr Diab Rep. 2013; 13(6): 795-804.
58. Národné centrum zdravotníckych informácií (NCZI) - http://www.nczisk.sk/Publikacie/Edicia_roceniek/Pages/default.aspx (15.3.2015)

59. Green A, Patterson CC. Trends in incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. Diabetologia 2001; 44, Suppl 3: B3-B8.
60. Pitkäniemi J, Onkamo P, Tuomilehto J, Arjas E. Increasing incidence of Type 1 diabetes – role for genes? BMC Genetics 2004; 5: 5.
61. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidencie of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes Care 2000; 23: 1516-1526.
62. Pettitt DJ, Talton J, Dabelea D, Divers J, Imperatore G, Lawrence JM, et al. Prevalence of diabetes in U.S. youth in 2009: the SEARCH for diabetes in youth study. Diabetes Care. 2014 Feb;37(2):402-8.
63. The Eurodiab ACE Study Group 1998 and the Eurodiab ACE Substudy 2 Study Group: Familial risk of Type 1-diabetes in Europe Children. Diabeteologia 1998; 41: 1151-1156.
64. Hummel S, Ziegler AG. Early determinants of type 1 diabetes: experience from the BABYDIAB and BABYDIET studies. Am J ClinNutr. 2011; 94 (6, Suppl): 1821S-1823S.
65. Cinek O. Deskriptivní, analytická a genetická epidemiologie dětského diabetu 1. typu. In: Perušicová J. Diabetologie. Praha: Triton 2005; 121-185.
66. Gale EA, Gillespie KM. Diabetes and gender. Diabetologia. 2001, 44 (1): 3-15.
67. Delogu LG, Deidda S, Delitala G, Manetti R. Infectious diseases and autoimmunity. J. Infect Dev Ctries. 2011; 5 (10): 679-687.
68. Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M. Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. Diabetic Medicine 2009; 26 (7): 673-678.
69. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early Infant Feeding and Risk of Developing Type 1 Diabetes–Associated Autoantibodies. JAMA 2003; 290 (13): 1721-1728.
70. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. Immunity. 2010; 32 (4): 457-467.
71. Kantárová D, Buc M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. Physiological Research. 2007; 56 (3): 255-266.
72. Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. N Engl. J Med. 1986; 314: 1360-1368.
73. Erlich HA, Valdes AM, Noble JA. Prediction of Type 1 Diabetes. Diabetes. 2013; 62: 1020-1021.
74. Kantárová D, Prídavková D, Ságová , Vrlík M, Mikler , Buc M. Genetický a molekulový podklad vývoja autoimunitného diabetes mellitus. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 2015; 31 (64): 121-129.
75. Redondo MJ, Rewers M, Yu L, Garg S, Pilcher CC, Elliott RB, et al. Genetic determination of islet cells autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type I diabetes: prospective twin study. BMJ 1999; 318: 698-702.
76. Zoka A, Muzes G, Somogyi A, et al. Altered Immune regulation in Type 1 Diabetes. Clinical & developmental immunology 2013; 254874.
77. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. The New England Journal of Medicine 2009; 360 (16): 1646-1654.
78. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families. Diabetes 2008; 57 (4): 1084-1092.
79. Kantárová D, Buc M, Stuchlíková M, Mokáň M, Vrlík M. Ethiopathogenesis of autoimmune diabetes mellitus in humans : a review. Central European Journal of Immunology 2006, 31 (3-4): 102-110.
80. Noble JA, Valdes AM, Varney MD, Carlson JA, Moonsamy P, Fear AL, et al. for the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. HLA Class I and Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes - Results From the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Diabetes 2010; 59 (11): 2972-2979.
81. Pietropaolo M, Towns R, Eisenbarth GS. Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes. Cold Spring HarbPerspect Med. 2010; 2 (10): a012831.
82. Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. Mol Aspects Med. 2015; 42: 42-60.
83. Lipner EM, Tomer Y, Noble JA, Monti MC, Lonsdale JT, Corso B, et al. HLA class I and II alleles are associated with microvascular complications of type 1 diabetes. Hum Immunol. 2013 May;74(5):538-44. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.013. Epub 2013 Jan 29.
84. Varney MD, Valdes AM, Carslon JA, Noble JA, Tait BD, Bonella P. et al. for the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. HLA DPA1, DPB1 Alleles and Haplotypes Contribute to the Risk Associated With Type 1 Diabetes Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families. Diabetes 2010; 59 (8): 2055-2062.
