

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

TANJA J. MILIČIĆ

**ANALIZA POREMEĆAJA SUBPOPULACIJA  
T LIMFOCITA PRVIH ROĐAKA  
PACIJENATA SA TIPOM 1 DIJABETESA  
KAO MARKERA RIZIKA ZA NASTANAK  
BOLESTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

TANJA J. MILIČIĆ

**ANALYSIS OF IMPAIREMENTS IN  
T CELLS SUBSETS IN FIRST DEGREE  
RELATIVES OF PATIENTS WITH TYPE 1  
DIABETES AS RISK MARKERS FOR  
DISEASE DEVELOPMENT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor: Akademik Nebojša M. Lalić

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Klinički centar Srbije

Članovi Komisije:

Prof. dr Aleksandra Jotić, predsednik

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Klinika za endokrinologiju,  
dijabetes i bolesti metabolizma, Klinički centar Srbije

Prof dr Vera Pravica

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Institut za mikrobiologiju i  
imunologiju

Prof dr Miroslava Zamaklar, profesor u penziji

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

*Srdačno se zahvaljujem svojim učiteljima, saradnicima i prijateljima koji su mi pomogli u izradi ove doktorske disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem akademiku Nebojši M. Laliću, mentoru ove doktorske disertacije, čoveku velike energije, strpljenja i mudrosti, koji je usmeravao izradu ovog istraživanja i stvarao uslove za njegovo izvođenje. Njegov izvanredan metodološki i pedagoški pristup, kreativnost i inventivnost u nauci, inspirisali su me da se bavim ovom oblašću naučnog istraživanja, a dragoceni saveti u interpretaciji rezultata učinili su rešivim sve nedoumice koje su pratile ovo istraživanje.*

*Prof dr Aleksandra Jotić je svojom energijom, inteligencijom i upornošću, pružala podršku u savladavanju svih teškoća vezanih za ovo istraživanje, a iz njene borbenosti, optimizma i prijateljstva crepela sam energiju tokom rada na ovom istraživanju.*

*Prof dr Ivanka Marković iz Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, bila je bezrezervno angažovana u saradnji kroz koju je ostvareno ovo istraživanje, a njena kreativnost, analitičnost i upornost omogućili su da rezultati ove doktorske disertacije imaju punu vrednost.*

*Profesor dr Miroslava Zamaklar, započela je u našoj sredini imunološka istraživanja u pacijenata sa novootkrivenim tipom 1 dijabetesa, i svojom toplom ljudskom podrškom i mudrošću iskusnog učitelja je pomogla u izradi ovog rada.*

*Prof dr Dušan Popadić sa Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, davao je dragocene i stručne savete tokom istraživanja.*

*Svojim kolegama, lekarima iz Odeljenja za metaboličke poremećaje, intenzivirani tretman i ćelijsku terapiju u dijabetesu Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS, zahvalna sam na razumevanju, podršci i atmosferi prijateljske saradnje.*

*Kolegama iz Instituta za za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dugujem posebnu zahvalnost za pruženu pomoć, spremnost za saradnju i zainteresovanost za istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.*

*Metabolička ispitivanja obavljena su u Odeljenju za metaboličke poremećaje, intenzivirani tretman i ćelijsku terapiju u dijabetesu, uz požrtvovanost, spretnost i preciznost u radu medicinskih sestara bez čije pomoći ova istraživanja ne bi imala vrednost.*

*I najzad, zahvaljujem se porodici, koja je sa mnom delila emocije i podržavala me u naučnom istraživanju.*

## **Analiza poremećaja subpopulacija T limfocita prvih rođaka pacijenata sa tipom 1 dijabetesa kao markera rizika za nastanak bolesti**

### **Rezime**

Prethodna istraživanja su ukazala na značajnu ulogu subpopulacija T limfocita, T helper 1 (Th1) i T helper 2 (Th2), fenotipski definisanih ekspresijom odgovarajućih hemokinskih receptora CXCR3 i CCR4, kao i T regulatorne (T reg) subpopulacije, u inicijalnoj fazi tipa 1 dijabetesa (T1D). Međutim, povezanost promena u nivou CXCR3<sup>+</sup> (Th1 asociranih), CCR4<sup>+</sup> (Th2 asociranih) i CD25<sup>high</sup> (T reg asociranih) subpopulacija T memorijskih limfocita kao i citokina, njihovih liganda/medijatora funkcije, interferon- $\gamma$  inducibilnog hemokina 10 (interferon- $\gamma$  inducible chemokine-IP-10) (Th1 asociranog), timusom i aktivacijom regulisanog hemokina (thymus and activation-regulated chemokine-TARC) (Th2 asociranog) i transformišućeg faktora rasta  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ -TGF $\beta$ ) (Treg asociranog), i rizika za ispoljavanje T1D, nije još uvek razjašnjena. Istovremeno, povezanost promena ovih imunoloških parametara i metaboličkih parametara u smislu nivoa insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti u ranim fazama razvoja T1D, nije do sada detaljnije analizirana. U tom smislu, cilj istraživanja je poređenje nivoa (a) CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> i CD25<sup>high</sup> subpopulacija memorijskih T limfocita (b) hemokina/citokina IP-10, TARC, TGF $\beta$  i (c) insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti, između grupa zdravih prvih rođaka pacijenata sa T1D (PR), sa visokim i niskim rizikom za ispoljavanje bolesti (gde je rizik za T1D definisan prisustvom/odsustvom antitela na glutamat dekarboksilazu (GAD) i tirozin fosfatazu (IA-2), pacijenata sa novootkrivenim T1D (NT1D) u insulin zavisnom stanju na početku bolesti i u stanju kliničke remisije (KR), i kontrolnih ispitanika. Uključili smo PR sa visokim rizikom (GADA<sup>+</sup>, IA-2<sup>+</sup>) (N=17), PR sa niskim rizikom (GADA<sup>-</sup>, IA-2<sup>-</sup>) (N=34), pacijente sa NT1D (N=24), pacijente sa T1D u KR (N=10) i kontrolne ispitanike (N=18). Nivo CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> i CD25<sup>high</sup> T memorijskih limfocita je analiziran četvorbojnom imunofluorescencijom i protočnom citometrijom. Nivo hemokina/citokina i antitela u serumu određeni su ELISA metodom. Prva faza insulinske sekrecije određivana je zbirom nivoa insulina u 1. i 3. minutu nakon IVGTT-a. Nivo insulinske senzitivnosti evaluiran je hiperinsulinemijskim euglikemijskim klampom. Rezultati ukazuju da je u PR sa visokim rizikom utvrđen povišen nivo CXCR3<sup>+</sup> Th1 subpopulacije i IP-10 hemokina, i snižen nivo CCR4<sup>+</sup> Th2 i CD25<sup>high</sup> T reg subpopulacije limfocita, što bi moglo sugerisati da je u PR rizik za ispoljavanje T1D povezan sa pojačanom aktivnošću Th1 i smanjenom aktivnošću Th2 i T regulatornog imunskog odgovora. Sa druge

strane, početak T1D je povezan sa značajnim smanjenjem nivoa CXCR3<sup>+</sup> i CCR4<sup>+</sup> subsetova T memorijskih limfocita i TGFβ, i porastom nivoa IP-10 i TARC, reflektujući njihovu akumulaciju u pankreasna ostrvca i funkcionalno iscrpljivanje regulatorne subpopulacije T limfocita, što bi moglo ukazati da je nastanak bolesti moduliran na nivou ovih subsetova T memorijskih limfocita i hemokina. Istovremeno, rezultati našeg istraživanja su pokazali da PR sa visokim rizikom imaju niže nivoe prve faze insulinskog odgovora i odsustvo promena u nivou insulinskoj senzitivnosti, dok je kod pacijenata sa NT1D utvrđen značajan pad u nivou i insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti. Naši nalazi bi mogli ukazivati da inicijalne promene u toku T1D uključuju proinflamatorni imuni odgovor, udružen sa ranim padom u insulinskoj sekreciji, koji ne utiče na insulinsku senzitivnost, dok su kasnije u toku bolesti, promene u insulinskoj senzitivnosti, najverovatnije posledica značajnog smanjenja insulinske sekrecije.

Ključne reči: tip 1 dijabetesa, prvi rođaci, hemokinski receptori, hemokini, Th1, Th2, T reg, insulinska sekrecija, insulinska senzitivnost

NAUČNA OBLAST: MEDICINA

UŽA NAUČNA OBLAST: INTERNA MEDICINA, ENDOKRINOLOGIJA

**Analysis of Impairments in T Cells Subsets  
in First Degree Relatives of Patients with Type 1 Diabetes  
as Risk Markers for Disease Development**

**Abstract**

Previous studies have reported an important role of T cells subpopulations, T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2), characterized with expression of chemokine receptors CXCR3 and CCR4 on their surface, respectively, as well as T regulatory (T reg) subpopulations, in the initial phase of type 1 diabetes (T1D). However, the relationship among the impairments in the level of CXCR3<sup>+</sup> (Th1 associated), CCR4<sup>+</sup> (Th2 associated) and CD25<sup>high</sup> (T reg associated) T memory cells subpopulations, as well as cytokines, their ligands/mediators of function, interferon- $\gamma$  inducible chemokine-IP-10 (Th1 associated), thymus and activation-regulated chemokine-TARC (Th2 associated) and transforming growth factor  $\beta$ -TGF $\beta$  (Treg associated), and risk for T1D developing, has not yet been clarified. Additionally, relationship between the immunological and metabolic changes, regarding the insulin secretion and insulin sensitivity level, early in T1D development, is still controversial. Therefore, the aim of this study was to analyse the changes in (a) percentage of CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> T memory cell and CD25<sup>high</sup> T cells subsets (b) IP-10, TARC and TGF $\beta$  (c) insulin secretion and insulin sensitivity levels and in peripheral blood in the following groups of subjects: (1) 17 high-risk nondiabetic first degree relatives (hrFDRs) of patients with T1D (glutamate decarboxylase antibodies-GADA<sup>+</sup>, tyrosine phosphatase insulinoma antigen-2 antibodies-IA-2<sup>+</sup>); (2) 34 low-risk nondiabetic first degree relatives (lrFDRs) of patients with T1D (GADA<sup>-</sup>, IA-2<sup>-</sup>); (3) 24 recent-onset T1D patients and (4) 10 patients in clinical remission (5) 18 healthy, unrelated control subjects. The percentages of CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> and CD25<sup>high</sup> T memory cell subsets were analyzed in peripheral blood by using four-color immunofluorescence staining and flowcytometry. IP-10, TARC, TGF $\beta$ , GADA and IA-2 levels were determined by ELISA. Insulin secretion was evaluated by first-phase insulin response (FPIR) as insulin levels 1+3 min after IVGTT. Insulin sensitivity was tested by using euglycemic hyperinsulinemic clamp method (M value). Our results have demonstrated that hr FDRs, defined by the presence of the autoantibodies, showed higher levels of CXCR3<sup>+</sup> T cell subset and IP-10 chemokine, both associated with Th1 response, together with lower level of CCR4<sup>+</sup> Th2 and CD25<sup>high</sup> T reg cell subsets. In this study, complementary investigations imply that in FDRs, the risk of progression to T1D might be strongly influenced by enhanced activity of Th1 and diminished activity of Th2 and T reg autoimmune response. In addition, we demonstrated that the onset of T1D is characterized by the decreases in CXCR3<sup>+</sup>

Th1 and CCR4<sup>+</sup> Th2 memory T subsets and TGFβ levels, and increases in IP-10 and TARC, presumably reflecting possible recruitment of those cells in pancreatic tissue and functionally exhaustion of T reg subpopulation. Simultaneously, the results have shown that hr FDRs had lower FPIR levels without impairments in insulin sensitivity levels, while patients with recent-onset T1D had decreases in both, insulin secretion and insulin sensitivity levels. Moreover, the results imply that initial changes in the course of type 1 diabetes comprise pro-inflammatory response associated with early decline of insulin secretion which does not affect insulin sensitivity, while later in the course of the disease insulin sensitivity impairments appear to be primarily due to the marked decrease in insulin secretion.

Key words: type 1 diabetes, first degree relatives, chemokine receptors, chemokines, Th1, Th2, Treg, insulin secretion, insulin sensitivity

SCIENTIFIC FIELD: MEDICINE

MAJOR IN: INTERNAL MEDICINE, ENDOCRINOLOGY



# SADRŽAJ

<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
1.1. Patogeneza T1D.....	2
1.2. Imunološki markeri rizika za ispoljavanje T1D u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	3
1.3. Karakteristike celularne autoimunosti u T1D.....	9
1.3.1. Efektorna faza autoimune destrukcije .....	10
1.3.2. Uloga hemokinskih receptora u fenotipskom definisanju Th1 i Th2 subpopulacija....	11
1.3.3. Uloga hemokina u patogenezi T1D.....	14
1.3.4. Th1 / Th2 paradigma u T1D.....	15
1.3.5. Uloga regulatornih T ćelija u T1D .....	18
1.3.5.1. Uloga CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatornih T ćelija u patogenezi T1D .....	19
1.4. Oštećenje funkcije beta ćelija u patogenezi T1D .....	23
1.5. Promene nivoa insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D .....	23
<b>2. Cilj.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Plan istraživanja i metode .....</b>	<b>29</b>
3.1. Plan istraživanja.....	29
3.1.1. Utvrđivanje demografskih i kliničkih karakteristika prvih rođaka pacijenata sa T1D. 29	
3.1.2. Utvrđivanje kliničkih osobina ispoljavanja oboljenja u pacijenata sa novootkrivenim T1D (NT1D) u toku prve godine bolesti .....	29
3.1.3. Analiza subpopulacija CD4 <sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi u PR pacijenata sa T1D, pacijenata sa NT1D u IZS i KR i kontrolnih ispitanika .....	29
3.1.4. Analiza nivoa hemokina/citokina u perifernoj krvi u PR pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i kontrolnih ispitanika.....	30
3.1.5. Analiza prisustva autoantitela na antigene beta ćelija u perifernoj krvi u PR pacijenata sa T1D, u pacijenata sa N-T1D u IZS, i u kontrolnih ispitanika.....	31
3.1.6. Utvrđivanje kapaciteta insulinske sekrecije u PR pacijenata obolelih od T1D, u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR, i u kontrolnih ispitanika.....	31
3.1.7. Utvrđivanje nivoa insulinske senzitivnosti u PR pacijenata obolelih od T1D, u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i u kontrolnih ispitanika.....	31
3.2. Metode.....	31
3.2.1. Izbor ispitanika .....	31
3.2.2. Metoda imunofluorescencije .....	32

3.2.3. Metoda protočne citofluorometrije.....	34
3.2.4. Određivanje antitela na GAD i IA2-2A .....	34
3.2.5. Analiza niva hemokina/citokina u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i kontrolnih ispitanika.....	35
3.2.6. Utvrđivanje stanja glukozne tolerancije u prvih rođaka pacijenata obolelih od T1D i kontrolnih ispitanika.....	35
3.2.7. Određivanje nivoa prve faze insulinske sekrecije metodom intravenskog testa tolerancije glukoze .....	35
3.2.8. Utvrđivanje nivoa insulinske senzitivnosti metodom hiperinsulinemijskog euglikemijskog klampa.....	36
3.2.9. Određivanje nivoa glikemije .....	37
3.2.10. Određivanje nivoa insulinemije.....	37
3.2.11. Određivanje indeksa telesne mase (ITM).....	38
3.2.12. Određivanje telesnog sastava .....	38
3.2.13. Terapija ispitivanih pacijenata.....	38
3.2.14. Statistika .....	38
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>39</b>
4.1. Analiza promena nivoa Th1, Th2 i T regulatornih subpopulacija u perifernoj krvi prvih rođaka pacijenata sa T1D .....	39
4.1.1. Detekcija CD4 <sup>+</sup> T memorijskih limfocita metodom protočne citometrije .....	53
4.1.2. Analiza promene nivoa CXCR3 <sup>+</sup> T memorijskih limfocita kao pokazatelja Th1 imunskog odgovora u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	57
4.1.3. Analiza intenziteta fluorescence CXCR3 hemokinskih receptora na memorijskim T limfocitima, kao pokazatelja Th1 imunskog odgovora, u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D .....	62
4.1.4. Definisavanje nivoa CXCR3 <sup>+</sup> T memorijskih limfocita koji razdvaja prve rođake pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike .....	64
4.1.5. Analiza promene nivoa CCR4 <sup>+</sup> T memorijskih limfocita kao pokazatelja Th2 imunskog odgovora u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	65
4.1.6. Analiza intenziteta fluorescence CCR4 hemokinskih receptora na memorijskim T limfocitima kao pokazatelja Th2 imunskog odgovora u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D .....	68
4.1.7. Definisavanje nivoa CCR4 <sup>+</sup> T memorijskih limfocita koji razdvaja prve rođake pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike .....	70

4.1.8. Analiza promene nivoa CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita kao pokazatelja nivoa T regulatorne subpopulacije u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	71
4.1.9. Analiza odnosa intenziteta fluorescence CD25 markera na CD4 <sup>+</sup> T limfocitima kao pokazatelja nivoa T regulatorne subpopulacije u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	74
4.1.10. Definisavanje nivoa CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita koji razdvaja prve rođake pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike.....	77
4.2. Analiza promene nivoa i odnosa Th1, Th2 i T regulatornih tipova hemokina/citokina u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	78
4.2.1. Analiza promene nivoa IP-10, Th1 tipa hemokina, u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	78
4.2.2. Analiza promene nivoa TARC, Th2 tipa hemokina, u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	81
4.2.3. Analiza nivoa TGFβ, antiinflamatornog citokina, kao pokazatelja funkcionalnosti subpopulacije T regulatornih limfocita, u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	84
4.2.4. Istraživanje povezanosti nivoa IP-10, TARC i TGFβ i nivoa CXCR3 <sup>+</sup> , CCR4 <sup>+</sup> memorijskih i CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	86
4.3. Istraživanje povezanosti promena nivoa subpopulacija CXCR3 <sup>+</sup> , CCR4 <sup>+</sup> memorijskih i CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T reg imunskog odgovora, i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	87
4.3.1. Istraživanje povezanosti promena nivoa CXCR3 <sup>+</sup> i CCR4 <sup>+</sup> T memorijskih limfocita, kao pokazatelja Th1 i Th2 imunskog odgovora i nivoa antitela na beta ćelijske antigene u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	87
4.3.2. Istraživanje povezanosti promena nivoa CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja T regulatornog imunskog odgovora, i nivoa antitela na beta ćelijske antigene u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	87
4.4. Istraživanje povezanosti nivoa IP-10, TARC i TGFβ i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 u perifernoj krvi prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	89
4.5. Istraživanje povezanosti promena nivoa CXCR3 <sup>+</sup> , CCR4 <sup>+</sup> memorijskih i CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T regulatornog imunskog odgovora u perifernoj krvi, sa promenama u nivou insulinske sekrecije u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	90
4.5.1. Analiza nivoa prve faze insulinske sekrecije u prvih rođaka pacijenata sa T1D.....	90

4.5.2. Analiza povezanosti promena nivoa CXCR3 <sup>+</sup> , CCR4 <sup>+</sup> memorijskih i CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T regulatornog imunskog odgovora u perifernoj krvi, sa promenama u nivou insulinske sekrecije u prvih rođaka pacijenata sa T1D .....	93
4.6. Istraživanje povezanosti promena nivoa CXCR3 <sup>+</sup> , CCR4 <sup>+</sup> memorijskih i CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T regulatornog imunskog odgovora u perifernoj krvi, sa promenama nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D .....	94
4.6.1. Analiza nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D .....	95
4.6.2. Analiza povezanosti promena nivoa CXCR3 <sup>+</sup> , CCR4 <sup>+</sup> memorijskih i CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th, Th2 i T regulatornog imunskog odgovora u perifernoj krvi, sa promenama nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D ..	96
4.7. Binarna logistička regresiona analiza u prvih rođaka sa visokim i niskim rizikom za ispoljavanje T1D .....	98
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>99</b>
<b>6. Zaključci .....</b>	<b>131</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>137</b>
<b>Skraćenice.....</b>	<b>171</b>
<b>Biografija .....</b>	<b>172</b>
<b>Prilozi .....</b>	<b>173</b>

## 1. UVOD

Tip 1 dijabetesa (T1D) je oboljenje u čijoj patogenezi osnovnu ulogu ima T ćelijski posredovana autoimuna destrukcija pankreasnih beta ćelija (1). Pokazano je da u inicijalnoj fazi autoimunog procesa koji je u osnovi T1D glavnu ulogu ima aktivacija autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> T ćelija, čime uz gubitak tolerancije na sopstvene antigene, započinje proces destrukcije beta ćelija (1). Takođe, poznato je da je populacija CD4<sup>+</sup> T limfocita heterogena i da postoje subsetovi CD4<sup>+</sup>T ćelija sa različitim funkcionalnim i imunoregulatornim svojstvima (2).

U tom smislu, pokazano je da subpopulacije CD4<sup>+</sup>T limfocita imaju ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji autoimunskog procesa ali i u ostvarivanju aktivne tolerancije na sopstvene antigene i ravnoteže u imunskom sistemu. Nedavno je utvrđeno da bi klasična paradigma u patogenezi T1D, o proinflamatornoj ulozi T helperskih 1 (Th1) subpopulacija limfocita i antiinflamatornoj ulozi T helperskih 2 (Th2) subpopulacija, mogla biti dopunjena učešćem supresorskih T regulatornih (Treg) subpopulacija limfocita, a njihove interakcije tokom razvoja T1D još uvek nisu dovoljno ispitane. Ipak, iako u patogenezi T1D dominantnu ulogu imaju defekti u celularnom imunskom sistemu, određivanje parametara humoralnog imunskog sistema i dalje ostaje osnova za predikciju T1D. Naime, za sada se smatra da je samo detekcija autoantitela na različite antigene beta ćelija pouzdan marker rizika za ispoljavanje T1D. Imajući u vidu da defekti u broju i funkciji subsetova CD4<sup>+</sup>T ćelija igraju važnu ulogu u patogenezi T1D, pretpostavlja se da bi upravo oni mogli predstavljati markere rizika za ispoljavanje oboljenja. Istovremeno, poznato je da su prvi rođaci pacijenata sa T1D do sada načešće ispitivani biološki model predijabetesa, sa 10-20 puta većim rizikom za ispoljavanje ovog oboljenja u poređenju sa opštom populacijom. Međutim, povezanost poremećaja subpopulacija CD4<sup>+</sup>T ćelija i rizika za nastanak T1D u prvih rođaka pacijenata sa T1D, u potpunosti još uvek nije razjašnjena.

### 1.1. Patogeneza T1D

Poznato je da je u osnovi patogeneze T1D T ćelijski posredovana autoimuna destrukcija pankreasnih beta ćelija, odnosno selektivni gubitak  $\beta$ -ćelija koje sekretuju insulin u genetski predisponiranih osoba (1). Prema postojećem modelu patogeneze T1D inicijalna faza je početna destrukcija  $\beta$ -ćelija, koja zatim pokreće kaskadu autoimunih procesa, od prezentacije autoantigena autoreaktivnim T helperskim limfocitima preko produkcije citokina kao medijatora imunog odgovora, sve do kompletne destrukcije beta ćelija. U tom smislu, proces destrukcije beta ćelija prolazi kroz dve faze, prvu koja nije posredovana T limfocitima i drugu u kojoj dolazi do aktivacije celularnog imunog odgovora, koji je odgovoran za posledičnu amplifikaciju imunog odgovora (2). Dodatno, histopatološko obeležje T1D postaje insulitis, odnosno selektivna infiltracija  $\beta$ -ćelija pankreasa mononuklearnim ćelijama i to makrofazima i dominantno  $CD8^+$  T limfocitima, uz manje prisustvo  $CD4^+$  T limfocita i suprotno očekivanjima ne baš obilno prisustvo T reg limfocita (2,3) Tačna  $\beta$  ćelijska masa preostala pri dijagnozi T1D nije dovoljno jasno definisana i kreće se između 1-20% normalne mase (4,5,6).

Pokazano je da je hronični destruktivni proces povezan sa promenama u celularnom i humoralnom imunom odgovoru koje se mogu detektovati u perifernoj krvi mesecima ili čak godinama pre kliničke pojave T1D (4,7).

Najzad, hiperglikemija koja nastaje u vreme ispoljavanja bolesti, je posledica oštećene, a ubrzo i potpuno uništene sposobnosti insulinske sekrecije u čijoj je osnovi autoimuna destrukcija beta ćelija nastala interakcijom prisustva genetske predispozicije i abnormalnog imunog odgovora na beta ćelije nakon izlaganja faktorima sredine koji još uvek u potpunosti nisu definisani (3,4,5).

Najvažniji geni koji doprinose ispoljavanju oboljenja su locirani na hromozomu 6, ali je bar još 40 gena dovedeno u vezu sa ispoljavanjem T1D (8,9). Pokazano je da pacijenti sa T1D imaju dominantno zastupljen HLA-DR3 i DR4 haplotip (10-13), a da je prisustvo HLA-DQB1\*0302 haplotipa udruženo sa visokim rizikom za brzu progresiju u insulinsku zavisnost (14). Nasuprot tome, ustanovljeno je postojanje protektivnog haplotipa HLA-DQB1\*0602 i HLA-DQA1\*0102 (10,12,15) zastupljenog u pacijenata sa T1D sa relativno niskim rizikom za brzu progresiju u insulinsku zavisnost u daljem toku bolesti. Najzad, novije studije u pacijenata sa T1D ukazale su na polimorfizam gena za hemokinski receptor CCR2, koji je uključen u kretanje leukocita u inflamatornom žarištu (16).

Ipak, manje od 10% osoba sa genetski potvrđenim rizikom za ispoljavanje T1D progredira u klinički oblik oboljenja, odnosno apsolutni rizik za decu sa rizičnim genotipom iz opšte populacije je sličan riziku koji imaju prvi rođaci pacijenata sa T1D (1 u 20)(4,17). Istovremeno, incidenca T1D u monozigotnih blizanaca značajno varira i iznosi 30-50%. Ovi podaci impliciraju postojanje dodatnih faktora koji otpočinju i upravljaju  $\beta$ -ćelijskom destrukcijom u genetski predisponiranih osoba (18,19).

Sa druge strane, pokazano je da su najvažniji faktori sredine koji potenciraju razvoj T1D upotreba kravljeg mleka i žitarica u toku prve godine života, postojanje insulina u mleku, deficit D vitamina ili omega-3 masnih kiselina u ranom detinjstvu i odsustvo ishrane majčnim mlekom. Međutim, značaj ovih nalaza još uvek nije dovoljno ispitan (4,20-23).

U celini, smatra se da se osobe sa rizikom za ispoljavanje T1D mogu identifikovati korišćenjem kombinacije imunoloških, genetskih i metaboličkih markera.

### *1.2. Imunološki markeri rizika za ispoljavanje T1D u prvih rođaka pacijenata sa T1D*

Smatra se da braća i sestre pacijenata sa T1D imaju relativni rizik za ispoljavanje T1D najmanje 10 puta veći u poređenju sa opštom populacijom (sa apsolutnim rizikom u rasponu od 6 do 10% (24,25). Istovremeno, rezultati studija su pokazali da rođaci imaju 10-20 puta veći rizik za ispoljavanje T1D u poređenju sa opštom populacijom (26-28).

I pored saznanja da je T1D bolest posredovana poremećajima u celularnom imunitetu, detekcija parametara humoralnog imuniteta, koji predstavljaju samo periferni odraz aktiviranog autoimunskog odgovora, ostaje za sada jedini relevantni imunološki marker u predikciji T1D. Postoje 4 vrste autoantitela koja se mogu detektovati u cirkulaciji pre ispoljavanja T1D: antitela na antigene pankreasnih ostrvca (islet cell antigen antibodies-ICA), antitela na glutamat dekarboksilazu (glutamic acid decarboxylase antibodies-GAD), antitela na tirozin fosfatazu (tyrosine phosphatase insulinoma antigen-2 antibodies -IA-2) i antiinsulinska antitela (insulin antibodies IAA), a u novijem periodu pažnja se usmerava na antitela na cink transporter 8 (Zn8) (3,4).

U tom smislu, u poslednjoj deceniji je učinjen značajan napredak u razumevanju patogeneze T1D dijabetesa i rasvetljavanju heterogenog intenziteta autoimunosti, pre svega analizom efekta T ćelija na tok bolesti. Izazov koji ostaje odnosi se na definisanje mera za supresiju autoreaktivnih T ćelija i otkrivanje faktora koji doprinose gubitku tolerancije na beta ćelijske antigene, jer je postalo očigledno da T ćelije imaju dva lica, i dok su određene T ćelije patogene, druge mogu regulisati tok bolesti, što omogućava postavljanje novih ciljeva za

imunointervenciju. Ipak, imunoterapije zasnovane na T ćelijama su već u upotrebi, ali su se pokazale ograničeno uspešnim u prezervaciji beta ćelija. Zahtev koji se nameće jeste definisanje terapije koja bi trebalo da deluje selektivnije na autoreaktivne T ćelije i sa manje neželjenih efekata.

Rezultati nekoliko studija su ukazali na mnogobrojne abnormalnosti u sastavu leukocita u pacijenata sa T1D, uključujući CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelije, CD45R-subpopulacije, NK T ćelije, dendritične ćelije i (29-39). Uzrok postojanja ovih razlika i njihova povezanost sa patogeneom T1D ostaje nedovoljno razjašnjena, ali mogući razlog uočenih razlika mogao bi biti defekt u imunoregulaciji. Pokazano je da je imuni odgovor prirodno regulisan različitim mehanizmima usmerenim prvenstveno ka kontroli hiperreaktivnosti i prevenciji procesa autodestrukcije, iz čega je proistekao i aktuelni stav da je svaki poremećaj ili disregulacija T ćelijske autoreaktivnosti koja dovodi do razvoja T1D povezana u prvom redu sa poremećajem supresivnog imunog odgovora.

Na osnovu svega navedenog, nameće se zaključak da T ćelijska autoreaktivnost ne predstavlja specifičan nalaz u autoimunim oboljenjima. Samim tim, naponi da se odredi T ćelijska autoreaktivnost vezana za određeno oboljenje poput T1D, su bili ometani u najvećoj meri prekomernim očekivanjima vezanim za senzitivnost i specifičnost tehnologija za njihovu detekciju i njihove reproducibilnosti kao markera merenja aktivnosti bolesti.

Imajući sve navedene činjenice u vidu, organizovana je internacionalna radionica o T ćelijskoj autoreaktivnosti u organizaciji internacionalnog Društva za imunologiju dijabetesa (Immunology of Diabetes Society-IDS) u cilju standardizacije imunoeseja i mogućnosti poređenja rezultata dobijenih u različitim studijama (40-43). Naime, do sada je izvršena standardizacija eseja za detekciju autoantitela vezanih za dijabetes (44). Međutim, ova iskustva nisu se mogla lako preneti na standardizaciju T ćelijskih eseja, zbog mnogobrojnih i jedinstvenih ograničenja (45), pre svega nemogućnosti sprovođenja eksperimenata u *in vivo* uslovima u ljudi, iz etičkih i praktičnih razloga, a zatim i nemogućnosti pristupanja ciljnom organu što značajno ograničava *in vitro* studije u naporima za definisanje surogat markera insulitisa. Pored ovoga, nivo autoreaktivnih T ćelija u cirkulaciji je mnogo manji nego u inflamatornim lezijama, za razliku od prisustva antitela u uslovima aktiviranog autoimunog odgovora. Nažalost, *in vitro* manipulacije takođe mogu biti povezane sa greškama nastalim u toku procedura: izolacije, koncentracije antigena, porekla seruma u kulturi medijuma, i za razliku od molekula autoantitela, T ćelije se ne mogu zamrzavati bez uticaja na njihov funkcionalni kapacitet. Istovremeno, određivanje broja T ćelija pre i posle stimulacije antigenom u mnogo slučajeva nije matematički moguće, jer su ćelije responderi prisutne u



veoma maloj koncentraciji u perifernoj krvi (tj. manje od 1 na 100000 ćelija u okviru totalne populacije ćelija periferne krvi). I na kraju, stepen čistoće autoantigena neophodnog za detekciju autoreaktivnih T ćelija je od odlučujućeg značaja za precizno određivanje cirkulišućih autoreaktivnih T ćelija (41, 42, 46).

U celini, teškoće vezane za determinisanje autoreaktivnih T limfocita pre svega su vezane za kvalitet preparata antigena i definisanje relevantnih imunogenih sintetisanih epitopa na peptidima autoantigena na pankreasnim ostrvcima. Takođe, potreba za adekvatno odabranom grupom kontrolnih ispitanika u cilju poređenja sa pacijentima obolelim od T1D je u značajnoj meri potcenjena. Imajući u vidu doprinos polimorfizma HLA gena u selekciji repertoara T ćelijskog receptora (TCR), indukciji tolerancije i prezentaciji antigena, uz činjenicu da incidenca autoimunih oboljenja opada sa starosnom dobi, veoma je važna selekcija odgovarajuće HLA i starosno usaglašene kontrolne grupe radi determinisanja T ćelijskog odgovora vezanog za određenu bolest. Uzimajući u obzir mogućnost da klinički početak T1D može biti povezan sa generalizovanim hiperimunim odgovorom (47), značajno je razmotriti uključivanje kontrolnih ispitanika koji imaju znake hronične inflamacije koja nije vezana za ispoljavanje T1D (48).

Postoji potreba za razvojem reproducibilnih eseja koji će koristiti smrznute ćelije, kao i za dobijanjem pankreasnog tkiva ili limfnih čvorova od osoba sa predijabetesom ili NT1D, radi karakterizacije antigen specifičnog T ćelijskog odgovora (47).

Uzimajući u obzir opisane teškoće u studijama vezanim za određivanje autoreaktivnih T limfocita, ipak je do sada ostvaren značajan napredak naročito u poslednjoj deceniji u rasvetljavanju patogeneze T1D, u smislu definisanja egzogenih faktora sredine koji započinju proces autoimune destrukcije beta ćelija, targeta za imunoterapiju, kao i realne procene kliničke efikasnosti imunoterapije.

Značajni podaci o ulozi celularne imunosti u patogenezi T1D dobijeni su ispitivanjem različitih imunomodulatornih procedura ili agenasa na pojavu i tok dijabetesa u eksperimentalnim modelima.

Imunoterapija usmerena protiv T ćelija se pokazala korisnom za prezervaciju beta ćelija (49-51). Smatra se da će dalje razumevanje uloge autoreaktivnih T ćelija, kao i osvetljavanje regulatornog procesa i identifikacija regulatornih ("supresivnih") T ćelija uključenih u imunološku kontrolu T ćelijske autoimunosti, omogućiti detekciju specifičnijih targeta za selektivnu imunoterapiju.

Iako do sada nije moguće detektovati autoimuni odgovor koji neposredno dovodi do razaranja beta ćelija nastanku T1D, pokazalo se da detekcija autoantitela predstavlja pouzdan

marker rizika za ispoljavanje T1D, mada ova autoantitela ne učestvuju direktno u patogenezi bolesti.

Poznato je da je u okviru velike preventivne studije Diabetes Prevention Trial-1 (DPT-1) insulin dat kao profilaksa prvim rođacima sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, sa ciljem da se potencira njegova imunološka komponenta, uz već prisutan metabolički efekat. Međutim, u okviru ove studije nije pokazano postojanje imunoloških dokaza za opravdanost ovakvog pristupa prevenciji T1D (52-56). Ipak, u određenoj meri su detektovane promene u autoimunom T ćelijskom odgovoru na insulin nakon započinjanja insulinske terapije po postavljanju dijagnoze T1D, koje sugerišu supresiju T ćelijske reaktivnosti ili indukciju tolerancije na insulin, ukazujući na potencijalni pozitivni imunološki efekat insulinske terapije (57). Na žalost, do sada ima malo podataka iz kliničkih studija koji bi ukazali na adekvatnu dozu insulina neophodnu radi generisanja ovog imunološkog efekta. Ovo može biti objašnjenje zašto profilaksa insulinom nije pokazala kliničku efikasnost do sada.

Imajući u vidu dosadašnja istraživanja, mogući razlozi za neuspeh u prevenciji T1D oralnim insulinom su veoma različiti počev od odabira prvih rođaka, jer je moguće da je kod pojedinaca autoimuni proces već ubrzan, a doza oralnog insulina nedovoljna da stimuliše imuni sistem. Međutim, ova tvrđenja je veoma teško dokazati jer do danas ne postoje priznati biomarkeri za progresiju T1D. U pojedinim animalnim modelima, prevencija oralnim insulinom je uspela, kod drugih nije. Moguće je da homologu insulina, korišćen u DPT studiji, nije uspeo da stimuliše protektivan imuni odgovor. Takođe, vreme započinjanja intervencije je veoma važno, jer je moguće da je, kada se registruju imunološki markeri koji identifikuju rođake sa povišenim rizikom za ispoljavanje T1D, destruktivni imuni odgovor možda već postao ireverzibilan (26).

Rezultati studije koja je ispitivala efikasnost aglikoziliranog humanizovanog anti-CD3 monoklonskog antitela u pacijenata sa N-T1D, pokazali su da kratkotrajna intravenska primena ovog medikamenta ima značajan uticaj na očuvanje rezidualnog kapaciteta endogene insulinske sekrecije, naročito u pacijenata koji su u vreme ispoljavanja T1D imali veći stepen očuvanosti sekretorne sposobnosti beta ćelija (58-60). Istovremeno, u toku je uključivanje prvih i drugih rođaka sa rizikom za ispoljavanje T1D, sa detektovanim autoantitelima i poremećajem glikozne tolerancije, u fazu II kliničkog ispitivanja, u kojoj se ispituje anti CD3 antitelo, teplizumab u prevenciji T1D (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01030861), a rezultati se očekuju početkom 2016. godine.

Pokazano je da prvi rođaci nedijabetičari pacijenata obolelih od T1D imaju često sličan imunološki odgovor kao i pacijenti oboleli od T1D u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, koji

nisu u srodstvu sa obolelima (61). Ipak, brojne studije prevencije T1D, nisu postigle cilj, kako studije primarne prevencije, pre registrovanja parametara beta ćelijske autoimunosti u osoba sa visokim genetski rizikom za ispoljavanje T1D (dijetarne manipulacije, uključujući formule za ishranu odojčadi bez kravljeg mleka ili govedeg insulina, obogaćena omega 3 masnim kiselinama, odloženo uvođenje hrane bogate glutenom ili suplementacija vitamina D), tako i studije sekundarne prevencije u osoba u koji je registrovano prisustvo autoantitela na beta ćelijske antigene (nikotinamid, insulin subkutano, oralno, nazalno, GAD i ciklosporin, kao i teplizumab i abatacept) (62-86).

Smatra se da je najsenzitivnije i najspecifičnije oruđe za predikciju T1D među rođaci detekcija autoantitela na biohemijski karakterisane autoantigene ostrvaca (87,88). Pozitivnost za 2 antitela je povezana sa kumulativnim rizikom za ispoljavanje T1D >80% tokom sledećih 15 godina (89) a pozitivnost za 3 antitela i sa većim stepenom progresije (90). Sa druge strane, poznato je da svi rođaci sa detektovanim antitelima ne progrediraju u manifestni T1D okviru vremenskog perioda određenog za praćenje, a saznanje o prisustvu antitela ima značajan psihološki efekat na osobu i na porodicu (91) i može imati za posledicu promene u ponašanju u pokušaju da se prevenira ili odloži progresija u kliničko oboljenje (92). Važno pitanje je i cena utvrđivanja rizika i praćenja osoba sa rizikom za ispoljavanje T1D.

Rezultati studija pokazuju da je u braće i sestara obolelih od T1D, procenjeni rizik od ispoljavanja T1D do 20. godine života bio 4.4%, a značajno viši kod braće i sestara čiji je rođak oboleo od T1D pre 7 godine života (93-95). Takođe, procenjeni rizik je kod roditelja bio 2.6% do 40. godine života i to kod očeva praktično dva puta veći nego kod majki (18). Istovremeno, samo 15% pacijenata sa T1D imaju obolele prve rođake. Kod prvih rođaka pacijenata sa T1D postoji rizik od oko ~5% za razvoj T1D. Deca čiji su očevi oboleli od T1D imaju veći rizik za razvoj T1D u poređenju sa decom čije su majke obolele (7 vs. 2%) (87).

Rizik kod braće i sestara je 10–20% viši, odnosno 3–6% do 20. godine (27,94) i 10% do 60. godine života (96). Pokazano je da je rizik veći kod braće i sestara pacijenata koji su od T1D oboleli do 5. godine života (kumulativni rizik do 20. godine 11.7% u poređenju sa 3.6% za starost 5–9. godina i 2.3% za kategoriju 10–14. godina) (94); isto važi i za roditelje. Lorenzen i saradnici su pokazali da se čak 50% drugih slučajeva oboljevanja u porodici javlja u okviru 10 godina nakon registrovanog prvog slučaja, a multivarijantna analiza je pokazala da je tip srodstva i starosna dob obolelog od T1D najznačajniji prediktor za oboljevanje od T1D u rođaka (96).

Istovremeno, smatra se da je pojava fenomena tranzitornosti antitela, koji se javlja kao posledica ukrštene reaktivnosti antitela koja su nastala na faktore sredine a koja reaguju slučajno i na pojedinačne epitope GAD, insulina ili ICA512, povezana sa starijim životnim dobom, muškim polom, pojedinačnom pozitivnošću za određeno antitelo, protektivnim *HLA* klase II haplotipom i odsustvom rizičnog *HLA DQ* haplotipa (97,98,99). Nijedno od dece sa tranzitornim antitelima nije ispoljilo dijabetes. Tranzitorna antitela se registruju u manje od 1 na 50 rođaka ili članova opšte populacije. Pojava perzistentnih antitela, pogotovu multipnih, povećava verovatnoću za progresiju u T1D.

U pokušaju predikcije ispoljavanja T1D sprovedene su skrining studije detekcije osoba sa povećanim rizikom za ovu bolest. U okviru ovih studija pokazan je prediktivni značaj određivanja ICA, GAD, IA2 i IAA. U tom smislu, pokazano je da kumulativni rizik za ispoljavanje T1D u toku 10 godina praćenja u opštoj populaciji iznosi u ICA<sup>+</sup> osoba 8%, u GAD<sup>+</sup> 10%, u IA2<sup>+</sup> 11% i u IAA<sup>+</sup> 5%.

Upravo je nastavak istraživanja u istom smeru u zdravih prvih rođaka pacijenata sa T1D ukazao na sličnu prediktivni vrednost određivanja svakog od markera pojedinačno (ICA<sup>+</sup>12%, GAD<sup>+</sup>12%, IA-2<sup>+</sup> 13% i IAA<sup>+</sup> 6%) ali je i potvrđena neosporna korist određivanja sva 4, ili bar više od 2 markera. U ovim studijama je pokazano da je pozitivnost sva 4 markera ukazivala na kumulativni rizik pojave bolesti od 88%, što već ima i veliki klinički značaj. Kasnija proučavanja su ukazala da postoje optimalne kombinacije određivanja pojedinih markera prema uzrastu i to za decu do 10 godina IAA+GAD+ IA-2, za uzrast od 10-20 godina GAD+IA-2+ICA, a za starije od 20 godina GAD+ICA (100).

Preporuke internacionalnog Društva za imunologiju dijabetesa imaju isti pristup u pogledu markera u populacionom skriningu i sugerišu primarno testiranje u srodnika u vidu detekcije GAD+IA-2 ili GAD+IAA (senzitivnost >85%, specifičnost >98%) a IAA za decu mlađu od 10 godina. Pozitivnost 2 ili više autoantitela definiše visok rizik za T1D pa je potrebno stalno dalje praćenje po mogućstvu sva 4 autoantitela (100).

Pokazano je da je ukupan broj antitela značajniji za predikciju od specifične kombinacije pozitivnih antitela na ostrvca (98). Na primer, dodavanje bilo kojeg pozitivnog antitela na pozitivnost na ICA u Bart's-Windsor, Bart's-Oxford prospektivnoj porodičnoj studiji podiglo je 15-godišnji rizik za ispoljavanje T1D od 47 na 66% (101). U Barbara Davis Center, prvi rođaci bez antitela su imali 5-godišnji rizik za ispoljavanje T1D samo 0.2% (45,102). Kada su testirani za GADA i IA-2A i/ili IAAs, rizik za T1D je bio 15% sa jednim antitelom, 44% sa 2 antitela i 100% sa 3 antitela. U Milan family studiji 6-godišnji rizik je bio

26% za ICA<sup>+</sup>, oko 18.2% za GAD<sup>+</sup> i IA-2A<sup>+</sup> i samo 5.6% za IAA<sup>+</sup> (103). U University of Florida studiji od 15,224 zdravih rođaka pacijenata sa T1D, prisustvo ICA je bio najsenzitivniji marker za 5-godišnju predikciju T1D (104). ICAs nosi rizik od 74%, GAD 60%, IA-2A 54% i IAA 50% (105).

U Munich-Germany family studiji (106) GAD<sup>+</sup> rođaci su imali 56% rizik za ispoljavanje T1D, dok je 24% bio rizik kod GAD<sup>-</sup> rođaka, IA-2A<sup>+</sup> rođaci su imali 64%, a samo 13% je bio rizik u IA-2<sup>-</sup> rođaka, tokom 5 godina praćenja.

Međutim, i pored brojnih ispitivanja koja su preduzeta u cilju definisanja imunološkog celularnog markera rizika za razvoj T1D u prvih rođaka pacijenata sa T1D, a u kojima su opisani poremećaji u nivou različitih limfocitnih subsetova, do sada ovaj problem nije razjašnjen (37,107,108,109). Naše istraživanje smo usmerili na prve rođake pacijenata obolelih od T1D, za koje je prethodno pokazano da se karakterišu 10-20 puta većim rizikom za oboljevanje od T1D u odnosu na opštu populaciju (110). Značajna prednost studija u kojima učestvuju prvi rođaci pacijenata obolelih od T1D zasniva se na odsustvu efekta hronične hiperglikemije i insulinske terapije na imuni sistem (111).

### 1.3. Karakteristike celularne autoimunosti u T1D

Smatra se da je destrukcija  $\beta$ -ćelija posredovana celularnim imunim odgovorom. Ovakvo shvatanje imalo je osnova u sledećim činjenicama (i) T ćelije su prisutne u insulitisu (ii) progresija oboljenja je odložena imunosupresivnim lekovima usmerenim na T ćelije (iii) cirkulišući autoreaktivni T limfociti su identifikovani u pacijenata sa kliničkom prezentacijom T1D (2). Pitanje koje ostaje i dalje nerazjašnjeno jeste inicijalna aktivacija potencijalno autoreaktivnih T ćelija. Aktivacija T ćelija zahteva prezentaciju autoantigenih determinanti autoreaktivnim T ćelijama u kontekstu produkata II klase MHC. Ipak, MHC II molekuli ne moraju biti ekspimirani normalno na  $\beta$ -ćelijama u *in vivo* uslovima. Pokazano je da u *in vitro* uslovima ekspresija MHC II molekula može biti indukovana na površini  $\beta$ -ćelija kombinovanim efektom IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , čineći mogućim i aktivaciju naivnih autoreaktivnih T ćelija lokalno u ostrvcima (112). Alternativno, ali verovatnije, autoantigeni se prezentuju naivnim autoreaktivnim T ćelijama preko antigen prezentujućih ćelija (APC) koje primarno ekspimiraju molekule MHC II klase. Prepostavljeno je da se inicijalni susret APC i naivne autoreaktivne T ćelije odvija u pankreasnim limfnim čvorovima. Aktivirane T ćelije su sposobne za invaziju ostrvaca gde postaju reaktivirane susretom sa  $\beta$ -ćelijskim antigenima i započinju insulitis. Nedavno završena studija je pokazala sve do sada poznate epitope za koje se

pokazalo da mogu biti T ćelijski targeti (113). Do sada je definisano 155 CD4 T-ćelijskih epitopa humanih  $\beta$ -ćelijskih antigena, dok lista za CD8 T-ćelijske epitope sadrži 22 motiva.

Mathis i saradnici su predložili 2 vrste mehanizama koji su odgovorni za smrt  $\beta$ -ćelije (114). U okviru prvog mehanizma, citotoksične T ćelije prepoznaju autoantigene prezentovane od strane I klase MHC molekula na površini  $\beta$ -ćelija, što zahteva direktan T ćelijski/ $\beta$ -ćelijski kontakt. U drugom mehanizmu posredovanom aktivacijom, T ćelije (ili CD4 ili CD8) prepoznaju  $\beta$ -ćelijske antigene prezentovane u kontekstu molekula II klase MHC na APĆ, pošto molekuli II klase MHC nisu eksprimirani *in vivo* na  $\beta$ -ćelijama. Aktivacioni model ima za rezultat direktno ubijanje nedužnih "bystander"  $\beta$ -ćelija preko citokina i solubilnih medijatora smrti produkovanih od strane T ćelija i aktivacijom citocodijalnih funkcija makrofaga. U celini,  $\beta$ -ćelijska smrt bi se odvijala mehanizmom apoptoze u okviru prvog modela, dok bi solubilni medijatori i slobodni radikali destruirali  $\beta$ -ćelije u drugom modelu.

Nedavno je pokazano da zapravo postoji dovoljan broj T ćelija u perifernoj krvi, koje bi reagovale sa autoantigenima (115). Ipak, ostaje otvoreno pitanje da li T ćelijski odgovor koji se viđa u perifernoj krvi reflektuje odgovor u ostvrcima ili pankreasnom limfnom čvoru. Serija dokaza sugerije da sve osobe koje su seropozitivne ne ispolje T1D, što znači da se jednom započet proces može i zaustaviti. U tom smislu,  $\beta$ -ćelijska autoimunost je veoma dinamičan proces. Razvoj multipnih antitela ( $\geq 2$ ) se dešava najčešće u prozoru od 6–12 meseci nakon pojave prvog antitela (116). Ovakva opservacija sugerije da bi svaka intervencija sa modulacijom autoimunog odgovor imala uspeha samo ako bi otpočela odmah nakon pojave prvih znakova  $\beta$ -ćelijske autoimunosti, što implicira vremenski period od samo godinu dana za imune intervencije.

### 1.3.1. Efektorna faza autoimune destrukcije

Poznato je da se Th1 i Th2 efektorne ćelije razvijaju iz tkzv. naivnih, antigen-neiskusnih CD4<sup>+</sup> T ćelija, a nakon kontakta sa antigenom kroz interakcije prepoznavanja sa dendritičnim APĆ i pod uticajem specifičnih solubilnih medijatora (117,118). Ipak, smatra se da striktna dihotomija klonova Th1/Th2, opisana na animalnim modelima, ne postoji u potpunosti u ljudi. U tom smislu, preciznije definisanje ovih subsetova zasnovano je na stavu da određeni subsetovi eksprimiraju pojedine površinske molekule i sekretuju određen profil citokina ili hemokina (119,120). Prethodne studije su pokazale da postoje različiti površinski molekuli koji se eksprimiraju na humanim Th1 ili Th2 ćelijama. Th1-asocirani molekuli su CD26 (121), membranski IFN- $\gamma$  (122), i limfocitni aktivirajući gen (LAG)-3 (123), dok se CD62L (124) i

CD30 (125) prvenstveno eksprimiraju na Th2 ćelijama. Istovremeno, svaki Th ćelijski subset se karakteriše produkcijom određenih citokina, Th1 ćelije sintetišu IFN- $\gamma$  i predominantno podržavaju razvoj celularnog imunskog odgovora, dok Th2 ćelije proizvode IL-4, IL-5, i IL-13, i potenciraju razvoj humoralnog imuniteta.

*In vivo* polarizacija T ćelijskih subsetova se najverovatnije odigrava u sekundarnim limfoidnim organima nakon izlaganja antigenu, a kada naivne CD4<sup>+</sup> T ćelije kontaktiraju antigen i pretvore se u memorijske ili efektorske prekursorske ćelije, migriraju iz sekundarnih limfoidnih organa u ciljna tkiva.

Nakon aktivacije, T limfociti stiču različite efektorske funkcije zavisno od njihovog citokinskog profila (126,127). Prisustvo IL-12 ili IL-4 tokom inicijalne T-ćelijske aktivacije utiče da pravac diferencijacije bude usmeren ka razvoju Th1 ili Th2 ćelija (128-130). Istovremeno, uz sticanje efektornih funkcija, Th1 i Th2 ćelije stiču i različiti migratorni kapacitet (131).

### 1.3.2. Uloga hemokinskih receptora u fenotipskom definisanju Th1 i Th2 subpopulacija

Poznato je da su hemokini i njihovi receptori ključni medijatori regrutacije i usmeravanja leukocita u mesta inflamacije, odnosno da su različite migratorne karakteristike Th1 i Th2 ćelija vezane za ekspresiju različitih hemokinskih receptora (132-134).

Nedavno završene studije rađene u *in vitro* uslovima, pokazale su da se hemokinski receptori različito eksprimiraju na Th1 i Th2 efektornim ćelijama, i to veoma rano u procesu njihovog nastanka, što za posledicu ima različitu distribuciju ovih ćelija u specifična tkivna okruženja (132-134).

Pokazano je da se korišćenjem odgovarajućih monoklonskih antitela mogu definisati hemokinski receptori eksprimirani na frakciji cirkulišućih CD4<sup>+</sup> T ćelija sa CD45RO<sup>+</sup> memorijskim fenotipom. U tom smislu, smatra se da Th1 ćelije predominantno eksprimiraju hemokinski receptor CXCR3, čiji su ligandi hemokini interferon- $\gamma$  inducibilni hemokin 10 (interferon- $\gamma$  inducible chemokine - IP-10) i monokin indukovan gama interferonom (MIG) i hemokinski receptor CCR5, čiji su ligandi hemokini makrofagni inflamatorni protein-1a (MIP-1a), makrofagni inflamatorni protein-1b (MIP-1b), i hemokin eksprimiran i sekretovan od T ćelija, regulisan pri aktivaciji (regulated on activation, normal T expressed and secreted - RANTES (119, 135-139).

Sa druge strane, Th2 ćelije eksprimiraju hemokinski receptor CCR4 koji vezuje timusom i aktivacijom regulisani hemokin (thymus and activation-regulated chemokine

(TARC)) i hemokin sekretovan iz makrofaga (Human Macrophage-derived Chemokine (MDC)) (123, 132-135, 137, 139, 140,141), zatim hemokinski receptor CCR3 (receptor za eotaxin, RANTES, monocitni hemoatraktantni protein-3 (monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3)) i monocitni hemoatraktantni protein-4 (monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)) (140), kao i hemokinski receptor CCR8 (receptor za humani hemokin I-309) (142).

Ovakva zapažanja su potvrđena i odgovarajućim funkcionalnim ispitivanjima T limfocita. Naime, u studiji rađenoj u *in vitro* uslovima, CXCR3 se eksprimira u visokom nivou na skoro  $\frac{3}{4}$  memorijskih T ćelija (139). Istovremeno, CXCR3 se eksprimira na visokom nivou na svim ćelijama Th1 ćelijske linije, dok se na Th2 linijama eksprimira u niskom nivou i sa veoma heterogenom šemom. Smatra se da se CXCR3 se eksprimira na čak 72% Th1 ćelija i samo 10% Th2 ćelija, odnosno da je ekspresija CXCR3 receptora skoro 7 puta veća na Th1 ćelijama (136). Takođe, utvrđeno je da niske koncentracije IP-10, agoniste CXCR3, stimulišu porast intracelularnog kalcijuma u Th1 linijama, a taj efekat nije registrovan u Th2 linijama. Sa druge strane, Th2 linije odgovaraju samo na desetostruko veće koncentracije IP-10, i to sa veoma malim porastom intracelularnog kalcijuma (139).