85. Stuchlíková M, Kantárová D, Michalková D, Barák Ľ, Buc M. Association of HLA-DPB1 alleles with type I diabetes mellitus in Slovak population. Bratislavské lekárske listy 2006; 107 (3): 73-75.

86. Kantárová D, Vrlík M, Mokáň M, Stuchlíková M, Buc M. Asociácia autoimunitného diabetes mellitus s alelami HLA-DP v slovenskej populácii. Interná medicína 2009; 9 (3): 138-142.
87. Buc M, Shawkatová I. Imunopatogenéza diabetes mellitus 1A. Čes.-slov. Pediatria 2002; 57: 299-305.
88. Cucca F, Dudbridge F, Loddo M, et al. The HLA-DPB1–Associated Component of the IDDM1 and Its Relationship to the Major Loci HLA-DQB1, -DQA1, and -DRB1. Diabetes 2001; 50: 1200-1205.
89. Undlien DE, Thorsby E. HLA association in type 1 diabetes: merging genetics and immunology, Trends Immunol. 2001; 22: 467-469.
90. Cerna M. Genbetics of autoimmune diabetes mellitus. Wien Med Wochenschr. 2008; 158 (1-2): 2-12.
91. Leslie RD, Delli Castelli M. Age-dependent influences on the origins of autoimmune diabetes: evidence and implications.Diabetes. 2004; 53 (12): 3033–3040.
92. Kantárová D, Prídavková D, Maňka V, Ságová I, Galajda P, Mokáň M. Molekulárny podklad pôsobenia HLA-molekúl v patogenéze diabetes mellitus 1. typu. Diabetes a obezita. 2012; 12 (23): 59-64.
93. Baschal EE, Aly TA, Babu SR, et al. HLA-DPB1*0402 Protects Against Type 1A Diabetic Autoimmunity in the Highest Risk DR3-DQB1*0201/DR4-DQB1*0302 DAISY Population. Diabetes. 2007; 56 (9): 2405-2409.
94. Kantárová D, Buc M. T-lymfocyty, ich subpopulácie, biologický význam a účasť v imunopatologických procesoch. Interná medicína. 2011, 11 (12): 541-544.
95. Szabó M. Význam markeru autoimunní inzulitidy pro klasifikaci, predikci a prevenci diabetes mellitus. DMEV 2004; 2 (7): 320-328.
96. Kantárová D, Mokáň M. Diabetes mellitus 1. typu a autoimunita. Vnitř Lék. 2005; 51 (11): 1297-1302.
97. Kantárová D, Buc M, Vrlík M, Mokáň M. Bude sa autoimunitný diabetes mellitus liečiť monoklonovými protilátkami? Diabetes a obezita. 2007; 7 (14): 45-51.
98. Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. Clin Chem. 2011; 57: 168-175.
99. Kantárová D, Buc M, Linceni M, Vrlík M. Možnosti liečby autoimunitného diabetes mellitus monoklonovými protilátkami. Klinická imunológia a alergológia. 2012; 22 (2): 14-18.
100. Kantárová D, Buc M, Prídavková D, Ságová I, Vrlík M, Mokáň M. Autoimunitný diabetes mellitus: dočkáme sa kauzálnej liečby? Interná medicína. 2013; 13 (11): 486-489.
101. Kantárová D, Vrlík M, Buc M. Genetic determination and immunopathogenesis of type 1 diabetes mellitus in humans. Act Med Mart. 2012; 12 (2): 19-31.
102. Kantárová D, Vrlík M, Buc M, Mokáň M. Analýza pozitivity autoprotilátok u pacientov s diabetes mellitus 1. typu. Klinická imunológia a alergológia. - Roč. 18, č. 4 (2008), s. 9-14
103. Wilkin TJ. Antibody markers in predicting type 1 diabetes: a review. Journal of the Royal Society of Medicine 1990; 83: 632-636.
104. Vandewalle CL, Falorni A, Svanholm S, et al. High diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in insulin dependent diabetes mellitus with clinical onset between age 20-40years. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1995; 80: 846-851.
105. Giannopoulou EZ, Winkler C, Chmiel R, Matzke C, Scholz M, Beyerlein A, et al. Islet autoantibody phenotypes and incidence in children at increased risk for type 1 diabetes. Diabetologia. 2015; 58 (10): 2317-2323.
106. Bender C, Schlosser M, Christen U, Ziegler AG, Achenbach P. GAD autoantibody affinity in schoolchildren from the general population. Diabetologia. 2014 Sep;57(9):1911-1918.
107. Hermann R, Soltész G. Prevalence and HLA association of GAD65 antibodies in Hungarian schoolchildren. Hum Immunol. 2003 Jan;64(1):152-5.
108. Knip M, Kukko M, Kulmala P, Veijola R, Simell O, Akerblom HK, Ilonen J. Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. Am J Med Genet. 2002 May 30;115(1):48-54.
109. Novota P, Cerna M, Kolostova K, Cejkova P, Zdarsky E, Novakova D, et al. Diabetes mellitus in adults: association of HLA DRB1 and DQB1 diabetes risk alleles with GADab presence and C-peptide secretion. Immunol Lett. 2004; 95 (2): 229-232.
110. Brorsson CA, Onengut S, Chen W, Wenzlau J, Yu L, Baker P, et al. Novel Association Between Immune-Mediated Susceptibility Loci and Persistent Autoantibody Positivity in Type 1 Diabetes. Diabetes 2015; 64(8): 3017-3027.
111. Yang L, Luo S, Huang G, et al. The diagnostic value of zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) for type 1 diabetes in Chinese. Diabetes Metab Res Rev. 2010; 26 (7): 579-584.
112. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al (2007). The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104 (43): 17040-17045.
113. Wenzlau JM, Liu Y, Yu L. et al. A Common Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphism in the SLC30A8 Gene Determines ZnT8 Autoantibody Specificity in Type 1 Diabetes. Diabe- tes 2008; 57 (10): 2693-2697.

114. Salonen KM, Ryhänen S, Härkönen T, Ilonen J, Knip M, Finnish Pediatric Diabetes Register. Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age, metabolic state and HLA DR genotype in children with newly diagnosed type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 2013; 8: 646-54.
115. Towns R, Pietropaolo M. GAD65 autoantibodies and its role as biomarker of Type 1 diabetes and Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA). Drugs of the future. 2011; 36 (11): 847.
116. Poudel RR. Latent autoimmune diabetes of adults: From oral hypoglycemic agents to early insulin. Indian J Endocrinol Metab. 2012; 16 (Suppl1): S41-S46.
117. Delitala AP, Pes GM, Fanciulli G, Maioli M, Secchi G, Sanciu F, et al. Organ-specific antibodies in LADA patients for the prediction of insulin dependence. Endocr Res. 2016; 11: 1-6.
118. Weber P, Meluzínová H, Kubesová H, Ambrosová P, Polcarová V, Cejkova P, et al. Type 1 diabetes and LADA--occurrence of HLA-DRB1 *03 and DRB1 *04 alleles in two age different groups of diabetics. Adv Gerontol. 2010; 23 (2): 243-248.
119. Coppieters KT, Boettler T, von Herrath M. Virus Infections in Type 1 Diabetes. Cold Spring HarbPerspect Med. 2012; 2: a007732.
120. MacLaren NK, Atkinson MA. Insulin-dependent diabetes mellitus: the hypothesis of molecular mimicry between islet cell antigens and microorganisms. Molecular Medicine Today. 1997; 3 (2): 76-83.
121. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, et al. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. Nature medicine. 1998; 4 (7): 781-785.
122. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. Clinical Microbiology Reviews. 2006; 19 (1): 80-94.
123. Hober D, Sauter P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. Nature Reviews Endocrinology 2010; 6, 279-289.
124. Coppieters KT, Wiberg A, Tracy SM, von Herrath MG. Immunology in the clinic review series: focus on type 1 diabetes and viruses: the role of viruses in type 1 diabetes: a difficult dilemma. Clin Exp Immunol 2012; 168 (1): 5-11.
125. Oikarinen M, Tauriainen S, Honkanen T, et al. Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. Clin Exp Immunol 2008; 151: 71-75.
126. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, et al. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. Diabetologia. 2009; 52: 1143-1151.
127. Oikarinen M, Tauriainen S, Oikarinen S,et al. Type 1 Diabetes Is Associated With Enterovirus Infection in Gut Mucosa. Diabetes. 2012; 61 (3): 687-691.