Nasuprot tome, TARC, selektivni agonista za CCR4 receptor (143), efikasno indukuje porast kalcijuma u Th2, ali ne i u Th1 ćelijskim linijama, što ukazuje da se ovaj receptor selektivno eksprimira na Th2 ćelijama. Istovremeno, CCR4 receptor je skoro 15 puta više ekspimiran na Th2 nego na Th1 ćelijskim linijama (136). Pokazano je i da se mRNA za CCR4 receptor eksprimira u Th2 linijama u visokom nivou, dok je u Th1 linijama potpuno odsutna. Nadalje, CCR4 receptor je ushodno regulisan sa citokinom TGF- $\beta$ , koji pripada grupi Th2/Treg citokina a nishodno regulisan sa IFN- $\alpha$ , Th1 citokinom.

Dodatno, nakon stimulacije CXCR3 receptora sa IP-10 i MIG, paraleleno sa ekspresijom liganda za E- i P-selectine (144), potencira se migracija Th1 i Th0 ćelija ka inflamatornim žarištima u kojima dominira produkcija IFN- $\gamma$  (145). U tom smislu, Th1 ćelije odgovaraju na 1/10 doze IP-10 u poređenju sa Th2 ćelijama. (133,136,139).

Istovremeno, u *in vivo* uslovima je pokazano da su ćelije sposobne za produkciju Th2 citokina, IL-4, IL-5, i IL-13, detektovane CCR4-ekspimirajućoj populaciji u okviru memorijskih CD4<sup>+</sup> T ćelija, dok su IFN- $\gamma$  produkujuće ćelije registrovane samo u CXCR3-ekspimirajućim memorijskim CD4<sup>+</sup> T ćelijama (117). Rezultati studije su pokazali da CXCR3 i CCR4, ali ne i CCR5 ili CCR3, služe kao korisni markeri u identifikaciji cirkulišućih Th1 i Th2 efektornih subpopulacija (117,146,147).

Naime, Qin i saradnici (137) su pokazali da se na cirkulišućim CD4<sup>+</sup> T ćelijama često detektuju i CCR5 i CXCR3 receptori, ali je učestalost CXCR3 značajno veća. U tom smislu,



dok se CXCR3 eksprimira kao stabilan marker na memorijskim Th1s i Th0s, prisutvo CCR5 receptora više reflektuje stanje aktiviranosti ćelija. Istovremeno, pokazano je da Th2 ćelije predominantno ekspimiraju CCR4 i značajno ređe CCR3 receptor (119, 136,140), koji snažno ekspimiraju bazofili (140, 148).

Poznato je da se CXCR3 receptor eksprimira ne samo na aktiviranim T ćelijama, već i na B i NK ćelijama (119,136-138). *In vivo*, pokazano je da se CXCR3 eksprimira na limfocitima sinovijalne membrane i u sinovijalnoj tečnosti pacijenata sa reumatoidnim artritismom (136-138), inflamiranoj vaginalnoj mukozi, crevima pacijenata sa ulcerativnim kolitisom (137), a da nije prisutan na glatkomišićnim, endotelijalnim ćelijama i fibroblastima. Visoka CXCR3 ekspresija je nedavno povezana sa nekoliko autoimunih oboljenja uključujući Gravesovu bolest (149) i multiplu sklerozu (150), u kojima ushodna regulacija CXCR3 korelira sa pojavom relapsa (151).

U skladu sa značajnom ulogom koju ima ekspresija CXCR3 u infiltraciji pankreasnih ostrvaca, pokazano je na animalnim modelima da je kod CXCR3 knockout miša u virusom indukovanom modelu dijabetesa, utvrđeno postojanje insulitisa značajno slabijeg intenziteta (152). Analiza infiltrata pankreasa pokazala je i da je ekspresija CXCR3 redukovana u prisustvu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija. Takođe, blokada IP-10, liganda CXCR3 receptora je dovoljna da uspori razvoj virusom indukovnog dijabetesa, što sugerise ključnu ulogu ovog puta u inflamaciji i destruktivnom insulitisu (153). Uzimajući navedene rezultate u obzir, sugerisano je da potenciranje efekta Tregs uz blokadu CXCR3 receptora, može činiti strategiju za inhibiciju regrutacije T ćelija u inflamatorno ognjište (154).

Istovremeno, pokazano je i da CXCR3 knockout limfociti ne mogu infiltrisati ostrvca pankreasa, što je u osnovi inhibicije ispoljavanja virusom indukovnog dijabetesa, i što ukazuje na ključnu ulogu CXCR3 u destruktivnom insulitisu (155).

Sa druge strane, CCR4 se eksprimira na velikoj subpopulaciji (20–30%) CD4<sup>+</sup> limfocita, na manjoj subpopulaciji (3–5%) CD8<sup>+</sup> limfocita kao i na maloj subpopulaciji timocita. Istovremeno, B limfociti, bazifili, eozinofili, neutrofil i NK ćelije ne ekspimiraju CCR4 receptor (156).

Pokazano je da je Th1 ćelije teško promeniti laboratorijskim intervencijama, te da one održavaju svoj IFN- $\gamma$  sekretujućí fenotip i nakon manipulacije sa Th2 citokinima. Za razliku od njih, humane Th2 ćelije su izgleda manje stabilne i mogu se dodatnim laboratorijskim intervencijama prevesti u IFN $\gamma$ - sekretujućí tip (135).

Uz efektorsku funkciju, aktivirani T limfociti stiču različite migratorne kapacitete, što je ključ za efikasnu regulaciju imunog odgovora (157). Regulacija migracije leukocita je proces

koji uključuje adhezione molekule poput selektina i integrina (158,159), kao i hemokine i njihove receptore (160). Kombinovana akcija adhezionih molekula i hemokina omogućava formiranje koda po kojem se ostvaruje migracija leukocita u različita područja (161,162).

### *1.3.3. Uloga hemokina u patogenezi T1D*

Poznato je nivo hemokina i citokina u cirkulaciji marker celularnog imuniteta. U tom smislu, nivo cirkulišućih hemokina može dati vredne informacije o riziku za ispoljavanje odnosno progresiji bolesti, iako ovi markeri nisu antigen specifični a za veliki broj njih još uvek nije poznat celularni izvor. Do sada je opisana povezanost prisustva i titra antitela na beta ćelijske antigene i nivoa markera urođene imunosti interleukina 18, faktora inhibicije makrofaga (macrophage inhibition factor-MIF) i monocitnog hemoatraktantnog proteina (monocyte chemoattractant protein 1)(163).

Poznato je da su hemokini klasa citokina sa hemoatraktantnim svojstvima (164). Naime, ćelije sa odgovarajućim hemokinskim receptorom (limfociti, eozinofili, fibroblasti, monociti, neutrofilni, NK ćelije, ili druge efektorne ćelije) migriraju ka izvoru hemokinske produkcije. Hemokini se proizvode od strane širokog spektra ćelija u odgovoru na infekciju (tj. bakterijske ili virusne produkte) ili agense koji uzrokuju fizičku štetu tkivima. Međutim, oni nisu samo prosti medijatori regrutacije ćelija, procesa koji zahteva prisustvo citokina da bi indukovali ekspresiju endotelijalnih adhezionih molekula i vazoaktivne medijatore koji će promovisati leukocitne interakcije sa vaskularnim endotelijumom. Hemokini igraju ulogu i u angiogenezi, razvoju limfocita i borbi protiv infekcija. Do danas je registrovano više od 50 hemokina (165).

Prva saopštenja o ulozi hemokina u T1D su bila vezana za istraživanja na animalnim modelima, a prve povezanosti su se bazirale na rezultatim dobijenim genetskim istraživanjima, imajući u vidu da je na animalnom modelu utvrđena povezanost ispoljavanja T1D i gena na centralnom regionu hromozoma, za određene familije hemokina (166).

Do danas su publikovani rezultati studija o hemokinima u T1D u humanoju populaciji, ali su one limitirane činjenicom da se njihova aktivnost analizirala u perifernoju krvi.

Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) ili mali inducibilni citokin B 10 (small-inducible cytokine B10) ili C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) sekretuje se od strane monocita, endotelijalnih ćelija i fibroblasta kao odgovor na stimulaciju sa [IFN- \$\gamma\$](#)  (167). CXCL10/IP-10, ima većinom hemotaktičnu aktivnost za aktivisane Th1 ćelije, Tc1 ćelije i NK ćelije koje ekspimiraju CXCR3, i uključen je u patogenezu različitim dominantno Th1-autoimunih oboljenja (168) poput eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE)

(169) i reumatoidnog artritisa (170). U animalnim modelima, pankreasne  $\beta$  ćelije proizvode CXCL10 tokom insulinitisa, a inhibicija CXCL10/CXCR3 interakcije suprimira razvoj autoimunog dijabetesa (167).

Sa druge strane, timus i aktivacijom regulisani hemokin (thymus and activation regulated chemokine (TARC)) ili chemokine (C-C motif) ligand 17 (CCL17) je citokin koji pripada CC familiji hemokina i konstitutivno se eksprimira u timusu, a tranzitorno na antigen stimulisanim perifernim mononuklearima. On učestvuje u hemotaksi T ćelija vezujući se za hemokinski receptor CCR4 (164).

Međutim, detaljnija analiza ova dva hemokina u cirkulaciji osoba sa rizikom za ispoljavanje T1D do sada nije rađena.

#### *1.3.4. Th1 / Th2 paradigma u T1D*

Poznato je da je diferencijacija efektornih T ćelija započinje nakon signala dobijenog sa TCR, kostimulatornih molekula i citokinskih receptora. Th1 i Th2 diferencijacija je inicirana aktivacijom T ćelija u prisustvu IFN- $\gamma$  ili IL-4. Ovi integrisani signali zatim indukuju ekspresiju linijski specifičnih transkripcionih faktora i usmeravaju Th ćelijsku diferencijaciju. Međusobna inhibicija citokina posredovana je linijski specifičnim transkripcionim mehanizmima. Nakon vezivanja za receptor, IL-12 aktivira provodnika signala transkripcionog faktora i aktivatora transkripcije 4 (the transcription factor signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)), što rezultira ekspresijom T-bet (poznatim i kao Tbx-21), master regulatora Th1 diferencijacije. Th2 polarizacija je inicirana dejstvom IL-4 preko STAT6, koji ushodno reguliše ekspresiju GATA-vezujućeg proteina 3 (GATA3), master regulatora Th2 diferencijacije. Sa druge strane, Th1/Th2 paradigma je paradoksalna jer animalni model tretiran anti- IFN- $\gamma$ -antitelima, kao i IFN- $\gamma$ - ili IFNR-deficijentni model razvijaju eksperimentalni alergijski encefalomijelitis, klasičnu Th1 asociranu bolest (171).

U tom smislu, rezultati nedavno završenih studije su pokazali sa klasičan model Th1/Th2 CD4<sup>+</sup>T ćelijski efektorni model zahteva reinterpretaciju, i da sem ove 2 subpopulacije postoje i T regulatorni subset kao i Th17 (171). Sada je poznato da su IL-17-produkujuće T ćelije, ranije posmatrane u sklopu Th1 subseta, specifična T ćelijska populacija. Ove novootkrivene T ćelije, nazvane Th17 ćelije, imaju definisani citokinski profil, svoj sopstveni set linijski specifičnih razvojnih gena i predstavljaju glavne pro-inflamatorne CD4<sup>+</sup> efektorne T ćelije u animalnim modelima mnogih autoimunih bolesti. Njihov master regulator je retinoid

orphan receptor (ROR)gt (RORC2 kod ljudi). IL-17 je marker molekul za Th17 ćelije, a Th17 citokin efektorni molekuli su IL-17 A/F, TNF- $\alpha$ , IL-6 i GM-CSF.

Smatra se da ispoljavanje T1D nastaje nakon prekida balansa u nivou T-ćelijskih subsetova. Th1 ćelije inhibiraju razvoj Th2 i Th17 subsetova, a Th2 ćelije inhibiraju razvoj Th1 subsetova. U tom smislu, svaka interferencija sa jednim putem diferencijacije najverovatnije menja balans drugog puta (172). Molekularni mehanizmi puteva razvoja T ćelijskih linija ukrštaju se na nivou linijski specifičnih transkripcionih faktora, poput T-Bet, GATA-3, FOXP3 i RORC2, za Th1, Th2, Treg, i Th17 (173). Pokazano je da su ove kompetitivne interakcije rezultat genetskog imprintinga ili remodelovanja hromatina koji diktiraju dostupnost hromatina subset-specifičnih gena u ćelijama progenitorima (174).

Definisanje T reg i Th17 subsetova omogućilo je sagledavanje druge ključne karakteristike T-ćelijske biologije, pored negativnih, kompetitivnih regulacionih procesa : svi putevi diferencijacije koriste pozitivne povratne sprege, koji mogu služiti kao autokrini i parakrini mehanizmi polarizacije T ćelijskih subsetova. Th1 ćelije proizvode IFN- $\gamma$ , koji direktno indukuje T-Bet u naivnim T ćelijama i indirektno stimuliše sekreciju IL-12 preko APC. IL-12 takođe indukuje T-Bet i jedan esencijalni citokin za razvoj Th1. Th2 proizvode IL-4, koji je poznat kao esencijalni faktor za autokrinu GATA-3-zavisnu diferencijaciju. Kombinacija TGF- $\beta$  i IL-6 uz transkripcione faktore STAT3 i RORgt je nedavno opisana kao esencijalna za inicijalnu diferencijaciju Th17 ćelija, a IL-23 za kasniju stabilizaciju Th17 ćelijskog subseta, dok IL-21, proizveden od strane samih Th17, igra značajnu ulogu u amplifikaciji Th17 ćelija. Nedavno završena studija pokazala je visok nivo IL-17 transkripata u okviru insulitisa u NOD miša, a utvrđeno je i da je povišen nivo IL-17 u serumu bio povezan sa ubrzanom progresijom T1D na animalnom modelu (175,176).

Pokazano je da u patogenezi T1D, u NOD miševa dominira Th1 subset, dok istovremeno, iako Th2 subset dominira u nedestruktivnom periinsulitisu u ovih miševa, interleukin 4 (IL-4) sekretujući Th ćelijski klonovi su sposobni da adoptivnim transferom prenesu insulitis ili dijabetes u nedijabetesnih imunoinkompetentnih NOD *scid* recipijenata i nisu u stanju da preveniraju pojavu bolesti (177).

U više studija rađenih u ljudi je pokazano da je N-T1D povezan sa predominacijom Th1 citokina i smanjenjem u produkciji Th2 tipa citokina, u najvećoj meri IL-4. Smatra se da Th1 citokini deluju dominantno na makrofage (MF) i CD8<sup>+</sup> T limfocite preko kojih pojačavaju infiltraciju pankreasnih ostrvaca, istovremeno inhibirajući produkciju solubilnih citokinskih antagonista, uključujući IL-1 receptorski antagonist, što dovodi do stimulacije produkcije IL-1 preko MF, a zatim i pojačane sekrecije Th1 tipa citokina.

Sa druge strane insulitis u pacijenata sa N-T1D je povezan sa naseljavanjem pankreasa Th2 ćelijama i predominacijom Th2 tipa citokina. Pokazano je da ekspresija Th2 citokina od strane ćelija pankreasnih ostrvaca ne može ublažiti proces autoimune destrukcije već naprotiv, je u osnovi stimulacije i ubrzanja ovog procesa oštećenja beta ćelija. Indukcija Th2 posredovanog humoralnog imunog odgovora prouzrokuje ubrzano širenje autoimunog odgovora na ne-beta ćelijske antigene, što zajedno sa delovanjem Th1 tipa citokina prouzrokuje egzacerbaciju procesa koji je u osnovi pojave T1D (178).

Na osnovu navedenog potvrđeno je i postojanje morfološke razlike u Th1 i Th2 insulitisu, odnosno Th1 insulitis je više fokalnog karaktera i sastoji se od dominantne CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T ćelijske infiltracije, pri čemu beta ćelija umire u procesu apoptoze. Th2 insulitis je rasprostranjeniji i sastoji se od pretežno Eo, MF, fibroblastne infiltracije uz prisustvo malog broja T limfocita, a beta ćelije pankreasnih ostrvaca umiru u procesu nekroze. Istovremeno, ustanovljena je i razlika u kinetici autoimunog odgovora. Th1 odgovor je brži, agresivniji i traje duži vremenski period, i dok je Th2 odgovor dominantno odgovoran za ranu fazu u nastanku T1D, Th1 odgovor je u najvećoj meri odgovoran za perzistentan i prolongirani atak procesa autoimune destrukcije beta ćelija.

U celini, postojanje Th1 ili Th2 tipa citokinskog profila predstavlja samo dve ekstremne opcije u poređenju sa velikim brojem drugih mogućih opcija od značaja za patogenezu T1D. Sa druge strane je ograničenje da se *in vitro* blokada jednog subseta limfocita preko monoklonskih antitela ne može izvoditi *in vivo*, a citokini kao što je IL-10 imaju pleotropne efekte, odnosno proizvode ih više od jedne vrste ćelija a deluju na više različitih ćelija.

Studije koje su radjene na animalnim modelima (NOD miševi i BB pacovi) podržale su koncept da je destruktivni beta ćelijski insulitis povezan sa ekspresijom proinflamatornih citokina (IL-1, TNF- $\alpha$ ) i to preovlađujuće Th1 tipa citokina (IFN $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-2, IL-12), dok je nedestruktivni insulitis povezan sa pojačanom ekspresijom Th-2 tipa citokina (IL-4 i IL-10) (178). Ipak, citotoksični T ćelijski klonovi obe i Th1 i Th2 ćelijske linije, mogu biti upotrebljeni za prenos dijabetesa u NOD miševa, sugerišući da promena ravnoteže Th1/Th2 ćelijskih subsetova, koja je u osnovi razvoja T1D kao autoimunog oboljenja, kao prethodna paradigma nije u potpunosti istinita. Istovremeno, pokazano je da oralno dat insulin i GAD mogu prevenirati pojavu dijabetesa stvaranjem Th2/Th3 ćelijskih subsetova koje karakteriše sekrecija transformišućeg faktora rasta  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ – TGF- $\beta$ ).

### 1.3.5. Uloga regulatornih T ćelija u T1D

Poznato je da je patogeneza T1D povezana sa gubitkom imunološke tolerancije na sopstvene antigene ali osnova ovog procesa koji dovodi do razvoja bolesti nije u potpunosti razjašnjena. Rezultati studija na animalnim modelima su pokazali da gubitak imunološke tolerancije na beta ćelijske antigene može biti posledica različitih faktora, uključujući genetske i faktore sredine (179). Smatra se da T ćelijska tolerancija nastaje u timusu a održava se brojnim mehanizmima na periferiji (180). Prema savremenoj interpretaciji hipoteze o klonalnoj selekciji, multipni klonovi imunokompetentnih T ćelija imaju jedinstvene antigen-specifične receptore i pre interakcije sa antigenima a selekcija se vrši na osnovu interakcija sa sopstvenim peptidima vezanim za MHC molekule u timusu. Većina timocita koji nose visoko afinitetne receptore za sopstvene antigene bivaju eliminisani centralno tokom diferencijacije u timusu procesom apoptoze koji se naziva negativna selekcija. Ipak, veliki broj autoreaktivnih T ćelija sa niskim i/ili intermedijarnim afinitetom za sopstvene antigene mogu izbeći negativnu selekciju u timusu i preći na periferiju, gde su sposobne za aktivaciju autoantigenom, proliferaciju i diferencijaciju u potencijalne patogene efektorne ćelije (181). Stoga, mehanizam koji kontroliše razvoj i funkciju ovih autoreaktivnih T ćelija automatski kontroliše inicijaciju i progresiju autoimunih bolesti.

U tom smislu, smatra se da autoimune bolesti nastaju kao posledica neuspeha u eliminaciji ili inaktivaciji visokoafinitetnih imunokompetentnih ćelija tokom njihovog razvoja i/ili neuspeha imunog sistema da kontroliše rast ili funkciju intermedijarnih autoreaktivnih klonova koji pobegnu na periferiju.

Ovi nalazi uticali su na formiranje preovlađujućeg shvatanja da i u T1D postoji poremećaj mehanizama centralne i periferne tolerancije (109). Naime, sa jedne strane je poznato da je klonalna delecija autoreaktivnih T ćelija u timusu jedan od mehanizama kojim se indukuje tolerancija na autoantigene. Sa druge strane, pokazano je da u timusu osoba koje imaju protektivne genske alele za nastanak dijabetesa, postoji snižena ekspresija insulina. Rezultati drugih studija sugerišu da u osoba koje su pod većim genetskim rizikom za razvoj dijabetesa postoji neefektivno vezivanje antigena za HLA-DQ ili -DR produkte koji potenciraju beta ćelijsku autoimunost, što omogućava autoreaktivnim T ćelijama da izbegnu eliminaciju u timusu i pređu u cirkulaciju. Takođe, pokazano je postojanje defekata u apoptozi aktiviranih T ćelija u animalnim modelima dijabetesa, kao i povezanost sa polimorfizmom CTLA-4 antigena, negativnog regulatora aktivacionih puteva u T limfocitima u pacijenata sa T1D (109), što bi zajedno moglo ukazati na postojanje defekata u perifernoj toleranciji.

Grupi "supresorskih" T ćelija pripadaju različiti subsetovi regulatornih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija kao i NK T ćelije, a njihova funkcija je usmerena na supresiju razvoja potencijalnih patogenih antigen-reaktivnih T ćelija. Supresorske T ćelije igraju značajnu kliničku ulogu u prevenciji i terapiji autoimunih bolesti a smatra se da su neophodne u kontroli autoimunosti i kontroli imunog odgovora na transplantate, alergene i infektivne patogene (182).

#### *1.3.5.1. Uloga CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u patogenezi T1D*

Prethodne studije su pokazale da je subset perifernih CD4<sup>+</sup> T ćelija koje koeksprimiraju  $\alpha$ -lanac receptora za IL-2 (CD25 antigen) neophodan za kontrolu autoreaktivnih T ćelija u in vivo uslovima (183). Naime, rezultati studije rađene na animalnom modelu miša timektomisanog u ranom životnom dobu, što je rezultiralo odsustvom populacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija, ukazali su da je nakon timektomije došlo do razvoja različitih autoimunih bolesti želuca, tireoidee i endokrinog pankreasa (183).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorne ćelije su prvo identifikovane kod animalnih modela (miš), a registrovana je komparabilna populacija T ćelija identičnog fenotipa i funkcionalnih karakteristika u pacova i čoveka (184,185). One reprezentuju 5–10% svih perifernih CD4<sup>+</sup> T ćelija. Analizom karakteristika ove subpopulacije u in vitro uslovima utvrđeno je da se izolovane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorne ćelije odlikuju smanjenom responsivnošću na alogene i poliklonalne aktivatore (186). Međutim, pokazano je da ova subpopulacija suprimira proliferaciju konvencionalnih CD25<sup>-</sup> T ćelija u kokulturi (187). Aktivirani inhibitorni kapacitet CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih T ćelija je antigen nespecifičan, što znači da je supresija nezavisna od specifičnosti antigena respodirajuće T ćelijske populacije (188). Ipak, u in vitro uslovima, inhibitorna aktivnost ove regulatorne subpopulacije je striktno zavisna od interćelijskog kontakta sa CD25<sup>-</sup> T ćelijama a nezavisna od solubilnih supresivnih citokina (184,188). Tačan mehanizam pomoću kojeg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorne ćelije ostvaruju svoj supresorski efekat ostaje nepoznat. Međutim, poznato je da je rezultat ove supresije inhibicija transkripcije IL-2 u populaciji ćelija respondera (188). Istovremeno, supresorski efekat i hiporesponsivno stanje CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih T ćelija može biti prevladano dodavanjem egzogenog IL-2 i IL-15 (184,188).

Rezultat ove supresije je inhibicija transkripcije IL-2 u populaciji ćelija respondera, blokada proliferacije i sekrecije proinflamatornih citokina i indukcija stanja anergije efektornih autoreaktivnih ćelija.

Poznato je da je CD25 antigen u svojoj osnovi  $\alpha$  lanac receptora za IL-2, koji na svojoj površini ekspimiraju ćelije nakon aktivacije antigenom, što implicira da bi u  $CD4^+CD25^+$  subpopulaciju mogle biti uključene i nedavno aktivirane efektorske  $CD4^+$  T ćelije. Ipak, pokazano je da se regulatorne T ćelije karakterišu stabilnom ekspresijom  $\alpha$  lanca receptora za IL-2 odnosno CD25 antigena a aktivirane efektorne ćelije na svojoj površini tranzitorno ekspimiraju CD25 antigen (189). Istovremeno, s obzirom da se u timusu razvijaju i konvencionalne  $CD4^+$  T ćelije i regulatorne  $CD4^+CD25^+$  T ćelije nametnula se dilema o mehanizmu koji je odgovoran za selekciju regulatornih i konvencionalnih T ćelija. Smatra se da je proces selekcije zavisen od stepena afiniteta T ćelijskog receptora (TCR): 1) nizak afinitet vodi u pozitivnu selekciju i nastanak konvencionalnih  $CD4^+$  T ćelija 2) intermedijarni afinitet vodi u pozitivnu selekciju i nastanak  $CD4^+CD25^+$  T regulatornih ćelija i 3) visok afinitet rezultira negativnom selekcijom i deplecijom takvih timocita nakon prepoznavanja sopstvenog peptida u kontekstu produkata MHC klase II (190).

U cilju precizne fenotipske identifikacije regulatorne subpopulacije sa supresorskim karakteristikama, analizirana je uloga i značaj većeg broja površinskih markera koji bi zajedno sa CD25 antigenom jasno fenotipski izdvojili regulatornu supresorsku subpopulaciju.

$CD4^+CD25^+$  regulatorne ćelije se karakterišu konstitutivnom ekspresijom nekoliko aktivacionih markera uključujući glukokortikoidima indukovani faktori nekroze tumora sličan protein (glucocorticoid-induced TNFR family-related protein - GITR), OX40 (CD134), L-selectin (CD62L) i CTLA-4 (CD152) (191). Značaj ovih molekula za funkcionisanje regulatornih ćelija za sada nije dovoljno jasan. Smatra se da membranski TGF- $\beta$  može učestvovati u inhibitornoj aktivnosti  $CD4^+CD25^+$  T regulatornih ćelija kod miša (192) a u jednoj studiji (193) pokazano je da je supresorski kapacitet humanih  $CD4^+CD25^+$  timocita blokiran kombinacijom antitela na CTLA-4 antigen i membranski TGF- $\beta$  u in vitro uslovima. Ipak, ovi rezultati se mogu teško reprodukovati (188) a upotreba anti-CTLA-4 monoklonskih antitela ili blokirajućih Fab fragmenata na CTLA-4 ili TGF- $\beta$ , nije pokazala efekat na supresornu aktivnost humanih  $CD4^+CD25^+$  T regulatornih ćelija u perifernoj krvi (194). Istovremeno, utvrđeno je da je membranski TGF- $\beta$  nishodno regulisan na humanim  $CD4^+CD25^+$  ćelijama nakon aktivacije (195). Najzad, poznato je da se  $CD4^+CD25^+$  regulatorne T ćelije sa punim supresorskim kapacitetom mogu izolovati iz TGF- $\beta$ -deficijentnog miša (196). Upravo zato potencijalna uloga TGF- $\beta$  i CTLA-4 u posredovanju interćelijskim supresorskim mehanizmima ostaje kontroverzna. Najveća zamerka navedenim studijama je činjenica da su oba, membranski TGF- $\beta$  i CTLA-4, ekspimirani na aktiviranim konvencionalnim  $CD4^+CD25^+$



T ćelijama. Stoga se sa sigurnošću ne bi moglo tvrditi da li su opisani efekti rezultat vezivanja blokirajućih antitela za CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatorne T ćelije ili konvencionalne CD4<sup>+</sup> T ćelije.

Značajno je naglasiti da ovi markeri ipak ne omogućavaju kategoričnu distinkciju između regulatornih i nedavno aktiviranih T ćelija. Upravo zato, definisani su i drugi markeri, kao FoxP3 kao glavnog transkripcionog faktora za razvoj i funkcionisanje CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih T ćelija, pa se u tom smislu prirodne Tregs karakterišu visokom ekspresijom CD25 i FoxP3 ali i niskom ekspresijom IL-7R (CD127) (197,198). Naime, do sada nije postignut konsenzus koji se tiče definisanja površinskih antigena karakterističnih za T reg: CD4<sup>+</sup> i CD25<sup>+</sup> ćelije su prethodno opisane kao indikatori Tregs, ipak, neke od studija ukazuju da samo ekspresija najviših nivoa CD25 ispoljava *in vitro* supresorsku aktivnost. Iako je FoxP3 konstitutivno eksprimira u Treg ćelijama, prisutan je i u aktiviranim T ćelijama, što smanjuje njegovu specifičnost kao markera za Treg (199). Nedavno završena istraživanja sugerisala su da je CD127 ( $\alpha$ -lanac za interleukin-7 receptor) nishodno regulisan na humanim T ćelijama nakon aktivacije. Niska ili negativna ekspresija površinska ekspresija ovog markera omogućava fleksibilnu alternativu FoxP3 markeru za identifikaciju i izolaciju T reg za funkcionalnu analizu, jer se CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> ćelije smatraju regulatornim T ćelijama (200,201).

Ipak, nedavno je utvrđeno da transkripcioni faktor FoxP3 igra glavnu ulogu u funkciji CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija (202). Na animalnom modelu je pokazano da odsustvo ovog faktora zbog mutacije FoxP3 gena uzrokuje razvoj fatalne limfoproliferativne bolesti i autoimunih poliendokrinopatija. Pokazano je da FoxP3 direktno učestvuje u razvoju i funkcionisanju regulatornih T ćelija (202). Za razliku od drugih markera koji su ekspimirani na aktiviranim T ćelijama, FoxP3 je ekspimiran i u ranim fazama razvoja regulatornih ćelija. Ipak, nedavno je pokazano da Foxp3 može biti ekspimiran i na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelijama nakon aktivacije. Naime, FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> ćelije čine periferni rezervoar diferentovanih regulatornih T ćelija koje se mogu regrutovati u CD25<sup>+</sup> pul nakon ekspanzije i/ili aktivacije (203). S obzirom da se Foxp3 eksprimira i na aktiviranim CD8<sup>+</sup> T ćelijama, postoje mišljenja da ekspresija ovog antigena korelira sa funkcionalnim svojstvom supresije ali ne i sa karakteristikom specifičnog linijskog markera (204).

FOXP3 se eksprimira na većini CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T ćelija u perifernoj krvi, dok je samo trećina CD4<sup>+</sup>CD25<sup>int</sup> populacije FOXP3<sup>+</sup>, što je u osnovi objašnjenja da je kod ljudi regulatorna aktivnost posredovana predominantno CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> pulom, pulom najjačih supresora (199). Rezultati studije su pokazali da je u ljudi, oko polovina CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> populacije FOXP3<sup>+</sup>. Sa druge strane, manje od 4% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelija eksprimira FOXP3 (205).

Inače, FOXP3 pripada forkhead familiji transkripcionih faktora i deluje prvenstveno kao represor. FOXP3 ima 3 funkcionalna domena: C2H2 zinc-finger motiv, leucine-zipper-like motiv i carboxy-terminal forkhead domen, koji se direktno ili preko formiranja represorskog kompleksa sa nuklearnim faktorom aktiviranih T ćelija (nuclear factor of activated T cells (NFAT)), može vezati za promotor gena za IL-2 i blokirati transkripciju mRNA za IL-2 (206). Istovremeno, FOXP3 može direktno vezati ARRE2 mesto u promotoru za interleukin-2 in a taj način inhibirati transkripcionu aktivaciju IL2 (207, 208). Takođe, najmanje jedan mehanizam vezan za FOXP3-posredovanu transkripcionalnu represiju uključuje direktan kontakt sa NFAT i njegovu posledičnu inhibiciju. Rezultati studija pokazali su na animalnom modelu da je broj gena regulisanih preko FOXP3 između 700 i 1100 (207, 209). Istovremeno, pokazano je da FOXP3 može funkcionisati i kao transkripcioni aktivator i kao transkripcioni represor. U skladu sa dvojnog ulogom FOXP3, nedavna istraživanja pokazala su da ekotopično eksprimirani FOXP3 može biti vezan za promotore CD25, CTLA4 i GITR gena, i da naj taj način remodeluje njihov hromatin i indukuje gensku transkripciju (207,208). Posledica ovih signalnih kaskada je rearanžiranje aktinskog citoskeleta, promene u transkripcijskom programu, čija priroda određuje stanje diferencijacije i proliferacije ćelije Međutim, T reg imaju drugačiji odgovor na kontakt sa TCR, odnosno ne proliferišu (205,207), niti produkuju citokine (188,195,207). Ipak, T Reg nisu kompletno neresponsivne na signale posredovane TCR-om, jer je upravo vezivane sa TCR neophodno za aktivaciju njihove sposobnosti da suprimiraju aktivaciju responderske T ćelije (207). U tom smislu, nameće se zaključak da TReg i efektorske T ćelije reaguju različito na isti biohemijski stimulus. Dodatno, pokazano je da u ljudi postoje 2 izoforme FOXP3, mada nije poznato da li jedna ćelija može eksprimirati obe forme i postoji li funkcionalna razlika između njih. Ipak, pretpostavlja se da može postojati razlika u funkcionalnosti različitih izoformi Foxp3, u smislu različitog proliferativnog odgovora na TCR stimulus ili količine IL-2 u zavisnosti od vrste izoforme u T reg (210).

Prethodne studije su pokazale da u okviru CD4<sup>+</sup> regulatornih ćelija postoji 2 subseta koji se razlikuju na osnovu načina na koji ostvaruju supresorske efekte (211). Urođene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorne ćelije ispoljavaju sopstveni supresorski efekat preko interćelijskog kontakta pomoću membranskog molekula čija priroda nije dovoljno poznata. Supresorski kapacitet drugog subseta, Th3 i tipa 1 T regulatornih ćelija Tr1, je nezavisan od interćelijskog kontakta i zasnovan je na efektima supresorskih citokina TGF-β odnosno IL-10. Smatra se da ove ćelije, za razliku od urođenih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih ćelija, predstavljaju druge oblike diferencijacije a ne posebnu ćelijsku liniju (202). Regulatorne Tr1 i Th3 ćelije nastaju iz naivnih ili neaktiviranih CD4<sup>+</sup> T ćelija na periferiji a postoji veliki broj dokaza u literaturi koji

sugerišu da tip i aktivacioni status dendritičnih ćelija kao profesionalnih APC kontrolišu diferencijaciju naivnih T ćelija u regulatorne T ćelije (203). Naime, indukcija maturacije dendritičnih ćelija inflamatornim stimulusima je ključni proces koji usmerava naivne T ćelije da se diferenciraju u efektorne T ćelije (Th1 ili Th2). Međutim, u stanju mirovanja, nezrele dendritične ćelije su prvenstveno tolerogene i favorizuju nastanak regulatornih T ćelija radi održavanja imunološke tolerancije (203).

Rezultati do sada urađenih studija koje su obuhvatale pacijente obolele od autoimunih bolesti poput multiple skleroze, reumatoidnog artritisa i autoimunog poliglandularnog sindroma tipa II, pokazali su postojanje poremećaja u broju i/ili funkcionalnom kapacitetu  $CD4^+CD25^+$  T ćelija (212). Uprkos pojačanom interesu za  $CD4^+CD25^+$  T ćelije i njihovu vezu sa patogenezom T1D, do sada je samo nekoliko studija urađeno u humanoj populaciji. Rezultati ovih studija su prilično različiti, od nalaza postojanja razlika u broju  $CD4^+CD25^+$  T ćelija u perifernoj krvi pacijenata sa N-T1D u poređenju sa zdravim ispitanicima, do potpunog odsustva ovakvog poremećaja.

#### *1.4. Oštećenje funkcije beta ćelija u patogenezi T1D*

Proces oštećenja beta ćelija je dugotrajan, a period u kome se odvija okarakterisan je postojanjem rezidualne sekrecije insulina koja je oštećena i zbog smanjenog kapaciteta samo je delimično sposobna da ostvari svoju ulogu u uspostavljanju normalnog metabolizma glukoze. Smatra se da je proces progresivne destrukcije beta ćelija moguće predvideti i pratiti i godinama pre ispoljavanja manifestne bolesti, kao i da je gubitak mase beta ćelija linearan i da se može izdvojiti u nekoliko faza u razvoju bolesti (213).

U prvoj fazi kod osoba sa genetskom predispozicijom da obole od T1D glikoregulacija je u potpunosti normalna, kao i odgovor beta ćelija na različite stimulacione testove. Mnoge od ovih osoba neće oboleti od T1D, ali će proces destrukcije beta ćelija biti započet ako dođe do delovanja nekih faktora sredine, tako da se u ovom periodu može verifikovati čitav niz imunoloških poremećaja, dok je glikoregulacija i dalje normalna, kao i oslobađanje insulina u testovima brze stimulacije. U tom periodu mogu se detektovati markeri autoimune destrukcije antitela ICA, GAD, IAA, IA-2, kao i izmenjen odnos  $CD4$  i  $CD8$  limfocita (213).

U trećoj fazi dolazi do postepenog smanjivanja mase beta ćelija sa gubitkom prve faze insulinske sekrecije. U ovom periodu glikemija je normalna pre i posle obroka, kao i u toku OGTT-a (214).

Četvrta faza je pojava klinički manifestnog dijabetesa koja se poklapa sa periodom kada masa preostalih beta ćelija ne iznosi više od 10-20 %. U ovom periodu još uvek postoji delimično očuvana rezidualna insulinska sekrecija, koja će progresivno opadati sve do potpune destrukcije beta ćelija, odnosno eliminacije antigena (215).

Takođe, izvestan broj pacijenata posle postavljanja dijagnoze T1D i primene insulinske terapije može da ima normalnu glikoregulaciju u jednom vremenskom periodu i bez primene insulina, odnosno ulazi u stanje kliničke remisije bolesti (215). Ovaj podatak ukazuje da u vreme postavljanja dijagnoze T1D još uvek postoji izvestan broj očuvanih, funkcionalno sposobnih beta ćelija. Na žalost neminovno se nastavlja opadanje mase beta ćelija zbog i dalje prisutnog autoimunog procesa, tako da krajem prve godine, najkasnije druge godine trajanja T1D više praktično i nema beta ćelija, odnosno dostupnih antigena, što potvrđuje i nalaz C peptida manjeg od 0.2 nmol/l. Ovo ukazuje na činjenicu da se metabolička dekompenzacija kao prva manifestacija dijabetesa (često veoma burna sa slikom ketoacidoze) javlja kada je insulinska sekrecija značajno redukovana, ali još uvek prisutna. Smatra se da u tom periodu ukupna masa beta ćelija iznosi oko 40% . U slučajevima da postavljanju dijagnoze bolesti ne prethodi infekcija ili neka stresogena situacija u kojoj su metaboličke potrebe povećane, nastaviće se progresivna i spora destrukcija beta ćelija, i bolest će se manifestovati kasnije. Kod ovih pacijenata sa N-T1D prisutne su neznatne vrednosti C peptida u vreme postavljanja dijagnoze, i veći procenat ovih pacijenata obično ne ulazi u kliničku remisiju bolesti, mada je pokazano da se na osnovu nivoa rezidualnog kapaciteta u vreme ispoljavanja bolesti ne može predvideti klinički tok bolesti (215) .

S obzirom na dugotrajnost procesa destrukcije beta ćelija endokrinog pankreasa koji se može pratiti i godinama pre ispoljavanja manifestne bolesti, smatra se da je moguće odložiti oštećenje beta ćelija zbog čega se i primenjuju intervencioni terapijski postupci (216).

#### *1.5. Promene nivoa insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D*

Poznato je da su pored imunoloških i genetskih markera rizika za ispoljavanje T1D analizirani i metabolički markeri. Naime, pokazano je da se T1D ranije manifestuje u osoba koje imaju dvojni defekt, leziju beta ćelije odnosno poremećaj insulinske sekrecije i smanjenu insulinsku senzitivnost odnosno insulinsku rezistenciju (217). U cilju evaluacije insulinske rezistencije i insulinske sekrecije korišćene su metode model homeostaze (homeostasis model

assessment HOMA-R) i prva faza insulinskog odgovora (first phase of insulin response-FPIR) tokom intravenskog testa stimulacije glukozom (IVGTT) (218,219).

Poznato je da je u osoba sa normalnom beta ćelijskom funkcijom moguće prilagoditi različite nivoe insulinske senzitivnosti adekvatnim nivoom insulinske sekrecije, u cilju održanja normoglikemije (220). Istovremeno, analiza regulatornih mehanizama koji upravljaju hepatickom produkcijom glukoze i insulinskom sekrecijom upućuje da povećana insulinska rezistencija ima za posledicu povećanje insulinske sekrecije. Takođe je poznato da je povećana incidenca T1D u pubertetu i nakon oboljenja koja su prethodila ispoljavanju T1D, posledica porasta relativne insulinske rezistencije tokom ovih perioda (221).

Danas je široko prihvaćeno mišljenje da faktori sredine indukuju destruktivni imuni odgovor koji za metu imaju insulin sekretujuće ćelije. Sa druge strane, postoji stav da je inicijalni poremećaj u insulinskoj sekreciji ili senzitivnosti genetski determinisan, i predisponiran za destruktivni autoimuni proces. U saglasnosti sa ovom hipotezom, T1D je povezan sa polimorfizmom promoter regiona gena za insulin a oba fenomena, smanjena insulinska sekrecija i smanjena insulinska senzitivnost mogu biti detektovana u predijabetesnom periodu (222). Istovremeno, promene u rastu i težini su povezani sa rizikom od progresije u dijabetes, kao što je pokazano u akcelerator hipotezi (223).

U osnovi akcelerator hipoteze je stav o ranijem ispoljavanju T1D u osoba sa većom telesnom težinom, bilo da je T1D ili T2D u pitanju. U tom smislu, insulinska rezistencija je funkcija mase masnog tkiva, a starosna dob je u korelaciji sa masom masnog tkiva. Poznato je da insulinska rezistencija sa jedne strane ushodno reguliše metabolizam  $\beta$  ćelija a sa druge strane ubrzava njihov gubitak u uslovima glukozne toksičnosti. Prema akcelerator hipotezi, osobe koje razvijaju T1D se karakterišu istim stepenom insulinske rezistencije i metaboličke ushodne regulacije, kao i istim ubrzanjem u gubitku  $\beta$  ćelija kao i osobe koje razvijaju T2D. Međutim, osobe koje ispoljavaju T1D su dodatno genetski predisopinirane za aktiviranje agresivnog imunog odgovora na metabolički ushodno regulisanu  $\beta$  ćeliju, a zavisno od genotipa, ova akceleracija može značajno ubrzati gubitak  $\beta$  ćelija. U tom smislu, osobe sa T1D dele sa osobama sa T2D bazični akcelerator a to je insulinska rezistencija. Akcelerator hipoteza iznosi pretpostavku da bi, ako bi osobe koje bi razvile T1D izgubile imunogenetski akcelerator, i dalje bi bile pod rizikom za razvoj T2D u kasnijem životnom dobu (223).

Sa druge strane, poznato je da su defekti u insulinskoj sekreciji u osnovi progresije T1D. Procenjeno je da prva faza insulinske sekrecije oštećena kada je ostalo 50%  $\beta$  ćelijske mase a kada je izgubljeno <50% ali >10% registruju se abnormalnosti u OGTT-u (povišena glikemija našte ili intolerancija na glukozu). Smatra se da tokom OGTT-a postoji 3 forme  $\beta$  ćelijske

stimulacije: autonomna stimulacija, povećanje nivoa glikemije u sistemskoj cirkulaciji i sekrecija inkretina iz creva. Nasuprot tome, u okviru IVGTT-a postoji samo jedan stimulus, pa je IVGTT mnogo senzitivniji test o  $\beta$  ćelijskoj funkciji (18).

U tom smislu, IVGTT je efikasan metod za određivanje stepena  $\beta$ -ćelijske disfunkcije, a redukovana prva faza insulinskog odgovora je visoko prediktivna za progresiju u T1D u ICA<sup>+</sup> prvih rođaka. Pokazano je da je kombinacija 2 pozitivna ICA rezultata sa 2 redukovana FPIR dobar prediktor za ispoljavanje T1D (90). Rezultati ove studije su pokazali da ispad u prvoj fazi insulinske sekrecije procenjuje 5-godišnji rizik za razvoj T1D na 50–65% a u Diabetes Prevention Trial–Type 1 studiji na oko 60%. Rezultati druge studije su pokazali da iako je utvrđeno postojanje značajnih razlika u vremenskom periodu do postavljanja dijagnoze manifestnog T1D u zavisnosti od stadijuma predijabetesa, ovaj vremenski period značajno varira i u okviru iste kategorije, npr. od 0.02 do 7.7 godina između osoba sa kasnim predijabetesom, što značajno otežava predikciju vremena do dijagnoze na individualnoj osnovi (99).

Podaci studija ukazuju da nivo glikemije počinje da raste bar 2 godine do 6 meseci pre postavljanja dijagnoze T1D, da bi u okviru tih 6 meseci bio registrovan značajniji porast nivoa glikemije. U tom smislu, osobe sa rizikom za ispoljavanje T1D imaju u proseku postepenu i prolongiranu metaboličku deterioraciju sa perzistentno prisutnom beta ćelijskom disfunkcijom najmanje 6 meseci pre dijagnoze, što ukazuje da bi u tih osoba intervencija i 6 meseci pre dijagnoze imala značaja (224).

Imajući u vidu dosadašnja istraživanja, smatra se da do sada nije detaljnije analiziran nivo insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D kao i u toku prve godine toka T1D .

## 2. CILJ

Tip 1 dijabetesa (T1D) je oboljenje u čijoj je osnovi T ćelijski posredovana autoimuna destrukcija pankreasnih beta ćelija (1). Pokazano je da je ovaj hronični destruktivni proces povezan sa promenama u celularnom i humoralnom imunom odgovoru, i gubitkom prve faze insulinske sekrecije, koje mesecima ili čak godinama mogu prethoditi kliničkoj pojavi T1D (3).

Istovremeno, poznato je da je rizik za oboljevanje od T1D 10-20 puta veći kod prvih rođaka pacijenata sa T1D u odnosu na opštu populaciju (110). Prethodne studije su pokazale da se u prvih rođaka pacijenata obolelih od T1D mogu detektovati markeri humoralne imunosti, izraženi prisustvom jednog ili više autoantitela u serumu ispitanika (najčešće kombinacija antitela na glutamat dekarboksilazu (GAD) i tirozin fosfatazu (IA-2)) (100), uz prisustvo metaboličkih markera, izraženih preko poremećaja insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti. Na osnovu ovih imunoloških i metaboličkih determinati je do sada procenjivan stepen rizika za razvoj T1D.

Poznato je da autoimuni proces destrukcije beta ćelija započinje aktivacijom autoreaktivnih  $CD4^+$  T ćelija (1). Pokazano je da je populacija  $CD4^+$  T limfocita (T helperskih ćelija-Th) izuzetno heterogena i da postoje subsetovi  $CD4^+$  T ćelija sa različitim funkcionalnim i imunoregulatornim svojstvima (2). Rezultati prethodnih studija su pokazali da se Th1 i Th2 ćelije mogu razlikovati i prema fenotipskim karakteristikama izraženim preko ekspresije određenih površinskih ćelijskih markera. U tom smislu, nedavno završena istraživanja ukazuju da se hemokinski receptor CXCR3 dominantno eksprimira na Th1 ćelijama, dok se CCR4 prvenstveno eksprimira na Th2 ćelijama (135-139). Istovremeno, ukazano je da, ne samo hemokinski receptori, nego i njihovi ligandi, hemokini/citokini, interferon  $\gamma$  inducibilni hemokin 10 (interferon- $\gamma$  inducible chemokine IP-10)(Th1 asocirani), kao i timusom i aktivacijom regulisani hemokin (thymus and activation-regulated chemokine TARC) (Th2 asocirani), učestvuju u patogenezi T1D (143,145). Međutim, opsežnija ispitivanja značaja promena parametara celularnog imuniteta, nivoa Th1/Th2 subpopulacija T limfocita i njihovih citokina, kao markera rizika za razvoj T1D u prvih rođaka pacijenata sa T1D do sada nisu detaljnije sprovedena, kao ni njihova moguća povezanost parametrima humoralnog imuniteta.

Takođe, pokazano je da i defekti u broju i funkciji regulatornih ćelija, koje direktnim interćelijskim kontaktom ili indirektno preko antiinflamatornih citokina mogu suprimirati aktivaciju destruktivnog Th1 ćelijskog odgovora, mogu imati značajnu ulogu u patogenezi

T1D. Poznato je da subpopulacija  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita predstavlja regulatorni T ćelijski subset (T reg), koji ostvaruje svoje efekte preko transformišućeg faktora rasta  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )) (Treg asocirani citokin)(202). Međutim, povezanost poremećaja subpopulacija regulatornih T ćelija i nastanka oboljenja u prvih rođaka pacijenata sa T1D, kao i međusobni odnos sa navedenim subpopulacijama  $CD4^+$  T limfocita, u potpunosti još uvek nije razjašnjena.

I najzad, pored imunoloških markera rizika za ispoljavanje T1D, poznati su i metabolički markeri rizika, u smislu poremećaja nivoa insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti (217), ali detaljnija analiza ovih parametara nije rađena u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim i niskim rizikom za ispoljavanje oboljenja.

**Cilj ove doktorske disertacije** je analiza nivoa Th1, Th2 i T reg subpopulacija i asociranih citokina u perifernoj krvi i njihova povezanost sa promenama u nivou antitela na beta ćelijske antigene (GAD i IA-2), kao i sa promenama u insulinskoj sekreciji i insulinskoj senzitivnosti, u prvih rođaka obolelih od tipa 1 dijabetesa.

Radi ostvarenja navedenog cilja u izradi ove disertacije su postavljeni sledeći zadaci:

1. analizirati promenu nivoa Th1, Th2 i T reg subpopulacija u perifernoj krvi u prvih rođaka obolelih od T1D
2. analizirati promenu nivoa Th1, Th2 i T reg citokina u perifernoj krvi u prvih rođaka obolelih od T1D
3. istražiti povezanost promena nivoa Th1, Th2 i T reg subpopulacija i nivoa antitela na beta ćelijske antigene (GAD i IA2) u perifernoj krvi u prvih rođaka obolelih od T1D
4. analizirati povezanost promena nivoa Th1 i Th2 i T reg subpopulacija u perifernoj krvi sa promenama u nivou insulinske sekrecije u prvih rođaka obolelih od T1D
5. istražiti povezanost promena nivoa nivoa Th1, Th2 i T reg subpopulacija u perifernoj krvi sa promenama nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka obolelih od T1D



### 3. PLAN ISTRAŽIVANJA I METODE

#### 3.1. PLAN ISTRAŽIVANJA

##### *3.1.1. Utvrđivanje demografskih i kliničkih karakteristika prvih rođaka pacijenata sa T1D*

U ispitivanih prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D utvrđivane su demografske karakteristike pomoću standardnog upitnika koji je obuhvatao sledeće podatke (a) stepen i vrsta srodstva sa pacijentom obolelim od T1D: rođeni brat, rođena sestra, brat ili sestra po jednom roditelju, majka ili otac; (b) prisustvo kravljeg mleka u ishrani tokom prve godine života; (c) ishrana dojenjem do 6. meseca života (d) supstituisanje vitaminom D u ishrani tokom prve godine života; (e) prisustvo drugih autoimunih oboljenja u porodici (tireoidne žlezde, želuca, tankog creva, kože i sistemskih bolesti); (f) telesna težina na rođenju. Istovremeno, urađene su i standardne laboratorijske analize (krvna slika, parametri zapaljinskog sindroma, nivo azotnih materija, hepatogram i jonogram), prisustvo drugih organ-specifičnih antitela u serumu (antimikrozomalna, antitireoglobulinska, antiparijentalna, antiglatkomišićna i antinuklearna antitela), kao i test oralne tolerancije glukoze.

##### *3.1.2. Utvrđivanje kliničkih osobina ispoljavanja oboljenja u pacijenata sa novootkrivenim T1D (NT1D) u toku prve godine bolesti*

U ispitivanih pacijenata u toku prve godine bolesti, utvrđivano je prisustvo jednog od dva moguća klinička stanja: (a) insulin-zavisnog stanja (IZS) i (b) kliničke remisije (KR), na osnovu potrebe primene terapije.

##### *3.1.3. Analiza subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi u PR pacijenata sa T1D, pacijenata sa NT1D u IZS i KR i kontrolnih ispitanika*

Analiza je urađena u uzorcima suspenzije izolovanih limfocita periferne krvi, primenom metode imunofluorescencije uz korišćenje obeleženih humanih monoklonskih antitela za specifično bojenje površinskih markera pojedinih subpopulacija. Specifična

imunofluorescencija u ispitivanim uzorcima biće detektovana metodom protočne citofluorometrije.

Detekcija CD4<sup>+</sup> limfocita obavljena je metodom dvobojne imunofluorescencije korišćenjem monoklonskih antitela anti-CD3 obeleženog FITC-om i anti-CD4 antitela obeleženog PE-om. Detekcija CD8<sup>+</sup> limfocita učinjena je metodom dvobojne imunofluorescencije korišćenjem monoklonskih antitela anti-CD3 obeleženog FITC-om i anti-CD-8 antitela obeleženog PE-om.

Detekcija CD45RO<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> limfocita obavljena je metodom četvorbojne imunofluorescencije korišćenjem monoklonskih antitela anti-CD45RO obeleženog APC-om i anti-CD4 antitela obeleženog PerCP-jem.

Detekcija CXCR3<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> obavljena je dodavanjem anti-CXCR3<sup>+</sup> antitela obeleženih FITC-om.

Detekcija CCR4<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> obavljena je dodavanjem anti-CCR4<sup>+</sup> antitela obeleženih PE.

Detekcija CD25<sup>+</sup> ćelija obavljena je metodom dvobojne imunofluorescencije u okviru CD4<sup>+</sup> limfocita obeleženih monoklonskim antitelom PE dodavanjem anti-CD25<sup>+</sup> antitela obeleženih FITC-om.

Analiza navedenih subpopulacija T limfocita urađena je u PR pacijenata obolelih od T1D, u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i u kontrolnih ispitanika.

U pacijenata u IZS testiranje je obavljeno u uslovima euglikemije ujutru našte (5.0–6.5 mmol/l) postignute primenom intenzivirane konvencionalne insulinske terapije.

#### *3.1.4. Analiza nivoa hemokina/citokina u perifernoj krvi u PR pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i kontrolnih ispitanika*

U svih ispitanika određivan je nivo 3 hemokina/citokina u perifernoj krvi : interferona  $\gamma$  inducibilni hemokin 10 (interferon- $\gamma$  inducible chemokine IP-10)(Th1 asocirani), timusom i aktivacijom regulisani hemokin (thymus-and activation-regulated chemokine TARC) (Th2 asocirani), i transformišući faktor rasta  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )) (Treg asocirani).

*3.1.5. Analiza prisustva autoantitela na antigene beta ćelija u perifernoj krvi u PR pacijenata sa T1D, u pacijenata sa N-T1D u IZS, i u kontrolnih ispitanika*

U svakog ispitanika utvrđeno je prisustvo sledećih autoantitela na antigene pankreasnih ostrvaca u perifernoj krvi: antitela na glutamat dekarboksilazu (GAD) i tirozin fosfatazu (IA2-2A).