128. Ramondetti F, Sacco S, Comelli M, et al (2012). RIDI Study Group. Type 1 diabetes and measles, mumps and rubella childhood infections within the Italian Insulin-dependent Diabetes Registry. Diabet Med. 29 (6): 761-766.
129. Janner M, Ballinari P, Mullis PE, et al. High prevalence of vitamin D deficiency in children and adolescent with type 1 diabetes. Swiss Med Wkly. 2010; 140: w13091.
130. Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C, Haller M, Schatz D, Atkinson M. Vitamin D levels in subjects with and without type 1 diabetes residing in a solar rich environment. Diabetes Care. 2009; 32 (11): 1977-1979.
131. Aljabri KS, Bokhari SA, Khan MJ. Glycemic changes after vitamin D supplementation in patients with type 1 diabetes mellitus and vitamin D deficiency. Ann Saudi Med. 2010; 30 (6): 454-458.
132. Bonifacio E, Ziegler AG. Advances in the prediction and natural history of type 1 diabetes. Endocrinol Metab Clin N Am. 2010; 39: 513-525.
133. Petru V. Dětská alergologie. Praha: Mladá fronta 2012; 531s.
134. Atkinson MA. The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes. Cold Spring HarbPerspect Med. 2012; 2 (11): a007641
135. DeStefano F, Mullooly JP, Okoro CA, Chen RT, Marcy SM, Ward JI, et al. Childhood vaccinations, vaccination timing, and risk of type 1 diabetes mellitus. Pediatrics 2001; 108 (6): E112.
136. Dankovčíková A. Očkovanie a diabetes mellitus 1. typu. In: Jeseňák M. Urbančíková I. (ed.) Očkovanie v špeciálnych situáciách. Praha: Mladá fronta 2013; 28-32.
137. Kantárová D, Prídavková D, Ságová I, Galajda P, Vrlík M, Mokáň M. Diabetes mellitus 1. typu a očkovanie. Diabetes a obezita. 2014; 14 (28): 70-76.
138. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Childhood vaccination and type 1 diabetes. N Engl J Med. 2004; 350 (14): 1398-404.
139. Altobelli E, Petrocelli R, Verrotti A, Valenti M. Infections and risk of type I diabetes in childhood: a population-based case-control study. Eur J Epidemiol. 2003;18(5):425-30.
140. Johns TL, Hutter GE. New combination vaccines: DTaP-IPV (Kinrix) and DTaP-IPV/Hib (Pentacel). Ann Pharmacother 2010; 44 (3): 515-23.
141. Bresson D, von Herrath M. Humanizing animal models: a key to autoimmune diabetes treatment. Sci Transl Med. 2011; 68 (2-3): 68ps4.

142. Skyler JS, Riccordi C. Stopping Type 1 Diabetes: Attempts to Prevent or Cure Type 1 Diabetes in Man. Diabetes. 2011; 60: 1-8.
143. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. N Engl J Med. 2002; 346 (22): 1692-1698.
144. Keymeulen B, Walter M, Mathieu C, Kaufman L, Gorus F, Hilbrands R, et al. Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. Diabetologia. 2010; 53 (4): 614-623.
145. Suen ChS, Burn P. The potential of incretin-based therapies in type 1 diabetes. Drug Discovery Today. 2012; 17: 89-95.
146. Bolt S, Routledge E, Lloyd I, Chatenoud L, Pope H, Gorman SD, et al. The generation of a humanize, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. Eur J Immunol. 1993; 23: 403-411.
147. Woodle ES, Xu D, Zivin RA, Auger J, Charette J, O'Laughlin R, et al. Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3gamma1(Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection. Transplantation. 1999; 68: 608-616.
148. Carpenter PA, Appelbaum FR, Corey L, Deeg HJ, Doney K, Gooley T, et al. A humanized non-FcR-binding anti-CD3 antibody, visilizumab, for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. Blood. 2002; 99: 2712-2719.
149. Herold KC, Gitelman SE, Masharani U, Hagopian W, Bisikirska B, Donaldson D, et al. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes Diabetes. 2005; 54: 1763-1769.
150. Sherry N, Hagopian W, Ludvigsson J, Jain SM, Wahlen J, Ferry RJ, et al. Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protégé study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. Lancet 2011; 378 (9790): 487-497.
151. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Rituximab, B-Lymphocyte Depletion, and Preservation of Beta-Cell Function. N Engl J Med. 2009; 361: 2143-2152
152. Posselt AM, Bellin MD, Tavakol M, et al. Islet transplantation in type 1 diabetics using an immunosuppressive protocol based on the anti-LFA-1 antibody efalizumab. Am J Trans- plant. 2010; 10 (8): 1870-1880.
153. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens. 1992; 39: 225-235.
154. Hviid TV, Madsen HO, Morling N. HLA-DPB1 typing with polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique in Danes. Tissue Antigens. 1992; 40: 140-144.
155. Buc M, Bucová M. Základná a klinická imunológia. Bratislava: Univerzita Komenského 2006; 334s.
156. Luo D, Rogers CN, Steed JT, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Development of glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) autoantibody assay using biotin–GAD65 fusion protein. Journal of Biotechnology. 2004; 111 (1): 97-104.
157. Kantárová D, Buc M, Vrlík M, Mokáň M. Genetická predispozícia k vývoju diabetes mellitus prvého typu. Interná medicína. 2007; 7 (3): 139-145-
158. Petrone A, Bugawan TL, Mesturino CA, Nisticò L, Galgani A et al. The distribution of HLA class II susceptible/protective haplotypes could partially explain the low incidence of type 1 diabetes in continental Italy (Lazio region). Tissue Antigens. 2001; 58 (6): 385-394.
159. Contu D, Cucca F. Susceptibility to Type 1 Diabetes: Genes and Mechanisms. Pediatr Adolesc Med. 2005; 10: 28-56.
160. Cerna M, Novota P, Kolostova K, Cejkova P, Zdarsky E, Novakova D, et al. HLA in Czech adult patients with autoimmune diabetes mellitus: comparison with Czech children with type 1 diabetes and patients with type 2 diabetes. Eur J. Immunogen. 2003; 30: 401-407.
161. Dorman JS, Bunker CH. HLA-DQ Locus of the Human Leukocyte Antigen Complex and Type 1 Diabetes Mellitus: A HuGE Review. Epidemiol Rev. 2000; 2 (22): 218-227.
162. Cinek O, Kolouškova S, Šnajderová M, Sumník Z, Sedláková P, Drevínek P, et al. HLA class II genetic association of type 1 diabetes mellitus in Czech children. Pediatric Diabetes. 2001; 2 (3): 98-102.
163. Noble JA, Martin A, Valdes AM, Lane JA, Galgani A, Petrone A. et al. Type 1 diabetes risk for HLA-DR3 haplotypes depends on genotypic context: Association of DPB1 and HLA class I loci among DR3 and DR4 matched Italian patients and controls. Hum Immunol. 2008; 69 (4-5): 291-300.
164. Noble JA, Valdes AM, Thomson G, Erlich HA. The HLA class II locus DPB1 can influence susceptibility to type 1 diabetes. Diabetes. 2000; 49: 121-125.
165. Cruz TD, Valdes AM, Santiago A, Frazer de Llado T, Raffel LJ, Zeidler A, et al. DPB1 Alleles Are Associated With Type 1 Diabetes Susceptibility in Multiple Ethnic Groups. Diabetes. 2004; 53: 2158-2163.

166. Balducci-Silano PL, Layrisse ZE. HLA-DP and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in an ethnically mixed population, associations with other HLA alleles. J Autoimmun. 1995; 8: 425-437.
167. Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. Genes and Immunity 2002; 3: 235-249.
168. Doytchinova IA, Darren R, Flower DR. In Silico Identification of Supertypes for Class II MHCs. The Journal of Immunology 2005; 174: 7085–7095.
169. Mbanya C, Sobngwi E, Mbanya DNS. HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 and DPB1 susceptibility alleles in Cameroonian type 1 diabetes patients and controls. European Journal of Immunogenetics. 2001; 28 (4): 459-462.
170. Al-Hussein KA, Rama NR, Ahmad M, Rozemuller E, Tilanus MG. HLA-DPB1*0401 is associated with dominant protection against type 1 diabetes in the general Saudi population and in subjects with a high-risk DR/DQ haplotype. Eur J Immunogenet. 2003; 30 (2): 115-119.
171. Johansson S, Lie BA, Pociot F, Nerup J, Cambon-Thomsen A, Kockum I, et al. HLA associations in type 1 diabetes: DPB1 alleles may act as markers of other HLA-complex susceptibility genes Tissue Antigens 2003; 61 (5): 344-351.
172. Radha V, Vimaleswaran KS, Deepa R, Mohan V. Genetics of diabetes mellitus. Indian J Med Res. 2003; 117: 225-238.
173. Watad A, Amital H, Shoenfeld Y. The environment and autoimmune diseases. Harefuah. 2015; 154 (5): 308-11.
174. Versini M, Jeandel PY, Bashi T, Bizzaro G, Blank M, Shoenfeld Y. Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. BMC Med. 2015; 13: 81.
175. Ohara N, Kaneko M, Furukawa T, Koike T, Sone H, Tanaka S, et al. Rapid Normalization of High Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody Titers and Preserved Endogenous Insulin Secretion in a Patient with Diabetes Mellitus: A Case Report and Literature Review. Intern Med. 2016; 55: 485-489.
176. Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J and the ABIS-study group. Dietary risk factors for the emergence of type 1 diabetes-related autoantibodies in 2½-year-old Swedish children. British Journal of Nutrition. 2006; 95: 603-608.
177. http://www.preimplantationgeneticdiagnosis.it/the-hla-complex.htm

ZOZNAM TABULIEK A OBRÁZKOV

Tab. 1 Výskyt autoimunitných chorôb u monozygotných dvojčiat
Tab. 2 Asociácia niektorých HLA-molekúl s autoimunitnými chorobami
Tab. 3 Názvoslovie monoklonových protilátok
Tab. 4 Porovnanie celosvetového výskytu DM 1. typu u detí vo veku 0 – 14 rokov v roku 2003 a 2011
Tab. 5 Rozdiely v náraste incidencie choroby v rozdielnych vekových skupinách (štúdia EURODIAB)
Tab. 6 Pozitivita autoprotilátok u detí diabetických rodičov
Tab. 7 Riziko DM1 podľa príbuzenského vzťahu
Tab. 8 Predispozičné a protektívne HLA haplotypy v patogenéze autoimunitného DM
Tab. 9 Prítomnosť niektorých HLA aliel a riziko vývoja DM1A v bežnej populácii v porovnaní s rodinnými príslušníkmi diabetika
Tab. 10 Výskyt autoimunitného DM u monozygotných dvojčiat pacientov v závislosti od ich veku pri stanovení diagnózy
Tab. 11 Vekové zloženie súboru diabetikov
Tab. 12 Rozdelenie súboru diabetikov do vekových pásiem
Tab. 13 Priemerná dĺžka trvania choroby
Tab. 14 Priemerný vek pacientov pri stanovení diagnózy
Tab. 15a Rozdelenie súboru diabetikov do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy
Tab. 15b Rozdelenie súboru diabetikov (dievčat) do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy
Tab. 15c Rozdelenie súboru diabetikov (chlapcov) do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy
Tab. 16 Rozdelenie súboru diabetikov podľa mesiaca, v ktorom bola stanovená diagnóza, hodnotené u všetkých pacientov spolu a osobitne u pacientov do veku 3rokov v čase stanovenia diagnózy
Tab. 17 Vekové zloženie kontrolnej skupiny
Tab. 18 Frekvencia výskytu HLA-DRB1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine
Tab. 19 Frekvencia výskytu najčastejších HLA-DRB1 aliel – DR3, DR4 u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine
Tab. 20 Frekvencia výskytu HLA-DQA1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine
Tab. 21 Frekvencia výskytu HLA-DQB1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine
Tab. 22 Frekvencia výskytu HLA-DPB1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine
Tab. 23 Väzby predispozičnej alely *HLA-DPB1*01:01* s predispozičnými DR a DQ alelami v súbore diabetikov
Tab. 24 Väzby protektívnej alely *HLA-DPB1*04:02* s protektívnymi DR a DQ alelami v kontrolnej skupine
Tab. 25 Porovnanie priemerného veku pri stanovení diagnózy u pacientov s jednotlivými predispozičnými HLA alelami a bez nich
Tab. 26 Rozdelenie súboru diabetikov podľa vyšetrenej autoprotilátky
Tab. 27 Hodnota vyšetrených autoprotilátok u diabetikov