*3.1.6. Utvrđivanje kapaciteta insulinske sekrecije u PR pacijenata obolelih od T1D, u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR, i u kontrolnih ispitanika*

U svakog ispitanika urađen je intravenski test tolerancije na glukozu.

*3.1.7. Utvrđivanje nivoa insulinske senzitivnosti u PR pacijenata obolelih od T1D, u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i u kontrolnih ispitanika*

U svakog ispitanika urađen je hiperinsulinemijski euglikemijski klamp.

## **3.2. METODE**

### *3.2.1. Izbor ispitanika*

U ovom radu ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 51 zdravih PR pacijenata obolelih od T1D, oba pola, negojaznih, odgovarajuće starosti, 24 pacijenata sa N-T1D u IZS, 10 pacijenata u KR bolesti i 18 zdravih kontrolnih ispitanika.

PR pacijenata obolelih od T1D su rođeni brat, rođena sestra, brat ili sestra po jednom roditelju, majka ili otac pacijenata, starosne dobi od 15 do 45 godina. Podelili smo ih u 2 podgrupe prema prisustvu/odsustvu autoantitela; 17 njih je klasifikovano kao PR sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR), koji su bili perzistentno pozitivni za prisustvo GAD i IA-2A antitela, dok je 34 klasifikovano kao PR sa niskim rizikom (nrPR) za ispoljavanje T1D, koji nisu imali ova autoantitela u perifernoj krvi.

U ispitanika uključenih u ispitivanje je isključeno postojanje drugih akutnih i hroničnih oboljenja koja bi mogla uticati na homeostazu glukoze. Ispitanici u kojih je ustanovljeno

postojanje infektivnih, alergijskih ili drugih autoimunih bolesti u periodu od 6 meseci pre uzimanja uzoraka za navedene analize, su isključeni iz ispitivanja. Takođe, isključeni su ispitanici koji su primali imunomodulatorne lekove u periodu od 3 meseca pre ispitivanja.

Uključeni su samo PR i kontrolni ispitanici bez poremećaja glikozne homeostaze, što je utvrđeno korišćenjem 2h oralnog testa glikozne tolerancije sa 75 g glukoze (OGTT) (225).

PR su bili testirani za prisustvo GAD i IA-2A antitela, 2 puta u toku jedne godine.

Uključujući kriterijumi za 18 kontrolnih ispitanika su bili nivo glikemije ispod 110 mg/dl (normalan nivo), negativna porodična anamneza za T1D, kao i odsustvo autoantitela specifičnih za T1D.

Postojanje dijabetesa je utvrđeno na osnovu dve uzastopno utvrđene vrednosti glikemija naše  $\geq 7.0$  mmol/l ili na osnovu vrednosti glikemije  $\geq 11,1$  mmol/l 2h posle unosa 75 g glukoze u toku sprovođenja oralnog testa tolerancije glikoze.

Postojanje T1D u pacijenata je definisano kao neophodnost primene insulinske terapije da bi se sprečila ketoza.

Novootkriveni T1D je definisan kao T1D dijagnostikovano pre najviše 3 meseca.

IZS u pacijenata sa novootkrivenim T1D je definisano kao neophodnost primene insulinske terapije da bi se postigla euglikemija (vrednosti glikemija preprandijano  $<6,5$  mmol/l, postprandijalno  $<10,0$  mmol/l) (226). Svi pacijenti su bili tretirani intenziviranom konvencionalnom insulinskom terapijom u vidu 4 dnevne doze insulina a doza je određivana prema vrednostima glikemije po posebnom algoritmu radi postizanja euglikemije.

KR bolesti je definisana kao stanje euglikemije bez primene insulinske terapije, u trajanju od najmanje mesec dana.

Od svih ispitanika, posle detaljnog objašnjenja, dobijen je pristanak za učešće u istraživanju, a istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta.

### 3.2.2. Metoda imunofluorescencije

Zavisno od fenotipskih karakteristika subpopulacije limfocita koja je ispitivana, primenjeno je bojenje površinskih markera metodom direktne imunofluorescencije korišćenjem istovremeno dva i četiri monoklonska antitela, čime je dobijena dvobojna i četvorbojna fluorescencija (227). Kombinacija boja koja je korišćena u istraživanju je: PercP-anti-CD4 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), APC-anti-CD45RO (BD Pharmingen, clone UCHL1, San Diego, CA, USA), FITC-anti CXCR3 (R&D Systems, clone 49801, Minneapolis, MN, USA) i PE-anti CCR4 (BD Pharmingen, clone 1G1, San Diego, CA, USA).

Bojenje monoklonskim antitelima je urađeno na uzorcima iz pune krvi, koji su tretirani FACS lysing rastvorom, prema postojećem protokolu.

Radi omogućavanja procene intenziteta nespecifične fluorescencije, suspenzija ćelija je inkubirana i sa mišjim imunoglobulinima neodgovarajuće specifičnosti obeleženih fikoeritrinom odnosno fluorescein izotiocijanatom, a inkubacija je obavljena prema opisanom postupku:

1. U svaku FACS epruvetu za analizu metodom protočne citometrije dodati po 10 $\mu$ L preformirane kombinacije humanih monoklonskih antitela i to CD14(FE)/CD45(FITC), izotipska kontrola IgG1(FITC)/IgG2(FE), CD3(FITC)/CD4(FE).
2. U epruvete za analizu dvobojnom fluorescencijom CD45RO<sup>+</sup> ćelija dodati po 10 $\mu$ L humanog monoklonskog antitela obeleženog APC-om i 10 $\mu$ L humanog monoklonskog antitela obeleženog PerCP-jem za CD4<sup>+</sup> ćelije.
3. U epruvete za analizu četvorbojnom imunofluorescencijom za CXCR3<sup>+</sup> ćelija dodati po 10 $\mu$ L humanog monoklonskog antitela obeleženog FITC-om, za CCR4<sup>+</sup> 10 $\mu$ L humanog monoklonskog antitela obeleženog PE, za CD45RO<sup>+</sup> 10 $\mu$ L humanog monoklonskog antitela obeleženog APC-om i za CD4<sup>+</sup> ćelije 10 $\mu$ L humanog monoklonskog antitela obeleženog PerCP-jem
4. U epruvete za analizu CD25<sup>+</sup> ćelija dodati po 10 $\mu$ L humanog monoklonskog antitela CD4 (FE) i 10 $\mu$ L humanog monoklonskog antitela CD 25 (FITC).
5. U svaku od epruveta dodati po 100  $\mu$ L pune krvi, vorteksovati pri maloj brzini tokom 3 sekunde i inkubirati sa monoklonskim antitelima na sobnoj temperaturi, u tami, najmanje 30 minuta.
6. Razblažiti FACS lysing rastvor u razmeri 1:10 sa destilovanom vodom, i iz tog rastvora u svaku od FACS epruveta dodati po 1 ml rastvora.
7. Vorteksovati pri maloj brzini tokom 3 sekunde i ostaviti na sobnoj temperaturi, u tami, ne duže od 12 minuta.
8. Centrifugirati na brzini od 300 g tokom 5 minuta sa brake on opcijom.
9. Odliti supernatant iz svake epruvete, ostaviti po jednu kapljicu, dodati po 2 ml sterilnog PBS rastvora.
10. Centrifugirati na brzini od 200 g tokom 5 minuta sa brake on opcijom.
11. Odliti supernatant iz svake epruvete, ostaviti po jednu kapljicu, dodati po 1 ml sterilnog PBS rastvora.

12. Centrifugirati na brzini od 200 g tokom 5 minuta sa brake on opcijom.
13. Odliti supernatant iz svake epruvete, dodati po 0.5 ml sterilnog PBS rastvora.

### 3.2.3. Metoda protočne citofluorometrije

Analiza uzorka četvorbojnom imunofluorescencijom obavljena je korišćenjem protočnog citometra FACS Calibur (Becton Dickinson), softverski program Cell Quest Pro, u Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu (228).

Uzorci su analizirani koristeći zrake aragonskog lasera talasne dužine 488 nm, air-i zrake lasera sa crvenom diodom talasne dužine 632 nm. U svakom uzorku analizirano je najmanje  $1-3 \times 10^4$  ćelija, a za određivanje CXCR3<sup>+</sup> i CCR4<sup>+</sup> T ćelija analiza je rađena na 100 000 ćelija. Obeleživači kanala su bili postavljeni pre svakog merenja tako da manje od 5% intenziteta nespecifične fluorescencije bude registrovano iznad odgovarajućeg markera tj. unutar mernog opsega.

Broj ćelija u okviru jedne populacije, dobijen kao rezultat merenja, izražen je kao procenat broja analiziranih ćelija a određivan je i srednji intenzitet fluorescence, odnosno broj receptora po jednoj ćeliji, pa su u tom smislu primenjivane dve komplementarne metode radi izražavanja rezultata merenja.

Definisanje CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> subpopulacije zasnovano je na razlici u količini eksprimiranog CD25 markera (merenog preko srednjeg intenziteta fluorescence) na vrhu 5% od CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija.

Analiza je obavljena bez prethodnog znanja o ispitaniku od koga potiče uzorak suspenzije ćelija.

### 3.2.4. Određivanje antitela na GAD i IA2-2A

GAD antitela su testirana metodom radioimunoeseja. Uzorci seruma se inkubiraju sa <sup>125</sup>I obeleženim GAD. GAD antitela koja su prisutna u serumu se vezuju za obeležena GAD. U drugom koraku protein A suspenzija se inkubira sa ovim medijumom. Antitela se vezuju preko Fc regiona za protein A radi formiranja kompleksa. Na kraju druge inkubacije uzorak se centrifugira radi separacije kompleksa od nevezanih obeleženih GAD, a meri se radioaktivnost u precipitatu, koja je proporcionalna količini GAD antitela prisutnih u serumu. Limit za detekciju je 0,11 U/ml, specifičnost eseja je 95%, senzitivnost 84%, a nivo GAD antitela > 1 U/ml se smatra pozitivnim.

IA2-2A antitela su određivana metodom radioimunoeseja. Uzorci seruma se inkubiraju sa obeleženim humanim rekombinantnim IA2. IA2-2A antitela koja su prisutna u serumu se vezuju za obeležena IA2-2A. U drugom koraku protein A suspenzija se inkubira sa ovim medijumom. Antitela se vezuju preko Fc regiona za protein A radi formiranja kompleksa. Na kraju druge inkubacije uzorak se centrifugira radi separacije kompleksa od nevezanih obeleženih IA2-2A, a meri se radioaktivnost u precipitatu, koja je proporcionalna količini IA2-2A antitela prisutnih u serumu. Limit za detekciju je 0,19 U/ml, specifičnost eseja je 100%, senzitivnost 70%, a nivo IA2 antitela > 1 U/ml se smatra pozitivnim.

*3.2.5. Analiza niva hemokina/citokina u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i kontrolnih ispitanika*

Određivanje nivoa hemokina/citokina (IP-10, TARC, TGFβ) iz seruma ispitanika rađeno je ELISA metodom (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Sve analize su rađene u duplikatu, prema instrukciji proizvođača.

*3.2.6. Utvrđivanje stanja glukozne tolerancije u prvih rođaka pacijenata obolelih od T1D i kontrolnih ispitanika*

U svakog ispitanika urađen je 2h test oralne tolerancije na glukozu sa 75g glukoze. Stimulacija glukozom je obavljena peroralnom ingestijom glukoze u obliku 50% rastvora u periodu od 3 minuta. Uzorci venske krvi za određivanje nivoa glikemije i insulinemije u serumu uzimani su u bazalnim uslovima neposredno pre stimulacije glukozom (0. minut) i posle stimulacije u 30., 60., 90. i 120. minutu testa.

*3.2.7. Određivanje nivoa prve faze insulinske sekrecije metodom intravenskog testa tolerancije glukoze*

Intravenskim testom tolerancije glukoze je evaluiran odgovor insulina na intravenski datu glukozu, odnosno prve faze insulinske sekrecije (first phase of insulin response - FPIR), koji je koristan pokazatelj rezidualne sekrecije beta ćelija.

Stimulacija glukozom je obavljena nakon završetka euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa, intravenskom aplikacijom 50% glukoze (0.3 g/kg telesne težine) u periodu od 1 min u antekubitalnu venu. Sat se restartuje na početku aplikacije glukoze.

Uzorci za određivanje insulina i c-peptida su uzimani tačno u +2 min, +4 min, +6 min i +8 min nakon započinjanja davanja glukoze. Uzorci za određivanje glikemije su uzimani u +2 min i +4 min. Po završetku uzimanja uzoraka, stopirana je infuzija insulina, dok je nastavljena infuzija glukoze, čija je brzina postepeno smanjivana i pacijentu je dat obrok. Sproveden je monitoring glikemija sve do odlaska pacijenta. Glikemija nije smela biti niža od 5 mmol/l, a takođe je morala biti stabilna 30 min po prestanku davanja infuzije glukoze. Nivo prve faze insulinske skrecije je izračunata po sledećoj formuli

$$\text{FPIR} = \text{insulinemija u +2 min (mU/l)} + \text{insulinemija u +4 min (mU/l)}$$

Nizak FPIR je definisan kao <100  $\mu\text{U/mL}$  za rođake i decu  $\geq 8$  godina starosti (njihov 10. percentil ) ili <60  $\mu\text{U/mL}$  za roditelje (njihov 1. percentil) ili za rođake i decu <8 godina starosti (njihov 10. percentil ), a smatra se da je 10. percentil utvrđen za sve starosne kategorije 81  $\mu\text{U/MI}$  (229).

### *3.2.8. Utvrđivanje nivoa insulinske senzitivnosti metodom hiperinsulinemijskog euglikemijskog klampa*

Insulinska senzitivnost evaluirana je testom 2h euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa, metodom za obezbeđivanje konstantne hiperinsulinemije i određivanje ukupne potrošnje glukoze kao osnove za dalja izračunavanja pri evaluaciji oksidativne i neoksidativne potrošnje glukoze i kao dopunske metode za utvrđivanje insulinom posredovanog korišćenja glukoze

Euglikemijski hiperinsulinemijski klamp je primenjen prema modifikovanoj originalnoj metodi De Fronza i saradnika (230).

Priprema za testiranje obuhvata postavljanje dva venska pristupa, jednog na dorzalnoj strani podlaktice ili šake za uzimanje uzoraka i drugog u kubitalnu venu sa iste strane radi ubrizgavanja insulina i glukoze. Mesto postavljanja kanile venskog pristupa za uzimanje uzoraka se zagreva pomoću električnog jastučeta na temperaturi 55<sup>0</sup>-60<sup>0</sup> C radi postizanja arterijalizacije venske krvi čime se obezbeđuju pouzdaniji rezultati za preračunavanje u okviru ove metode.

Pacijent sve vreme testiranja ostaje u sedećem položaju. Pre započinjanja testa pacijentu se iz braunile na dorzalnoj strani podlaktice ili šake urade 3 glikemije našte u razmaku od po 5 min, prosečna vrednost ovako dobijenih glikemija se uzima za baznu vrednost glikemije. U



početku primene metode, započeta je samo kontinuirana intravenska infuzija insulina brzinom od 15 ml/h. Infuzija insulina se prethodno pripremi u 47 ml 0,9% sol NaCl, i doza se preračunava prema telesnoj površini ( $40 \text{ mU/min/m}^2$ ). Telesna površina (BSA) se izražava u  $\text{m}^2$  i izračunava prema formuli

$$S=T^{0.425} \times V^{0.725} \times 71.84 \times 10^{-4}$$

S – telesna površina (cm)

T – telesna težina (kg)

V – telesna visina (cm)

Infuzija insulina korigovana u toku prvih 7 minuta prema sledećem algoritmu

- 1) 4 x konstantna infuzija insulina (60 ml/h od 0-4 min testa)
- 2) 2 x konstantna infuzija insulina (30 ml/h od 4-7 min testa)
- 3) konstantna infuzija insulina (15 ml/h od 7-120 min testa)

Istovremena infuzija 20% glukoze se započinje od 4. minuta trajanja infuzije insulina ukoliko je bazna glikemija  $\leq 5.5 \text{ mmol/l}$ , a u slučaju bazne glikemije iznad  $5.5 \text{ mmol/l}$ , infuzija glukoze se započinje tek po redukcije glikemije do  $5.5 \text{ mmol/l}$ . Brzina infuzije glukoze se podešava manuelno na osnovu vrednosti glikemije određivane svakih 5 minuta iz arterijalizovane venske krvi. Pritom, treba imati u vidu da 1 mg glukoze po kg telesne težine u minuti mora korespondirati sa jedinicama na infuzoru (20% glukoza =  $200 \text{ mg/ml}$ ). Uzorci za određivanje insulina u serumu uzimaju se iz istog venskog pristupa u intervalima od 20 min.

Ukupna potrošnja glukoze izračunava se kao srednja vrednost potrošnje glukoze u intervalima od po 20 minuta (od 80.-120. minuta) i izražava se kao M vrednost.

### 3.2.9. Određivanje nivoa glikemije

Vrednost nivoa glikemije određena je metodom korišćenja enzima glukozo-oksidade (pribor Beckman).

### 3.2.10. Određivanje nivoa insulinemije

Vrednost nivoa insulina određena je metodom radioimunoeseja (INEP Zemun)

### 3.2.11. *Određivanje indeksa telesne mase (ITM)*

U svakog ispitanika obavljeno je merenje telesne težine (TT) i telesne visine (TV) i na osnovu izračunat je ITM prema sledećoj formuli:

$$\text{ITM (kg/m}^2\text{)} = \text{TT (kg)} / \text{TV}^2 \text{ (m}^2\text{)}$$

### 3.2.12. *Određivanje telesnog sastava*

U svakog ispitanika, obavljeno je merenje telesnog sastava metodom bioimpedance (aparata TANITA TBF 300). Određivana je masa masnog tkiva, masa nemasnog tkiva (mišići i kosti), procenat telesnih masti, ukupna telesna tečnost i nivo bazalnog metabolizma. Ispitanik je meren ujutru, nakon 12h gladovanja, ispražnjene beške, u donjem vešu, bosonog.

### 3.2.13. *Terapija ispitivanih pacijenata*

U pacijenata je primenjen jedan terapijski režim odnosno terapija insulinom. Terapija insulinom je sprovedena u vidu intenzivirane konvencionalne terapije (4 dnevne doze). Pojedinačne doze insulina su podešavane na osnovu vrednosti glikemije pre glavnih obroka i pre spavanja.

### 3.2.14. *Statistika*

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Podaci su testirani za normalnost distribucije pomoću Kolmogorov–Smirnov testa

Statistička značajnost razlika između grupa evaluirana je analizom varijanse (Bonferroni/Tamhane korekcija), Studentovim t testom, neparametrijskim Mann-Whitney testom. Primenjena je i binarna logistička regresiona analiza. Korelacije su ispitivane Pearson's (r) koeficijentom korelacije. P-vrednost manja od 0.05 je statistički sinifikantna. Podaci su analizirani korišćenjem Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (Advanced Statistics, version 17.0), Chicago, IL.

## 4. REZULTATI

Prema postavljenim ciljevima i zadacima istraživanja, a primenom navedenih metoda u radu su dobijeni sledeći rezultati:

### ***4.1. Analiza promena nivoa Th1, Th2 i T regulatornih subpopulacija u perifernoj krvi prvih rođaka pacijenata sa T1D***

Smatra se da u inicijalnoj fazi autoimunog procesa koji je u osnovi T1D glavnu ulogu ima aktivacija autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> T ćelija, čime uz gubitak tolerancije na sopstvene antigene, započinje proces destrukcije beta ćelija (1). Takođe, poznato je da je populacija CD4<sup>+</sup> T limfocita heterogena i da postoje subsetovi CD4<sup>+</sup>T ćelija sa različitim funkcionalnim i imunoregulatornim svojstvima (2).

U tom smislu, pokazano je da subpopulacije CD4<sup>+</sup> T ćelija imaju ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji autoimunog procesa ali i ostvarivanju ravnoteže imunog sistema i aktivne tolerancije na sopstvene antigene. Poznata paradigma o agresivnoj proinflamatornoj ulozi Th1 subpopulacije i antiinflamatornoj protektivnoj ulozi Th2 subpopulacije, dopunjena je novim saznanjima o postojanju subpopulacija regulatornih T ćelija. Iako do sada nije moguće u potpunosti detektovati autoimuni odgovor koji neposredno dovodi do razaranja beta ćelija, pokazalo se da samo detekcija autoantitela na antigene pankreasnih ostrvaca predstavlja pouzdan marker rizika za ispoljavanje T1D. Smatra se da upravo defekti u broju i funkciji subsetova CD4<sup>+</sup> T ćelija igraju važnu ulogu u patogenezi T1D, a samim tim bi mogli biti markeri rizika za ispoljavanje oboljenja. Međutim, povezanost poremećaja subpopulacija CD4<sup>+</sup> T ćelija i rizika za nastanak T1D u PR pacijenata sa T1D, u potpunosti još uvek nije razjašnjena.

U nameri da se analizira ova povezanost, u radu je u PR pacijenata sa T1D kod kojih postoji povećan rizik za ispoljavanje ovog oboljenja analiziran ukupan broj induktorskih (CD4<sup>+</sup>) i supresorskih/citotoksičnih (CD8<sup>+</sup>) T limfocita, a zatim broj limfocita Th1, Th2 i Treg subpopulacija T ćelija: CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita u okviru subpopulacije memorijskih (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) T limfocita.

Analiza je urađena u uzorcima heparinizirane periferne krvi, primenom metode imunofluorescencije uz korišćenje obeleženih humanih monoklonskih antitela za specifično

bojenje površinskih markera pojedinih subpopulacija. Specifična imunofluorescencija u ispitivanim uzorcima je detektovana metodom protočne citofluorometrije.

Karakteristike PR pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS i stanju KR bolesti, i kontrolnih ispitanika, u kojih je urađena analiza subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi i prisustvo determinanti humoralnog imunog odgovora, autoantitela GAD i IA-2, prikazane su u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Kliničke karakteristike ispitanika u kojih su urađena imunološka i metabolička ispitivanja: prvih rođaka pacijenata sa tipom 1 dijabetesa (T1D) sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR), prvih rođaka pacijenata sa T1D sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa novootkrivenim T1D u insulin-zavisnom stanju (NT1D-IZS), pacijenata sa T1D u kliničkoj remisiji bolesti (T1D-KR) i kontrolnih ispitanika

Grupa	Broj	Pol (m/ž)	Starost (god.)	ITM <sup>a</sup> (kg/m <sup>2</sup> )
vrPR	17	4/13	29.82 ± 8.83	23.71±2.66
nrPR	34	18/16	26.44 ± 6.09	22.69±3.72
NT1D-IZS	24	15/9	26.43 ± 6.02	21.40±3.47
T1D-KR	10	4 / 6	26.22 ± 5.06	22.12±2.71
Kontrola	18	2/16	28.18 ± 7.21	22.00±4.21

a - indeks telesne mase (ITM) je izračunat po formuli  $ITM = \text{telesna masa} / (\text{telesna visina})^2$

Ispitivanje je obavljeno u vidu studije preseka u 51 zdravih PR pacijenata sa T1D, 24 pacijenta sa N-T1D u IZS, 10 pacijenata sa T1D u stanju KR i 18 zdravih kontrolnih ispitanika.

Karakteristike PR pacijenata sa T1D, pacijenta sa N-T1D u IZS, u stanju KR bolesti i kontrolnih ispitanika u kojih je urađena analiza subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi prikazane su u Tabeli 1. Ispitanici su bili usklađeni prema starosnoj dobi i ITM.

U našoj studiji od 51 ispitivanog PR pacijenata sa T1D, 17 je bilo pozitivno za prisustvo antitela na GAD i IA-2 u serumu, odnosno imalo je visok rizik za ispoljavanje T1D.

Imunološki i metabolički parametri u ispitivanih grupa prikazani su na Tabelama 2-13.

**Tabela 2.** Karakteristike prvih rođaka pacijenata sa T1D (PR) u kojih su urađena imunološka i metabolička ispitivanja

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>PR</i>
Broj	51
Pol (M/Ž)	22/29
Starost (godine)	27.57 ± 7.21
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	23.03 ± 3.41
Insulinemija (mU/l)	16.7 ± 2.7
Glikemija (mmol/l)	4.90 ± 1.12

a - indeks telesne mase (ITM) je izračunat po formuli  $ITM = \text{telesna masa} / (\text{telesna visina})^2$

**Tabela 3.** Imunološki i metabolički parametri u PR pacijenata sa T1D

<b>KARAKTERISTIKA</b>	<b>PR</b>
Broj leukocita ( $\times 10^6$ /ml)	4.90 $\pm$ 0.52
CD3 <sup>+</sup> (%)	67.88 $\pm$ 2.52
CD4 <sup>+</sup> (%)	39.32 $\pm$ 2.46
CD8 <sup>+</sup> (%)	27.46 $\pm$ 1.88
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	26.08 $\pm$ 6.19
CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	56.19 $\pm$ 8.86
CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	37.76 $\pm$ 9.29
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> (%)	0.22 $\pm$ 0.11
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CXCR3	42.49 $\pm$ 8.48
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CCR4	71.40 $\pm$ 13.66
Odnos intenziteta fluorescenci <sup>b</sup> CD25	2.98 $\pm$ 0.92
IP-10 (pg/ml)	123.64 $\pm$ 75.89
TARC (pg/ml)	354.31 $\pm$ 152.89
TGF- $\beta$ (pg/ml)	8281.75 $\pm$ 3640.90
FPIR ( $\mu$ U/ml)	137.81 $\pm$ 30.88
M vrednost (mg/ml/min)	9.23 $\pm$ 2.02

(%) procenat ukupnog broja limfocita periferne krvi određen imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom; rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija

<sup>a</sup> broj receptora (CXCR3 ili CCR4) po CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocitu; <sup>b</sup> odnos broja CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> limfocita

**Tabela 4.** Karakteristike prvih rođaka pacijenata sa tipom 1 dijabetesa (T1D) sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR) u kojih su urađena imunološka i metabolička ispitivanja

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>vrPR</i>
Broj	17
Pol (M/Ž)	4/13
Starost (godine)	29.82 ± 8.83
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	23.71±2.66
Insulinemija (mU/l)	13.4 ± 2.9
Glikemija (mmol/l)	4.84 ± 1.06

a - indeks telesne mase (ITM) je izračunat po formuli  $ITM = \text{telesna masa} / (\text{telesna visina})^2$

**Tabela 5.** Imunološki i metabolički parametri u prvih rođaka pacijenata sa tipom 1 dijabetesa (T1D) sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR)

<b>KARAKTERISTIKA</b>	<b>vrPR</b>
Broj leukocita ( $\times 10^6$ /ml)	4.82 $\pm$ 0.50
CD3 <sup>+</sup> (%)	67.92 $\pm$ 2.56
CD4 <sup>+</sup> (%)	39.68 $\pm$ 2.44
CD8 <sup>+</sup> (%)	26.88 $\pm$ 1.92
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	28.17 $\pm$ 5.63
CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	64.98 $\pm$ 5.19
CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	29.46 $\pm$ 2.83
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> (%)	0.13 $\pm$ 0.05
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CXCR3	56.37 $\pm$ 5.55
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CCR4	59.16 $\pm$ 12.80
Odnos intenziteta fluorescenci <sup>b</sup> CD25	2.16 $\pm$ 0.31
IP-10 (pg/ml)	160.12 $\pm$ 73.40
TARC (pg/ml)	438.84 $\pm$ 120.62
TGF- $\beta$ (pg/ml)	8883.17 $\pm$ 3105.96
FPIR ( $\mu$ U/ml)	114.75 $\pm$ 13.02
M vrednost (mg/ml/min)	9.61 $\pm$ 2.76

(%) procenat ukupnog broja limfocita periferne krvi određen imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom; rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija

<sup>a</sup> broj receptora (CXCR3 ili CCR4) po CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocitu; <sup>b</sup> odnos broja CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> limfocita



**Tabela 6.** Karakteristike pacijenata sa N-T1D u insulin-zavisnom stanju (IZS) u vreme ispoljavanja bolesti u kojih su urađena imunološka i metabolička ispitivanja

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>N-T1D IZS</i>
Broj	24
Pol (M/Ž)	15/9
Starost (godine)	26.43 ± 6.02
Trajanje dijabetesa (mesece)	2.30 ± 0.52
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	21.40 ± 3.47
Glikozilirani hemoglobin (HbA1c)(%)	9.70 ± 0.86
Glikemija (mmol/l)	5.2 ± 0.8
Insulinemija (mU/l)	7.1 ± 1.1

a - indeks telesne mase (ITM) je izračunat po formuli  $ITM = \text{telesna masa} / (\text{telesna visina})^2$

**Tabela 7.** Imunološki i metabolički parametri u pacijenata sa N-T1D u insulin-zavisnom stanju (IZS) u vreme ispoljavanja bolesti

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>N-T1D IZS</i>
Broj leukocita ( $\times 10^6$ /ml)	4.1 $\pm$ 0.62
CD3 <sup>+</sup> (%)	72.70 $\pm$ 0.78
CD4 <sup>+</sup> (%)	43.61 $\pm$ 1.98
CD8 <sup>+</sup> (%)	28.76 $\pm$ 1.79
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	27.23 $\pm$ 8.54
CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	40.19 $\pm$ 11.52
CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	31.53 $\pm$ 9.67
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> (%)	0.23 $\pm$ 0.03
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CXCR3	29.47 $\pm$ 8.24
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CCR4	60.49 $\pm$ 12.68
Odnos intenziteta fluorescenci <sup>b</sup> CD25	3.11 $\pm$ 0.42
IP-10 (pg/ml)	147.67 $\pm$ 63.02
TARC (pg/ml)	419.44 $\pm$ 298.42
TGF- $\beta$ (pg/ml)	5530.83 $\pm$ 197.75
FPIR ( $\mu$ U/ml)	5.88 $\pm$ 2.32
M vrednost (mg/ml/min)	4.05 $\pm$ 3.46

(%) procenat ukupnog broja limfocita periferne krvi određen imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom; rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija

<sup>a</sup> broj receptora (CXCR3 ili CCR4) po CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocitu

<sup>b</sup> odnos broja CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> limfocita

**Tabela 8.** Karakteristike pacijenata sa T1D u kliničkoj remisiji (KR) bolesti u kojih su urađena imunološka i metabolička ispitivanja

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>T1D-KR</i>
Broj	10
Pol (M/Ž)	4/6
Starost (godine)	26.22 ± 5.06
Trajanje dijabetesa (meseći)	9.20 ± 2.68
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	22.12 ± 2.71
Glikozilirani hemoglobin (HbA1c)(%)	7.06 ± 0.42
Glikemija (mmol/l)	5.8 ± 0.4
Insulinemija (mU/l)	9.3 ± 1.2

a - indeks telesne mase (ITM) je izračunat po formuli  $ITM = \text{telesna masa} / (\text{telesna visina})^2$

**Tabela 9.** Imunološki i metabolički parametri u pacijenata sa T1D u KR bolesti

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>T1D-KR</i>
Broj leukocita (x10 <sup>6</sup> /ml)	4.63 ± 0.47
CD3 <sup>+</sup> (%)	67.63±2.82
CD4 <sup>+</sup> (%)	40.46±2.09
CD8 <sup>+</sup> (%)	26.00±1.80
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	24.19±6.50
CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	42.16±11.13
CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	31.40±8.14
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> (%)	0.23±0.10
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CXCR3	32.21±10.64
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CCR4	63.53±14.04
Odnos intenziteta fluorescenci <sup>b</sup> CD25	3.22±0.52
IP-10 (pg/ml)	132.45±59.13
TARC (pg/ml)	289.48±116.75
TGF-β (pg/ml)	4048.89±151.61
FPIR (μU/ml)	7.17±1.73
M vrednost (mg/ml/min)	6.16±1.83

(%) procenat ukupnog broja limfocita periferne krvi određen imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom; rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija

<sup>a</sup> broj receptora (CXCR3 ili CCR4) po CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocitu

<sup>b</sup> odnos broja CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> limfocita

**Tabela 10.** Karakteristike kontrolnih ispitanika u kojih su urađena imunološka i metabolička ispitivanja

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>KONTROLA</i>
Broj	18
Pol (M/Ž)	2/16
Starost (godine)	28.18 ± 7.21
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	22.00 ± 4.21
Glikemija (mmol/l)	4.50 ± 1.20
Insulinemija (mU/l)	11.60 ± 2.34

a- indeks telesne mase (ITM) je izračunat po formuli  $ITM = \text{telesna masa} / (\text{telesna visina})^2$

**Tabela 11.** Imunološki i metabolički paramerti u kontrolnih ispitanika

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>KONTROLA</i>
Broj leukocita (x10 <sup>6</sup> /ml)	4.35 ± 0.48
CD3 <sup>+</sup> (%)	68.35±2.31
CD4 <sup>+</sup> (%)	38.58±2.27
CD8 <sup>+</sup> (%)	28.76±2.76
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	27.67±6.59
CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	53.09±6.29
CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	40.90±7.24
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> (%)	0.26±0.06
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CXCR3	41.77±6.02
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CCR4	71.93±5.80
Odnos intenziteta fluorescenci <sup>b</sup> CD25	3.22±0.91
IP-10 (pg/ml)	84.11±16.88
TARC (pg/ml)	218.63±81.09
TGF-β (pg/ml)	10064.44±681.99
FPIR (μU/ml)	167.83±30.98
M vrednost (mg/ml/min)	10.47±1.56

(%) procenat ukupnog broja limfocita periferne krvi određen imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom; rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija

<sup>a</sup> broj receptora (CXCR3 ili CCR4) po CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> limfocitu; <sup>b</sup> odnos broja CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> limfocita

**Tabela 12.** Karakteristike prvih rođaka pacijenata sa tipom 1 dijabetesa (T1D) sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR) u kojih su urađena imunološka i metabolička ispitivanja

<i>KARAKTERISTIKA</i>	<i>nrPR</i>
Broj	34
Pol (M/Ž)	18/16
Starost (godine)	26.44 ± 6.09
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	22.69 ± 3.72
Insulinemija (mU/l)	12.9 ± 1.6
Glikemija (mmol/l)	4.22 ± 1.31

a - indeks telesne mase (ITM) je izračunat po formuli  $ITM = \text{telesna masa} / (\text{telesna visina})^2$

**Tabela 13.** Imunološki i metabolički parametri u prvih rođaka pacijenata sa tipom 1 dijabetesa (T1D) sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR)

<b>KARAKTERISTIKA</b>	<b>nrPR</b>
Broj leukocita ( $\times 10^6$ /ml)	5.98 $\pm$ 1.57
CD3 <sup>+</sup> (%)	65.90 $\pm$ 2.98
CD4 <sup>+</sup> (%)	38.78 $\pm$ 2.86
CD8 <sup>+</sup> (%)	27.32 $\pm$ 1.74
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	25.02 $\pm$ 6.26
CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	51.79 $\pm$ 6.79
CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (%)	41.90 $\pm$ 8.58
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> (%)	0.26 $\pm$ 0.10
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CXCR3	42.19 $\pm$ 8.12
Intenzitet fluorescence <sup>a</sup> CCR4	75.82 $\pm$ 10.50
Odnos intenziteta fluorescenci <sup>b</sup> CD25	3.27 $\pm$ 0.88
IP-10 (pg/ml)	105.39 $\pm$ 71.30
TARC (pg/ml)	312.05 $\pm$ 151.14
TGF- $\beta$ (pg/ml)	7981.04 $\pm$ 3889.51
FPIR ( $\mu$ U/ml)	149.34 $\pm$ 30.85
M vrednost (mg/ml/min)	9.03 $\pm$ 1.54

(%) procenat ukupnog broja limfocita periferne krvi određen imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom; rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija

<sup>a</sup> broj receptora (CXCR3 ili CCR4) po CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocitu; <sup>b</sup> odnos broja CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> limfocita



Anamnestički podaci prikupljeni primenom standardnog upitnika o podacima iz detinjstva vezanim za faktore rizika za razvoj T1D u grupama vrPR i nrPR prikazani su na Tabeli 14 .

Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti kravljeg mleka u ishrani u prvoj godini života, majčinog mleka, supstituisanja vitamina D u ishrani, autoimunih oboljenja, i telesne težine na rođenju, poređenjem vrPR i nr PR (Tabela 14 ).

**Tabela 14.** Analiza standardnog upitnika o anamnestičkim podacima vezanim za prisustvo faktora rizika za ispoljavanje T1D u detinjstvu u prvih rođaka pacijenata sa tipom 1 dijabetesa (T1D) sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR) i prvih rođaka pacijenata sa tipom 1 dijabetesa (T1D) sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR)

	<i>Kravlje mleko da/ne</i>	<i>Majčino mleko da/ne</i>	<i>Vitamin D da/ne</i>	<i>Autoimune bolesti da/ne</i>	<i>TT na rođenju (g)</i>
<b>vrPR</b>	2/15	11/6	7/10	6/11	3370.6±327.9
<b>nrPR</b>	11/23	27/7	20/14	16/18	3502.6±375.7
p vrednosti	0.115	0.256	0.234	0.424	0.224

Značajnost razlike ispitivana  $\chi^2$  testom i Studentovim t testom.

vrPR/nrPR p=NS

#### **4.1.1. Detekcija CD4<sup>+</sup>T memorijskih limfocita metodom protočne citometrije**

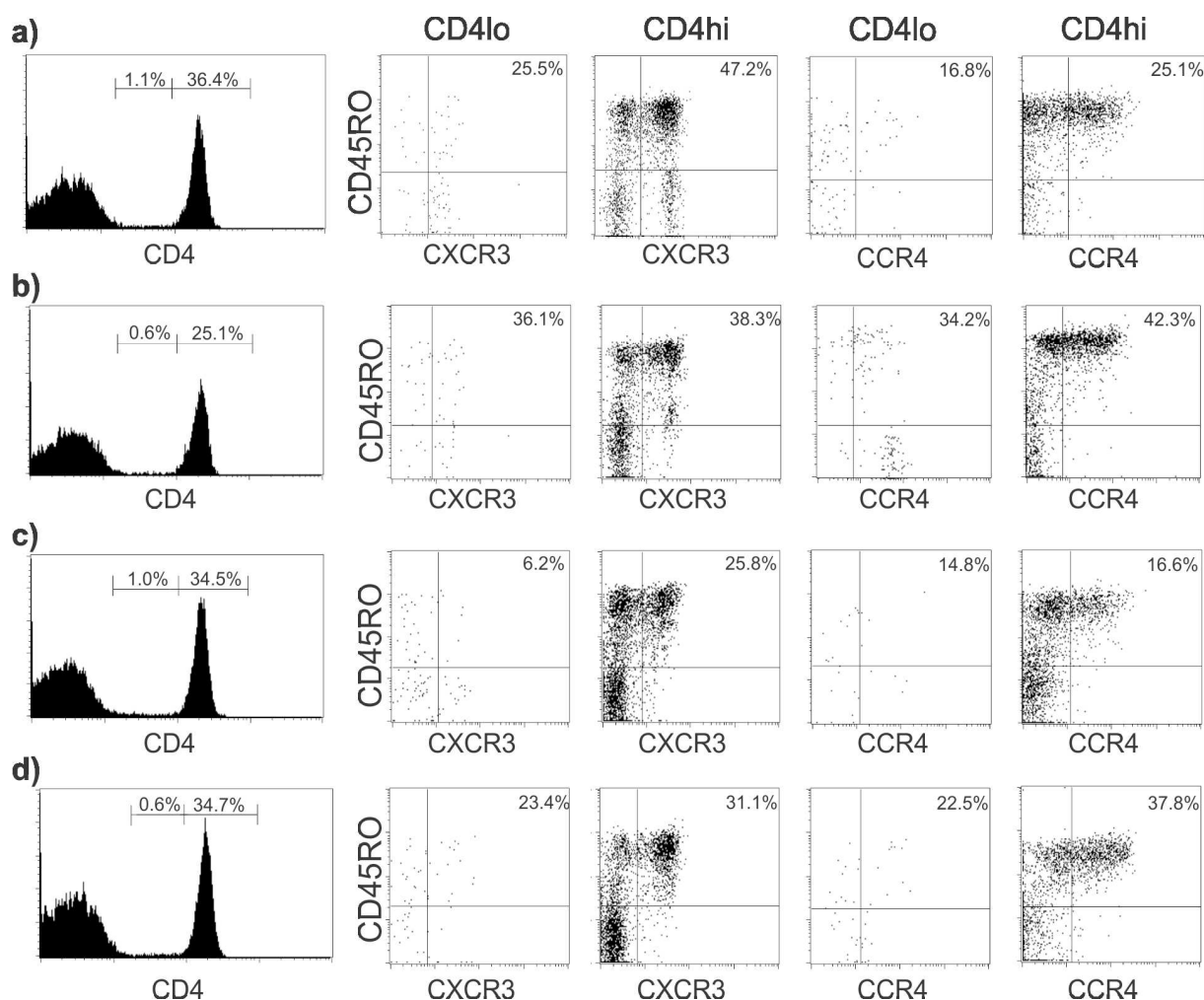
S obzirom da humani makrofagi i B limfociti eksprimiraju CD4, gejtovani smo prvo CD3<sup>+</sup> ćelije, odnosno T limfocite. U različitim panelima, memorijski T limfociti su identifikovani kao CD45RO<sup>+</sup> (133). Kvadranti su setovani prema bojenju sa kontrolnim

antitelima. Gejtovane periferne mononuklearne T ćelije koje koeksprimiraju CD4 i CD45RO su bojene za površinsku ekspresiju CXCR3 i CCR4. Imajući u vidu kontradiktornu ulogu CD4lo T ćelija u T1D, dodatno smo analizirali CD4hi/CD4lo panel u našim grupama. Pokazan je nizak nivo CD4lo subpopulacije u limfocitnom gejtu (vrPR:  $1.03 \pm 0.73\%$ , nrPR  $1.23 \pm 1.06\%$ , NT1D-IZS:  $0.96 \pm 0.57\%$ , T1D-KR:  $0.87 \pm 0.52\%$ , Kontrola  $1.25 \pm 1.52\%$ ,  $p=NS$ ) i među CD4<sup>+</sup> T ćelijama (vrPR  $2.67 \pm 0.55\%$ , nrPR  $3.17 \pm 2.66\%$ , NT1D-IZS:  $2.24 \pm 1.37\%$ , T1D-KR:  $2.15 \pm 1.13\%$ , Kontrola  $3.05 \pm 3.89\%$ ,  $p=NS$ ), rang (0-6.77% i 0-17.32%).

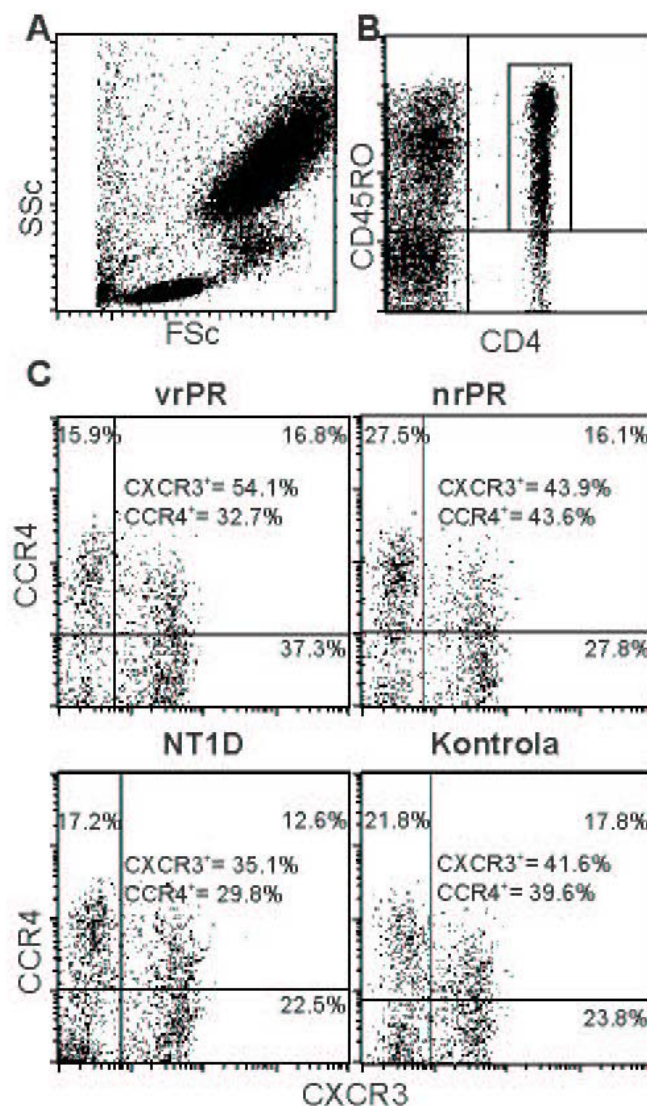
U tom smislu, dalje analize smo bazirali samo na CD4hi odnosno CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T ćelijama, u cilju izbegavanja precenjivanja uticaja CD4lo subpopulacije na finalne rezultate.

CD4<sup>+</sup> memorijske T ćelije su kvantifikovane metodom protočne citometrije u vr i nr zdravih PR, pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i kontrolnih ispitanika, u cilju ispitivanja ekspresije receptora u različitim stadijumima razvoja T1D. Dodatno, vrPR su bili pozitivni za prisustvo oba autoantiela GAD i IA-2A, dok su nrPR bili negativni za oba autoantitela.

Reprezentativni histogrami i dot plotovi za profile ekspresije CXCR3 i CCR4 na CD4 T ćelijskim subpopulacijama (CD4<sup>+</sup>low i CD4<sup>+</sup>high) su prikazani za svaku analiziranu grupu (Grafikon 1), kao i reprezentativni dot plotovi CXCR3 i CCR4 receptorske ekspresije na CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T ćelijama (Grafikon 2).



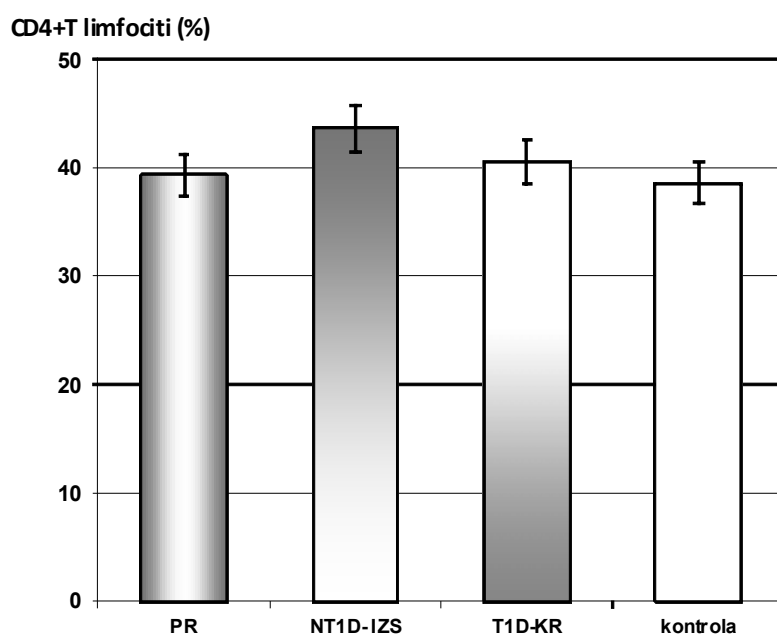
**Grafikon 1.** Profili ekspresije CXCR3 i CCR4 na CD4 T ćelijskim subpopulacijama (CD4<sup>low</sup> i CD4<sup>high</sup>). Na osnovu profila ekspresije, CD4<sup>+</sup> T ćelije su podeljene u CD4<sup>low</sup> i CD4<sup>high</sup> subpopulacije, a predstavljene su procenti njihovog učešća u limfocitnom gejtju (A-D, krajnji levi panel) i CXCR3 i CCR4 ekspresija je determinisana za CD4<sup>lo</sup>/CD45RO<sup>+</sup> ćelije i CD4<sup>high</sup>/CD45RO<sup>+</sup> ćelije. Reprezentativni histogrami i dot plotovi za (A) prve rođake sa visokim rizikom za ispoljavanje tipa 1 dijabetesa (vrPR), (B) prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje tipa 1 dijabetesa (nrPR), (C) pacijente sa novootkrivenim tipom 1 dijabetesa (NT1D) ili (D) kontrolne ispitanike su predstavljene.



**Grafikon 2.** Profili ekspresije CXCR3 i CCR4 na cirkulišućim CD45RO<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T ćelijama. (A) Selektovane su ćelije iz limfocitnog gejta i (B) populacija CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> ćelija je izabrana za analizu hemokinskih receptora (C) Reprerentativni dot plotovi CXCR3 i CCR4 ekspresije na CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> analize za prve rođake sa visokim rizikom za ispoljavanje tipa 1 dijabetesa (vrPR), prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje tipa 1 dijabetesa (nrPR), pacijente sa novootkrivenim tipom 1 dijabetesa (NT1D) ili kontrolne ispitanike su predstavljani, nakon bojenja monoklonskim antitelima metodom četvorbojne imunofluorescencije i protočne citometrije. Rezultati pokazuju procenat CD45RO<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ćelija koje ekspimiraju CXCR3 i CCR4 u reprezentativnim uzorcima.

#### 4.1.2. Analiza promene nivoa CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita kao pokazatelja Th1 imunskog odgovora u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D

U PR pacijenata sa T1D, nivo CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> limfocita i njihov međusobni odnos nisu se značajno razlikovali od nalaza u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bolesti, kao i u kontrolnih ispitanika (Grafikon 3,4,5).



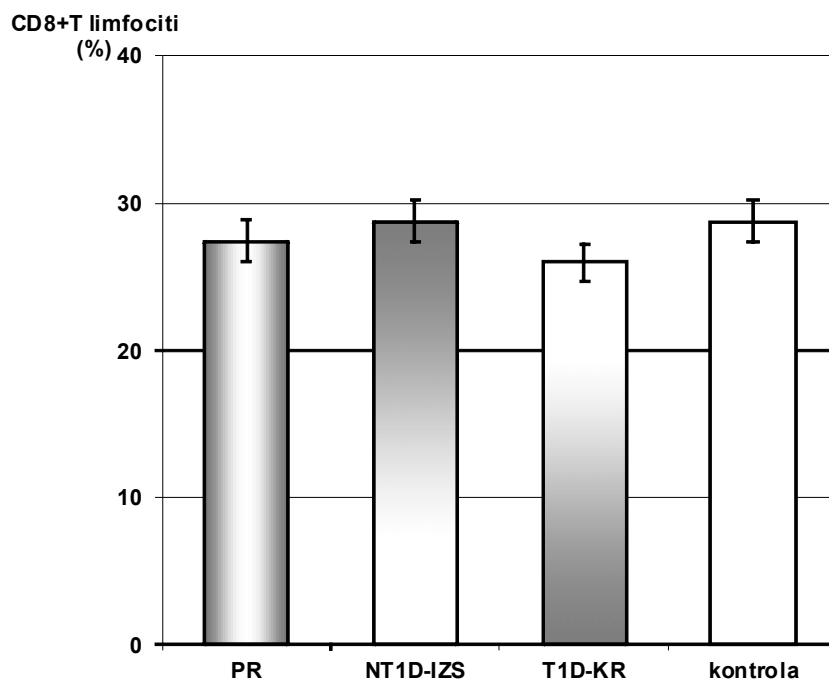
**Grafikon 3.** Nivo CD4<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Procenat CD4<sup>+</sup> T limfocita od ukupnog broja limfocita periferne krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike nisu registrovane između grupa (p=NS).



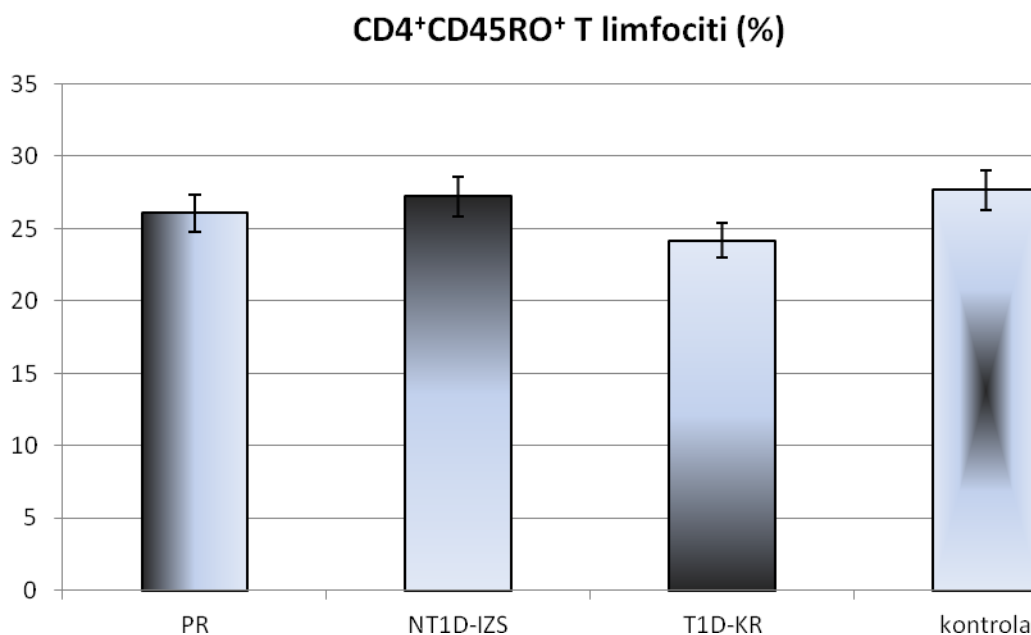
**Grafikon 4.** Nivo CD8<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Procenat CD8<sup>+</sup> T limfocita od ukupnog broja limfocita periferne krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike nisu registrovane između grupa (p=NS).



**Grafikon 5.** Nivo CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika  
 Procenat CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocita od ukupnog broja limfocita periferne krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

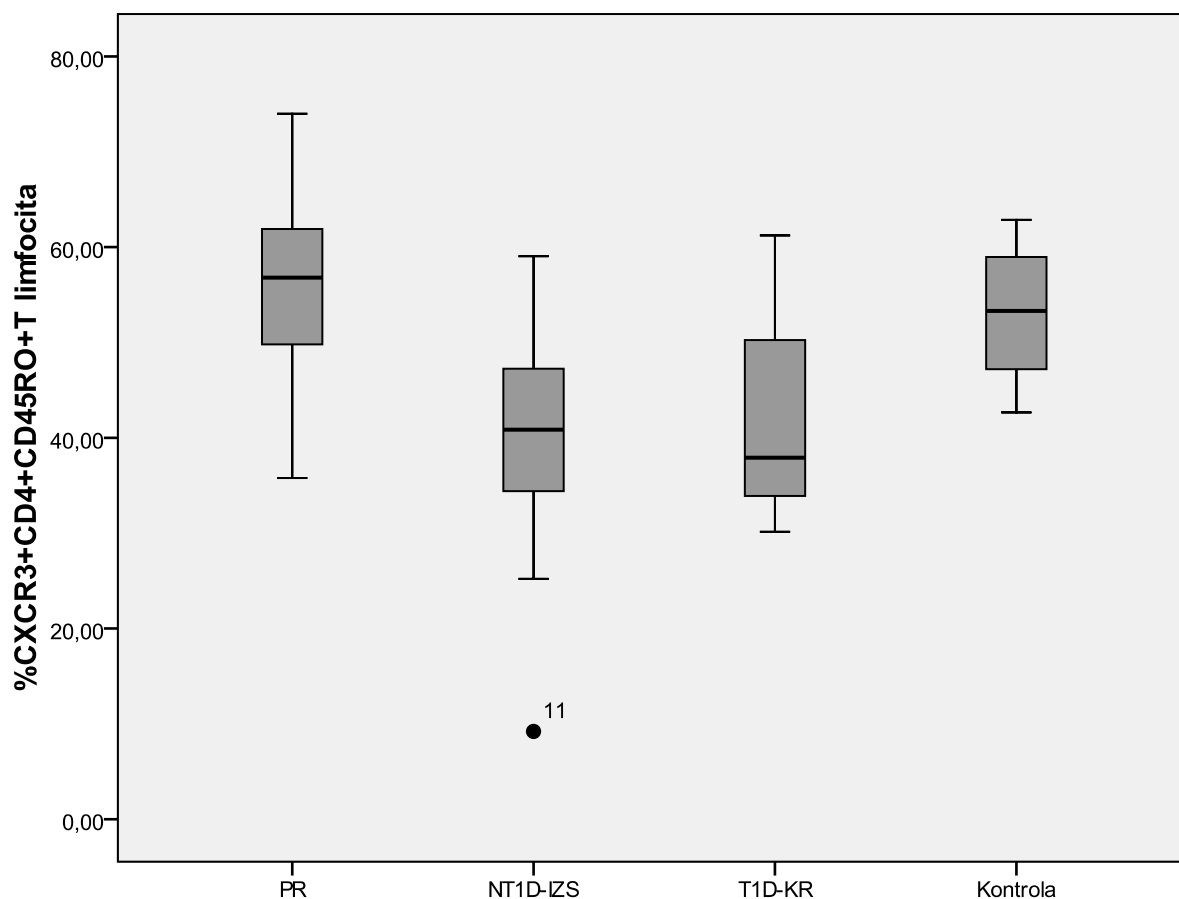
Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike nisu registrovane između grupa (p=NS).

Nivo memorijskih (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) T limfocita koji eksprimiraju CXCR3, Th1 hemokinski receptor, u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA2, je bio značajno veći u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR. Istovremeno, utvrdili smo da je u PR pacijenata sa T1D, nivo CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita bio veći nego u kontrolnih ispitanika, ali nije dostigao statističku značajnost (Grafikon 6).

Nivo CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita u vrPR je bio značajno veći u poređenju sa nrPR, pacijentima sa N-T1D u IZS i KR, kao i kontrolnim ispitanicima (Grafikon 7).

Sa druge strane, nivo CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bio je značajno manji u poređenju sa kontrolnim ispitanicima i nije se značajno razlikovao između pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bolesti (Grafikon 6).



**Grafikon 6.** Nivo CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika. Procenat CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocita koji eksprimiraju CXCR3 u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

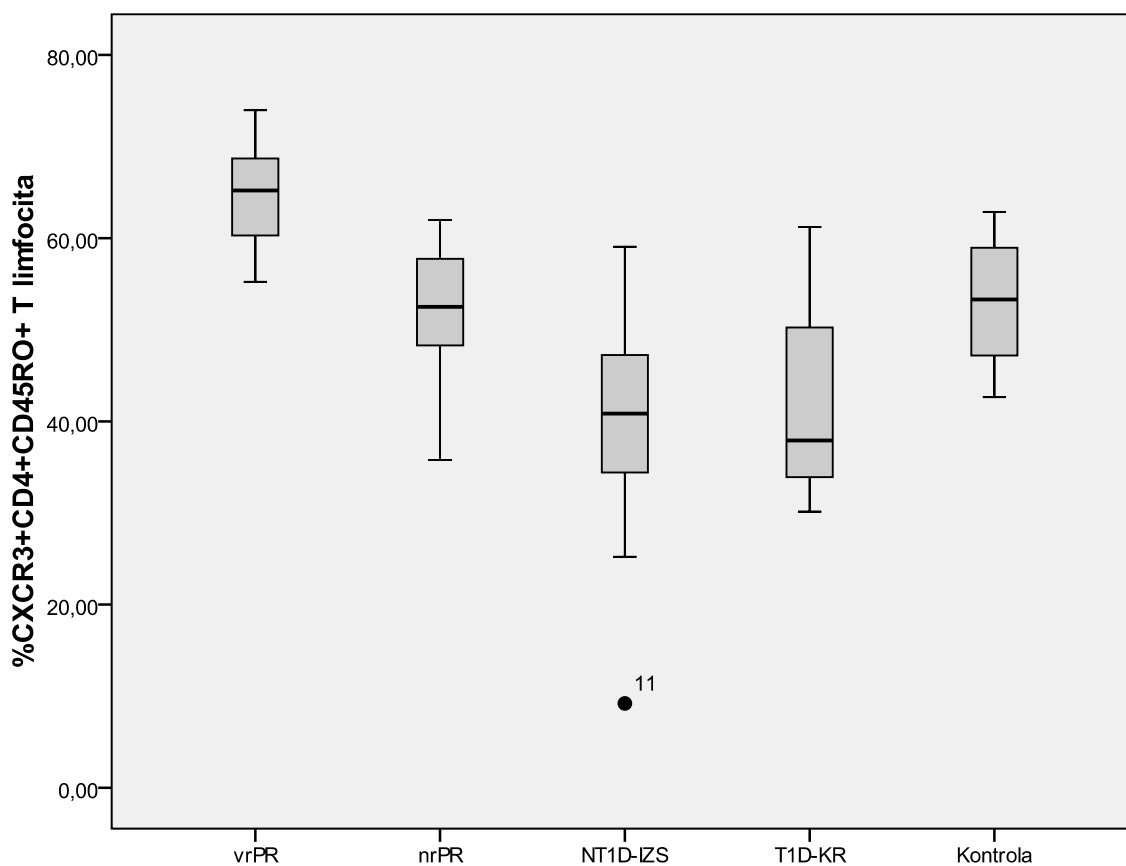
Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a error barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa PR/NT1D-IZS ( $p < 0.001$ ) i PR/T1D-KR ( $p < 0.001$ ), kao i NT1D-IZS/kontrola ( $p < 0.001$ ) i T1D-KR/ kontrola ( $p < 0.05$ ).

NT1D-IZS/ T1D-KR ( $p = \text{NS}$ ), PR/kontrola ( $p = \text{NS}$ )





**Grafikon 7.** Nivo  $CXCR3^+CD4^+CD45RO^+$  T limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Procenat  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocita koji ekspiriraju CXCR3 u perifernoj krvi određen je imunofluorescijom i protočnom citofluorometrijom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a error barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

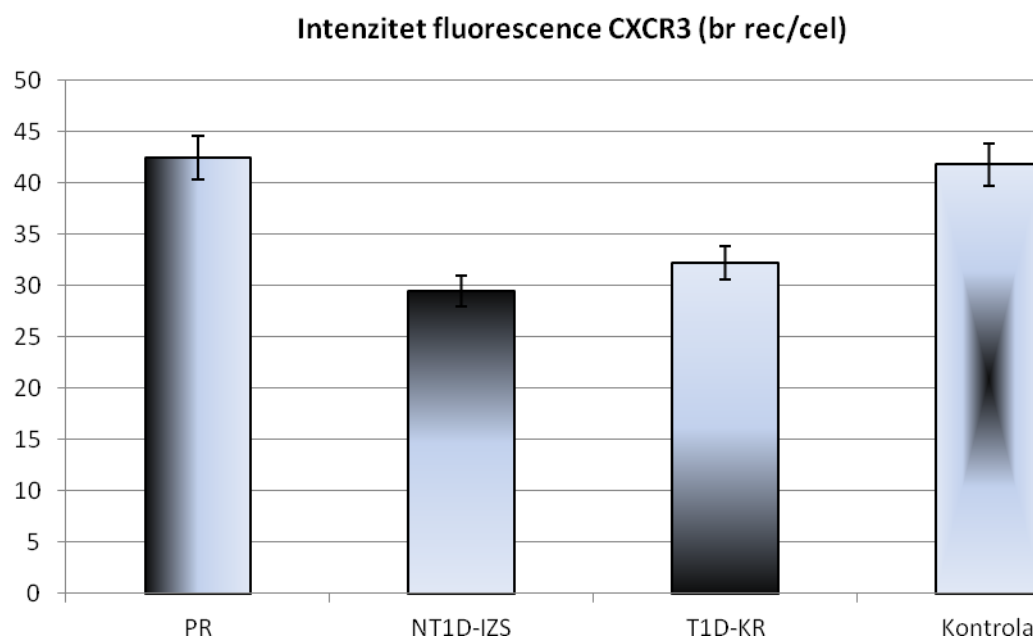
Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/nrPR ( $p < 0.01$ ), vrPR/NT1D-IZS ( $p < 0.001$ ), vrPR/T1D-KR ( $p < 0.001$ ), vrPR/kontrola ( $p < 0.01$ ).

#### 4.1.3. Analiza intenziteta fluorescence CXCR3 hemokinskih receptora na memorijskim T limfocitima, kao pokazatelja Th1 imunskog odgovora, u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D

Poređenjem intenziteta fluorescence CXCR3 receptora, odnosno broja CXCR3 hemokinskih receptora po jednom CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocitu, utvrđeno je da je intenzitet fluorescence CXCR3 receptora u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2, bio značajno veći u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR. Istovremeno, nivo intenziteta fluorescence CXCR3 receptora u PR pacijenata sa T1D u poređenju sa kontrolnim ispitanicima je bio veći, ali nije dostigao statističku značajnost (Grafikon 8).

Takođe, nivo intenziteta fluorescence CXCR3 receptora u vrPR, bio je značajno veći u poređenju sa nrPR, pacijentima sa N-T1D u IZS i KR, kao i u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Grafikon 9).

Sa druge strane, nivo intenziteta fluorescence CXCR3 receptora u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bio je značajno manji u poređenju sa kontrolnim ispitanicima a nije se značajno razlikovao između pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bolesti (Grafikon 8).



**Grafikon 8.** Intenzitet fluorescence CXCR3 receptora na CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocitima u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

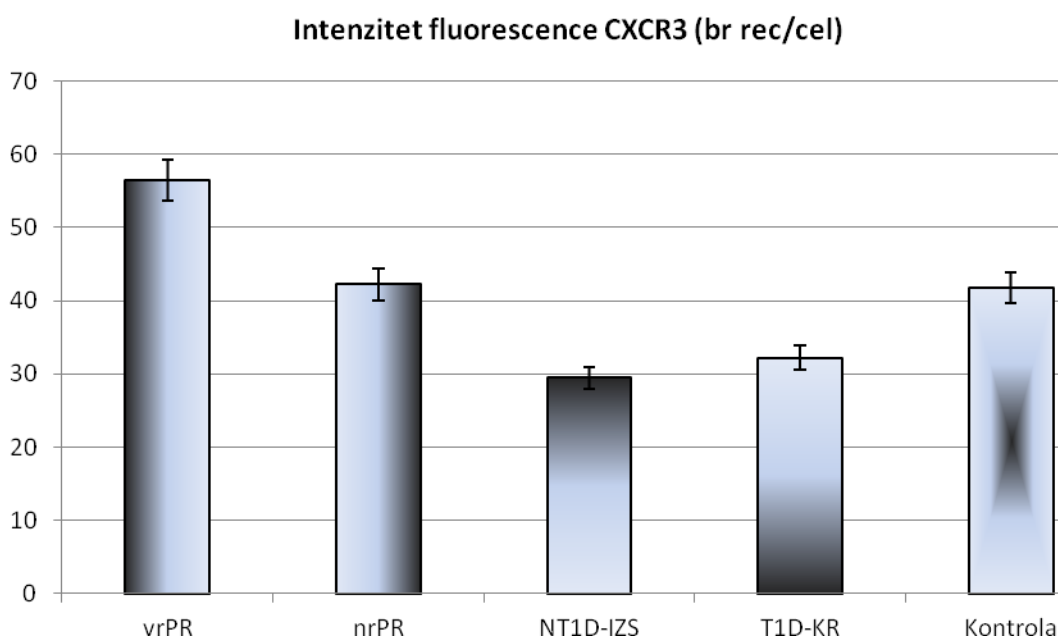
Broj CXCR3 receptora po  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocitu u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa PR/NT1D-IZS ( $p<0.001$ ) i PR/T1D-KR ( $p<0.001$ ), kao i NT1D-IZS/kontrola ( $p<0.001$ ) i T1D-KR/ kontrola ( $p<0.05$ ).

NT1D-IZS/ T1D-KR ( $p=NS$ ), PR/kontrola ( $p=NS$ )



**Grafikon 9.** Intenzitet fluorescence CXCR3 receptora na  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocitima u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Broj CXCR3 receptora po  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocitu u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

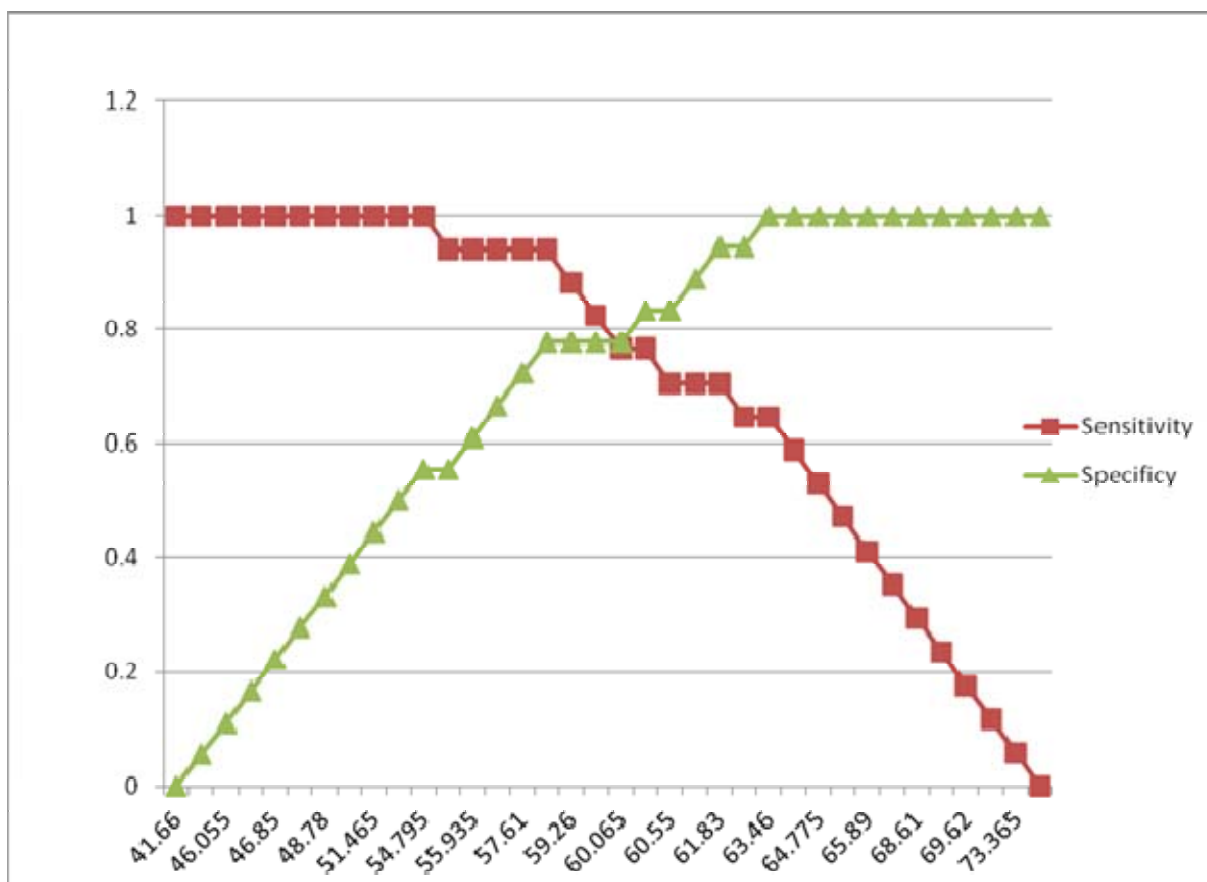
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/nrPR ( $p<0.01$ ), vrPR/NT1D-IZS ( $p<0.001$ ), vrPR/T1D-KR ( $p<0.001$ ), vrPR/kontrola ( $p<0.01$ ).

#### 4.1.4. Definisane nivoa CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita koji razdvaja prve rođake pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike

Definisali smo i tačku preseka (cut off point), odnosno nivo CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi, na kojem je moguće razdvojiti grupu vrPR i kontrolne ispitanike. Izračunati nivo je 59.67% (Grafikon 10).



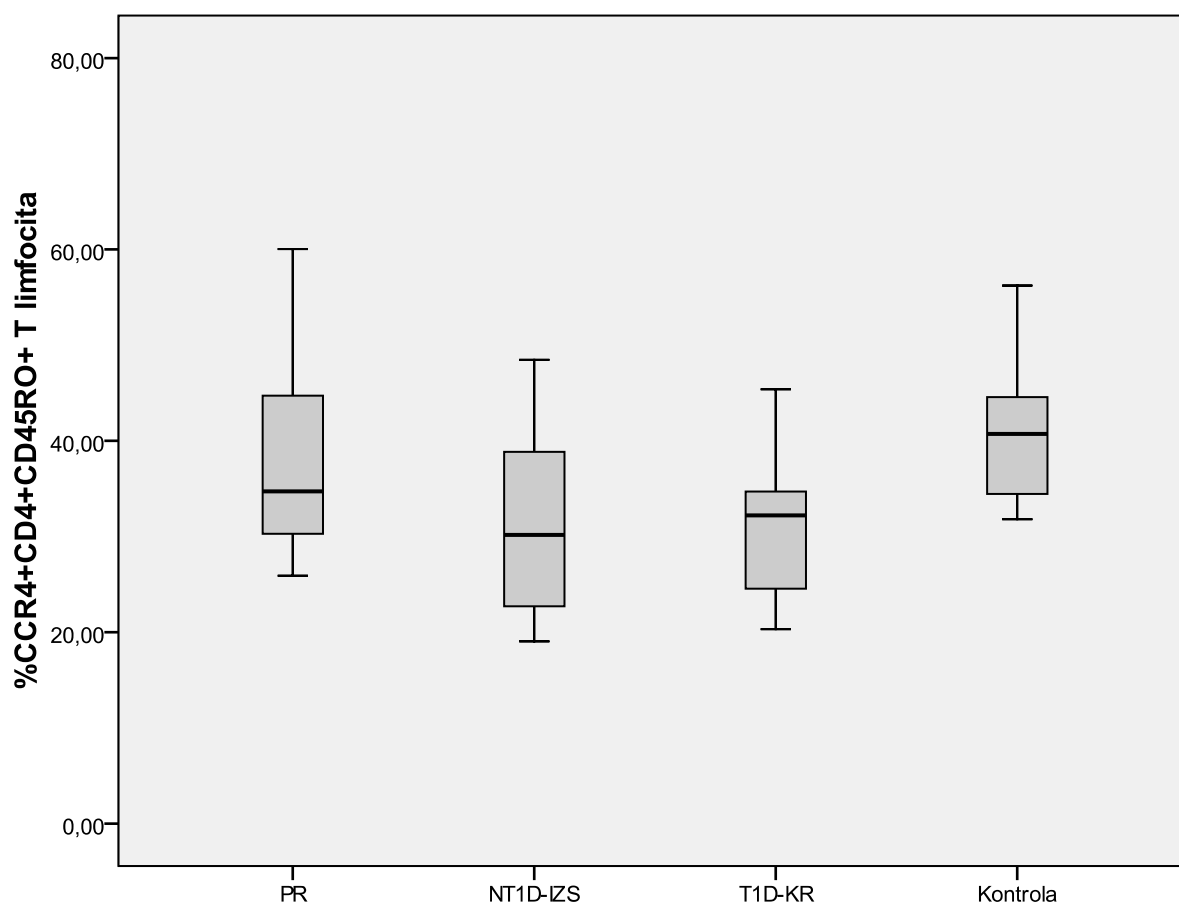
**Grafikon 10.** Nivo CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocita u perifernoj krvi: određivanje tačke razdvajanja (cut off point) grupe prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i kontrolnih ispitanika. Izračunati nivo je 59.67%.

#### ***4.1.5. Analiza promene nivoa CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita kao pokazatelja Th2 imunskog odgovora u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D***

Nivo T memorijskih limfocita, koji eksprimiraju CCR4, Th2 hemokinski receptor, u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA2, je bio značajno veći u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS. Istovremeno, utvrdili smo da je u PR pacijenata sa T1D nivo CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita bio manji nego u kontrolnih ispitanika, ali nije dostigao statističku značajnost (Grafikon 11).

Međutim, nivo CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita u vrPR je bio značajno manji u poređenju sa nivoom ove subpopulacije detektovanom u nrPR i u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Istovremeno, nije bilo statistički značajne razlike u nivou CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita između vrPR i pacijenata sa N-T1D u IZS i KR (Grafikon 12).

Sa druge strane, nivo CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita u pacijenata sa N-T1D u IZS bio je značajno manji u poređenju sa kontrolnim ispitanicima a nije se značajno razlikovao u poređenju sa nivoom utvrđenim u pacijenata u KR bolesti (Grafikon 11).



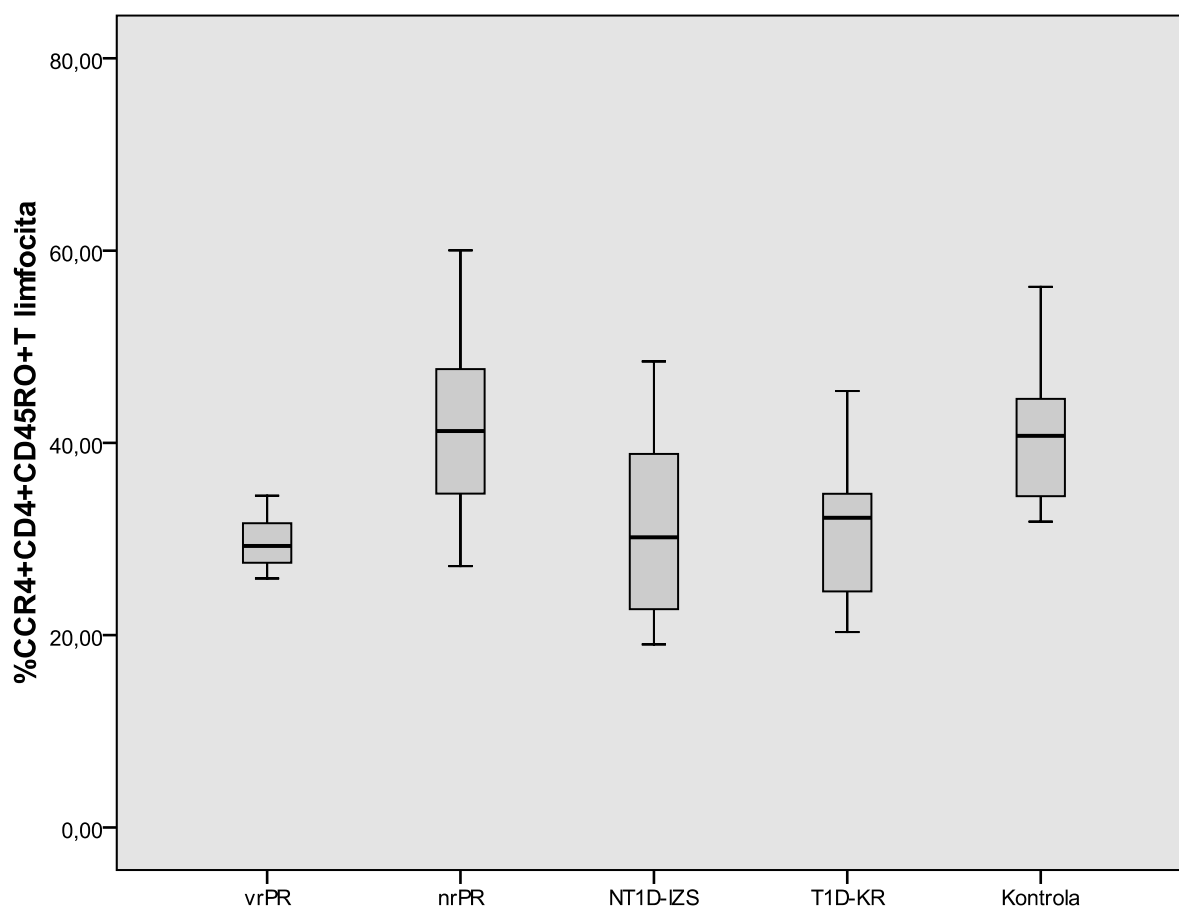
**Grafikon 11.** Nivo  $CCR4^+CD4^+CD45RO^+$  T limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika. Procenat  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocita koji eksprimiraju CCR4 u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a error barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa PR/NT1D-IZS ( $p < 0.01$ ), kao i NT1D-IZS/kontrola ( $p < 0.01$ ).

NT1D-IZS/ T1D-KR ( $p = NS$ ), PR/kontrola ( $p = NS$ )



**Grafikon 12.** Nivo  $CCR4^+CD4^+CD45RO^+$  T limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Procenat  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocita koji ekspimiraju CCR4 u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a eror barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/ nrPR ( $p < 0.001$ ), vrPR/kontrola ( $p < 0.001$ ).

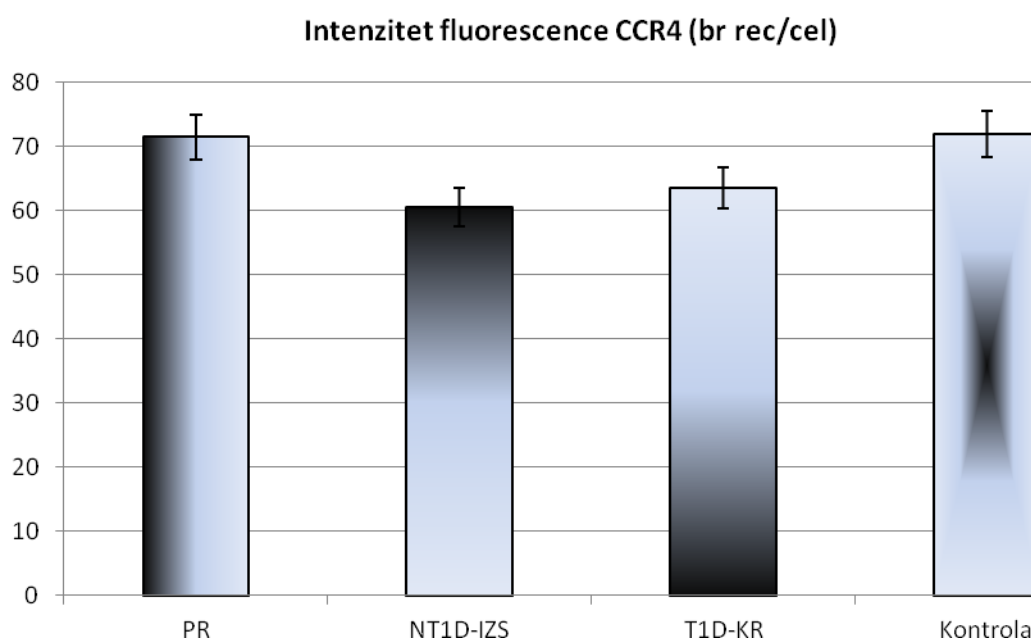
vrPR/NT1D-IZS ( $p = NS$ ), vrPR/T1D-KR ( $p = NS$ ).

#### 4.1.6. Analiza intenziteta fluorescence CCR4 hemokinskih receptora na memorijskim T limfocitima kao pokazatelja Th2 imunskog odgovora u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D

Intenzitet fluorescence CCR4<sup>+</sup> receptora u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2, je bio značajno veći u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS. Istovremeno, u PR pacijenata sa T1D, intenzitet fluorescence CCR4<sup>+</sup> receptora, je bio manji nego u kontrolnih ispitanika, ali nije dostigao statističku značajnost (Grafikon 13).

Međutim, intenzitet fluorescence CCR4<sup>+</sup> receptora u vrPR, bio je značajno manji u poređenju sa nrPR, i u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, ali nije bilo statističke značajnosti u nivou intenziteta fluorescence CCR4<sup>+</sup> receptora poređenjem vrPR i pacijenata sa N-T1D u IZS i KR (Grafikon 14).

Sa druge strane, intenzitet fluorescence CCR4<sup>+</sup> receptora u pacijenata sa N-T1D u IZS je bio značajno manji u poređenju sa kontrolnim ispitanicima a nije se značajno razlikovao u poređenju sa intenzitetom fluorescence CCR4<sup>+</sup> receptora utvrđenim u pacijenata u KR bolesti (Grafikon 13).



**Grafikon 13.** Intenzitet fluorescence CCR4 receptora na CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T limfocitima u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika



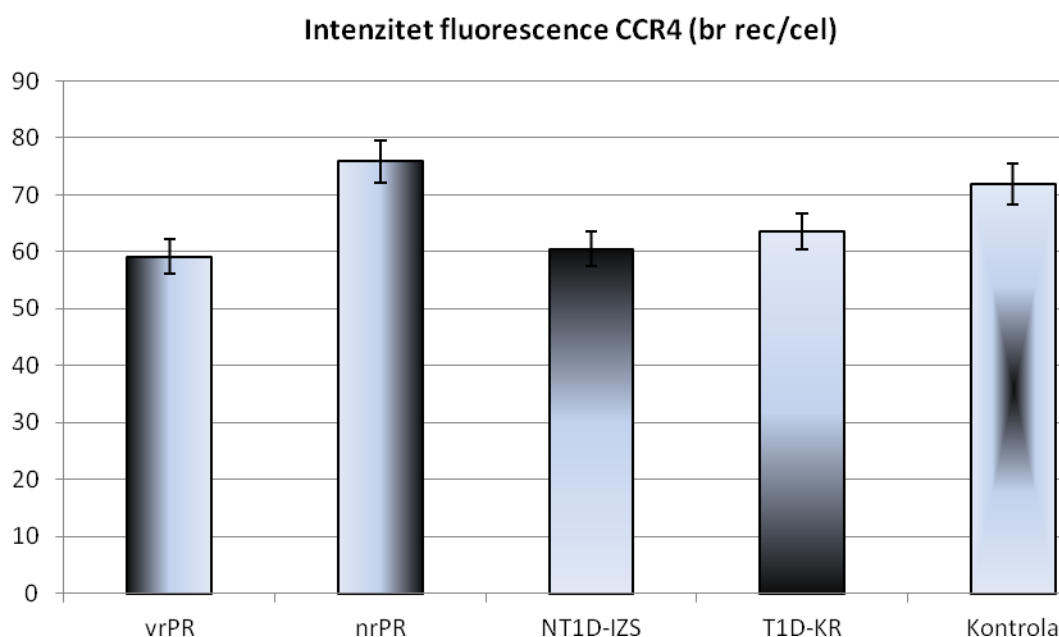
Broj CCR4 receptora po  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocitu u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa PR/NT1D-IZS ( $p < 0.01$ ), kao i NT1D-IZS/kontrola ( $p < 0.05$ ).

NT1D-IZS/ T1D-KR ( $p = NS$ ), PR/kontrola ( $p = NS$ )



**Grafikon 14.** Intenzitet fluorescence CCR4 receptora na  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocitima u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Broj CCR4 receptora po  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocitu u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

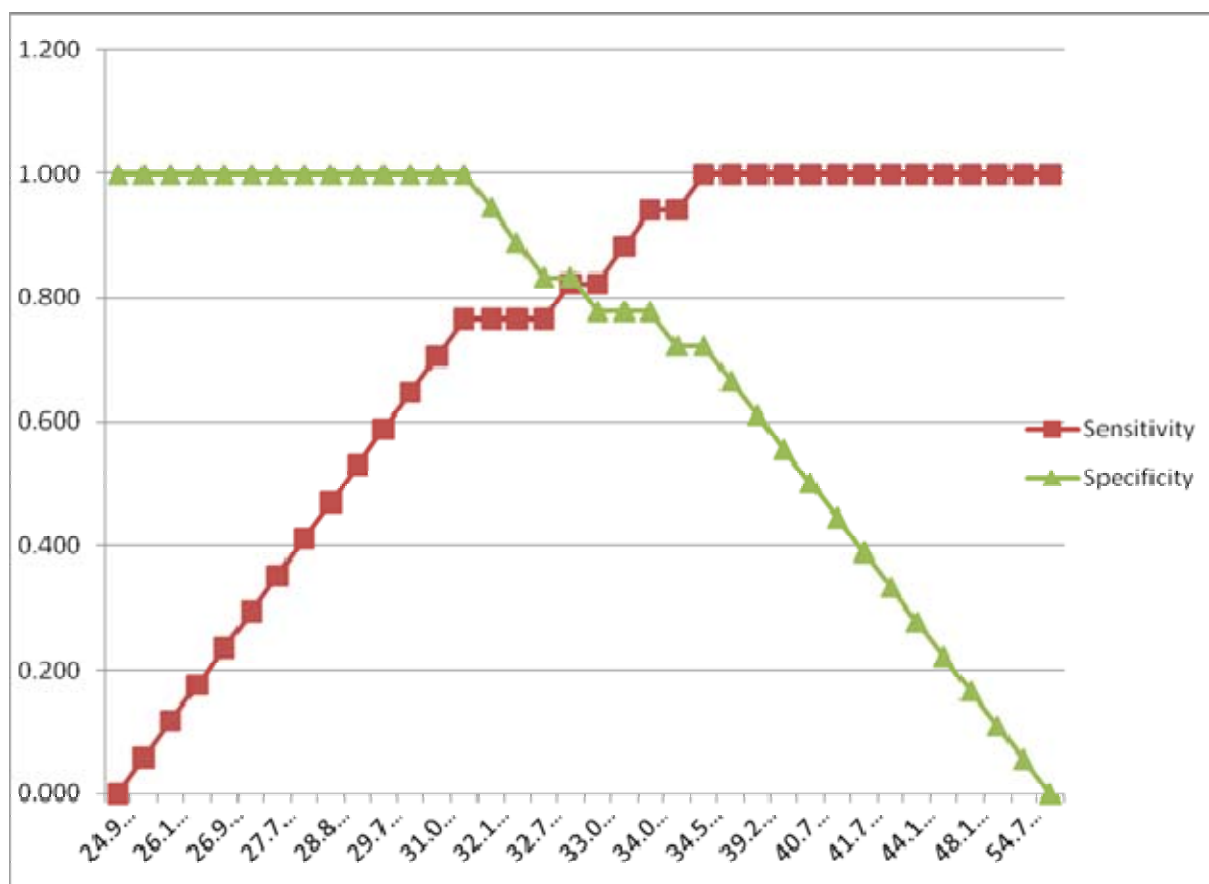
Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/ nrPR ( $p < 0.001$ ), vrPR/kontrola ( $p < 0.01$ ).

vrPR/NT1D-IZS ( $p = NS$ ), vrPR/T1D-KR ( $p = NS$ ).

#### 4.1.7. Definisane nivoa $CCR4^+$ T memorijskih limfocita koji razdvaja prve rođake pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike

Takođe, definisali smo i tačku preseka (cut off point), odnosno nivo  $CCR4^+CD4^+CD45RO^+$  T limfocita u perifernoj krvi, na kojem je moguće razdvojiti grupu vrPR i kontrolne ispitanike. Izračunati nivo je 32.83% (Grafikon 15).



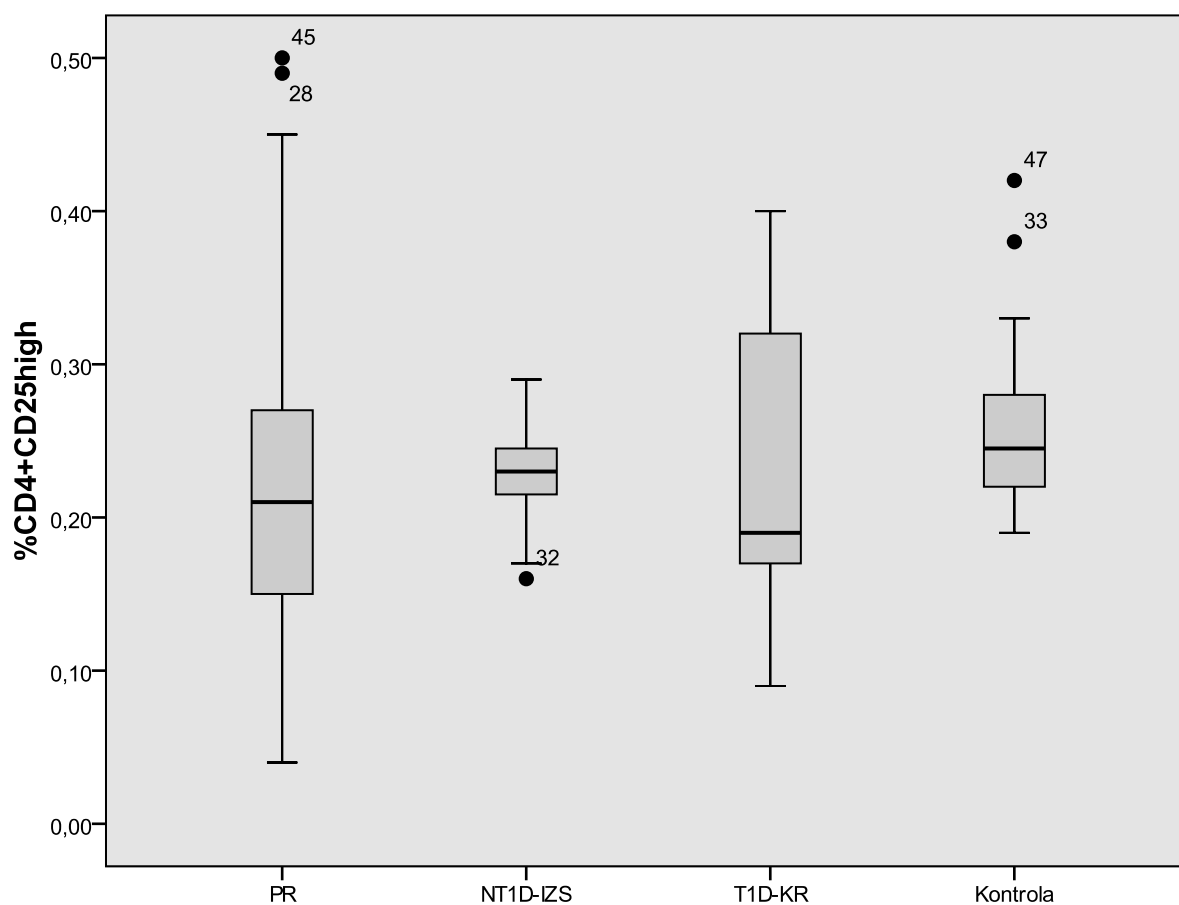
**Grafikon 15.** Nivo  $CCR4^+CD4^+CD45RO^+$  T limfocita u perifernoj krvi: određivanje tačke razdvajanja (cut off point) grupe prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i kontrolnih ispitanika. Izračunati nivo je 32.83%.

#### **4.1.8. Analiza promene nivoa $CD4^+CD25^{high}$ T limfocita kao pokazatelja nivoa T regulatorne subpopulacije u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

Analizom nivoa  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2, utvrdili smo da se nivo  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita nije značajno razlikovao u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR bolesti, kao i kontrolnim ispitanicima (Grafikon 16).

Međutim, nivo  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita u vrPR je bio značajno manji u poređenju sa nr PR. Istovremeno, nivo  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita u vrPR je bio značajno manji u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, kao i pacijentima sa N-T1D u IZS i KR bolesti (Grafikon 17).

Analizom nivoa  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bolesti, utvrđeno je da je nivo  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bolesti bio manji u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, ali bez statističke značajnosti. Istovremeno, nije bilo statistički značajne razlike u nivou  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita između pacijenata u IZS i pacijenata u KR bolesti (Grafikon 16).



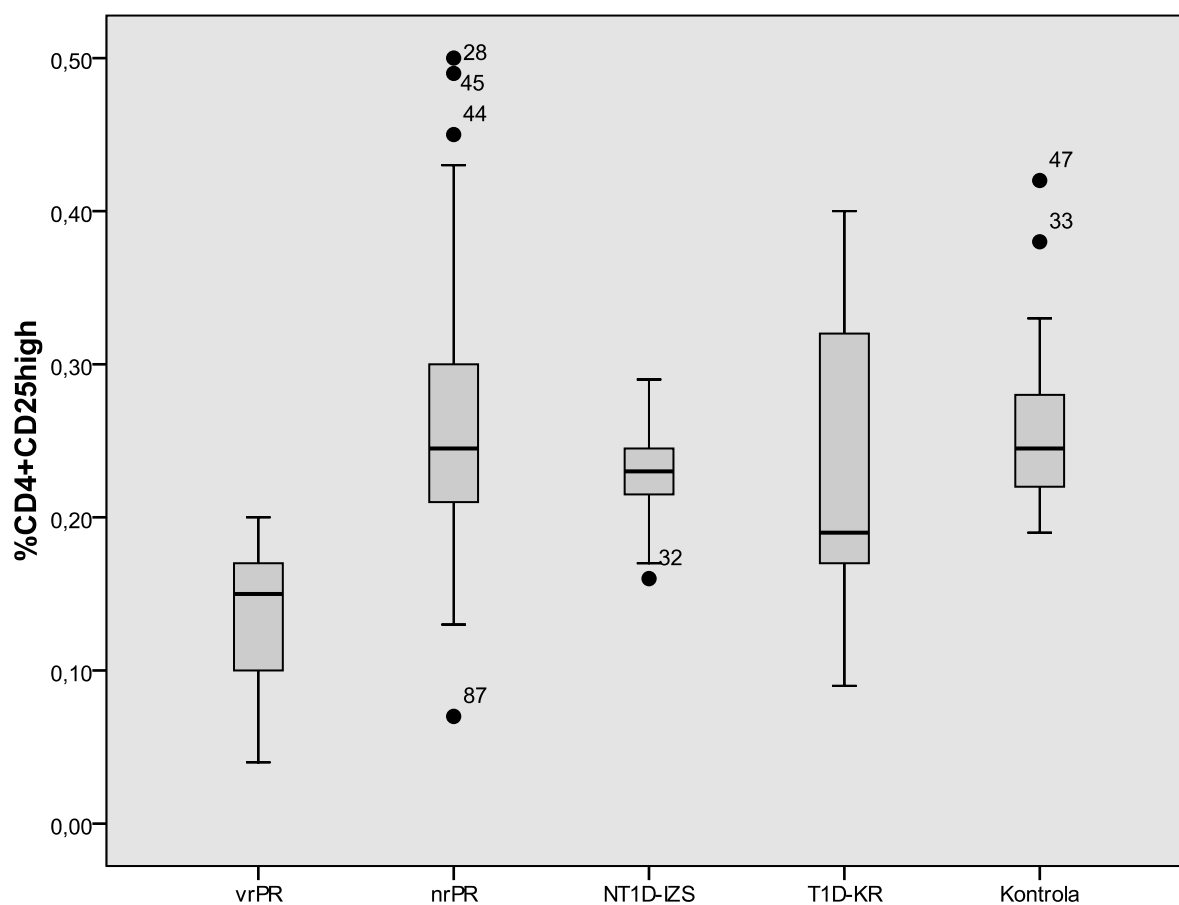
**Grafikon 16.** Nivo  $CD4^+CD25^{high}$  limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Procenat  $CD4^+CD25^{high}$  limfocita od ukupnog broja limfocita periferne krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a eror barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne razlike između grupa nisu registrovane ( $p=NS$ ).



**Grafikon 17.** Nivo  $CD4^+CD25^{high}$  limfocita u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Procenat  $CD4^+CD25^{high}$  limfocita od ukupnog broja limfocita periferne krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a error barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/nrPR ( $p < 0.001$ ), vrPR/kontrola ( $p < 0.001$ ), vrPR/NT1D-IZS ( $p < 0.001$ ), vrPR/T1D-KR ( $< 0.05$ ).

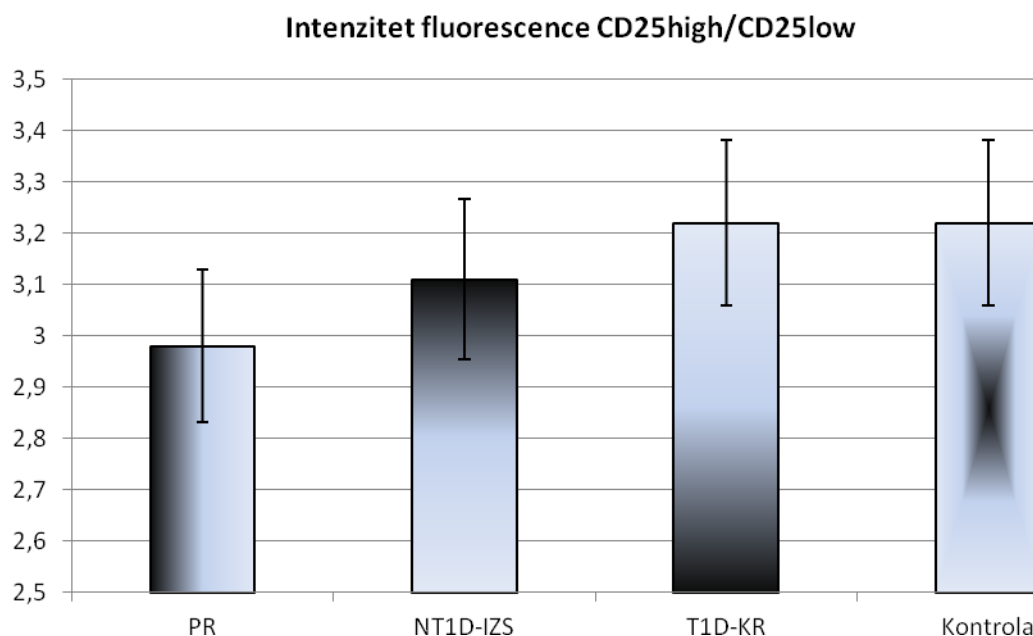
#### ***4.1.9. Analiza odnosa intenziteta fluorescence CD25<sup>+</sup> markera na CD4<sup>+</sup> T limfocitima kao pokazatelja nivoa T regulatorne subpopulacije u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D***

Merenjem intenziteta fluorescence CD25<sup>+</sup> markera na CD4<sup>+</sup> T limfocitima određivan je odnos intenziteta fluorescence CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T limfocita, a veći odnos intenziteta fluorescence ukazivao je na prisustvo većeg procenta ćelija sa većim intenzitetom fluorescence (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfociti) u poređenju sa ćelijama sa manjim intenzitetom fluorescence (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T limfociti).

U tom smislu, odnos intenziteta fluorescence CD25<sup>+</sup> markera u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2, nije se značajno razlikovao u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR bolesti, i kontrolnim ispitanicima (Grafikon 18).

Međutim, odnos intenziteta fluorescence CD25<sup>+</sup> markera u vrPR je bio značajno manji u poređenju sa nrPR i kontrolnim ispitanicima, kao i sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR bolesti (Grafikon 19)

Analizom odnosa intenziteta fluorescence CD25<sup>+</sup> markera u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bolesti, utvrđeno je da je odnos intenziteta fluorescence CD25<sup>+</sup> markera u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bolesti bio manji u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, ali bez statističke značajnosti. Istovremeno, nije bilo statistički značajne razlike u odnosu intenzitet fluorescence CD25<sup>+</sup> markera između pacijenata u IZS i KR bolesti (Grafikon 18).



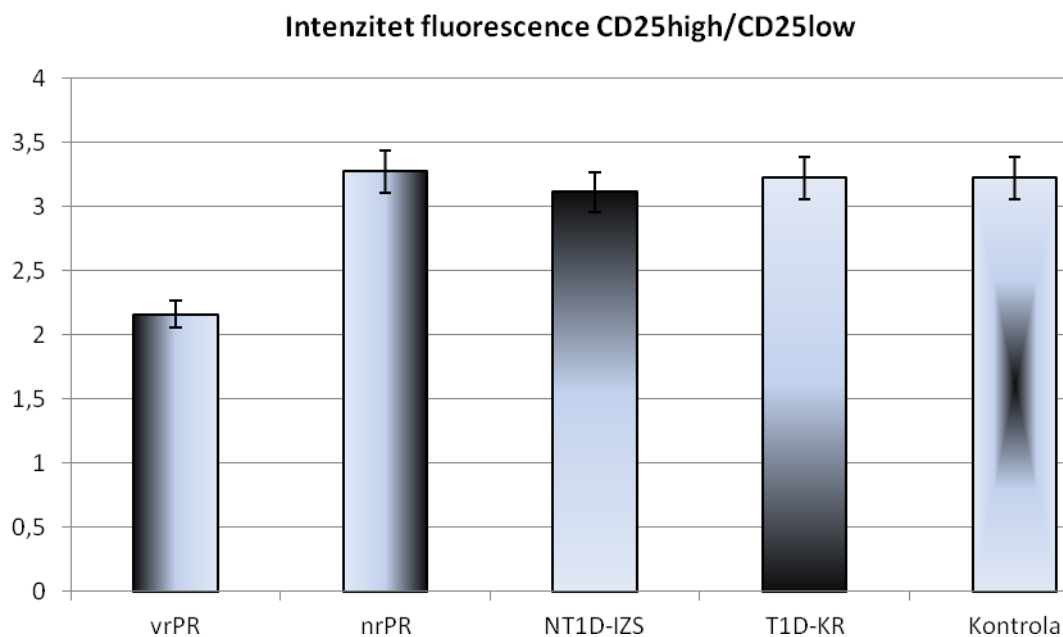
**Grafikon 18.** Odnos intenziteta fluorescence CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> markera na CD4<sup>+</sup> limfocitima u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Odnos intenziteta fluorescence CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> markera na CD4<sup>+</sup> limfocitima u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne razlike između grupa nisu registrovane (p=NS).



**Grafikon 19.** Odnos intenziteta fluorescence CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> markera na CD4<sup>+</sup> limfocitima u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Odnos intenziteta fluorescence CD25<sup>high</sup>/CD25<sup>low</sup> markera na CD4<sup>+</sup> limfocitima u perifernoj krvi određen je imunofluorescencijom i protočnom citofluorometrijom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

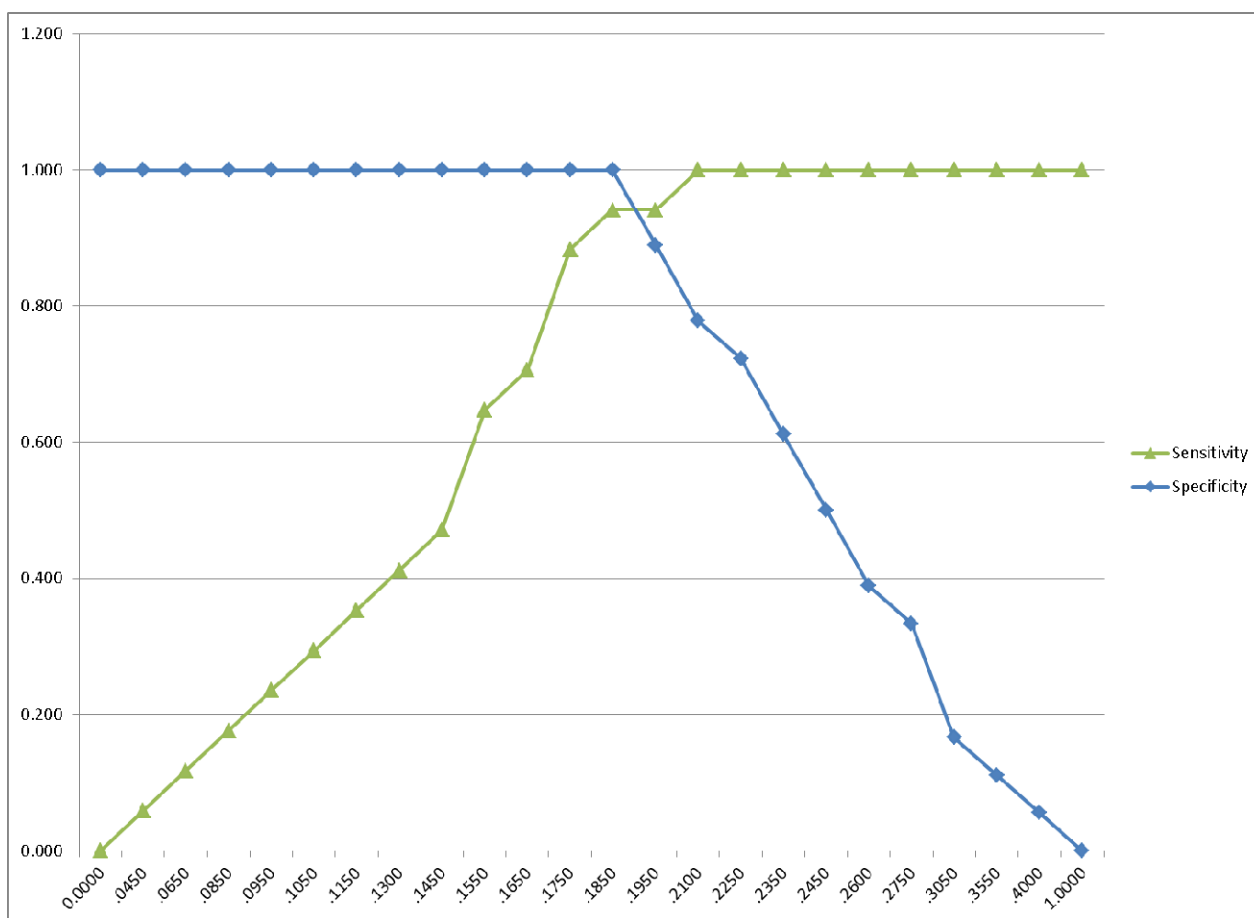
Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/nrPR ( $p < 0.001$ ), vrPR/kontrola ( $p < 0.01$ ), vrPR/NT1D-IZS ( $p < 0.01$ ), vrPR/T1D-KR ( $< 0.05$ ).



#### 4.1.10. Definisane nivoa $CD4^+CD25^{high}$ T limfocita koji razdvaja prve rođake pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike

Definisali smo i tačku preseka (cut off point), odnosno nivo  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita u perifernoj krvi, na kojem je moguće razdvojiti grupu vrPR i kontrolne ispitanike. Izračunati nivo je 0.19%. (Grafikon 20).



**Grafikon 20.** Nivo  $CD4^+CD25^{high}$  limfocita u perifernoj krvi: određivanje tačke razdvajanja (cut off point) grupe prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i kontrolnih ispitanika. Izračunati nivo je 0.19%.