Tab. 28 Pozitivita autoprotilátok v súbore diabetikov pri ich hodnotení jednotlivo
Tab. 29 Pozitivita autoprotilátok v súbore diabetikov (dievčatá a chlapci) pri ich hodnotení jednotlivo
Tab. 30 Priemerný vek pacientov s pozitivitou jednotlivých autoprotilátok pri stanovení diagnózy
Tab. 31 Rozdelenie pacientov s pozitivitou jednotlivých autoprotilátok do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy
Tab. 32 Pozitivita aspoň jednej autoprotilátky v súbore diabetikov pri ich vyšetrení v kombinácii
Tab. 33 Vzťah medzi pozitivitou autoprotilátok a prítomnosťou predispozičných HLA-DRB1 aliel
Tab. 34 Vzťah medzi pozitivitou autoprotilátok a prítomnosťou predispozičných HLA-DQA1 aliel
Tab. 35 Vzťah medzi pozitivitou autoprotilátok a prítomnosťou predispozičných HLA-DQB1 aliel
Tab. 36 Vzťah medzi pozitivitou autoprotilátok a prítomnosťou predispozičnej HLA-DPB1 alely
Tab. 37a Asociácia rizikového haplotypu a výskyt autoprotilátok GADA
Tab. 37b Asociácia rizikového haplotypu a výskyt autoprotilátok IA-2A, IAA
Tab. 38 HLA alely u pacientov s pozitivitou všetkých troch sledovaných autoprotilátok
Tab. 39 HLA alely u pacientov s negativitou všetkých troch sledovaných autoprotilátok
Tab. 40a Porovnanie získaných výsledkov týkajúcich sa predispozičného, protektívneho, resp. neutrálneho účinku aliel *DRB1* na vývoj DM 1. typu s literárnymi údajmi o kaukazoidnej populácii
Tab, 40b Porovnanie získaných výsledkov týkajúcich sa predispozičného, protektívneho, resp. neutrálneho účinku aliel *DQA1* na vývoj DM 1. typu s literárnymi údajmi o kaukazoidnej populácii
Tab. 40c Porovnanie získaných výsledkov týkajúcich sa predispozičného, protektívneho, resp. neutrálneho účinku aliel *DQB1* na vývoj DM 1. typu s literárnymi údajmi o kaukazoidnej populácii
Tab. 41 Porovnanie získaných výsledkov týkajúcich sa predispozičného, protektívneho, resp. neutrálneho účinku *DPB1* aliel na vývoj DM 1. typu s literárnymi údajmi o kaukazoidnej populácii

Obr. 1 Génová mapa hlavného histokompatibilného komplexu človeka
Obr. 2 HLA-molekula prvej triedy
Obr. 3 HLA-molekula druhej triedy
Obr. 4 Schéma terciárnej štruktúry HLA-molekúl druhej triedy
Obr. 5 Porovnanie incidencie DM1 u detí do 14 rokov (na 100 000 obyvateľov) v krajinách Európskej únie v roku 2011
Obr. 6 Schéma etiopatogenézy autoimunitného DM
Obr. 7 Zhodná sekvencia aminokyselín v štruktúre enzýmu glutamátdekarboxylázy (GAD65) a Coxsackie vírusu (P2C)
Obr. 8 Rozdelenie súboru diabetikov do vekových pásiem
Obr. 9 Rozdelenie súboru diabetikov do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy
Obr. 10 Rozdelenie súboru diabetikov (dievčat a chlapcov) do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy
Obr. 11a Rozdelenie celého súboru diabetikov podľa mesiaca, v ktorom bola stanovená diagnóza
Obr. 11b Rozdelenie súboru diabetikov do 3 rokov veku v čase stanovenia diagnózy podľa mesiaca, v ktorom bola stanovená diagnóza
Obr. 12 Frekvencia výskytu HLA-DRB1 aliel u pacientov s DM 1. typu a v kontrolnej skupine
Obr. 13 Frekvencia výskytu HLA-DQA1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine
Obr. 14 Frekvencia výskytu HLA-DQB1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine
Obr. 15 Frekvencia výskytu HLA-DPB1 aliel u pacientov s DM 1.typu a v kontrolnej skupine
Obr. 16 Pozitivita autoprotilátok v súbore diabetikov pri ich hodnotení jednotlivo
Obr. 17 Rozdelenie pacientov s pozitivitou jednotlivých autoprotilátok do vekových pásiem podľa veku pri stanovení diagnózy