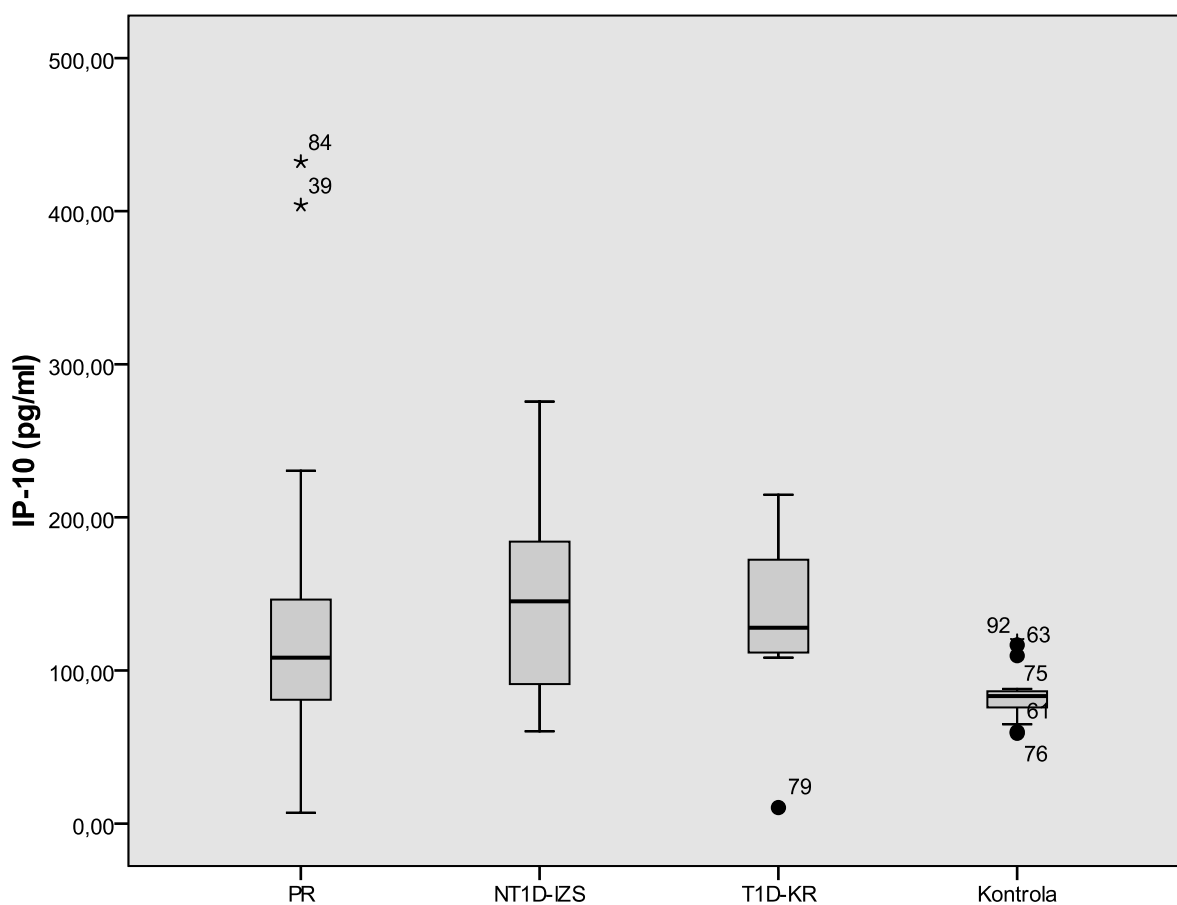
#### ***4.2. Analiza promene nivoa i odnosa Th1, Th2 i T regulatornih tipova hemokina/citokina u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D***

Smatra se da je nivo cirkulišućih hemokina marker ćelijske imunosti. U tom smislu, analizirali smo nivo IP-10, Th1, i TARC, Th2- tipa hemokina, liganda za CXCR3 i CCR4 receptore, kao i nivo TGF $\beta$ , medijatora supresorskog dejstva T reg, u PR pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS i KR i kontrolnih ispitanika.

##### ***4.2.1. Analiza promene nivoa IP-10, Th1 tipa hemokina, u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D***

Analizom nivoa IP-10 u perifernoj krvi, utvrdili smo da je u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2, nivo IP-10 bio statistički neznačajno niži, odnosno sličan nivou utvrđenom u pacijentima sa N-T1D kako u IZS tako i u KR bolesti. Istovremeno, nivo IP-10 u PR pacijenata sa T1D je bio statistički neznačajno viši u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Grafikon 21).

Nivo IP-10 u vrPR je bio značajno viši u poređenju sa nrPR i kontrolnim ispitanicima a sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR (Grafikon 22). Istovremeno, u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR, nivo IP-10 je bio značajno viši u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, a nije se značajno razlikovao poređenjem grupa N-T1D u IZS i KR (Grafikon 21).



**Grafikon 21.** Nivo IP-10 u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

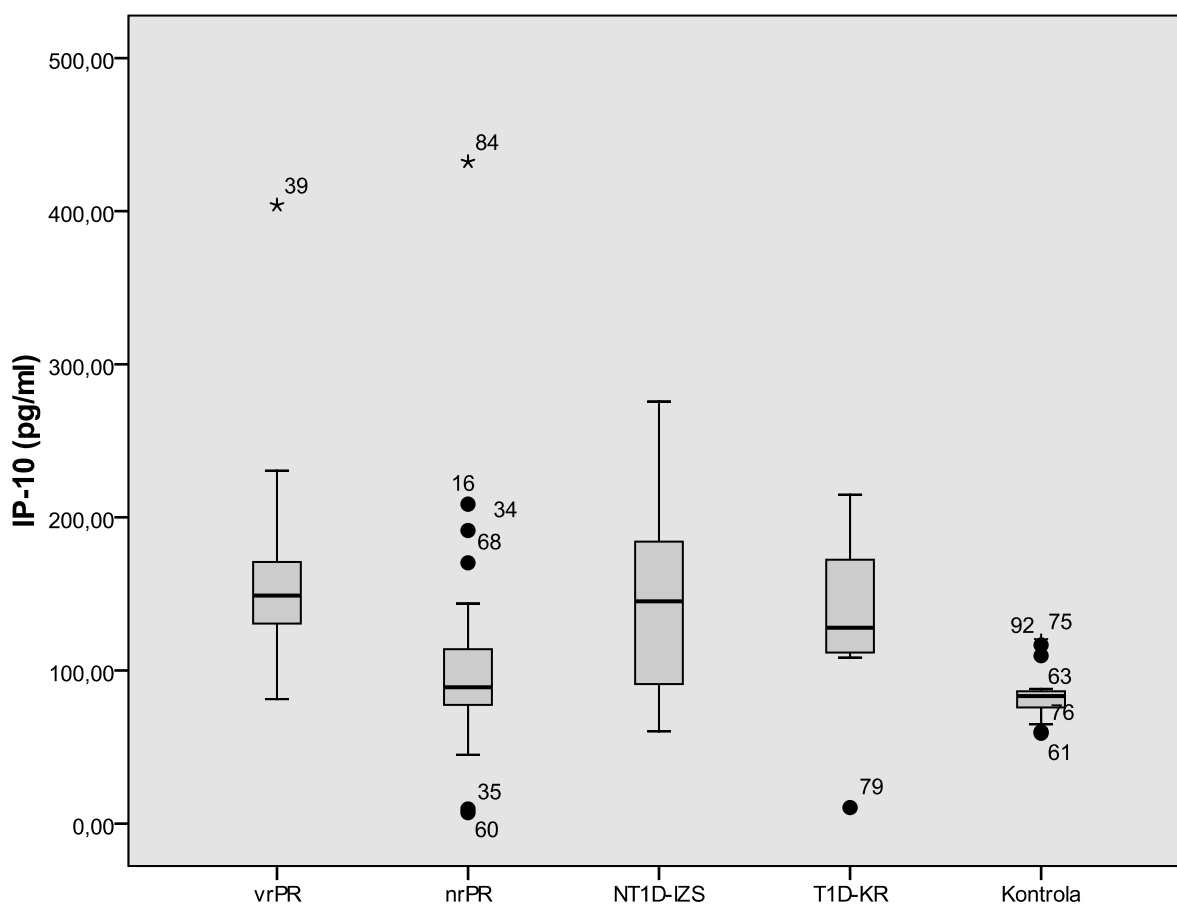
Nivo IP-10 u perifernoj krvi određen je ELISA metodom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a eror barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa NT1D-IZS/kontrola ( $p < 0.01$ ) i T1D-KR/kontrola ( $p < 0.05$ ).

NT1D-IZS/T1D-KR ( $p = \text{NS}$ ), PR/kontrola ( $p = \text{NS}$ ), PR/NT1D-IZS ( $p = \text{NS}$ ), PR/T1D-KR ( $p = \text{NS}$ )



**Grafikon 22.** Nivo IP-10 u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Nivo IP-10 u perifernoj krvi određen je ELISA metodom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a eror barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

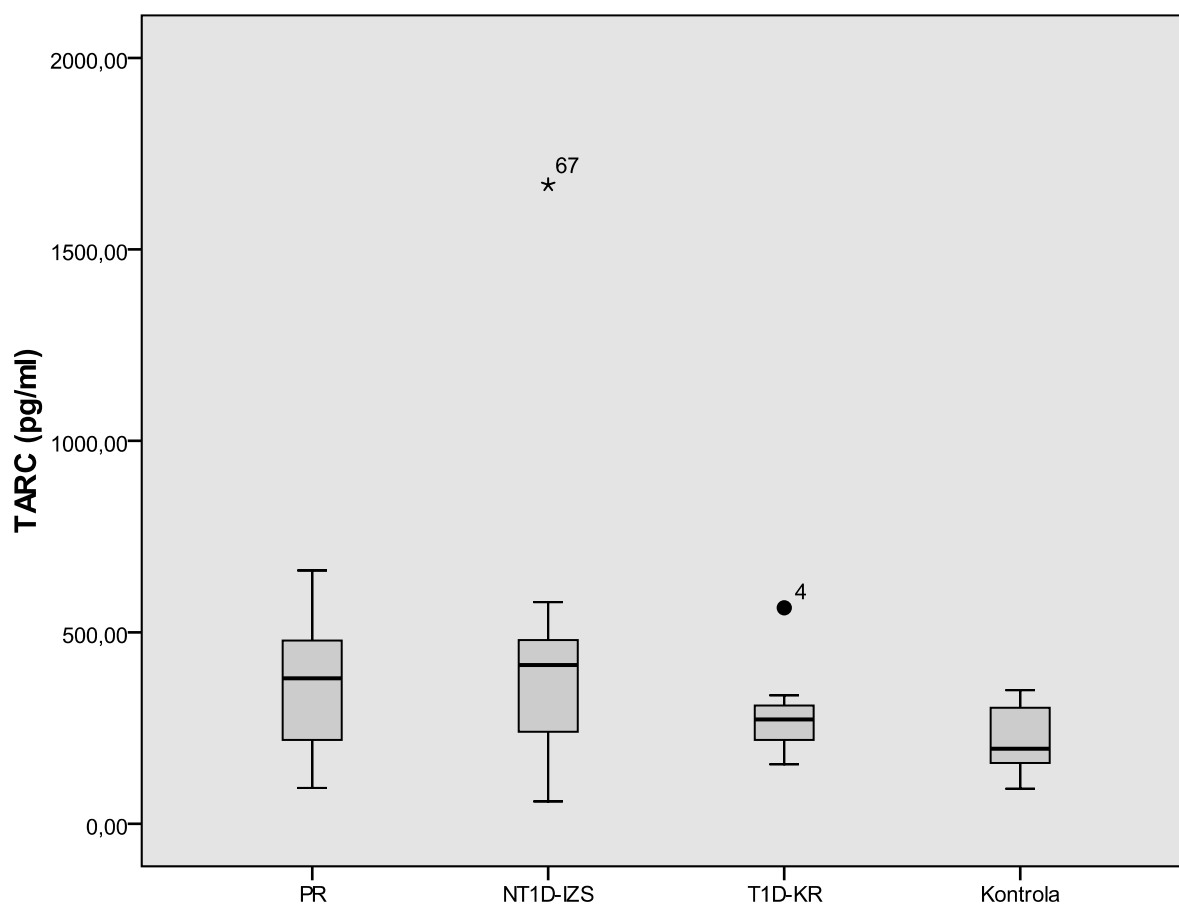
Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/nrPR ( $p < 0.05$ ) i vrPR/kontrola ( $p < 0.01$ ).

vrPR/NT1D-IZS ( $p = \text{NS}$ ), vrPR/T1D-KR ( $p = \text{NS}$ ).

#### **4.2.2. Analiza promene nivoa TARC, Th2 tipa hemokina, u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

Analizom nivoa TARC u perifernoj krvi, utvrdili smo da je u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2, nivo TARC bio statistički neznačajno niži, odnosno sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D kako u IZS tako i u KR bolesti. Istovremeno, nivo TARC u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2 je bio viši u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, ali bez dostizanja statističke značajnosti (Grafikon 23).

Nivo TARC u vrPR je bio statistički značajno viši u poređenju sa nrPR i kontrolnim ispitanicima i sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR (Grafikon 24). Istovremeno, u pacijenata sa N-T1D u IZS, nivo TARC je bio značajno viši u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, a nije se razlikovao od nivoa u pacijenata u KR bolesti (Grafikon 23).



**Grafikon 23.** Nivo TARC u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

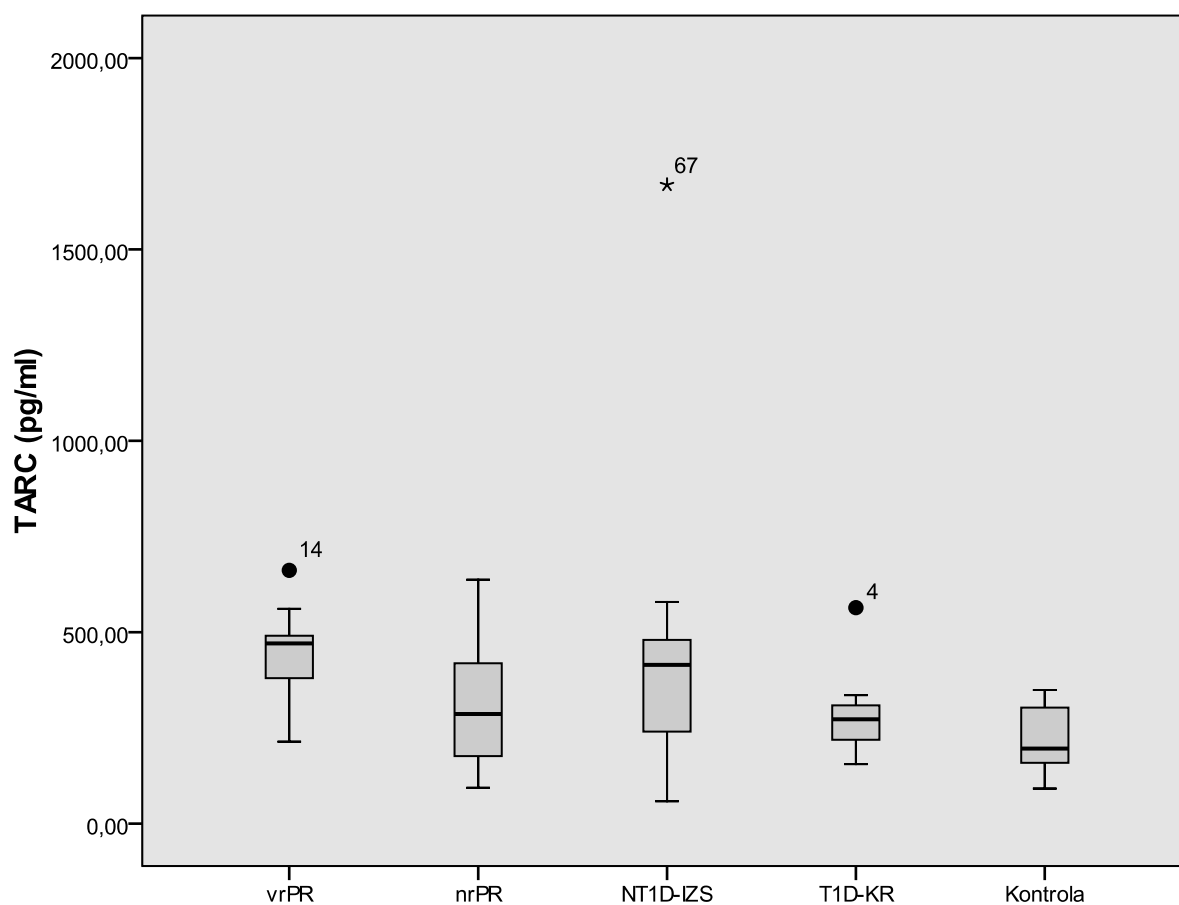
Nivo TARC u perifernoj krvi određen je ELISA metodom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a eror barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa NT1D-IZS/kontrola ( $p < 0.05$ ).

NT1D-IZS/T1D-KR ( $p = \text{NS}$ ), PR/kontrola ( $p = \text{NS}$ ), PR/NT1D-IZS ( $p = \text{NS}$ ), PR/T1D-KR ( $p = \text{NS}$ )



**Grafikon 24.** Nivo TARC u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Nivo TARC u perifernoj krvi određen je ELISA metodom.

Horizontalne linije reprezentuju medijanu, a box plotovi obuhvataju 25. i 75. percentil a error barovi 10. i 90. percentil. Vrednosti izvan intervala su označene.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/nrPR ( $p < 0.05$ ) i vrPR/kontrola ( $p < 0.01$ ).

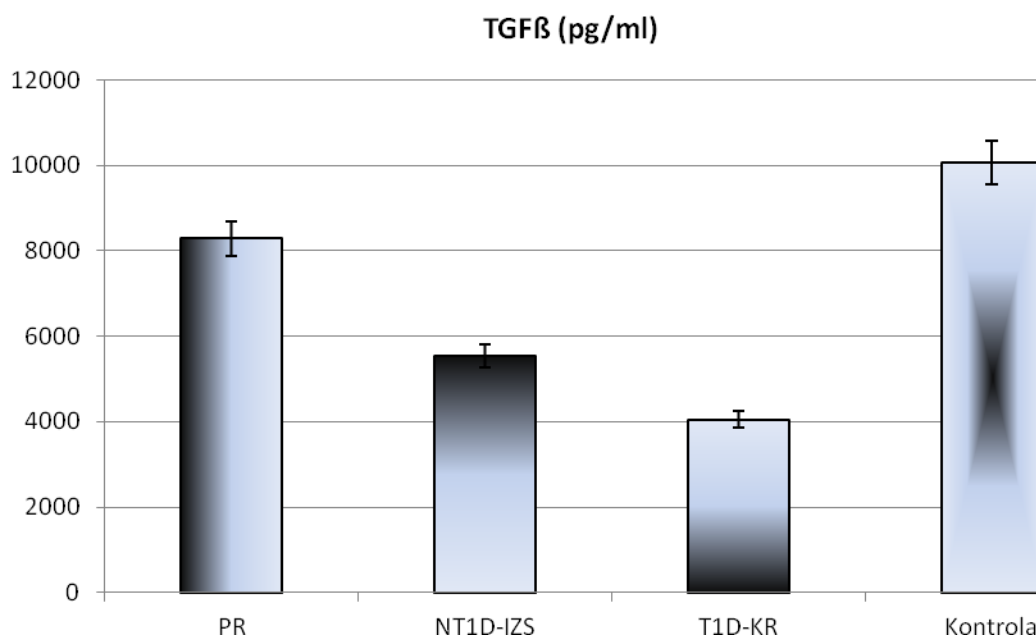
vrPR/NT1D-IZS ( $p = \text{NS}$ ), vrPR/T1D-KR ( $p = \text{NS}$ )

#### 4.2.3. Analiza nivoa TGF $\beta$ , antiinflamatornog citokina, kao pokazatelja funkcionalnosti subpopulacije T regulatornih limfocita, u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D

Kada smo analizirali nivo TGF $\beta$ , antiinflamatornog citokina i pokazatelja funkcionalnosti subpopulacije T regulatornih limfocita u perifernoj krvi, utvrdili smo da je u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2, nivo TGF $\beta$  bio značajno viši u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR. Sa druge strane, nivo TGF $\beta$  u perifernoj krvi, u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA-2 je bio niži u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, ali nije dostigao statističku značajnost (Grafikon 25).

Nivo TGF $\beta$  u vrPR je bio statistički neznačajno niži u poređenju kontrolnim ispitanicima, i značajno viši u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR (Grafikon 26).

Istovremeno, u pacijenata sa N-T1D u IZS i u KR bolesti, nivo TGF $\beta$  je bio značajno niži u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Grafikon 25).



**Grafikon 25.** Nivo TGF $\beta$  u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Nivo TGF $\beta$  u perifernoj krvi određen je ELISA metodom.

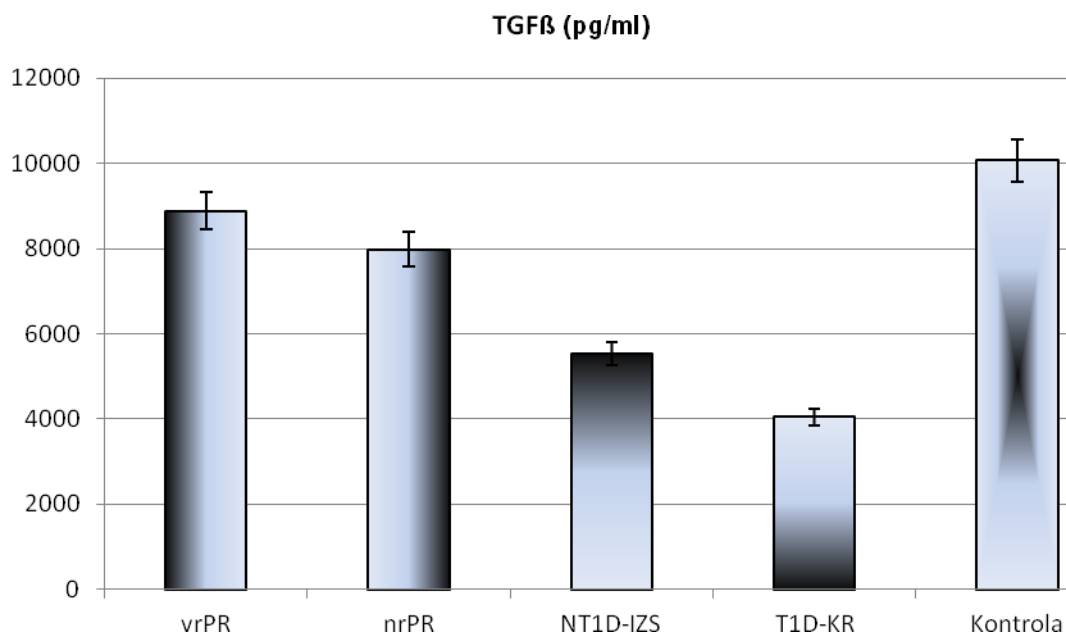
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.



Statistički značajne su razlike između grupa PR/NT1D-IZS ( $p < 0.001$ ), PR/T1D-KR ( $p < 0.001$ ), NT1D-IZS /kontrola ( $p < 0.001$ ) i T1D-KR/kontrola ( $p < 0.001$ ) .

PR/kontrola ( $p = \text{NS}$ )



**Grafikon 26.** Nivo TGF $\beta$  u perifernoj krvi: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Nivo TGF $\beta$  u perifernoj krvi određen je ELISA metodom.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/NT1D-IZS ( $p < 0.01$ ), vrPR/T1D-KR ( $p < 0.001$ ), vrPR/kontrola ( $p = \text{NS}$ )

#### 4.2.4. Istraživanje povezanosti nivoa IP-10, TARC i TGFβ i nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita u prvih rođaka pacijenata sa T1D

Istraživanjem povezanosti nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita i nivoa IP-10 (Th1 tipa) i TARC (Th2 tipa) hemokina u perifernoj krvi nije utvrđena značajna korelacija između nivoa IP-10, TARC i nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, u vrPR (Tabela 15).

Istovremeno, nije utvrđena statistički značajna povezanost nivoa TGFβ, antiinflamatornog citokina i pokazatelja funkcionalnosti T regulatornih ćelija, i nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita u vrPR (Tabela 15).

**Tabela 15.** Analiza povezanosti nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> T memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita i nivoa IP-10, TARC i TGFβ u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR)

Parametar	Subpopulacije T limfocita			
		CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>
IP-10	r	-0.154	-0.355	-0.121
	p	0.554	0.162	0.645
TARC	r	-0.096	-0.191	-0.110
	p	0.715	0.462	0.675
TGFβ	r	0.203	-0.083	-0.071
	p	0.434	0.751	0.785

Značajnost korelacije ispitivana Spearman-ovim testom.

p=NS

**4.3. Istraživanje povezanosti promena nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T reg imunskog odgovora, i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

U prethodnim studijama je pokazano postojanje inverzne korelacije između celularne i humoralne imunosti na određene beta ćelijske antigene, uključujući GAD antigen (29). Međutim, povezanost nivoa subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita sa različitim funkcionalnim svojstvima i nivoa antitela GAD i IA-2 u PR pacijenata sa T1D nije detaljno ispitivana.

**4.3.1. Istraživanje povezanosti promena nivoa CXCR3<sup>+</sup> i CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita, kao pokazatelja Th1 i Th2 imunskog odgovora i nivoa antitela na beta ćelijske antigene u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

Istraživanjem povezanosti nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup> i CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita, kao pokazatelja Th1 i Th2 imunskog odgovora, i nivoa antitela u perifernoj krvi nije utvrđena značajna korelacija između nivoa antitela GAD i IA-2 i nivoa CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita, kako u vrPR pacijenata sa T1D (Tabela 16), tako i u nrPR (Tabela 17).

Analiziranjem povezanosti nivoa antitela GAD i IA-2 i nivoa CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita kako u vrPR (Tabela 16), tako i u nr PR, nije utvrđena značajna korelacija (Tabela 17).

**4.3.2. Istraživanje povezanosti promena nivoa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja T regulatornog imunskog odgovora, i nivoa antitela na beta ćelijske antigene u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

Istraživanjem povezanosti nivoa subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita i nivoa antitela u perifernoj krvi nije utvrđena značajna korelacija između nivoa antitela GAD i IA-2 i nivoa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita kako u vrPR (Tabela 16), tako i u nrPR (Tabela 17).

**Tabela 16.** Analiza povezanosti promena nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T reg imunskog odgovora, i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR)

Subpopulacije T limfocita				
Antitela		CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>
GAD	r	0.236	-0.481	0.011
	p	0.362	0.051	0.966
IA-2	r	0.264	-0.316	0.151
	p	0.305	0.217	0.564

Značajnost korelacije ispitivana Pearson-ovim testom.

p=NS

**Tabela 17.** Analiza povezanosti promena nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th, Th2 i T reg imunskog odgovora, i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 u perifernoj krvi u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR)

Subpopulacije T limfocita				
Antitela		CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>
GAD	r	0.097	0.244	0.204
	p	0.587	0.164	0.246
IA-2	r	-0.262	0.211	0.255
	p	0.134	0.231	0.146

Značajnost korelacije ispitivana Pearson-ovim testom.

p=NS

#### 4.4. Istraživanje povezanosti nivoa IP-10, TARC i TGFβ i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 u perifernoj krvi prvih rođaka pacijenata sa T1D

Istraživanjem povezanosti nivoa IP-10 i TARC i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 nije utvrđena značajna korelacija između nivoa IP-10, TARC i nivoa GAD i IA-2, kako u vrPR (Tabela 18), tako i u nrPR (Tabela 19).

Istraživanjem povezanosti nivoa TGFβ i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 nije utvrđena značajna korelacija između nivoa TGFβ i nivoa GAD i IA-2, kako u vrPR (Tabela 18), tako i u nrPR (Tabela 19).

**Tabela 18.** Analiza povezanosti nivoa IP-10, TARC i TGFβ i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR)

Antitela		Citokini		
		IP-10	TARC	TGFβ
GAD	r	0.222	0.340	0.275
	p	0.392	0.182	0.286
IA-2	r	0.201	-0.054	0.001
	p	0.438	0.837	0.996

Značajnost korelacije ispitivana Spearman-ovim testom.

p=NS

**Tabela 19.** Analiza povezanosti nivoa IP-10, TARC i TGF $\beta$  i nivoa antitela na beta ćelijske antigene GAD i IA-2 u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR)

Antitela		Citokini		
		IP-10	TARC	TGF $\beta$
GAD	r	-0.157	0.168	0.137
	p	0.377	0.342	0.439
IA-2	r	-0.134	0.011	- 0.012
	p	0.450	0.950	0.948

Značajnost korelacije ispitivana Spearman-ovim testom.

p=NS

**4.5. Istraživanje povezanosti promena nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T regulatornog imunskog odgovora u perifernoj krvi, sa promenama u nivou insulinske sekrecije u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

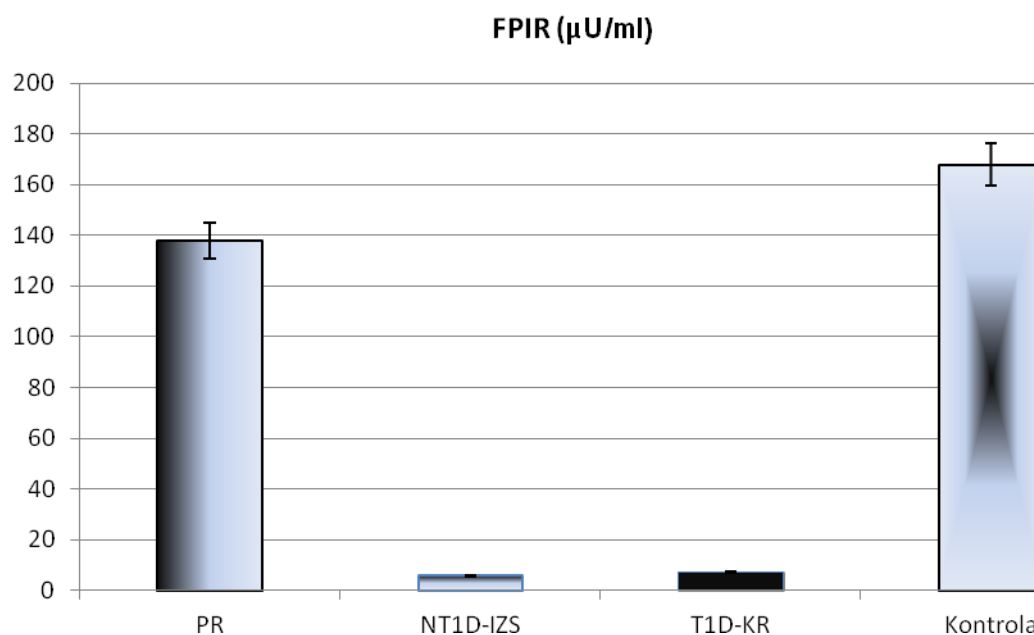
Nedavno je pokazano da se T1D ranije manifestuje u osoba u kojih postoji dvojni defekt, lezija beta ćelija i insulinska rezistencija (217,218). Smatra se da je određivanje prve faze insulinskog odgovora (first phase of insulin response-FPIR), pomoću testa intravenske stimulacije glikozom, metoda izbora za ‘stepenovanje’ prekliničke faze oštećenja beta ćelijske funkcije (219).

U tom smislu smo u našem istraživanju u prvih rođaka obolelih od T1D određivali i prvu fazu insulinskog odgovora izraženu kao FPIR, korišćenjem IVGTT-a.

**4.5.1. Analiza nivoa prve faze insulinske sekrecije u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

Analiziranjem nivoa FPIR u PR pacijenata sa T1D utvrđeno je da je nivo FPIR bio značajno veći u poređenju sa nivoom utvrđenim u pacijenata sa T1D u IZS i KR (Grafikon 27). Nasuprot tome, nivo FPIR je bio značajno manji u pacijenata sa sa T1D u IZS i KR u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Grafikon 27).

Istovremeno, nivo FPIR u vrPR je bio značajno manji u poređenju sa nrPR i kontrolnim ispitanicima, ali još uvek u granicama normale predviđene za tu starosnu dob. Sa druge strane, nivo FPIR u vrPR je bio značajno veći u poređenju sa pacijentima sa T1D u IZS i KR (Grafikon 28).



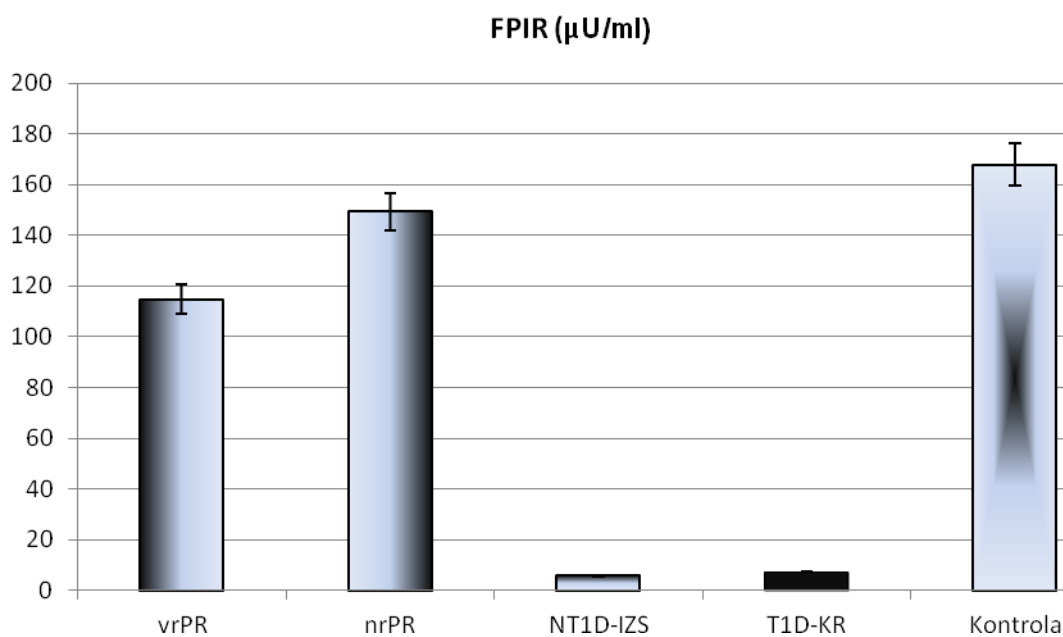
**Grafikon 27.** Nivo insulinske sekrecije: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika.

Nivo prve faze insulinske sekrecije (first phase of insulin response-FPIR) u perifernoj krvi određen je tokom IVGTT-a.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa PR/NT1D-IZS ( $p < 0.001$ ), PR/T1D-KR ( $p < 0.001$ ), PR/kontrola ( $p < 0.001$ ), NT1D-IZS /kontrola ( $p < 0.001$ ) i T1D-KR/kontrola ( $p < 0.001$ )



**Grafikon 28.** Nivo insulinske sekrecije: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Nivo FPIR u perifernoj krvi određen je tokom IVGTT-a.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike između grupa vrPR/nrPR ( $p < 0.001$ ), vrPR/NT1D-IZS ( $p < 0.001$ ), vrPR/T1D-KR ( $p < 0.001$ ), vrPR/kontrola ( $p < 0.001$ ).



**4.5.2. Analiza povezanosti promena nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T regulatornog imunskog odgovora u perifernoj krvi, sa promenama u nivou insulinske sekrecije u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

Istraživanjem povezanosti nivoa FPIR i nivoa CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita u prvih rođaka pacijenata sa T1D nije utvrđeno je da postoji značajna povezanost između nivoa FPIR i nivoa CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita, kako u vrPR (Tabela 20), tako i u nrPR (Tabela 21).

Takođe, nije ustanovljena statistički značajna korelacija između nivoa FPIR i nivoa CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita, kako u vrPR (Tabela 20), tako i u nrPR (Tabela 21).

Analizom povezanosti nivoa FPIR i nivoa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita kako u vrPR (Tabela 20), tako i u nrPR (Tabela 21), nije utvrđena statistički značajna korelacija.

**Tabela 20.** Analiza povezanosti promena nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T reg imunskog odgovora u perifernoj krvi, nivoa insulinske sekrecije i nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR)

Subpopulacije T limfocita				
Parametar		CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>
FPIR	r	-0.237	-0.110	0.403
	p	0.360	0.673	0.054
M vrednost	r	0.374	0.043	-0.169
	p	0.139	0.870	0.517

Značajnost korelacije ispitivana Spearman-ovim testom

p=NS

**Tabela 21.** Analiza povezanosti promena nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T reg imunskog odgovora u perifernoj krvi, nivoa insulinske sekrecije i nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rodaka pacijenata sa T1D sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR)

Subpopulacije T limfocita				
Parametar		CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>
FPIR	r	-0.217	-0.063	-0.243
	p	0.218	0.725	0.166
M vrednost	r	0.172	0.266	-0.290
	p	0.331	0.128	0.097

Značajnost korelacije ispitivana Spearman-ovim testom.

p=NS

**4.6. Istraživanje povezanosti promena nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T regulatornog imunskog odgovora u perifernoj krvi, sa promenama nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rodaka pacijenata sa T1D**

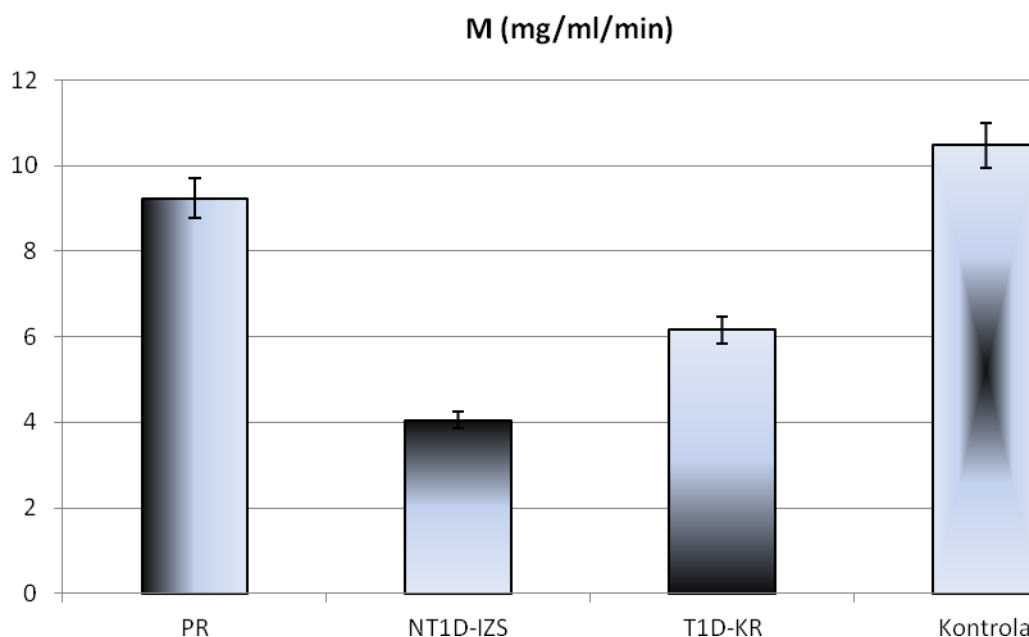
Pokazano je da određivanje samo insulinske sekrecije nije dovoljno, imajući u vidu da je viši nivo insulinske sekrecije detektovan u osoba koje imaju i viši nivo insulinske rezistencije, dok je niži nivo insulinske sekrecije registrovan u insulin-senzitivnijih osoba (220).

U tom smislu smo u našem istraživanju u ispitanika određivali i nivo insulinske senzitivnosti, detektovan metodom hiperinsulinemijskog euglikemijskog klampa, i izražen kao M vrednost.

#### 4.6.1. Analiza nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D

Analiziranjem nivoa M vrednosti u PR pacijenata sa T1D utvrđeno je da je nivo M vrednosti bio značajno veći u poređenju sa nivoom u pacijenata sa T1D u IZS i KR (Grafikon 29). Nasuprot tome, nivo M vrednosti je bio značajno manji u pacijenata sa T1D u IZS i KR u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Grafikon 29).

Istovremeno, M vrednost u vrPR se nije značajno razlikovala u poređenju sa M vrednošću detektovanom u nrPR i kontrolnih ispitanika, ali je bila značajno veća u poređenju sa pacijentima sa T1D u IZS i KR (Grafikon 30).



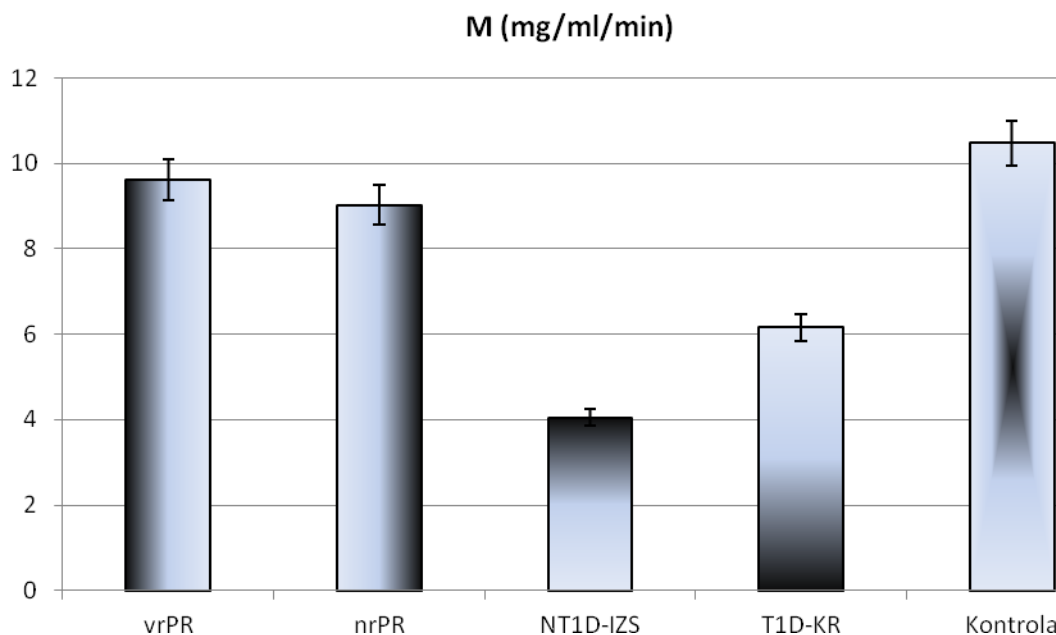
**Grafikon 29.** Nivo insulinske senzitivnosti: poređenje prvih rođaka (PR) pacijenata sa T1D, pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika.

Nivo M vrednosti određen je metodom euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana ANOVA testom.

Statistički značajne razlike su registrovane između grupa PR/NT1D-IZS ( $p < 0.001$ ), PR/ T1D-KR ( $p < 0.01$ ), NT1D-IZS/kontrola ( $p < 0.001$ ), T1D-KR/kontrola ( $p < 0.001$ ).



**Grafikon 30.** Nivo insulinske senzitivnosti: poređenje prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom (vrPR) i niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR), pacijenata sa N-T1D u IZS, KR bolesti i kontrolnih ispitanika

Nivo M vrednosti određen je metodom euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija.

Značajnost razlike ispitivana je ANOVA testom.

Statistički značajne su razlike su registrovane između grupa vrPR/NT1D-IZS ( $p < 0.001$ ), vrPR/T1D-KR ( $p < 0.01$ ).

vrPR/nrPR ( $p = \text{NS}$ ), vrPR/kontrola ( $p = \text{NS}$ )

#### **4.6.2. Analiza povezanosti promena nivoa CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th, Th2 i T regulatornog imunskog odgovora u perifernoj krvi, sa promenama nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D**

Istraživanjem povezanosti nivoa M vrednosti i nivoa CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita u prvih rođaka pacijenata sa T1D nije utvrđeno je da postoji značajna povezanost između nivoa M vrednosti i nivoa CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita, kako u vrPR (Tabela 20), tako i u nrPR (Tabela 21).

Takođe, nije ustanovljena statistički značajna korelacija između nivoa M vrednosti i nivoa CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita, kako u vrPR (Tabela 20), tako i u nrPR (Tabela 21).

Analizom povezanosti nivoa M vrednosti i nivoa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita kako u vrPR (Tabela 20), tako i u nrPR (Tabela 21), nije utvrđena statistički značajna korelacija.

**Tabela 20.** Analiza povezanosti promena nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T reg imunskog odgovora u perifernoj krvi, nivoa insulinske sekrecije i nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (vrPR)

Subpopulacije T limfocita				
Parametar		CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>
FPIR	r	-0.237	-0.110	0.403
	p	0.360	0.673	0.054
M vrednost	r	0.374	0.043	-0.169
	p	0.139	0.870	0.517

Značajnost korelacije ispitivana Spearman-ovim testom

p=NS

**Tabela 21.** Analiza povezanosti promena nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> memorijskih i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th1, Th2 i T reg imunskog odgovora u perifernoj krvi, nivoa insulinske sekrecije i nivoa insulinske senzitivnosti u prvih rođaka pacijenata sa T1D sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D (nrPR)

Subpopulacije T limfocita				
Parametar		CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>
FPIR	r	-0.217	-0.063	-0.243
	p	0.218	0.725	0.166
M vrednost	r	0.172	0.266	-0.290
	p	0.331	0.128	0.097

Značajnost korelacije ispitivana Spearman-ovim testom.

p=NS

#### 4.7. Binarna logistička regresiona analiza u prvih rođaka sa visokim i niskim rizikom za ispoljavanje T1D

Primenom binarne logističke regresione analize na naše podatke, utvrdili smo da su nivoi CXCR3<sup>+</sup> i CCR4<sup>+</sup> T memorijskih ćelija, uz nivo hemokina IP-10, nezavisni prediktori za rizik, visok ili nizak, u zdravih PR pacijenata sa T1D (Tabela 22).

**Tabela 22.** Binarna logistička regresiona analiza u prvih rođaka sa visokim (vrPR) i niskim (nrPR) rizikom za ispoljavanje T1D

	Odds Ratio (95% CI)	p - vrednost
IP-10	0.989 – 0.998	0.009
CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	0.431 - 0.833	0.002
CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	1.229 - 2.319	0.001
TARC	0.002 – 0.005	0.342

## 5. DISKUSIJA

U ovom radu pokazano je da je stanje visokog rizika za ispoljavanje T1D, u PR pacijenata sa T1D, povezano sa porastom nivoa CXCR3<sup>+</sup> memorijskih T limfocita i hemokina IP-10, oba pokazatelja Th1 autoimunskog odgovora, uz istovremeno sniženje nivoa CCR4<sup>+</sup> memorijskih T limfocita i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, kao pokazatelja Th2 autoimunskog odgovora, odnosno T regulatorne supresorske subpopulacije, što ukazuje da bi poremećaj nivoa i odnosa ovih CD4<sup>+</sup> subpopulacija T limfocita mogao biti marker rizika za ispoljavanje T1D. U okviru ovog rada, komplementarna istraživanja su pokazala da je u PR pacijenata sa T1D, rizik za ispoljavanje T1D, značajno povezan sa predominacijom proinflamatornog Th1 i supresijom antiinflamatornog Th2 imunskog odgovora, uz defekte u broju regulatornih supresorskih T limfocita, što ukazuje na dinamičan, kompleksan i višestruki poremećaj na nivou odnosa različitih imunskih mehanizama koji bi mogao biti u osnovi razvoja T1D.

Istovremeno, u ovom radu je pokazano da, u pacijenata sa N-T1D, ispoljavanje ali ne i klinički tok bolesti, može biti modulirano na nivou CXCR3<sup>+</sup> Th1 i CCR4<sup>+</sup> Th2 subpopulacija memorijskih T limfocita, odražavajući najverovatnije njihovu regrutaciju u inflamirana pankreasna ostrvca. Takođe, sniženje nivoa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T reg subpopulacije limfocita, bilo je praćeno značajnim iscrpljivanjem njihovog funkcionalnog kapaciteta, u pacijenata sa NT1D na početku bolesti. Dodatno, u radu je ukazano da su promene dominantno u nivou insulinske sekrecije a ne insulinske senzitivnosti povezane sa stanjem povećanog rizika za ispoljavanje T1D.

U literaturi postoje brojni podaci koji se odnose na istu oblast istraživanja, pa će dobijeni rezultati biti diskutovani u svetlu prethodnih saznanja.

Prethodne studije su pokazale da se u PR pacijenata sa T1D mogu detektovati prvenstveno promene u humoralnom imunitetu (231,232). U tom smislu je rizik za oboljevanje od T1D u PR izražavan prisustvom jednog ili više autoantitela u serumu. U dosadašnjim studijama je u zdravih PR pacijenata sa T1D registrovana i povećana reaktivnost T ćelija na antigene ostrvaca pankreasa kao i abnormalnosti limfocitnih subsetova u perifernoj krvi (233). Međutim, analiza defekata celularnog imuniteta u smislu poremećaja na nivou CD4<sup>+</sup> subpopulacija T limfocita, povezanost sa poremećajima humoralnih markera celularnog

imuniteta, kao i korelacija sa rizikom za ispoljavanje T1D, definisanim standardnim imunološkim markerima rizika, u PR pacijenata sa T1D do sada nije u detaljnije ispitivana.

U nameri da se analizira povezanost poremećaja subpopulacija  $CD4^+$  T ćelija, i rizika za ispoljavanje T1D, u radu je određivan nivo subpopulacija  $CD4^+$  T limfocita i to Th1, Th2 i T reg subpopulacije T limfocita u PR pacijenata sa T1D. U tom smislu, u radu je analiziran ukupan broj induktorskih ( $CD4^+$ ) i supresorskih/citotoksičnih ( $CD8^+$ ) T limfocita, a zatim i broj limfocita tri subpopulacije T ćelija i to  $CXCR3^+CD4^+CD45RO^+$ ,  $CCR4^+CD4^+CD45RO^+$  i  $CD4^+CD25^{high}$  limfocita u okviru subpopulacije  $CD4^+$  limfocita.

Analiza je urađena u uzorcima heparizirane periferne venske krvi, primenom metode četvorbojne imunofluorescencije uz korišćenje obeleženih humanih monoklonskih antitela za specifično bojenje površinskih markera pojedinih subpopulacija. Specifična imunofluorescencija u ispitivanim uzorcima je detektovana metodom protočne citofluorometrije.

Prethodni rezultati su pokazali da pojava i tok T1D mogu biti determinisani odnosom imunoregulatornih  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T limfocita (37,39). Imunohistohemijska analiza inflamatornog infiltrata pankreasnih ostrvaca pacijenata sa N-T1D ukazala je na dominaciju  $CD8^+$  T limfocita u infiltratu (3), dok su u pacijenata sa latentnim autoimunim dijabetesom, imunohistohemijskom analizom insulitisa detektovani predominantno  $CD4^+$  T limfociti. Istovremeno, u infiltratu su obavezno prisutni  $CD45^+$  limfociti, u većem broju i makrofazi, manje B limfociti ali i iznenađujuće malo T reg ćelija (3,234). Međutim, nivo ovih subpopulacija T limfocita na periferiji, odnosno u perifernoj krvi PR pacijenata sa T1D i pacijenata sa N-T1D do sada nije detaljnije proučavan.

Kada je u našem radu, analiziran ukupan broj  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  i  $CD45RO^+$  T limfocita, nisu utvrđene značajne razlike u PR pacijenata sa T1D u odnosu na zdrave, pacijente sa N-T1D, u IZS ni u KR bolesti (Grafikon 3,4,5).

Međutim, rezultati ranijih studija sugerisali su postojanje abnormalnosti limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi zdravih PR pacijenata sa T1D, ukazujući na snižene ali i povišene nivoe  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T limfocita (37,108). Istovremeno, u PR je registrovana značajna prekomerna ekspresija  $CD45RO$  "memorijskog" ćelijskog markera ali i  $CD45RA$  "naivnog" ćelijskog markera, kao i poremećaji u broju T reg ćelija (31,109).

Nasuprot ovim novijim saznanjima, podaci iz ranijih studija sprovedenih u pacijenata sa T1D, su ukazali da je broj  $CD4^+$  i odnos  $CD4^+/CD8^+$  T ćelija povećan u ovih pacijenata (235). Međutim u nekim novijim radovima pokazano je upravo suprotno, odnosno da je smanjen broj  $CD4^+$  i odnos  $CD4^+/CD8^+$  T ćelija u pacijenata sa N-T1D (236). Ipak, rezultati najvećeg broja



radova u kojima je analiziran ukupan broj  $CD4^+$  odnosno  $CD8^+$  T limfocita u adekvatno selektiranoj grupi pacijenata sa N-T1D nisu mogli da potvrde značajne promene u odnosu ovih subpopulacija u poređenju sa zdravim ispitanicima, kako u pogledu broja, tako i u pogledu odnosa ispitivanih subpopulacija, što je u saglasnosti i sa podacima dobijenim u ovom radu (237).

Kako na nivou ukupnog broja  $CD4^+$  odnosno  $CD8^+$  T limfocita u perifernoj krvi nisu utvrđene značajne promene koje bi mogle posredovati u destrukciji beta ćelije, a u svetlu podataka drugih autora koji su ukazivali na značajne promene upravo na nivou subsetova  $CD4^+$  T ćelija (235,238), u ovom radu je analiziran broj ćelija tri subpopulacije, Th1, definisane preko ekspresije hemokinskog receptora CXCR3; Th2, definisane preko ekspresije hemokinskog receptora CCR4 i T reg, definisane preko intenzivne ekspresije  $CD25^+$ , na memorijskim T limfocitima u perifernoj krvi PR pacijenata sa T1D. Istovremeno, određen je nivo cirkulišućih hemokina: IP-10, Th1 tipa hemokina i liganda za CXCR3 receptor; TARC, Th2 tipa hemokina i liganda za CCR4 receptor; i antiinflamatornog citokina TGF $\beta$ , markera funkcionalnosti T reg subpopulacije. U prethodnim radovima ukazano je da ove tri subpopulacije, svoje efekte ostvaruju različitim mehanizmima. Naime, rezultati brojnih studija su pokazali da značajan broj izolovanih cirkulišućih  $CXCR3^+$  i  $CCR4^+$  T ćelija sekretuje Th1 (IFN $\gamma$ ) odnosno Th2 (IL4,IL5,IL13) tip citokina, što je u osnovi shvatanja da ova dva površinska molekula predstavljaju validne ćelijske površinske markere za fenotipsko definisanje Th1 i Th2 subpopulacije (239, 117, 240).

Sa druge strane, smatra se da se u okviru  $CD4^+$  T limfocita, na osnovu ekspresije jedne od dve izoforme CD45 molekula, mogu definisati 2 subpopulacije, naivne i/ili efektorske  $CD45RA^+$ , koje nisu bile u kontaktu sa antigenom i memorijske  $CD45RO^+$  ćelije, koje su bile u kontaktu sa antigenom (241).

U tom smislu, u većini studija u *in vitro* uslovima karakteristike ekspresije hemokinskih receptora su ispitivane na memorijskim  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocitima, pa je to bilo u osnovi naše odluke da nivo ekspresije ispitivanih hemokinskih receptora u perifernoj krvi određujemo upravo na memorijskim T limfocitima (117,135, 156).

U našem radu je pokazano da je u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA2, nivo memorijskih T limfocita koji ekspimiraju CXCR3, Th1 hemokinski receptor, kao i intenzitet fluorescence ovog receptora, bio značajno viši u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR. Istovremeno, vrPR su imali najviši nivo  $CXCR3^+$  memorijskih T limfocita, u poređenju sa nrPR, pacijentima sa N-T1D u IZS i KR, i kontrolnim ispitanicima (Grafikoni 6-9).

U tom smislu, u našem istraživanju je ukazano na dominaciju Th-1 odgovora u vrPR pacijenata sa T1D, što je u saglasnosti sa rezultatima opisanim u literaturi (242, 243).

Međutim, do sada su u prethodnim radovima retko publikovani podaci vezani za nivo ekspresije hemokinskih receptora na CD4<sup>+</sup> T limfocitima u osoba sa predijabetesom. Praktično, u jedinoj studiji koja je obuhvatila osobe sa predijabetesom, pokazano je smanjenje nivoa Th1 tipa hemokinskih receptora CXCR3 na CD3<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> limfocitima periferne krvi, u obe ispitivane grupe (244). U poređenju sa našim istraživanjem, postoje značajne razlike prvenstveno u izboru učesnika i primenjenoj metodologiji. Naime, u ovoj studiji ispitivani su pacijenti pedijatrijskog uzrasta, dok je naša studija rađena u adultnoj populaciji. Takođe, oni nisu pratili osobe sa predijabetesom u periodu dužem od 12 meseci pre ispoljavanja T1D, kada bi intenzitet Th1 posredovanog autoimunskog odgovora mogao biti intenzivniji (89). Istovremeno, u ovoj studiji praćene su samo 2 osobe, a dijagnoza predijabetesa nije jasno definisana. Sa druge strane, detekcija hemokinskih receptora u opisanoj studiji rađena je metodom trobojne imunofluorescencije u okviru kulture mononukleara dobijenih separacijom na fokolnom gradijentu, a u našoj studiji, detekcija ekspresije ovih receptora na memorijskim T limfocitima urađena je metodom četvorbojne imunofluorescencije u uzorcima heparinizirane pune krvi.

Takođe, nivo CXCR3<sup>+</sup> memorijskih T limfocita u pacijenata sa N-T1D u IZS, kao i intenzitet fluorescence ovog receptora, bio je značajno niži u odnosu na kontrolne ispitanike i nije se značajno razlikovao u poređenju sa nivoom utvrđenim u pacijenata sa N-T1D u KR bolesti (Grafikoni 6,8).

Naši rezultati koji ukazuju na pad nivoa CXCR3<sup>+</sup> memorijskih Th1 subpopulacija, reflektujući najverovatnije njihovu migraciju i regrutaciju u inflamirana pankreasna ostrvca, su u saglasnosti sa nalazima u pacijenata sa T1D, publikovanim u okviru prethodnih istraživanja (237,244, 245).

U nedavno objavljenoj studiji, u pacijenata sa T1D i Grejvsovom bolešću, rađenoj takođe na uzorcima pune krvi, pokazano je prvo smanjenje, a zatim u dalje toku praćenja blagi porast odnosa ekspresije CXCR3/CCR4 hemokinskih receptora na CD4<sup>+</sup> T ćelijama (246).

Interesantni su i podaci publikovane studije, u kojoj su određivani nivoi ovih hemokinskih receptora i fenotipske razlike na CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocitima u pedijatrijskoj populaciji, metodom četvorbojne imunofluorescencije u kulturi periferenih mononukleara (337). Rezultati ove studije su pokazali smanjenu ekspresiju Th1 receptora na cirkulišućim T helper CD4<sup>+</sup> ali ne i na T citotoksičnim CD8<sup>+</sup> ćelijama u pacijenata sa T1D, što bi moglo sugerisati postojanje suboptimalne helperske funkcije pri kliničkoj manifestaciji T1D (337).

Takođe, u našoj studiji u pacijenata sa T1D stanju KR, registrovali smo blag porast nivoa CXCR3<sup>+</sup> memorijskih T limfocita, što je u saglasnosti sa nalazima drugih studija (245,246). Nasuprot tome, rezultati Finske studije (237) ukazuju na perzistiranje niske ekspresije Th1 hemokinskih receptora, i 18 meseci nakon kliničke manifestacije T1D. Naime, smatra se da progresija T1D ima za posledicu destrukciju većine ostrvaca pankreasnih β ćelija sa sledstvenim smanjivanjem otpuštanja autoantigena iz inflamatornog žarišta, (247) a smanjena prezentacija autoantigena smanjuje i obim T ćelijskog infiltrata u pankreasu i intenzitet autoimunskog odgovora.

U našem istraživanju, uzorke venske krvi za određivanje ekspresije hemokinskih receptora u pacijenata sa N-T1D, smo uzimali isključivo u uslovima optimalne glikoregulacije naše, čime smo eliminisali efekte hiperglikemije na broj limfocita i redistribuciju limfocitnih subsetova (248). Takođe, u prethodnoj studiji je pokazano da redukcija broja CXCR3 receptora na CD3<sup>+</sup> ćelijama u T1D nije posledica metaboličkih poremećaja u vreme postavljanja dijagnoze, niti je vezana za određenu genetsku predispoziciju (244). Naime, u pacijenata sa novootkrivenim tipom 2 dijabetesa sa sličnom, lošom, metaboličkom kontrolom, nije registrovano smanjenje ekspresije hemokinskih receptora u poređenju sa zdravim ispitanicima.

Istovremeno, iz istraživanja smo isključili ispitanike sa infekcijama, imajući u vidu da prisustvo infekcije može doprineti fluktuacijama u nivou ekspresije hemokinskih receptora.

Najveće ograničenje studija u T1D u humanoj opulaciji je limitiranost na perifernu krv, što praktično ostavlja mesta samo za prepostavke o prirodi autoimunskog procesa u samom pankreasu. Moguće objašnjenje za smanjenje broja CD4<sup>+</sup> ćelija koje eksprimiraju Th1 tip hemokinskih receptora je postojanje selektivne regrutacije Th1 ćelija u pankreas (137,244,249), ili nishodna regulacija ovih receptora putem hemokina (250).

Istovremeno, studije rađene na animalnim modelima, ali i u humanim biopstatima, su pokazale istu shemu, tj. smanjenje nivoa CXCR3 i CCR5, Th1 hemokinskih receptora u perifernoj krvi zajedno sa porastom ekspresije ovih receptora na T ćelijama u pankreasnim ostrvcima (251,252), sugerišući da su ovi receptori ključni medijatori kretanja patogenih T ćelija ka inflamiranom tkivu i da imaju značajnu ulogu u destruktivnom insulitisu (117,156).

Takođe, pokazano je da u autoimunom ataku u multipnoj sklerozi postoji značajno povećanje broja CCR5<sup>+</sup> i CXCR3<sup>+</sup> T limfocita u cerebrospinalnoj tečnosti (150,253-254) a sličan nalaz je opisan u sinovijalnoj tečnosti u pacijenata sa različitim formama artritisa (255).

Međutim, u studiji japanskih autora prezentovani su zanimljivi podaci koji nisu u potpunosti u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja, ali su neophodna dalje istraživanja u smislu pažljivog praćenja nivoa CXCR3<sup>+</sup> T ćelija na početku kliničke manifestacije T1D.

Naime, pokazana je različita (256) ekspresija CXCR3 na CD4<sup>+</sup> T ćelijama u pacijenata T1D, u zavisnosti od metaboličkog statusa na samom početku bolesti. U tom smislu je, fulminantni T1D, praćen teškim metaboličkim poremećajima, ketoacidozom, bio udružen sa značajnim smanjenjem nivoa Th1-asociranih hemokinskih receptora CXCR3 i CCR5 na CD4<sup>+</sup> T ćelijama, dok je klinički fenotip tipično sporijeg početka T1D, praćenog samo ketozom, bio udružen sa porastom nivoa T ćelija koje ekspimiraju ove hemokinske receptore, u poređenju sa kontrolom. Autori su smatrali da je rezultat visoke ekspresije CXCR3 u pacijenata sa tipičnim početkom T1D sugerisao da je CXCR3 stabilan Th1 marker, tipičan za T1D, odnosno Th1 posredovanu bolest (256).

Sa druge strane, prethodna istraživanja su sugerisala povišenu ekspresiju CXCR3 na CD4loCD40<sup>+</sup> T memorijskim ćelijama, jedinstvenoj T ćelijskoj subpopulaciji, koja je bila ekspanzirana u T1D (257), što je u suprotnosti sa našim nalazima. Ipak, precizna uloga CD4lo T subpopulacije u T1D nije u potpunosti razjašnjena, imajući u vidu da su publikovani podaci koji su opisali CD4loCD40<sup>+</sup> T ćelijsku subpopulaciju kao izuzetno dijabetogenu (258), ali i podaci koji su ukazali da je CD4hi fenotip karakteristika mnogih dijabetogenih T ćelija (259,260). Međutim, mi smo detektovali veoma niske nivoe CD4lo subpopulacija u limfocitnom gejtju kao i među CD4<sup>+</sup> T ćelijama. U tom kontekstu, sve naše analize smo bazirali na CD4hi odnosno na CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T ćelijama, upravo da bi izbegli precenjivanje efekta CD4lo subpopulacije na finalne rezultate. Istovremeno, u našem istraživanju, nismo određivali ekspresiju CD40 markera, pa je bilo nemoguće uporediti naše nalaze sa nalazima prethodne studije koja ga je određivala. Takođe, za razliku od te studije, mi smo u istraživanje uključili homogenu grupu isključivo N-T1D, u cilju eliminacije efekata insulinske terapije i dužine trajanja bolesti na naše rezultate.

U našem radu, nivo memorijskih T limfocita koji ekspimiraju CCR4, Th2 hemokinski receptor, kao i intenzitet fluorescence CCR4, u PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva autoantitela GAD i IA2, je bio značajno viši u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS. (Grafikon 11,13). Međutim, nivo CCR4<sup>+</sup> memorijskih T limfocita i intenzitet fluorescence ovog receptora u vrPR bio je značajno manji u poređenju sa nrPR i kontrolnim ispitanicima, a nije se značajno razlikovao od nivoa detektovanog u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR (Grafikon 12,14). Sa druge strane, nivo CCR4<sup>+</sup> memorijskih T limfocita i intenzitet fluorescence CCR4 u pacijenata sa N-T1D u IZS, bio je značajno niži u odnosu na kontrolne ispitanike i sličan nivou utvrđenom u pacijenata u KR bolesti (Grafikon 11,13).

U dosadašnjoj literaturi, prema našim saznanjima, do sada nije određivana ekspresija CCR4<sup>+</sup> receptora na T limfocitima u PR pacijenata sa T1D, već samo u pacijenata sa N-T1D. U

tom smislu, pokazano je smanjenje ekspresije Th2 tipa hemokinskog receptora CCR4 u pacijenata sa N-T1D na početku bolesti, a u daljem toku bolesti registrovan je blag porast broja ovih ćelija, što je u saglasnosti sa nalazima dobijenim u našem istraživanju (244). Istovremeno, nedavno je pokazan niži nivo CCR4<sup>+</sup> T ćelija i iRNA za CCR4 u novorođenčadi sa visokim genetskim rizikom za ispoljavanje T1D (261).

Sa druge strane, rezultati studije rađene u pacijenata sa atopijskim dermatitisom (AD), Th2 posredovanim autoimunskim oboljenjem kože, su pokazali da u pacijenata sa AD postoji povišena ekspresija CCR4 hemokinskog receptora na memorijskim T limfocitima, kao i povezanost nivoa CCR4<sup>+</sup> T ćelija i Th2 citokina. Autori smatraju se da je moguće da porast broja CCR4<sup>+</sup> T ćelija u cirkulaciji pacijenata sa AD odražava ekspanziju te T ćelijske populacije, a ne regrutaciju u vaskularni odeljak (239).

Rezultati brojnih, većinom eksperimentalnih studija, su pokazali (117,239,240) da značajan broj izolovanih cirkulišućih CXCR3<sup>+</sup> i CCR4<sup>+</sup> T ćelija, sekretuje Th1 (IFN $\gamma$ ) odnosno Th2 (IL4,IL5,IL13) tip citokina, što je u osnovi shvatanja da su ova dva antigena validni površinski ćelijski markeri. Sa druge strane postoje i stavovi da ovi receptori nisu striktno vezani za određenje subsetove, odnosno da ne postoji jasna CXCR3/Th1 i CCR4/Th2 asocijacija (119,156). Naime, potvrđeno je postojanje programa za ekspresiju hemokinskih receptora tokom razvoja Th1 i Th2 ćelija (132). Ipak, ovi programi su fleksibilni a mehanizmi za njihovu aktivaciju su i dalje nepoznati u najvećoj meri. Upravo zbog toga, savetuje se opreznost u interpretaciji ekspresije hemokinskih receptora kao surogat markera za određeni tip efektornog odgovora.

U tom smislu su nalazi drugih studija (156,262) pokazali da CCR4<sup>+</sup> memorijske T ćelije mogu koeksprimirati Th1 tip hemokinskih receptora, kao i da mogu proizvoditi Th1 tip pored Th2 tipa citokina, što je sve zajedno sugerisalo postojanje potencijalnih problema vezanih za korišćenje ovih markera za fenotipizaciju Th2 ćelija. Istovremeno, pokazano je da T ćelije kože, koje ekspresiraju kožni limfocitni antigen (cutaneous lymphocyte-associated antigen-CLA), mogu proizvoditi oba citokina i IFN- $\gamma$  i IL-4, a ipak, više od 95% ovih ćelija ekspresira visoke nivoe CCR4 markera (262). Takođe, značajan broj ćelija koje ekspresiraju CLA koeksprimiraju CCR4 i Th1-asocirane receptore, CXCR3 (35%) i CCR5 (50%). Takođe, pokazano je i (263) odsustvo korelacije između ekspresije hemokinskih receptora i Th1/Th2 citokinske produkcije od strane individualnih memorijskih ćelija. Smatra se da razlike u ovim nalazima mogu biti posledica razlika u regulaciji hemokinskih receptora i produkcije citokina u različitim uslovima, sa i bez hronične inflamacije (264). Ovakvi rezultati ukazuju na

kompleksnost ekspresije CCR4 na T ćelijskim subsetovima, a uloga CCR4 u fiziološkim i patofiziološkim migracijama T ćelija *in vivo*, još uvek nije u potpunosti razjašnjena.

Istovremeno, u prethodnim radovima je opisana moguća dvojna uloga CCR4<sup>+</sup> T limfocita i u patogenezi T1D. Naime, i pored dokaza da ovaj marker definiše Th2 subpopulaciju CD4<sup>+</sup> T ćelija, koja ima protektivni karakter u patogenezi T1D, publikovan je i nalaz koji ukazuje na prodijabetogeni profil ove subpopulacije.

U tom smislu, rezultati studije Kim i saradnika (265) su pokazali da CCR4<sup>+</sup> T ćelije predstavljaju ključni faktor u olakšavanju migracije patogenih T ćelijskih populacija, odnosno antigen specifičnih memorijskih T ćelija, ka pankreasnim ostrvcima kao i tkivno specifičnoj akumulaciji APĆ.

Naime, utvrđeno je na animalnom modelu, da je CCR4<sup>+</sup> patogena T ćelijska populacija ekstenzivno ekspanzirana u sekundarnim limfnim organima tokom progresije autoimunog procesa u dijabetesu, što ukazuje da su to mesta za početnu *in vivo* ekspanziju dijabetogene T ćelijske populacije, odakle kreće dalja infiltracija ciljnih ostrvaca. Prethodno je pokazano da uprkos postojanju ekstenzivnog insulitisa, intaktne β ćelije mogu perzistirati duži vremenski period, bez kliničkog ispoljavanja T1D, što ukazuje na odsustvo jednakosti između pojmova dijabetes i insulitisa. Molekularni mehanizmi i faktori koji su u osnovi prelaska pasivnog insulitisa u klinički manifestni T1D i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni (266). U ovoj studiji je pokazan porast broja CCR4<sup>high+</sup> T ćelija u slezini NOD miša koji je razvio T1D u poređenju sa predijabetičnim mišom, što ukazuje da je progresija bolesti povezana sa sticanjem patogenog potencijala CCR4<sup>high+</sup> populacije, koja kontroliše prelazak od insulitisa do manifestnog T1D kroz sticanje novih efektornih karakteristika.

Poznato je da hemokini produkovani u mestu inflamacije igraju glavnu ulogu u regrutaciji određenog ćelijskog tipa. S obzirom da je ekspresija liganda za CCR4, TARC, detektovana u okviru infiltrisanih ostrvaca u animalnom modelu sa predijabetesom i da ekspresija MDC u pankreasu izaziva intenzivno regrutovanje CCR4<sup>+</sup> ćelija i ubrzava ispoljavanje bolesti, pretpostavlja se da TARC ili MDC jesu inicijalni signali i modulatori za regrutovanje i održavanje antigen-specifične T ćelijske populacije (267,268). Pokazano je da su MDC (269,270) i TARC (271) konstitutivno eksprimirani na dendritičnim ćelijama limfnog čvora. U tom smislu, TARC ili MDC mogu imati dvojnu ulogu u nelimfoidnim i limfoidnim organima: inflamatornu, kada se produkuj u ciljnim organima i regulatornu, u regulaciji interćelijskih interakcija u sekundarnim limfoidnim organima. Poznato je da CCR4<sup>+</sup> T ćelije pokazuju značajan kapacitet za naseljavanje ciljnih organa, u osnovi kojeg je hiperekspresija adhezionih/aktivacionih molekula (ICAM-1, MHC klase I, CD95 i CD44) na njihovoj površini.

Istovremeno, CCR4<sup>+</sup> T ćelije zahtevaju čvrst kontakt sa APC radi dostizanja efektnog Th1 fenotipa, što implicira postojanje inflamatorne kaskade u dijabetogenom pankreasu. Takođe, pojačana regrutacija CCR4<sup>+</sup> T ćelija i APC preko ekspresije liganda MDC, ima za posledicu progresiju razvoja bolesti. Istovremeno, pokazano je i da inhibicija MDC molekula redukuje stepen insulitisa i progresiju T1D preko smanjenja broja CCR4<sup>+</sup> T ćelija (264). Akumulisane CCR4<sup>+</sup> T ćelije sekretuju veliki broj “inflamatornih” hemokina (272), posebno MCP-1 (273), što dalje povećava inflamatorni infiltrat u pankreasnim ostrvcima.

U tom smislu se zaključuje da CCR4<sup>+</sup> ćelije poseduju potencijal da izazovu bolest koji je zasnovan na jačanju migratornih kapaciteta patogenih T ćelija i sposobnosti da uspostave snažan kontakt između T ćelija i APC.

Međutim u opisanoj studiji postoje i izvesna ograničenja (265). Prvo, blokiranjem MDC nije postignuto potpuno zaustavljanje progresije T1D, odnosno prevencija T1D. Ovakav nalaz može biti posledica aktivnosti drugih liganada CCR4 receptora, poput TARC. Nemogućnost da agensi prekinu ovaj proces na lokalnom nivou (tj. u pankreasnim ostrvcima) ograničila je terapijski potencijal ovih nalaza. Uprkos opreznosti koja postoji u vezi sa terapijskim potencijalom, rezultati su značajni za strategije prevencije bolesti. Ključna karika koja nedostaje da bi bolest bila prevenirana, jeste da terapijska metoda koja bi morala da bude bezbedna i efikasna, sposobna da prekine autoimuni proces u osoba sa visokim rizikom za razvoj bolesti. Teoretski, migracija perifernih T ćelija u pankreasna ostrvca (proces koji se odigrava nekoliko meseci ili godina pre značajnije destrukcije mase β ćelija) može biti sprečena ciljanom eliminacijom CCR4<sup>+</sup> T ćelija.

U nameri da analiziramo odnose tri subpopulacije u perifernoj krvi, u našem istraživanju smo određivali i nivo T reg, odnosno CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita.

S obzirom da se CD25 antigen, α lanac receptora za IL-2, eksprimira na obe aktivirane, efektnoj i regulatornoj subpopulaciji T ćelija, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> populacija ćelija je veoma heterogena i u svakom trenutku sadrži balans između dva različita tipa ćelija. U okviru naše studije, da bi umanjili mogućnost da nedavno aktivirane T ćelije, veliki blasti, koje ekspimiraju CD25 antigen budu pogrešno interpretirane kao regulatorne ćelije, podesili smo uzak limfocitni gejt, što ipak ne isključuje nedavno aktivirane ćelije definisane drugim markerima celularne aktivacije. U našem istraživanju smo koristili CD25<sup>high</sup> marker radi definisanja T reg subpopulacije metodom merenja srednjeg intenziteta fluorescence CD25 markera na vrhu 5% od CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija, odnosno analizirali smo 5% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija sa najintenzivnijim intenzitetom fluorescence.

Naši rezultati su pokazali da u PR pacijenata sa T1D, nije bilo značajne razlike u nivou  $CD4^+CD25^{high}$  limfocita, regulatorne supresorske subpopulacije T ćelija, u odnosu na pacijente sa N-T1D u IZS i KR bolesti i kontrolne ispitanike. Istovremeno, u vrPR nivo  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita je bio značajno manji u odnosu na nrPR i kontrolne ispitanike, i sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR (Grafikoni 16-19).

Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studija u kojima je utvrđen smanjen broj regulatornih supresorskih subpopulacija T ćelija u vrPR (109,274,275). Istovremeno, interesantni podaci su publikovani u prospektivnoj studiji o PR pedijatrijskog uzrasta, u kojih su određivane 2 subpopulacije T reg,  $CD4^+CD25^+$  T ćelije i NKT ćelije (274). Testirani rođaci su stratifikovani na osnovu genetskog rizika za ispoljavanje T1D. Rođaci sa rizičnim genotipom (DQA1\*05, DQB1\*0201, DQB1\*0302) su imali značajno manji broj  $CD4^+CD25^+$  T ćelija u poređenju sa starosno usklađenim zdravim ispitanicima ili rođacima koji su bili nosioci genotipa sa niskim rizikom (DQB1\*0301, DQB1\*0603, DQB1\*0602). U ovoj studiji je pokazano da je veći genetski rizik za ispoljavanje T1D povezan sa manjim brojem  $CD4^+CD25^+$  Tregs, a razlika je najviše izražena u subpopulaciji  $CD4^+CD25^{high}$  ćelija, koja obuhvata ćelije sa najjačom supresorskom aktivnošću.

Istovremeno, u okviru druge studije ispitivana Treg subpopulacija u rođaka sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, definisanim na osnovu HLA genotipizacije, a kao markeri za detekciju T reg sem CD 25 korišćeni su i novi markeri, FoxP3 i CD127 (276).

U tom smislu, analiza FOXP3 metodom protočne citometrije, u zdravih ispitanika, je pokazala da se FOXP3<sup>+</sup> ćelije predominantno detektuju u okviru  $CD4^+CD25^+$  T-ćelijskog kvadranta (277). Naime, u prethodnom periodu su u cilju veće preciznosti u fenotipskom definisanju  $CD4^+CD25^+$  T reg subpopulacije, prezentovani i novi fenotipski markeri. (183,277,278). Nedavno je pokazano da su regulatorne funkcije  $CD4^+$  T ćelija povezane sa intracelularnim prisustvom FoxP3 molekula (279, 280) kao i sa novim površinskim markerom CD127 (200,201). U tom kontekstu, ranije je pokazano da je nivo FoxP3 ekspresije korelirao sa supresivnim sposobnostima T reg (201,280), mada je bilo i rezultata koji su ukazivali da broj FOXP3<sup>+</sup> T ćelija detektovan u perifernoj krvi, ipak ne diktira stepen *in vitro* supresije (277). Istovremeno je u 2 nedavno završene studije marker CD127 (200, 201) povezan sa ekspresijom FOXP3, imajući u vidu da su FOXP3<sup>+</sup> ćelije bile  $CD127^-$  ili  $CD127^{low}$ , dok su  $CD25^+$  ćelije bile manje restrihovane njegovom ekspresijom.

Rezultati studije su pokazali da je ekspresija  $CD 127^-$  markera snižena u vrPR, dok je FoxP3<sup>+</sup> marker pokazao sličan trend, ali bez statističkog značaja (276). Ovakav nalaz mogao bi biti posledica činjenice da nemaju sve FoxP3<sup>+</sup> i  $CD127^-$  T ćelije regulatorne sposobnosti.



Takođe, regulatorna aktivnost može zavistiti od nivoa ekspresije FoxP3 u okviru ćelije kao i od izoformi ovog proteina (200).

U celini, rezultati brojnih studija su pokazali smanjen broj Treg u PR pacijenata sa T1D (109,281), ali su zabeleženi i suprotni rezultati (212, 282,283).

U studiji koja je obuhvatala pacijente sa NT1D u pedijatrijskom uzrastu, nedijabetičare sa prisutnim autoantitelima i kontrolne ispitanike, starosno i HLA usklađene, registrovan je značajno viši nivo  $CD4^+CD25^+HLADR^-$  i  $CD4^+CD25^+CD69^-$  kod dece koja su bila pozitivna na 3 ili 4 antitela u poređenju sa kontrolom, a broj NKT ćelija se nije razikovao, što implicira intenziviranje regulatornog imunog odgovora tokom prekliničke faze T1D (284). Međutim, ovakav nalaz je najverovatnije posledica uticaja uzrasta na broj  $CD25^+FOXP3^-$  T-ćelija, s obzirom da su grupu rođaka činile osobe starijeg uzrasta u odnosu na druge grupe.

Naime, prethodno je pokazano da broj  $CD4^+$  T ćelija koje ekspimiraju niske do umerene nivoe CD25 raste sa starosnom dobi ispitanika a utvrđena je i značajna korelacija između  $CD4^+CD25^+FOXP3^-$  T ćelija i starosne dobi, što implicira da ova subpopulacija korespondira sa  $CD4^+CD25^{low}$  T ćelijskom subpopulacijom. Nasuprot tome, učestalost  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  T ćelija ne zavisi od starosne dobi. Rezultati ove studije su pokazali da se frekvencija Tregs definisana preko frekvence  $FOXP3^+$  ili  $CD25^+FOXP3^+$  T ćelija nije značajno razlikovala kao funkcija T1D, i to kako stanja, tako i rizika za oboljenje (212) .

Faktori koji mogu biti u osnovi zapaženih razlika u broju ćelija ovog regulatornog supresorskog subseta u različitim studijama su jednim delom posledica kako genetske tako i imunološke heterogenosti ispitivane populacije u stanju predijabetesa, kao i primenjenih postupaka u smislu definisanja T reg, podgrupa  $CD25^+$  ćelija prema intenzitetu fluorescencije ali i primenom različitih površinskih markera, kao i činjenice da je za analiziranje broja ćelija ovog regulatornog subseta neophodno evaluirati i druge parametare koji mogu uticati na dobijene rezultate, poput dužine trajanja bolesti i usklađivanja ispitanika prema starosnoj dobi i HLA haplotipu zdrave kontrolne populacije. Takođe, različiti nalazi u literaturi o broju T reg mogu biti posledica i činjenice da su se dosadašnja istraživanja sprovodila u uzorcima periferne krvi, pa u tom smislu ne moraju reflektovati T ćelijski repertoar na mestu inflamacije (tj. pankreas i pankreasni limfni čvorovi).

Naše istraživanje je pokazalo niže nivoe  $CD4^+CD25^{high}$  u pacijenata sa NT1D u IZS i KR u odnosu na zdrave ispitanike, mada bez dostizanja statističke značajnosti (Grafikon 16), što je u saglasnosti sa rezultatima većine studija publikovanih iz ove oblasti.

U tom smislu, (278) prvo su publikovani rezultati 4 studija koje su analizirale ulogu  $CD4^+CD25^+$  Treg u pacijenata sa T1D (New York (109), Denver (285), London (283) i

Gainesville (212)). U okviru Njujorške studije je pokazano postojanje značajno nižeg nivoa T reg u pacijenta sa NT1D i T1D dužeg trajanja, u poređenju sa zdravom kontrolom. Sa druge strane, rezultati 3 druge studije su pokazali odsustvo značajne razlike u broju ovih ćelija između pacijenata sa T1D i zdravih kontrola: u Denver i London studiji pacijenti sa T1D su imali neznačajno više a u Gainesville studiji niže nivoe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg u poređenju sa kontrolom. U studijama su korišćeni različiti kriterijumi za definisanje CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija sa regulatornim potencijalom: izotipska kontrola; definisanje CD25<sup>high</sup> populacije na osnovu intenziteta apsolutnog bojenja; ćelije koje eksprimiraju nivo CD25 viši od onog opserviranog na CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> limfocitima ili ćelijama koje eksprimiraju nešto niže nivoe CD4, kao i metoda koja je usmerena da definiše razlike u količini CD25 koja se eksprimira (merena kao srednji intenzitet fluorescence) na vrhu 5%, 2%, 1%, i 0.5% od CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija.

U našem istraživanju koristili smo metodu merenja srednjeg intenziteta fluorescence CD 25 markera na vrhu 5% od CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija.

U Njujorškoj studiji, u kojoj je registrovano smanjenje broja Treg u pacijenata sa NT1D u poređenju sa kontrolom, ali nije precizno naveden metodološki pristup, što otežava poređenje sa drugim studijama. Ipak, u Denver, London i Gainesville studiji korišćena metodologija i strategija "gejtovanja" jasno je definisana i nijedna od njih nije utvrdila postojanje razlike u broju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija između T1D pacijenata i kontrola. Takođe, Njujork studija je obuhvatala dve grupe, pacijente sa NT1D i T1D dužeg trajanja, dok je Denver studija obuhvatala samo pacijente sa T1D dužeg trajanja a u London studiji su uključeni samo pacijenti sa NT1D. Gainesville studija je obuhvatala najveći broj pacijenata sa T1D i to obe grupe, pa se u tom smislu ne može reći da razlika između Njujorške i drugih studija leži u izboru ciljne grupe koja je ispitivana. Pri ispitivanju nivoa ove subpopulacije grupe ispitanika moraju biti usklađene po starosnoj dobi (tj. značajno manji broj CD25<sup>+</sup> T ćelija opserviran u Njujork studiji kod pacijenata sa NT1D može se objasniti poređenjem sa starijom kontrolnom grupom u kojoj su nivovi viši zbog starijeg životnog doba).

U ovoj studiji registrovan je značajno niži procenat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> ćelija u perifernoj krvi dece sa T1D u poređenju sa kontrolom (197). Slična razlika koja nije bila statistički značajna pokazana je u broju CD4<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> subpopulacije, a procenat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>dim/-</sup> je bio veoma nizak i nije se razlikovao između T1D i kontrole. Istovremeno, real-time PCR analiza nije pokazala razliku u nivou iRNA transkripcionog faktora FoxP3, CD127, CD25, TGFβ u Treg ćelijama u ispitivanih uzoraka i kontroli.

Rezultati drugih studija su sugerisali da je broj Tregs u pacijenata sa NT1D normalan (200,277). Prema ovim autorima najbolja kombinacija markera za Treg je  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$  koja pokriva oko 80% FoxP3<sup>+</sup> cells.

Dodatno, u našoj studiji pokazano je da u pacijenata u KR bolesti dolazi do blagog porasta nivoa  $CD4^+CD25^{high}$  T ćelija, što je u saglasnosti sa objavljenim rezultatima.

U studiji u kojoj je u dece sa T1D pre i nakon započinjanja insulinske terapije određivana ekspresija iRNA markera za T reg (TGFβ, Foxp3, cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 [CTLA-4], i inducible co-stimulator [ICOS]) ili citokina (γ-interferon], interleukin [IL]-5, IL-4), pokazano je da je ekspresija Foxp3, CTLA-4 i ICOS iRNK u perifernim mononuklearima stimulisanim humanim insulinom bila veća u pacijenata na insulinskoj terapiji nego pre započinjanja insulinske terapije, implicirajući da tretman sa humanim insulinom aktivira insulin-specifične regulatorne T ćelije u pacijenata sa NT1D (286). Insulinom indukovana ekspresija proteina Foxp3 u  $CD4^+CD25^{high}$  ćelijama je detektovana i protočnom citometrijom. Istovremeno, tretman autoantigenom, odnosno insulinom, koji indukuje aktivaciju T reg može doprineti indukciji KR bolesti.

Nalazi registrovani u okviru ove studije su u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja. Naime, proporcija  $CD4^+CD25^{high}$  ćelija varira od 0 do 0.4% u dece sa NT1D pre započinjanja insulinske terapije, u dece koja su primala insulin 0.2 do 1.7%, dok u kontrolnoj grupi proporcija  $CD25^{high}$  ćelija među  $CD4^+$  ćelijama varira između 0 i 1.7%. Nivo Foxp3 eksprimirajućih ćelija u okviru  $CD4^+CD25^{high}$  ćelija se kretao između 52.0–62.5%.

Humanim insulinom indukovani Foxp3 odgovor u in vitro uslovima pokazao je inverznu korelaciju sa nivoom HbA1C, sugerišući povezanost sa oporavkom β-ćelijske funkcije nakon kliničke manifestacije, ali bez korelacije sa dužinom primenjenog insulinskog tretmana, što može ukazati da se aktivacija Tregs dešava neposredno nakon uvođenja insulinske terapije. Nalaz ushodne regulacije IL-4 u odgovoru na insulin u pacijenata sa T1D, iako na prvi pogled nije u saglasnosti sa Th1 konceptom patogeneze T1D, je u saglasnosti sa opservacijom da su IL-13–sekretujuće insulin specifične T ćelijske linije detektovane u pankreasnim limfnim čvorovima pacijenata sa T1D (287). Iako je najveći porast insulinom indukovane ekspresije IL-4 registrovan u pacijenata sa NT1D koji su započeli sa insulinskom terapijom, povećana insulin specifična IL-4 ekspresija na nivou mRNA je opservirana i kod pacijenata sa T1D pre započinjanja insulinske terapije. Ovo sugerise da je insulin-specifični imuni odgovor Th2 tipa takođe povezan sa autoimunskim odgovorom na endogeni insulin u pacijenata sa T1D i da egzogeni insulin pojačava takvu reaktivnost. Ovi rezultati ukazuju da primena sopstvenih antigena eksprimiranih u timusu aktivira T reg, i podržava koncept o indukciji i ekspanziji T

reg njihovim antigenom na periferiji. Ipak, tranzitorni karakter remisije sugerira defekt u mehanizmima T ćelijske regulacije kao što je i pokazano u pacijenata sa T1D (283).

Ovi nalazi su u saglasnosti sa nalazima u našoj studiji u kojoj u pacijenata sa NT1D registrujemo praktično isti defekt i istu shemu fluktuiranja u perifernoj krvi u nivou Treg i Th2 subpopulaciji.

Sa druge strane, u literaturi su dostupni i podaci o T reg definisanim sa dodatnim markerima, koji su u suprotnosti sa nalazima utvrđenim u našem istraživanju.

Rezultati nedavno publikovane studije (288) pokazali su da viši nivoi ekspresije FoxP3 na početku bolesti jesu prediktivni faktor za lošiju kontrolu glikemija, dok su viši nivoi IL-10 ćelija povezani sa boljom kontrolom glikemija. Ovi podaci sugeriraju da analiza IL-10 i FoxP3 na početku bolesti može predvideti koji će pacijenti u kasnijem toku bolesti imati bolju metaboličku kontrolu.

Smanjenje regulatornih antigen specifičnih T ćelija koje je registrovano u fazi KR može se interpretirati na 2 načina. Prvo, moguće je da esaji za periferne T ćelije ne reflektuju šta se dešava na nivou pankreasa ili pankreasnog limfnog čvora. Nizak nivo FoxP3 ili IL-10 ćelija koji je registrovan u KR može reflektovati činjenicu da većina ovih ćelija migrira u pankreas da bi se borila sa inflamacijom. Drugi način da se interpretiraju ovi podaci je da esaji sa perifernim T ćelijama jesu prognostički i nisu "presek" onoga što se dešava u ostrvcima.

Postoji nekoliko pitanja vezanih za ovu studiju. Prvo, s obzirom da je ovo presečna studija, individualne genetske razlike između pacijenata ne mogu biti adekvatno kontrolisane kao u studijama longitudinalnih kohorti. Drugo, relativno mali broj pacijenata stvara poteškoće prilikom generalizacije podataka. Treće, hiperglikemija nije bila adekvatno kontrolisana u grupi NT1D a samim tim i njen efekat na ekspresiju FoxP3, iako je registrovano skretanje ka produkciji IL-10 u hiperglikemičnoj grupi. Četvrto, funkcionalnost FoxP3 T ćelija nije rađena. Peto, nije adekvatno demonstrirano da imunski testovi mogu prediktovati da li će pacijent ući u KR, iako je registrovan trend za predikciju doze insulina pomoću nivoa FoxP3. Najzad, nemaju svi pacijenti odgovor na sve epitope i nije testirano više epitopa imajući u vidu ograničene količine krvi radi ispitivanja, koje je moguće uzeti od dece.

Funkcija Tregs zavisi od intracelularnih signala uključujući brojne transkripcione faktore, pro- i anti-inflamatorne citokine i citokinske receptore i druge molekule poput GITR, ICOS, CTLA-4 (289). Veoma malo se zna o produkciji citokina  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  T reg. Verovatno obe vrste, pro i antiinflamatorni citokini, učestvuju u fenomenu periferne tolerancije.

Sa druge strane ispitivanjem funkcionalnog kapaciteta T reg subpopulacije, ukazano je da defekt u supresorskoj funkciji Tregs u pacijenata sa T1D nije prisutan samo na početku

bolesti nego i u pacijenata sa dužim trajanjem bolesti (>3 godine trajanja) (290). Interesantno, nije uočena razlika u FoxP3 ili CD127 ekspresiji. Slično nalazima ove studije, Kivling *et al.* (291) nisu našli razlike u ekspresiji FoxP3 između dece sa T1D i kontrola. U drugim studijama ekspresija FoxP3, CTLA-4, CD28 i ICOS u mononuklearnim i CD4<sup>+</sup> ćelijama pacijenata sa T1D je bila komparabilna sa kontrolom (292). Ipak, nedavno je jedna grupa istraživača, korišćenjem validiranog protokola za izolaciju FoxP3 pomoću protočne citometrije, pokazala povećanu ekspresiju FoxP3 u pacijenata sa T1D (293).

Međutim, ovakvi nalazi ne odbacuju decidno hipotezu da defekt Treg ćelija leži u osnovi T1D ali mogu ukazati da je imunoregulacija autoimunih bolesti posredovana preko nekoliko subsetova imunoregulatornih ćelija koji usklađeno funkcionišu (294). Stoga u svakog pojedinačnog pacijenta, autoimunost ne mora reflektovati deficit jednog određenog subseta, već defekt integrisanog sistema imunoregulacije posredovanog različitim nivoima T ćelijskih subsetova.

Naši nalazi sugerišu da u pacijenata sa N-T1D postoji jedan opšti i globalni defekt na nivou T ćelija koji dovodi do imunog deficita i pogađa prevashodno proces imunoregulacije. Poznato je da su drugi istraživači sugerisali postojanje globalnog T ćelijskog deficita u uslovima T1D (295). Smanjena T ćelijska produkcija IL-2 je opisana u pacijenata sa T1D u kojih je postojala snažna destrukcija beta ćelija (295). Takođe, rezultati druge studije su pokazali postojanje defekta u sekreciji IL-2 i solubilnog IL-2 receptora kako u novootkrivenih tako i pacijenata sa T1D dužeg trajanja (296). Na animalnim modelima je pokazano da T ćelijska hiporesponsivnost korelira sa redukcijom p56<sup>lck</sup>, molekula koji je uključen u transdukciju signala u T ćelijama (297), mada su neophodna dalja istraživanja definitivne kvantifikacije molekula uključenih u transdukciju signala u T ćelijama pacijenata sa T1D.

Istovremeno, rezultati prethodnih studija na animalnim modelima su pokazali da Treg potentno suprimiraju infiltraciju tkiva dijabetogenim CD4<sup>+</sup> T ćelijama (298), što najverovatnije ostvaruju preko nishodne regulacije adhezionih molekula, odnosno homing receptora. U tom smislu, utvrđeno je da ekspresija CXCR3, koja je pokazana u infiltrisanom pankreasu, redukovana u prisustvu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija (298). Sa druge strane, interesantan je nalaz snažne ekspresije hemokinskih receptora CCR4 i CCR8 na humanim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatornim T ćelijama (299). U našem istraživanju se dve subpopulacije, Th2 i Treg, ponašaju praktično na isti način, odnosno u vrPR, registrovano je značajno smanjenje nivoa obe opisane subpopulacije. Ovakav nalaz otvara područje diskusije o mogućem preklapanju ove dve subpopulacije. U okviru naše studije određivali smo CCR4 hemokinski receptor na memorijskim T limfocitima. Prethodno je pokazano da CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatorne ćelije

ekspimiraju oba antigena, CD45RO ali i CD45RA, što je u osnovi stava da u našem radu nije došlo do preklapanja u definisanju dve subpopulacije od interesa, Th2 i T reg. Takođe, ranije je pokazano da  $CD4^+CD25^+ CD62L^-$  splenociti mogu ekspimirati oba hemokinska receptora CCR4 i CXCR3 i migrirati ka odgovarajućim inflamatornim hemokinima (300). Dodatno, (139) poznato je da je hemokinski receptor CCR4 ushodno regulisan preko TGF- $\beta$ .

Poznato je da, sa jedne strane, dve velike studije, ENDIT i DPT-1, rađene u humanoj populaciji u kojima je prvim rođacima pacijenata sa T1D koji su bili pod visokim rizikom za razvoj T1D, dat parenteralno insulin ili nikotinamid, nisu pokazale protektivan efekat nijednog od ovih lekova (55, 301). Međutim, u maloj studiji koja je uključivala 7 osoba pod visokim rizikom za razvoj T1D, tretman insulinom je odložio nastanak T1D (302). Ipak, iako su antitela markeri autoimunog procesa i mogu biti prediktivni faktori za tok oboljenja, malo je dokaza da intervencije koje imaju za cilj promenu prirodnog toka T1D utiču na imunoglobuline. Sa druge strane, rezultati nedavno završenih studija u kojima je analiziran citokinski profil u prvih rođaka pacijenata sa T1D i visokim rizikom za razvoj bolesti, ukazali su na postojanje redukovano nivoa antiinflamatornih Th2 citokina, IL-4 i IL-13, uz povišen nivo proinflamatornih Th1 citokina, IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-18 (242, 303, 304). Ovakav nalaz sugerise postojanje primarnih poremećaja u celularnom imunitetu i predominaciju Th1 imunog odgovora u stanju predijabetesa. Istovremeno, rezultati imunointervencionih studija u pacijenata sa N-T1D su pokazali da se povoljan efekat delovanja humanizovanih anti CD3 monoklonskih antitela i heat-shock protein peptida DiaPep277 na prezervaciju C peptida zasniva upravo na promeni citokinskog profila  $CD4^+$  T limfocita u smislu veće sekrecije IL-4 i IL-10 i pomeranju imunog odgovora sa inflamatorne Th1 na protektivnu Th2 stranu, odnosno na uticaju imunomodulatorne terapije na ushodnu regulaciju regulatorne supresorske subpopulacije (305-307).

Redukcija broja perifernih  $CD4^+CD25^{high}$  i  $CD4^+CCR4^+$  T ćelija predstavlja veliki defekt u T ćelijskoj regulatornoj mreži u T1D. Ovaj dvojni imunoregulatorni defekt može predstavljati odraz obimnijih poremećaja na nivou T ćelija.

S obzirom da  $CD4^+CD25^+$  i  $CD4^+CCR4^+$  T ćelije nisu bile u potpunosti odsutne u pacijenata sa N-T1D, pretpostavlja se da modaliteti kojima bi se postigla njihova stimulacija i proliferacija, mogu aktivno doprineti ostvarivanju novih terapijskih strategija. Naime, izolacija, prečišćavanje i proliferacija ovih ćelija a zatim i njihov transfer u pacijente obolele od T1D imali bi za cilj imunomodulaciju toka T1D. Primena ovakvih imunomodulatornih terapija imala bi svoje opravdanje prvenstveno u PR pacijenata sa T1D i rizikom za razvoj bolesti, u

kojih bi nalaz izrazito niskog nivoa regulatornih supresorskih subpopulacija mogao predstavljati dodatni imunološki prediktivni marker za nastanak ovog oboljenja.

Poznato je da se predikcija T1D u rođaka je prvenstveno zasniva na prisustvu i titru autoantitela. Ipak, pokazano je da jedan broj rođaka sa prisustvom multipnih autoantitela ne ispoljava T1D, što je isticalo neophodnost usavršavanja dodatnih imunoloških testova koji bi poboljšali preciznost predikcije (106). U aktuelnoj literaturi dostupni su podaci o detektovanju i praćenju nivoa drugih markera celularnog imunog odgovora, odnosno, markera funkcionalnosti subpopulacija T limfocita. U većem broju istraživanja je u PR pacijenata sa T1D registrovana predominacija Th1 autoimunskog odgovora izraženog nivoom određenih citokina ili hemokina u perifernoj cirkulaciji ili značajno češće u kulturi perifernih limfocita (242, 243). Sa druge strane, u pacijenata sa N-T1D, na početku bolesti, podaci o nivou pro i antiinflamatornih citokina i hemokina su često kontradiktorni, i kreću se od sniženog do povišenog nivoa proinflamatornih Th1 i antiinflamatornih Th2 tipova citokina (237,308).

Nivo cirkulišućih citokina i hemokina predstavlja marker celularne imunosti. Iako tim markerima nedostaje antigenska specifičnost, a ćelijski izvor za mnoge cirkulišuće imune medijatore nije poznat, oni ipak pružaju validne informacije o riziku za ispoljavanje oboljenja ili progresiju bolesti (309). Poznato je da je detekcija citokina zbog niskog nivoa produkcije citokina u ćelijskom supernatantu, često vidljiva samo nakon specifične ili nespecifične stimulacije. Za razliku od toga, hemokini se sekretuju u višim nivoima i obično se detektuju i bez prethodne stimulacije. Takođe, dok spontana sekrecija u ćelijskom supernatantu ukazuje na *in vitro* sposobnost perifernih mononukleara, da bez stimulacije luče citokine, nivoi hemokina u serumu mogu reflektovati produkciju od strane raznih ćelija u inflamatornim žarištima.

Poznato je da su studije o fokalnoj produkciji citokina lokalno u tkivu humanog pankreasa limitirane zbog očigledne teškoće da se dobije uzorak tkiva (310,311). Ipak, pokazano je da postoji snažna korelacija između unutarostvske produkcije citokina i njihovog nivoa na perifriji na animalnom modelu (312). U tom smislu, smatra se da abnormalnosti cirkulišućeg nivoa citokina mogu odražavati događaje u pankreasu.

U našoj studiji je u vrPR registrovan najviši nivo IP-10, Th1 tip hemokina, i to sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D, a značajno viši u poređenju sa nivoom u nrPR i kontrolnim ispitanicima (Grafikon 22).

Nedavno je utvrđen visok nivo cirkulišućeg IP-10, IFN- $\gamma$  i IL-18 u pacijenata sa T1D, LADA i vrPR (167, 245, 304, 309, 313, 314), a sugerisano je da serumski nivo IP-10 predstavlja validan klinički marker autoimunskog odgovora. Ovi podaci ukazuju na proinflamatorne promene u celularnom imunitetu u osoba sa predijabetesom (315), što je u

saglasnosti sa našim opservacijama. Istovremeno, saopšteni su i rezultati ushodne regulacije 2 proinflamatorna hemokina CCL3 i CCL4, i nishodne regulacije hemokina funkcionalno suprotnog dejstva, CCL2 u vrPR (261), što sugeriše da je sistemski nivo citokina i hemokina povezan sa progresijom bolesti (163).

Rezultati studija rađenih na animalnom modelu pokazali su postepeni porast nivoa IP-10 u periodu koji je prethodio kliničkom ispoljavanju T1D. Ipak, nivo ekspresije IP-10 u pankreasu se smanjivao zajedno sa smanjivanjem mase  $\beta$  ćelija, odnosno IP-10 nije uopšte detektovan u fazi teškog destruktivnog insulitisa (304). Ovakav rezultat je u saglasnosti sa našim nalazima najvišeg nivoa IP10 u vrPR.

Suprotno ovim nalazima, drugi autori su saopštili odsustvo razlike u nivou IP-10 ili smanjenu sekreciju IP-10 u ćelijskom supernatantu pacijenata sa T1D u poređenju sa zdravom kontrolom (316). Neslaganja u nalazima su posledica različitog izbora pacijenata, koji su uključivani u raznim stadijumima T1D sa različitim preostalim masama  $\beta$  ćelija.

Dodatno, saopšteno je da IP-10 sekretovan od strane  $\beta$  ćelija aktivira i privlači autoreaktivne T ćelije i makrofage ka ostrvcima preko CXCR3 receptora. Rekrutovane ćelije proizvode brojne citokine u ostrvcima, oštećujući dalje  $\beta$  ćelije, ali i ubrzavajući generisanje IP-10 u preostalim  $\beta$  ćelijama, što je u osnovi intenziviranja destrukcije  $\beta$  ćelija (317). Istovremeno, izgleda da je IP-10 uključen ne samo u imunski odgovor, nego i u supresiju proliferacije  $\beta$  ćelija (318). Takođe, pokazana je ne samo korelacija između nivoa ekspresije IP-10 u celom pankreasu i stepena insulitisa, već i korelacija sa populacijom GAD-reaktivnih IFN- $\gamma$ -produkujućih CD4<sup>+</sup> ćelija (167,319). Takođe, u pankreasnim limfnim čvorovima, ekspresija mRNA za IP-10 je pozitivno korelirala sa ekspresijom mRNA za CXCR3, sugerišući da nivo serumskog IP-10 može reflektovati akumulaciju CXCR3<sup>+</sup> ćelija u pankreasu. Interesantno, nedavno publikovani podaci eksperimentalne studije su pokazali da bi inhibicija IP-10 mogla prevenirati T1D, dok blokada CXCR3 receptora nije dovoljna da zaustavi razvoj T1D, što implicira mnogo kompleksniju i za sada još uvek nerazjašnjenu ulogu oba, IP-10 i CXCR3 u ćelijske subpopulacije u patogenezi ove bolesti (320).

U okviru ovog istraživanja, suprotno našim očekivanjima, cirkulišući nivoi TARC su bili viši, u vrPR u poređenju sa nrPR i kontrolnim ispitanicima, i slični nivou detektovanom u pacijenata sa NT1D (Grafikon 24). Povišen nivo TARC može predstavljati indirektan marker inflamacije pankreasnih ostrvaca ali i dvojnju ulogu koja ovaj hemokin može imati u T1D u smislu potencijalnog prodijabetogenog dejstva (265).



U prethodnim istraživanjima, nivo cirkulišućeg TARC nije analiziran u PR pacijenata sa T1D, a veoma retko je analiziran i u pacijenata sa T1D. Do sada je pokazano da pacijenti sa T1D imaju nešto više nivoa TARC u poređenju sa zdravim kontrolama (245).

U našem istraživanju, nije utvrđena korelacija između nivoa CXCR3<sup>+</sup> i CCR4<sup>+</sup> T ćelija, nivoa IP-10 i TARC i titra autoantitela na β ćelije u vrPR (Tabela 16,18). Ovakav nalaz je očekivan, imajući u vidu da se primarni patogeni proces u T1D ostvaruje preko celularnog imunskog odgovora, i da autoantitela specifična za antigene pankreasnih ostrvaca tokom insulitisa ne doprinose destruktiji β ćelija (321).

Istovremeno, istraživanjem povezanosti procenata subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita i nivoa antitela u perifernoj krvi nije utvrđena značajna korelacija između nivoa antitela GAD i IA-2 i nivoa procenata CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> limfocita i TGFβ u PR pacijenata sa T1D (Tabela 16,18).

Naši rezultati su u saglasnosti sa nalazima studija (246,277,283) u kojima takođe nije registrovana značajna korelacija između nivoa regulatornih supresorskih subpopulacija i antitela na beta ćelijske antigene u PR pacijenata sa T1D.

Binarna logistička regresiona analiza koju smo primenili na naše podatke pokazala je da su nivoi CXCR3<sup>+</sup> i CCR4<sup>+</sup> T memorijskih ćelija, uz nivo hemokina IP-10, nezavisni prediktori za rizik, visok ili nizak, u zdravih PR pacijenata sa T1D (Tabela 22).

I najzad, kada smo analizirali nivo TGFβ, antiinflamatornog citokina i pokazatelja funkcionalnosti subpopulacije T regulatornih limfocita u perifernoj krvi, utvrdili smo da je nivo TGFβ u vrPR je bio statistički neznačajno niži u poređenju kontrolnim ispitanicima, i značajno viši u poređenju sa pacijentima sa N-T1D u IZS i KR. Istovremeno, u pacijenata sa N-T1D u IZS i u KR bolesti, nivo TGFβ je bio značajno niži u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Grafikon 26), sugerišući funkcionalnu iscrpljenost Treg subpopulacije pri otkriću bolesti.

U literaturi su dostupni limitirani i kontradiktorni podaci iz ove oblasti (314). Rezultati studije rađene na perifernim mononuklearima izolovanim na fikolnom gradijentu, u dece sa visokim rizikom za razvoj T1D [ICA≥20 JDF], pacijenata sa NT1D i zdrave dece nosilaca rizičnih HLA gena, pokazali su da je nivo Th1 citokina, IFN-γ i TNF-β, sekretovanih spontano ili nakon specifične stimulacije, veći u dece sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D u poređenju sa decom sa NT1D. Sa druge strane, nivo Th3 citokina TGF-β i IL-10, inflamatornih citokina TNF-α i IL-6, i hemokina RANTES, MCP-1 i IL-7 je bio povišen u pacijenata sa T1D u poređenju sa decom sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, što je delimično u saglasnosti sa rezultatima našeg rada (314). Istovremeno, u prethodnim studijama je pokazano da je u PR pacijenata sa T1D registrovan i poremećaj funkcionalnosti regulatornih subsetova (109).

TGF- $\beta$  je citokin uključen u kontrolu različitih imunskih funkcija uključujući proliferaciju i aktivaciju značajnih subpopulacija. Rezultati jednog istraživanja ukazali su na nižu, ali ne značajno, ekspresiju receptora 1 i 2 za TGF- $\beta$ 1 u Tregs u pacijenata sa T1D u poređenju sa kontrolom (293). U drugoj studiji je registrovan pad u nivou membranskog TGF- $\beta$  koji je vodio u ispoljavanje T1D (322). Takođe, novootkrivena subpopulacija Treg, CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> koji je FoxP3<sup>-</sup> i IL-10<sup>-</sup>, se karakteriše sa membranskim TGF- $\beta$ 1 i CD122, što potvrđuje ulogu ovog imunosupresivnog citokina u funkciji T reg (323). Najzad, primena separisanih Tregs i povećanje nivoa TGF- $\beta$ 1 predstavlja vid savremene efektivne imunoterapije u T1D (324).

Mehanizam kojim se postiže supresorni efekat regulatornih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija i dalje nije dovoljno objašnjen, a većina podataka postoji samo u okviru animalnih modela. Ipak, većina ispitanih modela ukazuje na neophodnost direktnog interćelijskog kontakta između regulatornih i efektornih ćelija (325). Izgleda da je direktna supresivna funkcija regulatornih ćelija u osnovi nezavisna od delovanja antiinflamatornih citokina IL-10 i TGF- $\beta$ , i u tom smislu dominantna u poređenju sa drugim supresorskim mehanizmima (193,326). Sa druge strane, rezultati drugih studija ukazuju na važnu ulogu TGF- $\beta$  što je zasnovano na uočenoj korelaciji između redukcije supresivnih svojstava ovog regulatornog subseta T ćelija i blokade TGF- $\beta$  monoklonskim antitelima (193,327).

Međutim, do danas je objavljeno samo nekoliko studija koje su pokušale da razjasne ovu kontroverzu analizom regulatornog kapaciteta CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija u pacijenata sa T1D. Poznato je iz prethodnih studija da su CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelije relativno anergične nakon poliklonalne aktivacije (184,328,329), ali i pored toga one mogu suprimirati proliferaciju i produkciju citokina od strane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T ćelija, na dozno zavisnan način. Ipak, pokazano je da je regulatorni kapacitet CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija pacijenata sa T1D značajno smanjen u poređenju sa zdravim kontrolama a citokinski milje u kokulturi pacijenata sa T1D se razlikuje od zdravih, što je u saglasnosti sa nalazima našeg rada. Naime, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorne ćelije pacijenata sa T1D mogu imati defekte u regulaciji proinflamatornog odgovora zbog nesposobnosti da suprimiraju produkciju proinflamatornih citokina efektornih T ćelija i nemogućnosti da promovišu sekreciju antiinflamatornih citokina (283). Istovremeno, smatra se da bi regulatorne ćelije pacijenata sa T1D mogle biti sklone klonalnom iscrpljivanju pri pokušaju da kontrolišu aktivaciju imunog sistema koja prethodi kliničkoj dijagnozi T1D.

Sa druge strane, opadanje funkcionalnog kapaciteta Treg sa starosnom dobi opisao je Tsaknaridis (330). Ipak, postoje i saopštenja na animalnim modelima (331) koja ukazuju na jednaku funkciju Treg u različitim starosnim grupama. Moguće je da defekti u funkciji Treg

mogu biti povezani sa nedovoljnom aktivacijom CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> efektorskih T-ćelija (Teffs). Naime, Teffs reprezentuju primarni izvor IL-2, a Tregs zahtevaju IL-2 signalizaciju za odgovarajući razvoj (332). Poznato je da nishodni signalni putevi povezani sa IL-2, uključujući STAT5, mogu biti poremećeni u T1D (333). Istovremeno, površinski marker CD127 se eksprimira u visokom nivou na T eff, dok su funkcionalne Tregs CD127<sup>low</sup> ili negativne (200).

Poznato je da je nivo TGFβ važan za ispoljavanje regulatornog fenotipa. Međutim, u literaturi su prisutni i podaci koji su u suprotnosti sa ovakvim nalazima. Naime, pokazano je da se visoki nivoi ekspresije FOXP3 mogu indukovati u uslovima TGFβ stimulacije ali da aktivacija TCR nije dovoljna za indukciju ekspresije FOXP3 u odsustvu TGFβ u humanoj populaciji (334). Ipak, i dalje ostaje nejasno da li kostimulacija sa TGFβ u in vivo uslovima može voditi u perifernu konverziju humanih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> u CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ćelije.

Pokazano je da transformišući faktor rasta-β1 (TGF-β1), konvertuje naivne T ćelije u regulatorne T ćelije. Ipak, u prisustvu interleukina (IL)-6, TGF-β1 takođe promovise diferencijaciju u IL-17-produkujuće Th17 ćelije koje su značajno uključene u autoimunost i inflamaciju. Međutim, nije razjašnjeno kako TGF-β1 i IL-6 determinišu tako različite sudbine. Implicira se da bi master regulator za Th17, RORγt, bio brzo indukovano preko TGF-β1 nezavisno od prisustva IL-6 (335).

Istovremeno, pokazano je da pacijenti sa NT1D imaju niže nivoe mRNA za IFN-γ, IL-4 i TGF-β u nestimuliranih perifernih mononukleara u poređenju sa zdravom kontrolom (316, 336), što je u saglasnostim sa rezultatima dobijenim u našem radu.

Finalno, nalaz da je nivo Th1 hemokina viši u rođaka sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D u poređenju sa pacijentima sa T1D je u saglasnosti sa shvatanjem o Th1 dominantnom imunom profilu, izraženom preko povišene sekrecije IP-10 tokom faze predijabetesa (107, 242, 336). Dodatno, pokazano je da u rođaka sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D autoantigeni GAD65, IA-2 i heat shock protein indukuju značajnu sekreciju IFN-γ (107).

U periodu kada se bliži nastanak klinički manifestnog T1D, smanjuje se masa β-ćelija, pa se i Th1-odgovor smanjuje i biva suprimiran kod pacijenata sa NT1D (244,316, 336-338). Ova opservacija se poklapa sa nalazima da reaktivnost T ćelija na GAD65 pokazuje pad na početku manifestnog T1D (339), uz smanjenje sekrecije IFN-γ (109). Istovremeno, smatra se da zdravi rođaci sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D imaju sposobnost da menjaju Th1 imunu devijaciju u protektivniji Th2 odgovor u prisustvu autoantigena vezanih za dijabetes (197,242).

Indirektno, ovakva opservacija je u skladu sa rezultatima naših istraživanja gde su PR pacijenata sa T1D nezavisno od prisustva antitela, imali više nivoe protektivne CCR4<sup>+</sup> subpopulacije u poređenju sa obolelima od T1D.

U celini, izgleda da imunološki proces u kojem predominiraju Th1 ćelije prethodi kliničkom otkrivanju T1D, nakon čega dolazi do pojačane aktivacije inflamatornih citokina i hemokina uključenih u destrukciju preostalih insulin-produkujućih  $\beta$ -ćelija, što je u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja.

Tome u prilog govore i nalazi velikog broja studija, koje su proučavale sheme citokinske sekrecije u osoba sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, a fokusirale su se na monozigotne blizance ili trojke, diskordantne za T1D (29,242,340-342). Wilson i autori su pokazali postojanje povećane sekrecije IFN $\gamma$  i smanjenu sekreciju IL-4, kao znak progresije T1D u ovih osoba (29). Takođe, Kallmann i autori su pokazali redukovanu stimulisanu sekreciju IL-4 i IL-10 u blizanaca sa T1D, uz odsustvo razlike u sekreciji IFN $\gamma$  (341). Ovakav citokinski profil je bio prisutan i u antitelo-pozitivnih i antitelo-negativnih blizanaca, što je bilo u osnovi zaključka da njihov humoralni i celularni imuni odgovor nisu korelirali. Nekonzistentni podaci su opisani i u antitelo-pozitivnih PR, odnosno Karlsson i autori su registrovali povećanu IFN $\gamma$  i IL-4 sekreciju GAD65 stimulisanih perifernih mononukleara, dok su Szelachowska i autori korišćenjem nespecifične stimulacije, pokazali normalnu sekreciju IFN $\gamma$  uz smanjenu sekreciju IL-4 i IL-10 u ovih osoba (242, 342). U tom smislu, ovi rezultati su ukazivali na neophodnost dalje evaluacije citokinskog profila u osoba sa visokim rizikom za razvoj T1D, prvenstveno u PR pacijenata sa T1D koji predstavljaju do sada najveću prepoznatu i definisanu populaciju osoba sa predijabetesom.

Takođe, rezultati još jedne studije su pokazali razliku u stimulisanom citokinskom profilu između PR i zdravih osoba koje nisu u srodstvu sa pacijenatima sa T1D (340). Ova shema se sastoji od elevacije nivoa oba, IL-2 i IL-4 citokina, i to kako porasta njihovog maksimuma, tako i ukupne citokinske sekrecije u PR. Ipak, Th1/Th2 balans u ovoj grupi, jasno ukazuje na predominaciju Th1 imunskog odgovora u smislu povišenog IL-2/IL-4 i IL-2/IL-10 odnosa. Istovremeno, rezultati dobijeni nakon godinu dana praćenja osoba sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D pokazali su porast srednjih vrednosti sekrecije IFN $\gamma$ , što je dodatno podržalo koncept o pomeranju imunološkog balansa ka Th1 predominaciji. Ipak, u literaturi postoje i suprotni nalazi, koji sugerišu da je autoimuni dijabetes povezan sa pojačanom sekrecijom IL-4, a ne pojačanom sekrecijom Th1 citokina (343, 336). U uslovima u kojima dolazi do gubitka protektivnog efekta IL-4, dolazi do progresije u manifestnu bolest. U osnovi, kasni pad u produkciji IL-4 je neposredno pre pojave manifestne bolesti saopšten je prvo na

animalnim modelima (344). U celini, rezultati ove studije podržavaju koncept da je perzistentno niska sekrecija IL-4 uz dominaciju Th1 citokina povezana sa pojačanim rizikom za razvoj T1D u PR sa prisutnim autoantitelima na beta ćelijske atigene u cirkulaciji.

Ovaj nalaz je u saglasnosti sa nalazom registrovanim u našem istraživanju u kojem je u vrPR registrovana dominacija Th1 autoimunskog odgovora, kroz povišeni nivo CXCR3<sup>+</sup> subpopulacije T ćelija i IP-10, uz nizak nivo Th2 autoimunskog odgovora, utvrđenog preko smanjenog nivoa CCR4<sup>+</sup> T memorijskih ćelija u poređenju sa nrPR i kontrolnim ispitanicima.

I najzad, nedavno je u pacijenata sa T1D pokazana povezanost sheme citokinskih profila, nivoa hemokina i statusa antitela (163), što nameće potrebu za karakterizacijom celularnog imunog odgovora u visokorizičnih osoba. U tom smislu bi u osoba sa predijabetesom, dodavanje citokinske sekretorne sheme uz prisustvo antitela, moglo biti važan skrining instrument.

Cilj našeg istraživanja nije bio određivanje prevalence ovih autoantitela u PR već određivanje sheme citokinske i hemokinske sekrecije u PR i poređenje ovog nalaza sa nalazima kontrolnih ispitanika, uz korelaciju sa njihovim "antitelo" statusom. Efekat HLA klase na citokinsku sekreciju nije određivan. Ipak, smatra se da genetsko testiranje ima ograničenu vrednost kod PR pacijenata sa T1D u kojih je poznat nivo autoantitela (45), a HLA tipizacija nije uključena ni u novije stratifikacije rizika za T1D, zasnovane prvenstveno na titru antitela (106).

U tom smislu, smatramo da genetska tipizacija u maloj grupi ispitanika, poput našeg istraživanja, ima ograničenu vrednost i ne bi značajno menjala zaključke ovog rada.

Dodatno, pokazano je i da cirkulišući nivoi TNF- $\alpha$  i solubilnog interleukin-2 (sIL-2) receptora u PR dostižu nivoe koji se registruju kod pacijenata obolelih od T1D (345). Ovakav nalaz predstavlja intrigirajući paradoks. Uprkos abnormalnostima u produkciji citokina koje su registrovane, većina PR nikada neće razviti dijabetes. Nameće se pitanje kako objasniti ovu činjenicu u svetlu nalaza koji impliciraju učešće i monocitnih i tip 1 T ćelijskih citokina u patogenezi T1D? Najverovatnije objašnjenje za ovaj nalaz povezan je sa apsolutnim nivoima u kojima se proizvode ovi citokini u *in vivo* uslovima. Prethodno je pokazano da su cirkulišući nivoi IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-1 $\alpha$  značajno viši u vreme dijagnoze dijabetesa i u predijabetesnom periodu u poređenju sa rezultatima u ovoj studiji u zdravih PR ili u pacijenata sa T1D (346). Istovremeno, jasan bjas prema aktivaciji Th1 ćelija nije bio očigledan kod članova porodica pacijenata sa T1D dele sklonost ka pojačanoj aktivaciji monocita i T ćelija sa svojim rođacima dijabetičarima, ali ovaj odgovor nikada ne dostiže maksimume koji se

registruju u predijabetesnom/i ranom dijabetesnom periodu. Alternativno objašnjenje za ovakve nalaze je da je potencijalni dijabetogeni efekat ovih citokina možda blokiran u zdravih članova porodice produkcijom citokinskih antagonista (347). Drugo pitanje koje se nameće jeste zašto uopšte pacijenti oboleli od dijabetesa i njihovi rođaci ispoljavaju takav spektar imunoloških abnormalnosti? Jedno od objašnjenja bilo bi da u ovih osoba postoji naglašena reaktivnost imunog sistema (233). Ova hipoteza je snažno podržana nalazima pojačane sekrecije monocitnih citokina iz perifernih mononukleara kod ovih osoba nakon nespecifične stimulacije. Prethodne studije su pokazale da preterana aktivnost imunog sistema predstavlja mogući predisponirajući faktor za autoimune bolesti u osoba sa određenom genetskom konstitucijom, poput HLA klase II alela (HLA DR3/DR4) (348). Međutim, u opisanoj studiji nije postojala povezanost cirkulišućeg nivoa citokina i HLA DR 3 ili 4 fenotipa. Ovakav nalaz sugerira da ovi »dijabetogeni« aleli nemaju veliki uticaj na produkciju citokina u pacijenata i njihovih rođaka. Takođe, ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija gde takođe nije registrovana povezanost produkcije monocitnih IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  i HLADR fenotipa (349). Naravno, moguće je da su drugi aleli povezani sa abnormalnostima u sekreciji citokina.

Istovremeno, u studiji (242) je pokazano da različiti peptidi mogu uticati na ushodno ili nishodno regulisanu sekreciju IFN- $\gamma$  i IL-4, što je igralo važnu ulogu u moduliranju progresije odnosno odlaganja ispoljavanja T1D na animalnim modelima. Takođe, pokazano je da se specifičan celularni odgovor na insulin može registrovati u predijabetesu (350) i kod NT1D (351). Takođe, registrovan je i snažan ćelijski odgovor sa pojačanom sekrecijom IFN- $\gamma$  posebno na epitope B lanca insulina (348). Nazalna aplikacija GAD65 peptida može indukovati Th2 ćelijski odgovor koji inhibira spontani razvoj autoreaktivnog Th1 odgovora i progresiju  $\beta$ -ćelijske autoimunosti u NOD miša (352). Dodatno, aktivna celularna supresija povezana sa promenom balansa Th1/Th2 ka produkciji Th2 citokina, indukovana je imunizacijom NOD miša sa GAD65 (353). Tretman sa insulinom na različite načine može da prevenira dijabetes i destrukciju pankreasnih  $\beta$ -ćelija u predijabetesnih animalnih modela (354) i rođaka sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D (355). Pokazano je da davanje insulina oralnim putem utiče na razvoj dijabetesa u NOD miša preko generisanja ćelija koje mogu sekretovati imunoregulatorne citokine u okviru ciljnih organa i pomeriti balans od Th1 ka Th2 shemi citokinske ekspresije (356). Insulin korišćen kao antigen u ovoj studiji uzrokovao je smanjenje Th1-odgovora ali i ushodnu aktivaciju Th2-odgovora u rođaka sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D. Takođe, pokazano je i da indukcijom tolerancije pomoću insulina može biti odloženo oboljenje na animalnim modelima, ali bez humoralnog odgovora ili promene u sekreciji IL-4 (357). Ovakav

nalaz može biti posledica prisustva T regulatornih ćelija pre nego protektivnog dejstva nepatogenog Th2 imunog odgovora (357).

Sa druge strane, analiza metaboličkih markera rizika za ispoljavanje T1D u PR, u našem radu je pokazala da je u vrPR nivo prve faze insulinske sekrecije bio značajno manji u odnosu na nrPR i kontrolne ispitanike, i značajno viši u odnosu na pacijente sa N-T1D u IZS i KR, ali još uvek u granicama normale predviđene za tu starosnu dob. Istovremeno, u vrPR nivo insulinske senzitivnosti je bio sličan u odnosu na nrPR i kontrolne ispitanike, i značajno viši u odnosu na pacijente sa N-T1D u IZS i KR. Sa druge strane, nivo insulinske sekrecije i senzitivnosti u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR bio značajno niži u odnosu na PR i kontrolne ispitanike (Grafikoni 28,30).

Takođe, u vrPR nije utvrđena značajna povezanost kako nivoa insulinske sekrecije tako i nivoa insulinske senzitivnosti i nivoa subpopulacija CXCR3<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita (Tabela 20).

U literaturi nisu dostupni podaci o povezanosti i odnosu nivoa subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita i nivoa insulinske sekrecije odnosno senzitivnosti u PR pacijenata sa T1D. Retki podaci ukazuju da smanjena sekrecija IFN- $\gamma$  korelira sa nivoom C-peptida našte u pacijenata sa T1D ali i da postoji inverzna povezanost nivoa C-peptida i Th2 citokina IL-13 u zdravih rođaka sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, što implicira da faktori vezani za funkciju  $\beta$ -ćelije u T1D mogu modifikovati T-ćelijsku funkciju (336).

U našem istraživanju u ispitanika određivali prvu fazu insulinske sekrecije, korišćenjem IVGTT-a, izraženu preko FPIR, i nivo insulinske senzitivnosti, primenom hiperinsulinemijskog euglikemijskog klapa, izraženu preko M vrednosti.

Najveći broj studija iznosi podatke o nivou insulinske sekrecije, određivane IVGTT-om, i insulinske senzitivnosti, determinisane homeostatskim modelom ili minimalnim modelom, u prvih rođaka u kojih su određena antitela na antigene  $\beta$  ćelija.

Poznato je da je u okviru velike prospektivne (358) studije o prevenciji dijabetesa (Diabetes Prevention Trial - Type 1 (DPT-1)), samo jedna osoba (3%) imala normalan IVGTT i OGTT u okviru 6 meseci od ispoljavanja T1D. Smatra se da se u osoba koje razvijaju T1D prvo registruju povišene vrednosti postprandijalnih glikemija u toku 2h OGTT-a a zatim i nivo glikemija našte. Ipak, pokazano je da je FPIR<10. percentila za starosnu dob mnogo manje specifičan za T1D jer je utvrđeno da je značajan broj osoba koje neće oboleti u okviru 2 godine praćenja imao abnormalan nivo FPIR. Većina osoba ima normalne glikemije našte, čak i kada im se registruje patološka kriva u 2h OGTT-u, što znači da je sama glikemija našte nedovoljna za dobru predikciju T1D, te da je preciznije korišćenje oba IVGTT i OGTT (217).

Istovremeno, značajan broj osoba ima normalan OGTT (24%) ili normalan IVGTT (22%) 6 meseci pre dijagnoze T1D, a veoma mali broj ima normalne rezultate oba testa (3%), što sugeriše da se maksimalna senzitivnost postiže primenom oba testa.

U opsežnoj studiji koja je obuhvatala preko (359) 700 inicijalno zdravih rođaka, izvršena je klasifikacija stadijuma prekliničkog T1D i to na osnovu 2 kriterijuma: broja antitela detektovanih pre postavljanja dijagnoze: ništa (bez antitela), rani (1 antitelo), napredovali (2 antitela) i kasni predijabetes (više od 3 antitela), i kombinacije broja antitela i odgovora prve faze insulinske sekrecije (FPIR) na intravensku glukozu: ništa (bez antitela), rani (1 antitelo, normalan FPIR), napredovali (2 antitela ili više antitela, normalan FPIR) i kasni predijabetes (1 ili više antitela, redukovani FPIR). Pokazano je da, ako se za stratifikovanje predijabetesa koristi princip kombinacije broja antitela i FPIR, prediktabilnost u grupi kasnog predijabetesa značajno povećava sa 66% na čak 92%. U tom smislu, analiza FPIR poboljšava prediktivnu vrednost strategije klasifikovanja a IVGTT je se preporučuje kao dodatna metoda za rođake koji su pozitivni na jedno ili više autoantitela.

Takođe, u okviru DPT-1 studije koja je obuhvatila skoro 60000 rođaka pacijenata sa T1D, koji su skriningovani na prisustvo ICA, ispitivana je mogućnost antigen bazirane terapije u formi intervencija sa parenteralnim insulinom za visokorizične osobe (>50% verovatnoće za ispoljavanje T1D u sledećih 5 godina) ili oralnim insulinom za osobe sa umerenim rizikom (25%-50% za 5 godina) u cilju prevencije ili odlaganja ispoljavanja T1D. Pokazano je da je nivo FPIR je bio niži kod ICA<sup>+</sup> ili IAA<sup>+</sup> rođaka, rođaka sa većim titrom ICA ili IAA, i osoba sa poremećenom tolerancijom na glikozu (229). Istovremeno pokazano je da FPIR snažno korelira sa faktorima rizika za ispoljavanje T1D. Nizak FPIR je definisan kao <100 µU/mL za rođake i decu ≥8 godina starosti (njihov 10. percentil) ili <60 µU/mL za roditelje (njihov 1. percentil) ili za rođake i decu <8 godina starosti (njihov 10. percentil), što je navedeno i u Florida Family Study (360). Smatra se da je 10. percentil utvrđen za sve starosne kategorije 81 µU/mL (361).

Ranije je pokazano da starosna dob korelira sa FPIR, a najniži FPIR je zabeležen u prepubertalnih osoba, <8 starosti. Rosenbloom (362) je pokazao najniže našte i posprandijalne nivoje insulina u zdrave dece kojima je urađen OGTT. Ove podatke treba imati u vidu kada se procenjuje validnost FPIR u određivanju faktora rizika za ispoljavanje T1D, odnosno treba obratiti pažnju na različite vrednosti FPIR za različite starosne grupe.

Sa druge strane, nivo FPIR je bio dodatno za 35% -39% niži u osoba u kojih je detektovan visok titar IAA (>80 nU/mL) u poređenju sa ispitanicima sa negativnim titrom antitela. Starije osobe (31-45 godina) nisu imale smanjenje nivoa FPIR vezanu za ICA titar.



Ipak, kada su i ICA i IAA bili pozitivni, FPIR je bio redukovan za 35% u grupi sa najvećim IAA titrom. Međutim, starije osobe koje su bile samo ICA<sup>+</sup> i nisu imale nizak FPIR i najverovatnije neće razviti dijabetes, dok su mlađe osobe sa registrovanim poremećajima na glikoznu toleranciju ili dijabetesom, imale su FPIR koji je bio značajno niži u poređenju sa osobama sa normalnim OGTT-om. U poređenju sa svim starosnim grupama, one osobe koje su imale poremećen rezultat OGTT-a, imale su vrednosti FPIR za oko 2/3 od onih registrovanih u inače visokorizičnih osoba sa normalnim OGTT testom. Osobe sa dijabetesnim OGTT-om su imale i niže vrednosti FPIR, u proseku oko 1/2 FPIR registrovanog u osoba sa normalnim OGTT-om. Generalno, ovi nalazi sugerišu da je FPIR odličan prediktor progresije u T1D.

Sa druge strane, izvedena je i studija koja je procenjivala nivo insulinske sekrecije na osnovu parametra druge faze insulinske sekrecije, akutnog insulinskog odgovora (acute insulin response AIR), merenog na osnovu intravenskog testa stimulacije na glukozu sa učestalim uzimanjem uzoraka (minimalni model). U ovoj studiji tokom 3 godine praćeno je (363) 85 rođaka koji su bili ICA ili IAA pozitivni, a njih 10 je ispoljilo T1D. Smatra se da kada je vrednost AIR ispod 10. percentila zdravih ljudi, rizik za ispoljavanje T1D je 50% za 5 godina. Međutim, u studiji je registrovano čak 13 pacijenata sa niskim AIR i 13 osoba sa 2 ili više antitela koji nisu progredirali u dijabetes. Rezultati studije su pokazali da ICA<sup>+</sup> uz prisustvo GAD antitela i nisku vrednost AIR predstavljaju dobre prediktore za ispoljavanje T1D, dok dodavanje IAA antitela ili samo pojedinačno određivanje AIR ne pojačava prediktivnu snagu.

Istovremeno, pojedine osobe u kojih je AIR bio u granicama normale razvile su T1D. Podaci ukazuju da jednom izmerena niska vrednost AIR ima visoku prediktabilnu moć za ispoljavanje T1D u kratkom vremenskom intervalu. Međutim, više puta merene niske vrednosti AIR u dužem vremenskom intervalu, gube na prediktivnoj moći. Progresori imaju trend opadanja vrednosti AIR a neprogresori imaju značajno varijabilnije vrednosti AIR tokom vremena (363). Ovi podaci kod neprogresora podržavaju hipotezu o više “događaja” neophodnih za ispoljavanje T1D. U tom smislu, osoba neće razviti T1D iako ima smanjenu funkciju beta ćelije, ukoliko se ne desi još neki događaj, poput virusne infekcije. Alternativna hipoteza jeste da kod neprogresora postoji kontinuirani proces oštećenja beta ćelija, ali je progresija oboljenja izuzetno spora, pa samo izgleda da su te osobe i dalje zdrave i neprogresori. Takvi neprogresori bi razvili T1D u starijem životnom dobu.

Dodatno, rezultati nedavno završene studije ukazuju da je, u cilju održavanja reproducibilnosti metaboličkih testova tokom praćenja osoba sa rizikom za ispoljavanja T1D, neophodno ponavljati odabrani test za procenu insulinske sekrecije, kao i da je smanjenje nivoa

C peptida u 30. minutu tokom OGTT-a i odloženi pik C peptida, znak za progresiju deterioracije sekretorne funkcije  $\beta$  ćelije (364).

Sa druge strane, smanjenje nivoa insulinske senzitivnosti, odnosno insulinska rezistencija u osoba sa prisutnim markerima autoimunosti na antigene beta ćelija može imati genetsko-konstitucionalnu osnovu, ali može biti i sekundaran kao posledica autoimunog procesa. Poznata je povezanost insulinske rezistencije i gojaznosti, a u dece koja obole od T1D utvrđen povećan ITM u prvoj godini života (365, 366). Ipak, poznato je da ITM ne mora precizno odražavati visceralnu gojaznost koja utiče na nivo insulinske rezistencije (367), a ne mogu se isključiti male razlike u sastavu tela (body composition) između progresora i neprogresora (368). Hipoteze “fetalnog porekla” (369) i posledični “štedljivi fenotip” (370) i “nadoknada težine” (371, 372) fokusirale su se na populaciju male telesne težine na rođenju, usled loše ishrane tokom gestacije, a koji se kasnije u toku života karakterišu insulinskom rezistencijom. Takođe, prevalenca i titar GAD antitela su povezane sa ITM u prvih rođaka pacijenata sa T1D (373). Prema akcelerator hipotezi deca koja imaju veću telesnu težinu u detinjstvu razvijaju T1D u ranijem životnom dobu. U našem istraživanju ispitanici nisu bili gojazni i bili su usklađeni u odnosu na ITM.

Dodatno, insulinska rezistencija može reflektovati agresivniju formu autoimune bolesti, koja se izražava preko imunoinflamatornih faktora koji posreduju u  $\beta$  ćelijskoj destruktiji. Takvi faktori su TNF- $\alpha$  i IL-6, koji posreduju u insulinskoj rezistenciji (374,375) i autoantitela na insulinski receptor, za koji je saopšteno da je povezan sa IAA (376).

S obzirom da nivo glikemije određuje odnos insulinske sekrecije i senzitivnosti (220), očekivalo bi se da insulinska rezistencija vodi ka ranijem nastanku hiperglikemije, u uslovima kada je beta ćelija ugrožena atakom autoimunog odgovora. Takođe, porast glikemije sekundarno zbog insulinske rezistencije bi mogao pojačati inflamatorni proces na ostrvcima i  $\beta$  ćelijsku smrt. Pokazano je da glikoza indukuje stvaranje proinflamatornih citokina IL-1 $\beta$  u ostrvcima (377), koji ushodno regulišu ekspresiju Fas receptora smrti (378) i autoantigena (52,379) u beta ćelijama, u cilju indukcije beta ćelijske apoptoze (380).

Istovremeno, rezultati našeg istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima publikovanim u okviru studije u kojoj se nivo insulinske senzitivnosti nije razlikovao između progresora i neprogresora (363). U našem radu za procenu nivoa insulinske senzitivnosti korišćen je zlatni metodološki standard, hiperinsulinemijski euglikemijski klamp, a u ovoj studiji insulinska senzitivnost procenjivana je na osnovu minimalnog modela.

Poznato je da su do sada 3 loginutidalne studije ispitivale uticaj insulinske rezistencije na progresiju subkliničkog T1D (381). U jednoj od studija u cilju evaluacije glikozne

homeostaze korišćeni su HOMA-R i FPIR, za merenje insulinske rezistencije (218,382,383) i insulinske sekrecije (219). Nivo HOMA-R je značajno korelirao sa vremenom do ispoljavanja T1D (382). Rezultati Melbourne Pre-Diabetes Family Studije su pokazali da se rođaci sa prisutnim autoantitelima na antigene pankreasnih ostrvaca koji najbrže progrediraju u dijabetes se karakterišu većim nivoom insulinske rezistencije za njihov nivo insulinske sekrecije godinama pre otkrića dijabetesa (384) a sličan rezultat je dobijen i u Childhood Diabetes in Finland studiji (217). Međutim, rezultati Seattle Family studije su pokazali da određivanje odnosa nivoa insulinske rezistencije prema nivou FPIR nije poboljšalo predikciju T1D (385).

Rezultati Melbourne pre-diabetes family studije su pokazali da je nivo insulinske rezistencije izražen preko HOMA-R i insulinske sekrecije merene preko FPIR, u osoba sa autoantitelima na antigene pankreasnih ostrvaca, bio dobar prediktor za rizik za razvoj manifestnog T1D (384). Slični rezultati objavljeni su i u Childhood Diabetes in Finland Studiji (217). Međutim, rezultati Seattle family studije su pokazali da ovako određivanje nivoa insulinske rezistencije nije poboljšalo predikciju T1D (385). Ipak, i u DPT-1 studiji utvrđena je značajna povezanost između nivoa HOMA-R, odnosa FPIR/HOMA-R i ispoljavanja T1D u obe rizične grupe rođaka. Takođe, osobe koje su razvile T1D u obe grupe pokazale su povećan nivo HOMA-R i smanjen FPIR/HOMA-R odnos u vreme postavljanja dijagnoze, u odnosu na njihove početne vrednosti (229). Ovaj nalaz je u saglasnosti sa drugim studijama (365,386) u kojima je korišćenja ista metodologija za merenje insulinske rezistencije, a studija u kojoj nije registrovana povezanost između insulinske rezistencije i ispoljavanja T1D koristila je drugu metodologiju.

U celini, rezultati ovih studija ukazuju na povezanost insulinske rezistencije i progresije T1D, implicirajući da je FPIR/HOMA-R odnos kao mera insulinske rezistencije i sekrecije, bolji prognostički prediktorni marker nego svaki od ovih markera pojedinačno.

Interesantno zapažanje publikovano u okviru jednog od istraživanja u kojem je procenjivan značaj nivoa insulinske rezistencije kao faktora rizika za progresiju T1D, odnosi se na progresore u kojih je registrovan porast glikemije i insulinemije našte u poređenju sa neprogresorima, iako su te vrednosti bile još uvek u okviru normalnog ranga, što je bilo u osnovi višeg nivoa HOMA-R vrednosti. U daljem toku registrovan je porast odnosa HOMA-R i FPIR, sugerišući progresivnu disregulaciju odnosa insulinske senzitivnosti i sekrecije (365). Značaj ovih nalaza leži u činjenici da se brzi progresori mogu identifikovati i ranije, čak i kada su metabolički parametri poput glikemije, insulinemije našte i FPIR još uvek u okviru normalnog ranga. Važno je istaći da pojedinačno određivanje HOMA-R može dovesti do pogrešnih zaključaka jer nivo HOMA-R opada kako se osoba približava klinički manifestnoj

bolesti, jer opada nivo insulinemije našte. Istovremeno, Wallace i saradnici sugerišu da insulinska rezistencija merena HOMA-R može potceniti aktuelni nivo insulinske rezistencije (387).

Takođe, rezultati druge studije ukazali su da ne postoji genetski determinisano smanjenje insulinske senzitivnosti, koje bi predisponiralo osobu da dobije T1D (388). Pokazano je smanjenje i insulinske sekrecije i odnosa insulinska senzitivnost/insulinska sekrecija u predijabetesnih blizanaca koji su razvili T1D, ali s obzirom da iste promene nisu registrovane u identičnih blizanaca koji nisu razvili dijabetes, sugeriše se da ove promene nisu genetski determinisane. Ovi nalazi ukazuju da patogeni proces koji uzrokuje T1D najverovatnije nije posledica nasleđenog defekta insulinske sekrecije ili senzitivnosti, ali rezultati ne isključuju druge faktore koji mogu ubrzati progresiju oboljenja ili potencirati metaboličku dekompenzaciju. Ne može se isključiti pretpostavka da senzitivnije tehnike za determinisanje insulinske senzitivnosti i sekrecije mogu detektovati manje promene u onih blizanaca koji nisu razvili T1D, a poznato je da osobe sa prisutnim autoantitelima pokazuju širok spektar kliničkih i metaboličkih fenotipova (217,389).

Do danas su u pokušaju prevencije T1D korišćeni različiti agensi koji bi trebalo da moduliraju insulinsku sekreciju i/ili senzitivnost, a velika diskusija je vođena o efektima nikotinamida na  $\beta$  ćelijsku funkciju (390). Naime, u istraživanju je u kojem je učestvovalo preko 1000 rođaka pokazano je da je oralno dati nikotinamid protektivno delovao na  $\beta$  ćelijsku funkciju i preventivno na ispoljavanje T1D u ICA<sup>+</sup> prvih rođaka. Istovremeno, Elliott i Chase (391) publikovali su u studiju u kojoj su pokazali da je oralna primena nikotinamida smanjila incidencu T1D. Međutim, u German-Austrian Nicotinamide trial (DENIS) (77) nije pokazan efekat nikotiamida ni na beta ćelijsku funkciju ni na incidencu T1D. Pokazano je da je u zdravih ICA<sup>+</sup> PR pacijenata sa T1D registrovan porast nivoa insulinske rezistencije nakon 2 nedelje tretmana sa nikotinamidom i da je ovaj nalaz bio povezan sa očekivanim porastom u insulinskoj sekreciji (392). Smatra se da je mehanizam dejstva nikotinamida zaštita  $\beta$  ćelija od efekata imune agresije, a ne modulirajuće dejstvo na antitela. U tom smislu, nikotinamid bi delovao protektivno u odnosu na celularni imuni odgovor preko 3 mehanizma: scavenging (blokiranje) slobodnih kiseoničnih radikala produkovanih preko aktiviranih makrofaga, nishodnom regulacijom citokinima indukovane inducibilne NO sintaze u beta ćeliji, i redukovanja štete nastale preko NO, i inhibirajući poli-adenin-riboza polimeraze (PARP), i na taj način izbegavajući destruktivan efekat ekscesivne popravke DNA u oštećenom genetskom materijalu (77,390).

I najzad, novije studije ukazale su na značaj  $\beta$ -ćelijske glukozne senzitivnosti, kao prediktora za ispoljavanje T1D. Naime,  $\beta$ -ćelijska glukozna senzitivnost bi se grafički mogla predstaviti kao kriva odnosa između stope insulinske sekrecije i nivoa plazma glikemije, koja bi, kod progresora ili osoba sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D koji će i progredirati u manifestni T1D, bila značajno manjeg nagiba ili niža u poređenju sa neprogresorima (393). U tom smislu, pokazano je da je ispad u  $\beta$ -ćelijskoj glukoznoj senzitivnosti rani defekt u toku T1D, odnosno, da u najranijoj fazi poređenja progresora i neprogresora, nije bilo razlike u nivou insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti, ali je registrovana značajno smanjena  $\beta$ -ćelijska glukozna senzitivnost u progresora. U daljem toku, u progresora je porast glikemije korelirao sa padom insulinske senzitivnosti uz dodatno pogoršanje  $\beta$  ćelijske glukozne neosetljivosti, zajedno sa padom nivoa insulinske sekrecije. Drugim rečima, putanje glikemije i  $\beta$ -ćelijske funkcije su pomerene jedna u odnosu na drugu za 6–8 meseci, tokom kojih se ni apsolutna insulinska sekrecija, ni insulinska senzitivnost ne menjaju primetno i značajno, a jedino gubitak  $\beta$ -ćelijske glukozne senzitivnosti predstavlja značajan akcelerator za hiperglikemiju u osoba sa visokim rizikom koje će brzo progredirati u T1D (393).

Međutim, postoje i podaci koji sugerišu da porast glikemije u predijabetesnom periodu nije linearan, već veoma varijabilan, i da se u osnovi tih fluktuacija glikemija nalaze kako rani ispad u insulinskoj sekreciji tako i pad nivoa insulinske senzitivnosti tokom prekliničkog razvoja T1D (394).

U tom smislu, povezanost  $\beta$ -ćelijske glukozne nesenzitivnosti i glikozne tolerancije sama po sebi ne znači i uzročno posledičnu vezu: primarni  $\beta$ -ćelijski defekt može uzrokovati gubitak glikozne tolerancije ali može biti i posledica toksičnog efekta blage ali prisutne hiperglikemije na  $\beta$ -ćeliju. Istovremeno, primarni  $\beta$ -ćelijski defekt može biti posledica kako smanjenja njihovog broja tako i smanjenja njihove funkcionalnosti, ili udruženog poremećaja, a *in vivo* određivanje  $\beta$ -ćelijske glukozne senzitivnosti ne omogućava distinkciju između ova dva defekta. U tom kontekstu, u osoba koje će ispoljiti dijabetes, tip 1 ili tip 2, mora biti poremećeno nekoliko faktora koji kontrolišu glikoznu toleranciju, što je u osnovi tkzv kritičnog stanja nestabilnosti. U takvim uslovima, faza tranzicije može biti započeta malim promenama u kontrolnim varijablama koje veoma brzo nastaju. Paradigma nestabilnosti se u patogenezi T1D zasniva na značajnoj promeni u broju  $\beta$ -ćelija, makrofaga i Th limfocita, koja za krajnju posledicu ima perzistentnu eliminaciju  $\beta$ -ćelija, što je u osnovi shvatanja da je ispoljavanje T1D vezano za dinamičan proces nestabilnosti više faktora a ne samo jednog pojedinačnog etiološkog faktora (393,395).

U celini, rezultati našeg istraživanja su pokazali da vrPR imaju niže nivoe FPIR, porast CXCR3<sup>+</sup> Th1, snižen nivo CCR4<sup>+</sup> Th2 i CD25<sup>high</sup> Treg limfocita, bez promena u insulinskoj senzitivnosti, dok su kod pacijenata sa NT1D slične promene bile udružene sa smanjenjem insulinske senzitivnosti. Naši nalazi bi mogli ukazivati da inicijalne promene u toku T1D uključuju proinflamatorni imuni odgovor, udružen sa ranim padom u insulinskoj sekreciji, koji ne utiče na insulinsku senzitivnost, dok su kasnije u toku bolesti, promene u insulinskoj senzitivnosti, najverovatnije posledica značajnog smanjenja insulinske sekrecije.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, postoji porast nivoa proinflatornog Th1 autoimunskog odgovora.

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- a. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, utvrđen je viši nivo  $CD4^+CXCR3^+$  memorijskih T limfocita, proinflatorne Th1 subpopulacije, u odnosu na prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D, kontrolne ispitanike i pacijente sa N-T1D u IZS i KR.
- b. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, utvrđen je viši nivo intenziteta fluorescence CXCR3 receptora, u odnosu na prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D, kontrolne ispitanike i pacijente sa N-T1D u IZS i KR.
- c. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D nivo IP-10, Th1 hemokina i liganda za CXCR3 receptor, je značajno viši u odnosu na prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike, a sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR.

2. U pacijenata sa N-T1D u IZS na početku bolesti intenzitet proinflatornog Th1 autoimunskog odgovora opada, i ne menja se značajno u daljem toku bolesti.

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- a. U pacijenata sa N-T1D u IZS utvrđen je značajno niži nivo  $CD4^+CXCR3^+$  T memorijskih limfocita, u odnosu na kontrolne ispitanike, sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa T1D u KR bolesti.
- b. U pacijenata sa N-T1D u IZS utvrđen je značajno niži nivo intenziteta fluorescence CXCR3 receptora, u odnosu na kontrolne ispitanike, sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa T1D u KR bolesti.

- 
- c. U pacijenata sa N-T1D u IZS, nivo IP-10, liganda za CXCR3 receptor, je značajno viši u odnosu na kontrolne ispitanike, i sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa T1D u KR bolesti.
3. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, postoji smanjenje nivoa antiinflamatornog Th2 autoimunskog odgovora.  
Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:
- a. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, utvrđen je značajno niži nivo  $CD4^+CCR4^+$  T memorijskih limfocita, antiinflamatorne Th2 subpopulacije, u odnosu na prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike, i sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR.
- b. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, utvrđen je značajno niži nivo intenziteta fluorescence CCR4 receptora, u odnosu na prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike, i sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR.
- c. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D nivo TARC, Th2 hemokina i liganda za CCR4 receptor, je značajno viši u odnosu na prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike a sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR.
4. U pacijenata sa N-T1D u IZS na početku bolesti intenzitet antiinflamatornog Th2 autoimunskog odgovora opada, i ne menja se značajno u daljem toku bolesti.  
Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:
- a. U pacijenata sa N-T1D u IZS prisutan je značajno niži nivo  $CD4^+CCR4^+$  T memorijskih limfocita, u odnosu na kontrolne ispitanike, sličan nivou utvrđenom u pacijenata u KR bolesti.
- b. U pacijenata sa N-T1D u IZS prisutan je značajno niži nivo intenziteta fluorescence CCR4 receptora, u odnosu na kontrolne ispitanike, sličan nivou utvrđenom u pacijenata u KR bolesti
- c. U pacijenata sa N-T1D u IZS, nivo TARC, liganda za CCR4 receptor, je značajno viši u odnosu na kontrolne ispitanike, i sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa T1D u KR bolesti.
-



- 
5. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, postoji smanjenje nivoa supresorskog T regulatornog imunskog odgovora.

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- a. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nivo  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita je značajno niži u odnosu na prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D, kontrolne ispitanike i pacijente sa N-T1D u IZS i KR.
- b. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nivo  $TGF\beta$ , pokazatelja funkcionalnosti subpopulacije T regulatornih limfocita, je sličan nivou utvrđenom u kontrolnih ispitanika i značajno viši u odnosu na pacijente sa N-T1D u IZS i KR bolesti.

6. U pacijenata sa N-T1D u IZS nivo supresorskog T regulatornog imunskog odgovora je oštećen na početku bolesti, dominantno u smislu funkcionalne iscrpljenosti T reg limfocita, i ne menja se značajno u daljem toku bolesti.

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- a. U pacijenata sa N-T1D u IZS utvrđen je niži nivo  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita u odnosu na kontrolne ispitanike, ali bez statističke značajnosti, i sličan nivou utvrđenom u pacijenata sa T1D u KR bolesti.
- b. U pacijenata sa N-T1D u IZS i u KR bolesti, nivo  $TGF\beta$  je značajno niži u odnosu na kontrolne ispitanike.

7. U prvih rođaka pacijenata sa T1D nije utvrđena povezanost između rizika za ispoljavanje bolesti, kliničke manifestacije bolesti i promene ukupnog broja induktorskih, supresorskih/citotoksičnih i memorijskih T limfocita.

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- a. U prvih rođaka pacijenata sa T1D nije utvrđen poremećaj ukupnog broja induktorskih  $CD4^+$  i supresorskih/citotoksičnih  $CD8^+$  T limfocita i memorijskih  $CD4^+CD45RO^+$  T limfocita u odnosu na kontrolne ispitanike, pacijente sa N-T1D u IZS i KR bolesti.

8. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nije utvrđena povezanost između celularnih i humoralnih parametara autoimunosti.

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- a. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nije utvrđena značajna povezanost između nivoa subpopulacija  $CD4^+CXCR3^+$ ,  $CD4^+CCR4^+$  memorijskih T limfocita i  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita i nivoa antitela specifičnih za antigene beta ćelija, GAD i IA2.
- b. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nije utvrđena značajna povezanost između nivoa IP-10, TARC i  $TGF\beta$  i nivoa antitela specifičnih za antigene beta ćelija, GAD i IA2.

9. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, utvrđeno je sniženje nivoa prve faze insulinske sekrecije, koja je još uvek u granicama normale predviđene za tu starosnu dob, dok u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR postoji značajan gubitak u prvoj fazi insulinske sekrecije.

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- a. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nivo prve faze insulinske sekrecije je značajno niži u odnosu na prve rođake sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolne ispitanike, i značajno viši u odnosu na pacijente sa N-T1D u IZS i KR, ali još uvek u granicama normale predviđene za tu starosnu dob
- b. U prvih rođaka pacijenata sa T1D, utvrđeno je da je nivo prve faze insulinske sekrecije značajno niži u odnosu na kontrolne ispitanike i značajno viši u odnosu na pacijente sa N-T1D u IZS i KR, ali još uvek u granicama normale predviđene za tu starosnu dob.

10. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nije bilo ispada u nivou insulinske senzitivnosti, dok je u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR nivo insulinske senzitivnosti bio značajno narušen.

Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:

- a. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nivo insulinske senzitivnosti je sličan nivou utvrđenom u prvih rođaka sa niskim rizikom za ispoljavanje T1D i kontrolnih ispitanika, ali značajno viši u odnosu na pacijente sa N-T1D u IZS i KR.
  - b. U prvih rođaka pacijenata sa T1D, nivo insulinske senzitivnosti je značajno viši u odnosu na pacijente sa N-T1D u IZS i KR, dok je nivo insulinske senzitivnosti u pacijenata sa N-T1D u IZS i KR značajno niži u odnosu na kontrolne ispitanike .
11. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanje T1D, nije utvrđena povezanost između metaboličkih i imunoloških parametara.  
Ovaj zaključak se zasniva na sledećim rezultatima:
- a. U prvih rođaka pacijenata sa T1D sa visokim rizikom za ispoljavanjem T1D, nije utvrđena značajna povezanost kako nivoa insulinske sekrecije tako i nivoa insulinske senzitivnosti i nivoa subpopulacija  $CD4^+CXCR3^+$ ,  $CD4^+CCR4^+$  T memorijskih limfocita i  $CD4^+CD25^{high}$  T limfocita.
12. Binarna logistička regresiona analiza koju smo primenili na naše podatke pokazala je da su nivoi  $CXCR3^+$  i  $CCR4^+$  T memorijskih ćelija, uz nivo hemokina IP-10, nezavisni prediktori za rizik, kako visok tako i nizak, u zdravih prvih rođaka pacijenata sa T1D.

U celini, u prvih rodaka pacijenata sa T1D, sa visokim rizikom za nastanak oboljenja, rizik za ispoljavanje bolesti je povezan sa porastom nivoa proinflamatorne Th1 subpopulacije CXCR3<sup>+</sup> T memorijskih limfocita i hemokina IP-10, uz istovremeno sniženje nivoa dve subpopulacije, antiinflamatorne Th2 subpopulacije CCR4<sup>+</sup> T memorijskih limfocita i regulatorne supresorske subpopulacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T limfocita, što ukazuje da bi poremećaj nivoa, odnosa i funkcionalnosti ovih CD4<sup>+</sup> subpopulacija T limfocita mogao predstavljati potencijalnu metu za preventivne intervencije u fazi predijabetesa. Istovremeno, prvi rodaci pacijenata sa T1D, sa visokim rizikom za nastanak oboljenja, imaju niži nivo prve faze insulinske sekrecije i nemaju poremećaj u nivou insulinske senzitivnosti.

U okviru ovog rada, komplementarna istraživanja su pokazala da je rizik za ispoljavanje T1D, značajno povezan sa predominacijom proinflamatornog Th1 i sniženjem Th2 autoimunskog odgovora, uz defekte u broju regulatornih T limfocita, što ukazuje na dinamičan, kompleksan i višestruki poremećaj na nivou odnosa različitih imunskih mehanizama koji bi mogao biti u osnovi razvoja T1D.

---

## 7. LITERATURA

1. Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes *Autoimmunity Reviews* 2008; 7: 550–557.
2. Roep BO. The role of T cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure. *Diabetologia* 2003; 46:305-321.
3. Atkinson MA, Eisenbarth GE, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*, 2014 Jan 4;383(9911):69-82.
4. Eisenbarth GS. Update in Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 92(7):2403–2407
5. Gianani R, Putnam A, Still T, Yu L, Miao D, Gill RG, Beilke J, Supon P, Valentine A, Iveson A, Dunn S, Eisenbarth GS, Hutton J, Gottlieb P, Wiseman A. Initial results of screening of non-diabetic organ donors for expression of islet autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1855–1861
6. Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained  $\beta$  cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 2005; 48:2221–2228
7. Stene LC, Barriga K, Hoffman M, Kean J, Klingensmith G, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Normal but increasing hemoglobin A1c levels predict progression from islet autoimmunity to overt type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Pediatr Diabetes* 2006; 7:247–253
8. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007;39:857–64.
9. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 2009 ; 360: 1646–54
10. Caillat-Zucman S, Garchon HJ, Timsit J, Assan R, Boitard C, Djilali-Saiah I, Bougneres P, Bach JF. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 90:2242–2250.
11. Vandewalle CL, Decraene T, Schuit FC, De Leeuw IH, Pipeleers DG, Gorus FK. Insulin autoantibodies and high titre islet cell antibodies are preferentially associated with the HLA DQA1\*0301-DQB1\*0302 haplotype at clinical type 1 (insulin-dependent) diabetes

- mellitus before age 10 years, but not at onset between 10 and 40 years: The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia* 1993; 36:1155–1162.
12. Hawa NU, Fava D, Medici F, Deng YJ, Notkins AL, De Mattia G, Leslie RDG. Antibodies to IA-2 and GAD65 in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23:228–233.
  13. Niskanen LK, Tuomi T, Karjalainen J, Groop LC, Uusitupa MI. GAD antibodies in NIDDM: ten-year follow-up from the diagnosis. *Diabetes Care* 1995;18:1557–1565.
  14. Palmer JP, Juneja R. Type 1 1/2 diabetes: myth or reality? *Autoimmunity* 1999; 29:65-83.
  15. Buzzetti R, Quattrocchi CC, Nisticò L. Dissecting the genetics of type 1 diabetes: Relevance for familial clustering and differences in incidence. *Diabete Metab Rev* 1998; 14:111–128.
  16. Szalai, C., Császár A, Czinner A, Szabó T, Pánczél P, Madácsy L, Falus A. Chemokine receptor CCR2 and CCR5 polymorphisms in children with insulin dependent diabetes mellitus. *Pediatr. Res.* 1999;46:82–84.
  17. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, Yu L, Miao D, Erlich HA, Fain PR, Barriga KJ, Norris JM, Rewers MJ, EisenbarthGS. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14074–14079
  18. Winter WE, Harris N and Schatz D. Immunological Markers in the Diagnosis and Prediction of Autoimmune Type 1a Diabetes *Clinical Diabetes*; 2002;20(4) : 183-191.
  19. Maclaren NK, Atkinson MA: Is insulindependent diabetes mellitus environmentally induced? *N Engl J Med* 1992; 327:347–349.
  20. Akerblom HK, Knip M: Putative environmental factors in type 1 diabetes. *DiabetesMetab Rev* 1998; 14:31–67.
  21. Bognetti E, Meschi F, Malavasi C, Pastore MR, Sergi A, Illeni MT, Maffei C, Pinelli L, Chiumello G: HLA-antigens in Italian type 1 diabetic patients: role of DR3/DR4 antigens and breast feeding in the onset of the disease. *Acta Diabetol* 1992;28:229–232.
  22. Kostraba JN, Cruickshanks KJ, Lawler-Heavner J, Jobim LF, Rewers MJ, Gay EC, Chase HP, Klingensmith G, Hamman RF: Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. *Diabetes* 1993; 42:288–295
  23. Komulainen J, Kulmala P, Savola K, Lounamaa R, Ilonen J, Reijonen H, Knip M, Akerblom HK. Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of very young children with type 1 diabetes: Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care* 1999; 2:1950–1955.

24. Knip M. Should We Screen for Risk of Type 1 Diabetes? *Diabetes Care* 2008; 31:622-623.
25. Lorenzen T, Pociot F, Hougaard P, Nerup J: Long-term risk of IDDM in first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia* 1994;37:321–327.
26. THE DIABETES PREVENTION TRIAL–TYPE 1 STUDY GROUP. Effects of Oral Insulin in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:1068–1076.
27. Wagener DK, Sacks JM, LaPorte RE, MacGregor JM: The Pittsburgh study of insulin-dependent diabetes mellitus: risk for diabetes among relatives of IDDM. *Diabetes* 1982; 31:136–144.
28. Allen C, Palta M, D’Alessio DJ: Risk of diabetes in siblings and other relatives of IDDM subjects. *Diabetes* 1991; 40:831–836.
29. Wilson SB, Kent SC, Patton KT et al. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; 391:177–181.
30. Jansen A, van HM, Drexhage HA. Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes. *Lancet* 1995; 345:491–492.
31. Peakman M, Alviggi L, Hussain MJ et al. Increased expression of T-Cell markers of immunological memory associated with protection from type I diabetes—a study of identical twins. *Diabetes* 1994; 43:712–717.
32. Peakman M, Leslie RDG, Vergani D. Immunological studies on Type-1 diabetes in identical twins. *Arch Dis Child* 1993; 69:97–99.
33. Peakman M, Mahalingam M, Leslie RD, Vergani D. Co-expression of CD45RA (naive) and CD45R0 (memory) T-cell markers. *Lancet* 1994; 343:424.
34. Douglas Petersen L, Duinkerken G, Bruining GJ, van Lier R, De Vries RRP, Roep BO. Increased numbers of in vivo activated T-cells in patients with recent onset diabetes mellitus. *J Autoimmun* 1996; 9:731–737.
35. Al-Sakkaf L, Pozzilli P, Bingley PJ et al. Early T-cell defects in pre-type-1 diabetes. *Acta Diabetol* 1992; 28:189–192.
36. Al-Sakkaf L, Pozzilli P, Tarn AC, Schwarz G, Gale EA, Bottazzo GF. Persistent reduction of CD4/CD8 lymphocyte ratio and cell activation before the onset of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1989; 32:322–325.
37. Faustman D, Eisenbarth G, Daley J, Breitmeyer J. Abnormal T-lymphocyte subsets in type I diabetes. *Diabetes* 1989; 38:1462–1468.

- 
38. Faustman D. Occult CD45 T cell developmental defect in type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 1993; 19:446–457.
  39. Douglas Petersen L, Van der Keur M, De Vries RRP, Roep BO. Autoreactive and immunoregulatory T-cell subsets in insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999; 42:443–449.
  40. Worsaae A, Hejnaes K, Moody A et al. T cell proliferative responses to glutamic acid decarboxylase-65 in IDDM are negatively associated with HLA DR3/4. *Autoimmunity* 1995; 22:183–189.
  41. Roep BO, Atkinson MA, van Endert PM, Gottlieb PA, Wilson SB, Sachs JA. Autoreactive T cell responses in insulin-dependent (Type 1) diabetes mellitus. Report of the first international workshop for standardization of T cell assays. *J Autoimmun* 1999; 13:267–282.
  42. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and tgf-Beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:263–276.
  43. Peakman M, Tree TI, Endl J, van Endert P, Atkinson MA, Roep BO. Characterization of preparations of GAD65, proinsulin, and the islet tyrosine phosphatase IA-2 for use in detection of autoreactive T-cells in type 1 diabetes: report of phase II of the Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T-cell assays in type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; 50:1749–1754.
  44. Roep BO. Standardization of T-cell assays in Type I diabetes. Immunology of diabetes society T-cell committee. *Diabetologia* 1999; 42:636–637.
  45. Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG, Schatz DA, Atkinson MA, Eisenbarth GS. Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24:398.
  46. Mallone R., Mannering S. I., Brooks-Worrell B. M, Durinovic-Belló I., Cilio C. M, Wong F. S. and Schloot N. C; on behalf of the Immunology of Diabetes Society T-Cell Workshop Committee. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society *Clinical and Experimental Immunology*, 2010; 163: 33–49
  47. Atkinson MA, Honeyman MC, Peakman M, Roep BO. T-cell markers in type 1 diabetes: progress, prospects and realistic expectations. *Diabetologia* 2000; 43:819–820.



48. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; ii:1279–1282.
49. Roep BO, Arden SD, De Vries RRP, Hutton JC: T-cell clones from a type-1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. *Nature* 1990; 345:632–634.
50. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PGF, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA class II molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 1985; 313:353–360
51. Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Andersen HU, Helqvist S, Spinas GA, Munck M. Lack of predictive value of islet cell antibodies, insulin antibodies, and HLA-DR phenotype for remission in cyclosporin- treated IDDM patients. The Canadian-European Randomized Control Trial Group. *Diabetes* 1990; 39:204–210.
52. Aaen K, Rygaard J, Josefsen K et al. Dependence of Antigen Expression on Functional State of  $\beta$ -Cells. *Diabetes* 1990; 39:697–701.
53. Schloot N, Eisenbarth GS: Isohormonal therapy of endocrine autoimmunity. *Immunology Today* 1995; 16:289–294.
54. Keller RJ, Eisenbarth GS, Jackson RA. Insulin prophylaxis in individuals at high risk of type I diabetes. *Lancet* 1993; 341:927–928.
55. Diabetes Prevention Trial—Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2002; 346:1685–1691.
56. Gale EAM. Can we change the course of beta-cell destruction in type 1 diabetes? *N Engl J Med* 2002; 346:1740–1742.
57. Reijonen H, Daniels TL, Lernmark A, Nepom GT. GAD65-specific autoantibodies enhance the presentation of an immunodominant T-cell epitope from GAD65. *Diabetes* 2000; 49:1621–1626.
58. Chatenoud L. Restoration of self-tolerance is a feasible approach to control ongoing beta-cell specific autoreactivity: its relevance for treatment in established diabetes and islet transplantation. *Diabetologia* 2001; 44:521–536.
59. Chatenoud L, Primo J, Bach JF. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* 1997; 158:2947–2954.
60. Friend PJ, Hale G, Chatenoud L et al. Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. *Transplantation* 1999; 68:1632–1637.
61. Razack NN, Wherrett DK. Type 1 diabetes: New horizons in prediction and prevention. *Paediatr Child Health* 2005;10(1):35-37.

62. Todd J. A., Knip M. and Mathieu C. Expert Position Statement Strategies for the prevention of autoimmune Type 1 diabetes. *Diabet. Med.* 2011;28: 1141–1143.
63. Luo X, Herold KC, and Miller SD. Immunotherapy of Type 1 Diabetes: Where Are We and Where Should We Be Going? *Immunity* 2010;32 (4): 488-499.
64. Chen W, Xie A, and Chan L. Mechanistic basis of immunotherapies for type 1 diabetes mellitus. *Translational Research* 2013;161:217–229
65. Cardwell CR, Stene LC, Ludvigsson J, Rosenbauer J, Cinek O, Svensson J et. al, Breast-Feeding and Childhood-Onset. Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:2215–2225.
66. Ludvigsson J, Krisky D, Casas R, Battelino T, Castaño L, Greening J, Kordonouri O, Otonkoski T, Pozzilli P, Robert JJ, Veeze HJ, and Palmer J. GAD65 Antigen Therapy in Recently Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 2012;366:433-42.
67. Skyler JS. Primary and secondary prevention of Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2013 Feb;30(2):161-9.
68. Gale EAM. Nicotinamide: potential for the prevention of type 1 diabetes? *Horm Metab Res* 1996; 28: 361–364
69. Akerblom HK, Krischer J, Virtanen SM, Berseth C, Becker D, Dupre J, et al. TRIGR Study Group. The Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR) study: recruitment, intervention and follow-up. *Diabetologia.* 2011; 54:627–633.
70. Tiittanen M, Paronen J, Savilahti E, Virtanen SM, Ilonen J, Knip M, et al. Finnish TRIGR Study Group. Dietary insulin as an immunogen and tolerogen. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006; 17:538–543.
71. Vaarala O, Ilonen J, Ruohtula T, Pesola J, Virtanen SM, Harkonen T, et al. Removal of bovine insulin from cow's milk formula and early initiation of beta-cell autoimmunity in the FINDIA pilot study. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012; 166:608–614.
72. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *J Am Med Assoc.* 2003; 290:1721–1728.
73. Hummel S, Pfluger 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: the BABYDIET study. *Diabetes Care.* 2011; 34:1301–1305
74. Gabbay MA, Sato MN, Finazzo C, Duarte AJS, Dib SA. Effect of cholecalciferol as adjunctive therapy with insulin on protective immunologic profile and decline of residual  $\beta$ -cell function in new-onset type 1 diabetes mellitus. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012; 166:601–607.

- 
75. Bizzarri C, Pitocco D, Napoli N, Di Stasio E, Maggi D, Manfrini S, et al. IMDIAB Group. No protective effect of calcitriol on  $\beta$ -cell function in recent-onset type 1 diabetes: the IMDIAB XIII trial. *Diabetes Care*. 2010; 33:1962–1963
  76. Dulin WE, Wyse BM. Studies of ability of compounds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. *Diabetes*. 1969; 18:459–466
  77. Lampeter EF, Klinghammer A, Scherbaum WA, Heinze E, Haastert B, Giani G, et al. The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: an attempt to prevent type 1 diabetes. DENIS Group. *Diabetes*. 1998; 47:980–984.
  78. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, et al. Diabetes Prevention Trial Type 1 Diabetes Study Group. Effects of oral insulin in relatives of patients with Type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2005; 28:1068–1076.
  79. Vehik K, Cuthbertson D, Ruhlrig H, Schatz DA, Peakman M, Krischer JP. DPT-1 and TrialNet Study Groups. Long-term outcome of individuals treated with oral insulin: diabetes prevention trial-type 1 (DPT-1) oral insulin trial. *Diabetes Care*. 2011; 34:1585–1590
  80. NCT 00419562. Oral insulin for prevention of diabetes in relatives at risk for Type 1 diabetes mellitus. Available at <http://www.ClinicalTrials.gov>
  81. Harrison LC, Honeyman MC, Steele CE, Stone NL, Sarugeri E, Bonafacio E, et al. Pancreatic beta-cell function and immune responses to insulin after administration of intranasal insulin to humans at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27:2348–2355.
  82. Furlanos S, Perry C, Gellert SA, Martinuzzi E, Mallone R, Butler J, et al. Evidence that nasal insulin induces immune tolerance to insulin in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes*. 2011; 60:1237–1245.
  83. NCT 00336674. Trial of intranasal insulin in children and young adults at risk of Type 1 diabetes (INIT II). Available at <http://www.ClinicalTrials.gov>
  84. Achenbach P, Barker J, Bonifacio E. Modulating the natural history of type 1 diabetes in children at high genetic risk by mucosal insulin immunization. *Curr Diab Rep*. 2008; 8:87–93.
  85. NCT 01030861. Teplizumab for prevention of Type 1 diabetes in relatives ‘at-risk’. Available at <http://www.ClinicalTrials.gov>

- 
86. NCT. CTLA-4 Ig (abatacept) for prevention of abnormal glucose tolerance and diabetes in relatives at-risk for Type 1 diabetes mellitus. Available at <http://www.ClinicalTrials.gov>
87. Ziegler GA and Nepom GT. Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes. *Immunity* 2010;32 (4): 468-478.
88. Korhonen S, Knip MM, Kulmala P, Savola K, Akerblom HA, Knip M, The Finnish Study Group for ICA Screening Autoantibodies to GAD, IA-2 and insulin in ICA-positive first-degree relatives of children with type 1 diabetes: a comparison between parents and siblings. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18: 43–48.
89. Siljander H, Veijola R, Reunanen A, Virtanen SM, Åkerblom HK, Knip M: Prediction of type 1 diabetes among siblings of affected children and in the general population. *Diabetologia* 2007;50:2272–2275.
90. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vähäsalo P, Karjalainen J, Löppönen T, Dyrberg T, Åkerblom HK, Knip M, the Childhood Diabetes in Finland Study Group: Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes: a population-based study. *J Clin Invest* 1998;101:327–336.
91. Galatzer A, Green E, Ofan R, Benzaquen H, Yosefsberg Z, Weintrob N, Karp M, Vardi P: Psychological impact of islet cell antibody screening. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(Suppl. 1):675–679.
92. Bennett Johnson S, Tercyak KP Jr: Psychological impact of islet cell antibody screening for IDDM on children, adults, and their family members. *Diabetes Care* 1995; 18:1370–1372.
93. Steck AK, Barriga KJ, Emery LM, Fiallo-scharer R, Gottlieb PA, Rewers MJ. Secondary Attack Rate of Type 1 Diabetes in Colorado Families *Diabetes Care* 2005;28:296–300.
94. Gillespie KM, Gale EA, Bingley PJ: High familial risk and genetic susceptibility in early-onset childhood diabetes. *Diabetes* 2002;51:210–214.
95. The Eurodiab Ace Study Group and The Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group: Familial risk of type I diabetes in European children. *Diabetologia* 1998;41:1151–1156.
96. Lorenzen T, Pociot F, Hougaard P, Nerup J: Long-term risk of IDDM in first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia* 1994; 37:321–327.
97. Truyen I, De Grijse J, Weets I, Kaufman L., Pipeleers L, Nanos N. et al. Belgian Diabetes Registry. Identification of prediabetes in first-degree relatives at intermediate risk of type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 2007;149(2):243-250.
-

- 
98. Savola K, Läärä E, Vähäsalo P, Kulmala P, Åkerblom HK, Knip M, the Childhood Diabetes in Finland Study Group. Dynamic pattern of disease-associated autoantibodies in siblings of children with type 1 diabetes: a population based study. *Diabetes* 2001; 50:2625–32.
99. Yu J, Yu L, Bugawan TL et al. Transient antiislet autoantibodies: infrequent occurrence and lack of association with ‘genetic’ risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2421–8.
100. American Diabetes Association. Position Statement. Prevention of Type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23 (Suppl): S108.
101. Bingley PJ, Gale EAM: The incidence of insulin-dependent diabetes in England: a study in the Oxford region 1985–6. *B M J* 1989; 298:558–560.
102. Bingley PJ. Interactions of Age, Islet Cell Antibodies, Insulin Autoantibodies, and First-Phase Insulin Response in Predicting Risk of Progression to IDDM in ICA+ Relatives. *Diabetes* 1996; 45:1720-1728.
103. Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu L, Orban T, Naclaren M, Jackson R et al. Diabetes prevention trial-type 1 study group. Screening Strategies for the Identification of Multiple Antibody-Positive Relatives of Individuals with Type 1 Diabetes *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 103–108.
104. Gardner SG, Gale, Williams A, Gillespie KM, Lawrence KM, Bottazzo GM, Bingley PJ, Progression to Diabetes in Relatives With Islet Autoantibodies *Diabetes Care* 1999; 22: 2049–2054.
105. Kimpimäki T, Kulmala P, Savola K, Vähäsalo P, Reijonen H, Ilonen J, the Childhood Diabetes in Finland study group Disease-Associated. Autoantibodies as Surrogate Markers of Type 1 Diabetes in Young Children at Increased Genetic Risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1126–1132
106. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke H, Williams A, Bingley PJ, Bonifacio E and Ziegler AG. Stratification of Type 1 Diabetes Risk on the Basis of Islet Autoantibody Characteristics *Diabetes* 2004; 53: 384–392.
107. Hedman M, Ludvigsson J, Faresjö MK. Nicotinamide reduces high secretion of IFN- $\gamma$  in high-risk relatives even though it does not prevent type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26:207–13.
108. De Berardis P, James RFL, Wise PH. Do CD4 positive cytotoxic T cells damage islet beta cells in type 1 diabetes. *Lancet* 1988; 823-828.

- 
109. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109:131–140.
110. Yu L, Cuthbertson DD, Eisenbarth GS, Krischer JP. Diabetes Prevention Trial 1. prevalence of GAD and ICA512 (IA-2) autoantibodies by relationship to proband *AnnNYAcadSci.*2002;Apr;958:254-8.
111. Greenbaum C and Atkinson MA. An Important Lesson for Attempts to Prevent and Reverse Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2011; 60 (3): 693-694.
112. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, et al. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 1987;326:304–6.
113. Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. Translational mini-review series on type 1 diabetes: systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol* 2007; 148:1–16.
114. Mathis D, Vence L, Benoist C. Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001; 414:792–8.
115. Seyfert-Margolis V, Gisler TD, Asare AL, Wang RS, Dosch HM, Brooks-Worrell B, et al. Analysis of T-cell assays to measure autoimmune responses in subjects with type 1 diabetes: results of a blinded controlled study. *Diabetes* 2006; 55:2588–94.
116. Kupila A, Muona P, Ronkainen M, Simell T, Erkkilä S, Arvilommi P, et al. Genetic risk determines the emergence of diabetes-associated autoantibodies in young children. *Diabetes* 2002; 51: 646–51.
117. Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, Adachi YS, Okabe Y, Itazawa T, Toyoda M, Seki T, Morohashi M, Matsushima K and Miyawaki T. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4T cells. *J. Leukoc. Biol.* 68:568–574; 2000.
118. Mosmann, T. R., Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immuno. Today* 1996; 17, 138–146.
119. Annunziato F, Cosmi L, Galli G, Beltrame C, Romagnani P, Manetti R, Romagnani S, and Maggi E. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo *J. Leukoc. Biol.* 65:691–699; 1999.
120. Romagnani, S. (1997) *The Th1/Th2 Paradigm in Disease*. Heidelberg, Germany: Springer

121. Scheel, D., Richter, E., Toellner, K.-M., Reiling, N., Key, G., Wacker, H.-H., Ulmer, A. J., Flad, H. D., Gerdes, J. (1995) Correlation of CD26 expression with Th1-like reactions in granulomatous diseases. In *Leukocyte Typing V White Cell Differentiation Antigens* (S. F. Schlossmann, L. Boumsell, W. Gilks, J. M. Harlan, T. Kishimoto, J. Ritz, S. Shaw, R. Silverstein, T. Springer, T. F. Tedder, and R. F. Todd, eds.) Oxford, UK: Oxford University Press, p. 1111.
122. Assenmacher, M., Scheffold, A., Schmitz, J., Segura Checa, J. A., Miltenyi, S., Radbruch, A. Specific expression of surface interferon-g on interferon-g-producing T cells from mouse and man. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26, 263–267.
123. Annunziato F., Manetti, R., Tomasevic, L., Giudizi, M-G., Biagiotti, R., Gianno`, V., Germano, P., Mavilia, C., Maggi, E., Romagnani, S. Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4<sup>+</sup> T cells are associated with IFN-g production. *FASEB J.* 1996; 10: 767–776.
124. Kanegane, H., Kasahara, Y., Niida, Y., Yachie, A., Sugii, S., Takatsu, K., Taniguchi, N., Miyawaki, T. Expression of L-selectin (CD62L) discriminates Th1- and Th2-like cytokine-producing memory CD41 T cells. *Immunol.* 1996; 87: 186–190.
125. Del Prete, G. F., De Carli, M., Almerigogna, F., Daniel, K. C., Zancuoghi, M. M., Vinante, E., Pizzolo, G., Romagnani, S. () Preferential expression of CD30 by human CD4<sup>+</sup> T cells producing Th2-type cytokines. *FASEB J.* 1995; 9: 81–86.
126. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986 ;136 : 2348-57.
127. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
128. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-93.
129. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annu Rev Immunol* 1994 ; 12 : 635-73.
130. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990 ; 172 : 921-9.
131. Syrbe U, Siveke J, Hamann A. Th1/Th2 Subsets: Distinct Differences in Homing and Chemokine Receptor Expression? *Springer Semin Immunopathol* 1999 ; 21:263±85.

- 
132. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F and Geginat J. Chemokine Receptor Expression Identifies Pre-T Helper (Th)1, Pre-Th2, and Nonpolarized Cells among Human CD4<sup>+</sup> Central Memory T Cells *J. Exp. Med.* 2004; 200 (6) : 725–735.
133. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Mackay, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today* 1998; 19, 568–574.
134. Kim, C. H., Broxmeyer, H. E. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 65: 6–15.
135. Aarvak T, Strand E, Teigland J, Miossec P & Natvig JB. Switch in Chemokine Receptor Phenotype on Memory T Cells without a Change in the Cytokine Phenotype. *Scand. J. Immunol.* 2001; 54: 100-108.
136. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187:129-34.
137. Qin S, Rottman JB, Myers P et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998;101:746-54.
138. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res.* 2011; 317(5): 620-631.
139. Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., Lanzavecchia, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1998; 187, 875–883.
140. Sallusto, F., Mackay, C. R., Lanzavecchia, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper cells. *Science* 1997; 277, 2005–2007.
141. Gerber, B. O., Zanni, M. P., Ugucioni, M. G., Loetscher, M., Mackay, C. R., Pichler, X. J., Yawalkar, N., Baggiolini, M., Moser, B. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr. Biol.* 1997; 7: 836–843.
142. Bernardini, G., Hedrick, J., Sozzani, S., Luini, W., Spinetti, G., Weiss, M., Menon, S., Zlotnik, A., Mantovani, A., Santoni, A., Napolitano, M. Identification of the CC chemokines TARC and macrophage inflammatory protein-1 beta as novel functional ligands for the CCR8 receptor. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 582–588.
143. Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, S., Takagi, and O. Yoshie. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J. Biol. Chem.* 1997;272:15036–15042.



- 
144. Austrup, F., Vestweber D., Borges E., Lohning M., Brauer R., Herz U., Renz H., Hallmann R., Scheffold A., Radbruch A., and Hamann A.. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature*. 1997; 385:81–83.
145. Kaplan G., Luster A.D., Hancock G., and Cohn Z.A. The expression of a g interferon–induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med* 1987; 166: 1098–1108.
146. Colantonio L, Rossi B, Constantin G, D’Ambrosio D. Integration and independent acquisition of specialized skin- versus gut-homing and Th1 versus Th2 cytokine synthesis phenotypes in human CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 2419–2429.
147. Song K, Rabin RL, Hill BJ, De Rosa SC, Perfetto SP, Zhang HH, Foley JF, Reiner JS, Liu J, Mattapallil JJ, Douek DC, Roederer M, Farber JM. Characterization of subsets of CD4<sup>+</sup> memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans *PNAS*; 2005, 102(22): 7916–7921.
148. Ochensberger, B., Tassera L., Bifrare, D., Rihs S., Dahinden, C. A. Regulation of cytokine expression and leukotriene formation in human basophils by growth factors, chemokines and chemotactic agonists. *Eur. J. Immunol.* 1999;29, 11–22.
149. Aust, G., D. Sittig, M. Steinert, P. Lamesch, and T. Lohmann. Graves’ disease is associated with an altered CXCR3 and CCR5 expression in thyroid derived compared to peripheral blood lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 2002; 127:479.
150. Sorensen, T. L., C. Trebst, P. Kivisakk, K. L. Klaege, A. Majmudar, R. Ravid, H. Lassmann, D. B. Olsen, R. M. Strieter, R. M. Ransohoff, et al. Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 2002; 127:59.
151. Mahad, D. J., J. Lawry, S. J. Howell, and M. N. Woodroffe. Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. *Mult. Scler.* 2003;9:189.
152. Frigerio, S., T. Junt, B. Lu, C. Gerard, U. Zumsteg, G. A. Hollander, and L. Piali.  $\beta$  cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis. *Nat. Med.* 2002; 8:1414.
153. Christen U., McGavern D. B., Luster A. S., von Herrath M. G., and Oldstone M. B. A. Among CXCR3 chemokines, IFN- $\gamma$ -inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN- $\gamma$  (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. *J. Immunol.* 2003; 171:6838.
-

- 
154. Xie, J. H., N. Nomura, M. Lu, S. L. Chen, G. E. Koch, Y. Weng, R. Rosa, J. Di Salvo, J. Mudgett, L. B. Peterson, et al.. Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J. Leukocyte Biol.* 2003;73:771.
155. Frigerio, S., T. Junt, B. Lu, C. Gerard, U. Zumsteg, G. A. Hollander, and L. Piali.  $\beta$  cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis. *Nat. Med.* 2002;8:1414.
156. Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, Murphy K, Campbell JJ, Butcher EC and Wu L. C-C Chemokine Receptor 4 Expression Defines a Major Subset of Circulating Nonintestinal Memory T Cells of Both Th1 and Th2 Potential *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 103–111.
157. Mackay, C.R. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5:423–427.
158. Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990; 346:425–434.
159. Butcher, E.C., and L.J. Picker. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996; 272:60–66.
160. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:675–705.
161. Butcher, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991; 67: 1033–1036.
162. Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76:301–314.
163. Hanifi-Moghaddam P, Schloot NC, Kappler S, Seissler J, Kolb H. An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 1137–1142.
164. Atkinson MA and Wilson SB. Fatal attraction: chemokines and type 1 diabetes *J. Clin. Invest.* 2002; 110:1611–1613.
165. Rossi, D., and Zlotnik, A.. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18:216–242.
166. Gill B.M., Jaramillo, A., Ma, L., Laupland, K.B., and Delovitch, T.L. Genetic linkage of thymic T-cell proliferative unresponsiveness to mouse chromosome 11 in NOD mice. A possible role for chemokine genes. 1995; *Diabetes.* 44:614–619.

- 
167. Shigihara T, Oikawa Y, Kanazawa Y, Okubo Y, Narumi S, Saruta T, Shimada A. Significance of serum CXCL10/IP-10 level in type 1 diabetes. *Journal of Autoimmunity* 2006; 26: 66-71
168. Arimilli S, Ferlin W, Solvason N, Deshpande S, Howard M, Mocci S. Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 2000;177:43-51.
169. Narumi S, Kauraki T, Yoneyama H, Iwamura H, Kobayashi Y, Matsushima K. Neutralization of IFN-inducible protein 10/CXCL10 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2002;32:1784-91.
170. Salomon I, Netzer N, Wildbaum G, Schif-Zuck S, Maor G, Karin N. Targeting the function of IFN-gamma-inducible protein-10 suppresses ongoing adjuvant arthritis. *J Immunol* 2002;169:2685-93.
171. Furuzawa-Carballeda J., Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective *Autoimmunity Reviews* 2007; (6): 169–175.
172. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA, TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:247-54.
173. Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Miyamoto T, Sugaya K, Hosokawa H, Hasegawa A, et al. Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *J Biol Chem* 2004;279:26983-90.
174. Letimier FA, Passini N, Gasparian S, Bianchi E, Rogge L. Chromatin remodeling by the SWI/SNF-like BAF complex and STAT4 activation synergistically induce IL-12Rbeta2 expression during human Th1 cell differentiation. *EMBO J* 2007;26:1292-302.
175. Emamullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A and Shapiro AMJ. Inhibition of Th17 Cells Regulates Autoimmune Diabetes in NOD Mice *Diabetes* 2009;58:1302–1311.
176. Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, Jegga AG, Hutton JJ, Aronow BJ, Katz JD. Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. *Physiol Genomics* 2005;21:201–211.
177. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995; 268:1185–1188.
178. Wassim Y, Almawi, Hala Tamim and Sami T Azar. T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type 1 diabetes. *JCEM* 1999; 84: 1497-1502.
-

- 
179. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002; 98:1395–1401.
180. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T-cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:11–19.
181. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004; 114:1198-1208.
182. Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004; 114:1209-1217.
183. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases (Abstract). *J Immunol* 1995; 155:1151
184. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193:1285
185. Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4<sup>+</sup> thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> subpopulations. *J Immunol* 2000; 165:3105
186. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164:183.
187. Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:389.
188. Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188:287.
189. Waldmann TA. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 1991, 266:2681–2684.
190. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001; 2:301
191. Chai JG, Tsang JY, Lechler R, Simpson E, Dyson J, Scott D. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells as immunoregulatory T cells in vitro. *Eur J Immunol* 2002; 32:2365.

192. Nakamura K, Kitani A, Strober W. T-cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ 1. *J Exp Med* 2002; 194:629.
193. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> human thymocytes. *J Exp Med* 2002; 196:379.
194. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MS. Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001; 193:1295.
195. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25<sup>+</sup> regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4<sup>+</sup> T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196:255.
196. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor  $\beta$ 1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002; 196:237.
197. Łuczyński W, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Stasiak-Barmuta A, Urban R, Ilendo E, Urban M, Hryszko M, Krętowski A and Górska M. Diminished expression of ICOS, GITR and CTLA-4 at the mRNA level in T regulatory cells of children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Acta biochimica polonica* 2009; (56):2/, –000
198. Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H, Lee J, Zhang Y, Appleby M, Der SD, Kang J, Chambers CA. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med* 2009;206: 421–434.
199. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martínez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1681–1691.
200. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701–1711
201. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of

- interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1693–1700.
202. Homann D, von Herrath M. Regulatory T cells and type 1 diabetes. *Clinical Immunology* 2004; 112:202–209.
203. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 4091-4096.
204. Walker MR, Carson BD, Nepom GD, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:4103-4108.
205. Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. and Hafler, D. A., CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001. 167: 1245–1253.
206. Bacchetta R, Gambineri E and Roncarolo M. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:227-35.
207. Campbel DJ and Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature reviews | immunology* 2007; 4: (7).
208. Chen, C., Rowell, E. A., Thomas, R. M., Hancock, W. W. & Wells, A. D. Transcriptional regulation by FOXP3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 2006;281: 36828–36834.
209. Zheng, Y. *et al.* Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 2007; 445, 936–940.
210. Ziegler S. FOX p3: of mice and man. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24:209–26.
211. Jonuleit H, Schmitt E. The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323-6327.
212. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz M, Atkinson MA. Functional Defects and the Influence of Age on the Frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Cells in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2005; 54:1407-1414.
213. Rossini AA, Greiner DL, Friedman HP *et al.* Immunopathogenesis of diabetes mellitus, *Diabetes Rev* 1993; 1:43.
214. Hawa M, Rowe R, Lan SM *et al.* Value of Antibodies to Islet Protein tyrosine Phosphatase-Like Molecule in Predicting Type 1 Diabetes, *Diabetes* 1997; 46:1270-1275.
215. Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus: a chronic and predictable autoimmune disease. *Upjohn* 1989; 4-28.

- 
216. Gale EAM. Can we change the course of beta-cell destruction in type 1 diabetes? *N Engl J Med* 2002; 346:1740–1742.
217. Greenbaum CJ, Cuthbertson D, Krischer JP, the DPT-1 Study Group: Type 1 diabetes manifested solely by 2-h oral glucose tolerance test criteria. *Diabetes* 2001;50: 470–476.
218. Wallace TM, Matthews DR.:The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 2002; 19: 527-534.
219. Bingley PJ, Colman P, Eisenbarth GS, Jackson RA, McCulloch DK, Riley WJ, Gale EA: Standardization of IVGTT to predict Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 1992;15: 1313-1316.
220. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, et al.: Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects: Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993; 42: 1663-1672.
221. Greenbaum C.J: Insulin resistance in Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab Rev* 2002; 18:192-200.
222. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F: Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 1995; 9:284–292.
223. Wilkin TJ: The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. *Diabetologia* 2001;44:914–922.
224. Sosenko JM, Palmer JP, Greenbaum JP, et al. The Diabetes Prevention Trial–type 1 study group. Patterns of Metabolic Progression to Type 1 Diabetes in the Diabetes Prevention Trial–Type 1. *Diabetes Care* 2006; 29:643–649.
225. World Health Organization. *Definition, Diagnosis, and Classification: Diabetes Mellitus*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1985:9-25. Technical report series 727
226. Report of the Expert Committee on the diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2002; 25:S5-S20.
227. Herzenberg LA, De Rosa SC. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunology today* 2000; 21(8):383-390.
228. Givan AL . Flow citometry: an introduction. *Methods Mol Biol*, 2004; 263:1-32.
229. Chase HP, Cuthbertson DD, Dolan LM, Kaufman F, Krischer JP, Schatz DA, White NH, Wilson DM, Wolfsdorf J, and The Diabetes Prevention Trial–Type 1 Study Group.

- First-phase insulin release during the intravenous glucose tolerance test as a risk factor for type 1 diabetes. *J Pediatr* 2001;138:244-9.
230. Hills SA, Balkau B, Coppack SW, Dekker JM, Mari A, Natali A, Walker M, Ferrannini E; EGIR-RISC Study Group. The EGIR-RISC STUDY (The European group for the study of insulin resistance: relationship between insulin sensitivity and cardiovascular disease risk): I. Methodology and objectives. *Diabetologia*. 2004;47(3):566-70.
231. Durinovic-Bello Á I, Hummel M, Ziegler AG. Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes* 1996; 45: 795±800
232. HaÈggloÈ f B, Rabinovitch A, Mackay P et al. Islet cell and other organ-specific autoantibodies in healthy first-degree relatives to insulin-dependent diabetic children. *Acta Paediatr Scand* 1986; 75: 611±618.
233. Peakman M, Warnock T, Vats A et al. Lymphocyte subset abnormalities, autoantibodies and their relationship with HLA DR types in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes and their first degree relatives. *Diabetologia* 1994; 37: 155-165
234. Campbell-Thompson M. L., Atkinson M. A., Butler A. E., Chapman N. M., Frisk G., Gianani R., Giepmans B. N., von Herrath M. G, Hyöty H., Kay T. W., Korsgren O., Morgan N. G., Powers A. C., Pugliese A., Richardson S. J., Rowe P. A., Tracy S., In't Veld P. A. The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 2013; 56:2541–2543
235. Horita M, Suzuki H, Onodera T, Ginsberg-Fellner F, Fauci AS, Notkins AL. Abnormalities of immunoregulatory T cell subsets in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 1982; 129:1426-1429
236. Chatenoud L, Salomon B, Bluestone JA. Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev* 2001; 182:149 –163.
237. Hedman M, Faresjö M., Axelsson S., Ludvigsson J. and Casas R. Impaired CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type 1 diabetic children. *Clin Exp Immunol*, 2008;153: 360–368
238. Ilonen J, Surcel HM, Kaar M. Abnormalities within CD4 and CD8 T lymphocyte subsets in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 278-281.
239. Okazaki H., Kakurai M., Hirata D., Sato H., Kamimura T., Onai N., Matsushima K., Nakagawa H, Kano S and Minota S. Characterisation of chemokine expression and cytokine production in circulation CD4<sup>+</sup> T cells from patients with atopic dermatitis up regulation of C-C chemokine receptor 4 in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2002; 31 1236-1242



- 
240. Nakatani T, Kaburagi Y, Shimada Y et al. CCR4<sup>+</sup> T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 353-8.
241. Summers KL, O'Donnell JL, Hart DN. Co-expression of the CD45RA and CD45RO antigens on T lymphocytes in chronic arthritis. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:39-44.
242. Karlsson MGE, Sederholm Lawesson S, Ludvigsson J: Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 2000; 43:742-749.
243. Hussain MJ, Maher J, Warnock T, Vats A, Peakman M, Vergani D. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM *Diabetologia*.1998; 41: 343-349
244. Lohmann T., Laue S., Nietzschmann U. Kapellen TM, Lehmann I, Schroeder S, Paschke R, Kiess W: Reduced Expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2474-2480.
245. Aso Y, Matsuura H, Momobayashi A, Inukai Y, Sugawara N, Nakano T, Yamamoto R, Wakabayashi S, Takebayashi K, Inukai T. Profound reduction in T-helper (Th1) 1 lymphocytes in peripheral blood from patients with concurrent type 1 diabetes and Graves disease. *Endocrine Journal* 2006; 53(3): 377-385
246. Yoshimasa A., Matsuura H., Momobayashi A., Inukai Y., Sugawara N., nakano T. Et al. Profound reduction in T-helper (Th1) 1 lymphocytes in peripheral blood from patients with concurrent type 1 diabetes and Graves disease. *Endocrine Journal* 2006; 53(3): 377-385
247. Oppenheim JJ, Dong HF, Plotz P et al. Autoantigens act as tissuespecific chemoattractants. *J Leukoc Biol* 2005; 77:854-61.
248. von Kanel, Mills PJ, Dimsdale JR. Short term hyperglycemia induces lymphopenia and lymphocyte subset distribution. *Life Sciences* 2001; 69:255-262.
249. Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathman GC:  $\beta$ -cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45:1063-1067.
250. Wang J, Guan E, Roderiquez G, Norcross MA: Inhibition of CCR5 expression by IL-12 through induction of  $\alpha$ -chemokines in human T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 163:5763-5769.

251. Roep BO, Kleijwegt FS, van Halteren AGS, Bonato V, Boggi U, Vendrame F, Marchetti P, Dotta F. Islet inflammation and CXCL 10 in recent onset type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2009; 159:338–343.
252. Gazda LS, Charlton B, Lafferty KJ: Diabetes results from a late change in the autoimmune response of NOD mice. *J Autoimmun* 1997; 10:261–270.
253. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM: Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999; 103:807–815.
254. Balashov, K. E., Rottman, J. B., Weiner, H. L., Hancock, W. W. CCR5<sup>+</sup> and CXCR3<sup>+</sup> T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 6873–6878.
255. Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, inflammation and autoimmune disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009; 1173: 310–317.
256. Yamada S., Oikawa Y, Sakai G, Atsumi Y, Maruyama T., Shimada A. Expression Levels of CXC Chemokine Receptors 3 Are Associated with Clinical Phenotype of Type 1 Diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1079: 186–189.
257. Waid DM, Wagner RJ, Putnam A, Vaitaitis GM, Pennocka N, Calverley DC, Gottlieb P, Wagner Jr. DH. A unique T cell subset described as CD4<sup>lo</sup>CD40<sup>+</sup> T cells (TCD40) in human type 1 diabetes. *Clinical Immunology* 2007; 124: 138–148.
258. Waid DM, Vaitaitis GM and Wagner Jr. DH. Peripheral CD4<sup>lo</sup>CD40<sup>+</sup> auto-aggressive T cell expansion during insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Immunology* 2004; 34 (5):1488–1497.
259. Lejon K and Fathman CG. Isolation of self antigen-reactive cells from inflamed islets of nonobese diabetic mice using CD4 (high) expression as a marker. *Journal of Immunology* 1999; 163(10): 5708–5714.
260. Linkes S, Fry C, Quinn A. Antigen-Experienced CD4<sup>lo</sup> T Cells Are Linked to Deficient Contraction of the Immune Response in Autoimmune Diabetes. *Autoimmune Dis.* 2010 Sep 29;2010:920148. doi: 10.4061/2010/920148
261. Luopajarvi K, Skarsvik S, Ilonen J, Akerblom HK and Vaarala O. Reduced CCR4, interleukin-13 and GATA-3 up-regulation in response to type 2 cytokines of cord blood T lymphocytes in infants at genetic risk of type 1 diabetes *Immunology*, 2007, 121: 189–196

262. Teraki, Y., and Picker, L.J. Independent regulation of cutaneous lymphocyte associated antigen expression and cytokine synthesis phenotype during human CD4 memory T cell differentiation. *J. Immunol.* 1996; 159:6018–6029.
263. Nanki T., Lipski PE. Lack of correlation between chemokine receptor and Th1/Th2 cytokine expression by individual memory T cells. *Int Immunol* 2000; 12: 1659-67.
264. Lloyd CM, Delaney T, Nguyen T, Tian J, Martinez CA, Coyle AJ, and Gutierrez-Ramos JC. CC Chemokine Receptor (CCR)3/Eotaxin Is Followed by CCR4/Monocyte-derived Chemokine in Mediating Pulmonary T Helper Lymphocyte Type 2 Recruitment after Serial Antigen Challenge In Vivo. *J. Exp. Med.* 2000; 191 (2): 265–273.
265. Kim S, Cleary MM, Fox HS, Chantry D, and Sarvetnick N. CCR4-bearing T cells participate in autoimmune diabetes. *J. Clin. Invest.* 2002; 110:1675–1686.
266. André I., Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D.. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93:2260–2263.
267. Godiska, R., Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A, Gray PW. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1997; 185:1595–1604.
268. Schaniel, C., Sallusto F, Ruedl C, Sideras P, Melchers F, Rolink AG. Three chemokines with potential functions in T lymphocyte-independent and -dependent B lymphocyte stimulation. *Eur. J. Immunol.* 1999;29:2934–2947.
269. Katou, F., Ohtani H, Nakayama T, Ono K, Matsushima K, Saaristo A, Nagura H, Yoshie O, Motegi K. Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue. *Am. J. Pathol.* 2001; 158:1263–1270.
270. Vulcano, M., Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, et al.. Dendritic cells as a major source of macrophage derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31:812–82
271. Lieberam I. and Forster I. The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol* 1999; 29:2684–2694.
272. Bradley L.M., Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krahl T, Patstone G, Woolf N, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 1999; 162:2511–2520.

273. Grewal I.S., Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, Rollins BJ. Transgenic MCP-1 in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *J. Immunol.* 1997; 159:401–408.
274. Michalek J., Vrabelova Z., Hrotekova Z., Kyr M., Pejchlova M., Kolouskova S., Faresjo M., Stechova K. Immune Regulatory T Cells in Siblings of Children Suffering from Type 1 Diabetes Mellitus *Scandinavian Journal of Immunology* 2006; 64: 531–535.
275. Cinek O, Kolouskova S, Pechova M et al. Prediction of insulin dependent diabetes mellitus in first-degree relatives of diabetic patients. *Cas Lek Cesk* 2001;140:492–6.
276. Vrabelova Z., Hrotekova Z., Hladikova Z., Bohmova K., Stechova K., Michalek J. CD127<sup>-</sup> and FoxP3<sup>+</sup> Expression on CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Regulatory Cells upon Specific Diabetogenic Stimulation in High-risk Relatives of Type 1 Diabetes Mellitus Patients *Scand J Immunol.* 2008 Apr;67(4):404-10.
277. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, et al. No Alterations in the Frequency of FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T-Cells in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2007; 56:604–612.
278. Tree TI, Roep BO, Peakman M. A mini meta-analysis of studies on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in human type 1 diabetes: report of the Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1079 : 9–18.
279. Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Cell Mol Immunol* 2006;3:189–95.
280. Yagi H, Nomura T, Nakamura K et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:1643–56.
281. Sedlakova N, Praksova P, Pejchlova M, Kovarova L, Hrstkova H, Michalek J. Immunoregulatory T cell defects in children with type 1 diabetes. *Cs Pediatr* 2005;60:183–7.
282. DeJaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2006;117:289–300.
283. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:92–9.
284. Oling V, Marttila J, Knip M, Simell O, Ilonen O. Circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> high regulatory T cells and natural killer T cells in children with newly diagnosed type 1 diabetes or with diabetes associated autoantibodies, *Ann N Y Acad Sci* 2007 Jun; 1107:363-72.

- 
285. Putnam, A.L., Vendrame F., Dotta F. & Gottlieb P.A.. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.* 2005; 24: 55–62.
286. Tiittanen M, Huupponen JT, Knip M and Vaarala O. Insulin Treatment in Patients With Type 1 Diabetes Induces Upregulation of Regulatory T-Cell Markers in Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated With Insulin In Vitro. *Diabetes* 2006; 55:3446–3454.
287. Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ, Hafler DA: Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature* 2005; 435:224–228.
288. Sanda S, Roep BO, von Herrath M. Islet antigen specific IL-10+ immune responses but not CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells at diagnosis predict glycemic control in type 1 diabetes, *Clin Immunol* 2008; 127: 138–143.
289. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008; 224: 166–182.
290. Lawson JM, Tremble J, Dayan C, Beyan H, Leslie RD, Peakman M, Tree TI . Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2008; 154: 353–359.
291. Kivling A, Nilsson L, Falth-Magnusson K, Sollvander S, Johanson C, Faresjo M. Diverse foxp3 expression in children with type 1 diabetes and celiac disease. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1150: 273–277.
292. Tsutsumi Y, Jie X, Ihara K, Nomura A, Kanemitsu S, Takada H, Hara T. Phenotypic and genetic analyses of T-cell-mediated immunoregulation in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2006; 23: 1145–1150.
293. Grant J, Bourcier K, Wallace S, Pan D, Conway A, Seyfert-Margolis V, Wallace PK () Validated protocol for FoxP3 reveals increased expression in type 1 diabetes patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2009; 76: 69–78.
294. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* 2002; 110:793-800.
295. Kaye WA et al. Acquired defect in IL-2 production in patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1986; 315:920-924.
296. Giordano C et al. Interleukin 2 and soluble interleukin 2 receptor secretion defect in vitro in newly diagnosed type 1 diabetic patients. *Diabetes* 1989; 38:310-315.
297. Nervi S et al. Specific deficiency of p56[lck] expression in T lymphocytes from type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2000; 165:5874-5883

298. Sarween N, Chodos A, Raykundalia C, Khan M, Abbas AK and Walker L. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Cells Controlling a Pathogenic CD4 Response Inhibit Cytokine Differentiation, CXCR-3 Expression, and Tissue Invasion *The Journal of Immunology*, 2004; 173: 2942–2951
299. Iellem A., M. Mariani R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia, and D. D'Ambrosio. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194:847.
300. Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton, and E. M. Shevach. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 1998; 160:1212.
301. The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) Group. Intervening before the onset type 1 diabetes: baseline data from the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial. *Diabetologia* 2003; 46: 339–346.
302. Fuchtenbusch M, Rabl W, Grassl B, Bachmann W, Standl E, Ziegler AG. Delay of type I diabetes in high risk, first degree relatives by parenteral antigen administration: the Schwabing Insulin Prophylaxis Pilot Trial. *Diabetologia* 1998; 41:536–541.
303. Kretowski, Myliwiec, Kinalska. *In Vitro* Interleukin-13 Production by Peripheral Blood in Patients with Newly Diagnosed Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Their First Degree Relatives. *Scandinavian Journal of Immunology* 2000; 51: 321.
304. Nicoletti F, Conget I, Di Marco R, Speciale AM, Morinigo R, Bendtzen K, Gomis R. Serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk of developing type I diabetes. *Diabetologia* 2001; 44:309-11.
305. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 2001; 358:1749–1753.
306. Herold KC, Hagopian W, Auger JA et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2002; 346:1692–1698.
307. Herold KC, Stephen E, Gitelman, Masharani U, Hagopian W, Bisikirska B, Donaldson D, Rother K, Diamond B, Harlan DM, Bluestone JA. A Single Course of Anti-CD3 Monoclonal Antibody hOKT31(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
308. Karlsson MGE, Ludvigsson J. Peptide from glutamic acid decarboxylase similar to coxsackie B virus stimulates IFN-g mRNA expression in Th1-like lymphocytes from

- children with recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1998; 35: 137±144
309. Hanifi-Moghaddam P., Kappler S., Seissler J., Müller-Scholze S., Martin S., Roep B. O, Strassburger K., Kolb H. and Schloot N. C. Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 2006; 23: 156–163.
310. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulinitis in type 1 insulin-dependent diabetes mellitus in man ± macrophages, lymphocytes and interferon-g containing cells. *J Pathol* 1991; 165: 97±103.
311. Huang X, Yuan J, Goddard A et al. Interferon expression in the pancreases of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1995; 44: 658±664.
312. Hussain MJ (1995) Role of cytokines in the pathogenesis of type 1 diabetes. University of London Ph.D. Thesis, pp 190±193
313. Nicoletti F, Conget I, Di Mauro M, Di Marco R, Mazzarino MC, Bendtzen K, Messina A, Gomis R. Serum concentrations of the interferon- $\gamma$ -inducible chemokine IP-10/CXCL10 are augmented in both newly diagnosed Type I diabetes mellitus patients and subjects at risk of developing the disease. *Diabetologia* 2002; 45: 1107–1110.
314. Stechova K., Bohmova K., Vrabelova Z., Sepa A., Stadlerova G., Zacharovova K., Faresjö M. High T-helper-1 cytokines but low T-helper-3 cytokines, inflammatory cytokines and chemokines in children with high risk of developing type 1 diabetes *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 462–471.
315. Chase HP, Cooper S, Osberg I, Stene LC, Barriga K, Norris J et al. Elevated C-reactive protein levels in the development of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 2569–2573.
316. Halminen M, Simell O, Knip M, Ilonen J. Cytokine expression in unstimulated PBMC of children with type 1 diabetes and subjects positive for diabetes-associated autoantibodies. *Scand J Immunol* 2001; 53:510–13.
317. Tanaka S, Nishida Y, Aida K, Maruyama T, Shimada A, Suzuki M, Enterovirus Infection, CXC Chemokine Ligand 10 (CXCL10), and CXCR3 Circuit. *Diabetes* 2009;58:2285–2291.
318. Shimada A, Oikawa Y, Yamada Y, Okubo Y, Narumi S. The Role of the CXCL10/CXCR3 System in Type 1 Diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2009;6 (2):81-4.
319. Oikawa Y, Shimada A, Kasuga A, Morimoto J, Osaki T, Tahara H, et al. Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2003;171:5865-75.

320. Christen S, Holdener M, Beerli C, Thoma G, Bayer M, Pfeilschifter JM, Hintermann E, Zerwes HG, Christen U. Small molecule CXCR3 antagonist NIBR2130 has only a limited impact on type 1 diabetes in a virus-induced mouse model. *Clin Exp Immunol*. 2011; 165(3):318-28.
321. Charlton B, Zhang MD, Slattery RM. B lymphocytes not required for progression from insulinitis to diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 597–60
322. Gregg RK, Jain R, Schoenleber SJ, Divekar R, Bell JJ, Lee HH, Yu P, Zaghoulani H. A sudden decline in active membrane-bound TGF-beta impairs both T regulatory cell function and protection against autoimmune diabetes. *J Immunol* 2004; 173: 7308–7316.
323. Han Y, Guo Q, Zhang M, Chen Z, Cao X. CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane bound TGF-beta 1. *J Immunol* 2009; 182: 111–120.
324. Tian B, Hao J, Zhang Y, Tian L, Yi H, O'Brien TD, Sutherland DE, Hering BJ, Guo Z. Upregulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in pancreatic lymph nodes in diabetic NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Transplantation* 2009; 87: 198–206
325. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004; 16:89–98.
326. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* 2002; 196 :247–253.
327. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 2004; 172:834–842.
328. Nag WF, Duggan P, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; 98:2736.
329. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193:1303.
330. Tsaknaris L, Spencer L, Culbertson N, Hicks K, LaTocha D, Chou YK, Whitham RH, Bakke A, Jones RE, Offner H, Bourdette DN, Vandenbark AA: Functional assay for human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res* 2003;74:296–308.



331. Nishioka T, Shimizu J, Iida R, Yamazaki S, Sakaguchi S: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells in aged mice. *J Immunol* 2006; 176:6586–6593.
332. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY: A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6:1142–1151.
333. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ, Frank DA, Ritz J: IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells through a STAT dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006 Sep 1;108(5):1571-9.
334. Tran DQ, Ramsey H and Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factorβ-dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*. 2007;110:2983-2990
335. Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, Chinen T, Saeki K, Nakaya M, Takaesu G, Hori S, Yoshimura A, Kobayashi T. Foxp3 inhibits RORγ-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORγ. *J Biol Chem*. 2008;283(25):17003-8.
336. Faresjö M, Vaarala O, Thuswaldner S, Ilonen J, Hinkkanen A, Ludvigsson J. Diminished IFN-γ response to diabetes-associated autoantigens in children at diagnosis and during follow up of type 1 diabetes *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 462–470.
337. Karlsson Faresjö M, Ernerudh E, Ludvigsson J. Cytokine profile in children during the first 3 months after the diagnosis of type 1 diabetes. *Scand J Immunol* 2004; 59: 517–526.
338. Avanzini MA, Ciardelli L, Lenta E, *et al*. IFN-gamma low production capacity in type 1 diabetes mellitus patients at onset of disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005; 113: 313–317.
339. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, *et al*. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 1993; 366: 69–72.
340. Rapoport MJ, Bistrizerc T, Aharonia D, Weis M. TH1/TH2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients. *Cytokine* 2005; 30:219-227.
341. Kallmann BA, Lampetr EF, Hanifi-Moghaddam P, Hawa M, Leslie RDG, Kolb H. Cytokine secretion patterns in twins discordant for Type I diabetes. *Diabetologia* 1999;42:1080-5.

342. Szelachowska A, Kretowski A, Kinalska I. Decreased in vitro IL-10 production by peripheral blood in first degree relatives at high risk of diabetes Type-I. *Horm Metab Res* 1998;30:526-30.
343. Falcone M, Yeung B, Tucker L, Rodriguez E, Krahl T, Sarvetnick N. IL-4 triggers autoimmune diabetes by increasing self-antigen presentation within the pancreatic islets. *Clin Immunol* 2001;98:190-9.
344. Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, et al. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993;178:87-99.
345. Dunger A, Cunningham JM, Delaney CA () Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned-rat islets. *Diabetes* 1996; 45: 183±189.
346. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H et al. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 60±6.
347. Mandrup-Poulsen T, Pociot F, Mølvig J et al. Monokine antagonism is reduced in patients with IDDM. *Diabetes* 1994; 43: 1242±1247
348. Jaworski MA, Colle L, Guttman RD. Abnormal immunoregulation in patients with insulin dependent diabetes mellitus and their healthy first degree relatives. *Hum Immunol* 1983; 7: 25±34.
349. Mølvig J, Pociot L, Bñk L et al. Monocyte function in IDDM patients and healthy individuals. *Scand J Immunol* 1990; 32: 297±311.
350. Tovo PA, Cerutti F, Palomba E, Salomone C, Pugliese A. Evidence of circulating interferon- $\gamma$  in newly diagnosed diabetic children. *Acta Paediatr Scand* 1984;73: 785±788
351. Espersen GT, Mathiesen O, Grunnet N, Jensen S, Ditzel J. Cytokine plasma levels and lymphocyte subsets in patients with newly diagnosed insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus before and following initial insulin treatment *APMIS* 1993; 101: 703±706.
352. Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M et al. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-independent diabetes. *J Exp Med* 1996; 183: 1561±1567.
353. Sai P, Rivereau AS, Granier C, HaertlØ T, Martignat L. Immunization of non-obese diabetic (NOD) mice with glutamic acid decarboxylase-derived peptide 524±543 reduces cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 330±337.

354. Karounos DG, Bryson JS, Cohen DA. Metabolically inactive insulin analog prevents type 1 diabetes in prediabetic NOD mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 1344±1348.
355. Fuchtenbusch M, Rabl W, Grassl B, Bachmann W, Standl E, Ziegler A-G. Delay of Type I diabetes in high risk, first degree relatives by parenteral antigen administration: the Schwabing insulin prophylaxis pilot trial. *Diabetologia* 1998; 41: 536±54.
356. Hancock WW, Polanski M, Zhang J, Blogg N, Weiner HL. Suppression of insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and  $\pm 10$ , transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin-E. *Am J Pathol* 1995; 147: 1193±1199.
357. Pociot F, Mølvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396±402
358. Barker JM, McFann K, Harrison LC, et al. the DPT-1 Study Group. Pre-Type 1 Diabetes Dysmetabolism: Maximal sensitivity achieved with Both Oral and Intravenous Glucose Tolerance Testing. *J Pediatr.* 2007 ; 150(1): 31–36.e6
359. Mrena S, Savola K, Kulmala P, Åkerblom HK, Knip M, and the Childhood Diabetes in Finland Study Group. Staging of Preclinical Type 1 Diabetes in Siblings of Affected Children. *Pediatrics* 1999;104:925-930.
360. Schatz D, Krischer J, Horne G, Riley W, Spillar R, Silverstein J, et al. Islet cell antibodies predict insulin dependent diabetes in U.S. school age children as powerfully as in unaffected relatives. *J Clin Invest* 1994;93:2403-7.
361. Srikanta S, Ganda OP, Gleason RE, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Pre-type 1 diabetes. Linear loss of beta cell response to intravenous glucose. *Diabetes* 1984;33:717-20.
362. Rosenbloom AL, Wheeler L, Bianchi R, Chin FT, Tiwary CM, Grgic A. Age-adjusted analysis of insulin responses during normal and abnormal glucose tolerance tests in children and adolescents. *Diabetes* 1975;24:820-8.
363. Greenbaum CJ, Sears KL, Kahn SE and Palmer JP. Relationship of  $\beta$ -Cell Function and Autoantibodies to Progression and Nonprogression of Subclinical Type 1 Diabetes Follow-Up of the Seattle Family Study *Diabetes* 1999; 48:170-175.
364. Greenbaum CJ, Buckingham B, Chase HP, Krischer J. Metabolic Tests to Determine Risk for Type 1 Diabetes in Clinical Trials. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011 Sep;27(6):584-9.

- 
365. Furlanos S, Narendran P, Byrnes GB, Colman PG, Harrison LC. Insulin resistance is a risk factor for progression to Type 1 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47:1661–1667.
366. Bruining GJ. Association between infant growth before onset of juvenile type-1 diabetes and autoantibodies to IA-2. Netherlands Kolibrie study group of childhood diabetes. *Lancet* 2000; 356:655–656.
367. McCarthy HD, Ellis SM, Cole TJ. Central overweight and obesity in British youth aged 11–16 years: cross sectional surveys of waist circumference. *BMJ* 2003; 326:624.
368. Kibirige M, Metcalf B, Renuka B, Wilkin TJ. Testing the Accelerator Hypothesis. *Diabetes Care* 2003; 26:2865–2870.
369. Barker DJ: The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 301:1111–1116, 1990
370. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent): diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35:595–601.
371. Cianfarani S, Germani D, Branca F: Low birthweight and adult insulin resistance: the “catch-up growth” hypothesis. *Arch Dis Child Fetal/Neonatal Ed* 1999; 81:F71–F73.
372. Bavdekar A, Yajnik CS, Fall CHD, Bapat S, Pandit AN, Deshpande V, Bhawe S, Kellingray SD, Joglekar C: Insulin resistance syndrome in 8-year-old Indian children: small at birth, big at 8 years, or both? *Diabetes* 1999; 48:2422–2429.
373. Weets I, Van Autreve J, Van der Auwera BJ, Schuit FC, Du Caju MV, Decochez K, De Leeuw IH, Keymeulen B, Mathieu C, Rottiers R, Dorchy H, Quartier E, Gorus FK; Belgian Diabetes Registry: Male-to-female excess in diabetes diagnosed in early adulthood is not specific for the immunerelated form, nor is it HLA-DQ restricted: possible relation to increased body mass index. *Diabetologia* 2001; 44:40–47.
374. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:859–862.
375. Hak AE, Pols HA, Stehouwer CD et al. Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relation to insulin resistance in nondiabetic elderly: the Rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4398–4405.
376. Harrison LC, Flier JS, Roth J, Karlsson FA, Kahn CR. Immunoprecipitation of the insulin receptor: a sensitive assay for receptor antibodies and a specific technique for receptor purification. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48:59–65.
377. Maedler K, Sergeev P, Ris F et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002; 110:851–860.

378. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 2001; 50:1683–1690.
379. Bjork E, Kampe O, Karlsson FA et al. Glucose regulation of the autoantigen GAD65 in human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1574–1576.
380. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 1999; 48:738–744.
381. Xu P, Cuthbertson D, Greenbaum C, Palmer JP, Krischer JP and Diabetes Prevention Trial-Type Study Group. The Role of Insulin Resistance in Predicting the Progression to Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* In Press, *Diabetes Care*. 2007 Sep;30(9):2314-20
382. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.
383. Radziuk J: Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4426-4433.
384. Rosenbloom AL, Hunt SS, Rosenbloom EK, Maclaren NK. Ten-year prognosis of impaired glucose tolerance in siblings of patients with insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1982;31:385–387.
385. Allen HF, Jeffers BW, Klingensmith GJ, Chase HP. First-phase insulin release in normal children. *J Pediatr* 1993;123:733–738.
386. Mrena S, Virtanen SM, Laippala P, Kulmala P, Hannila ML, Akerblom HK, Knip M, and the Childhood Diabetes in Finland Study Group: Models for Predicting Type 1 Diabetes in Siblings of Affected Children. *Diabetes Care* 2006; 29: 662-667.
387. Wallace T. M., Levy, J. C., Matthews, D. R.: Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* 2004;27: 1487-1495.
388. Hawa MI, Bonfanti R, Valeri C, Castelli MD, Beyan H, Leslie RDG. No Evidence for Genetically Determined Alteration in Insulin Secretion or Sensitivity Predisposing to Type 1 Diabetes, *Diabetes Care* 2005; 28:1415–1418.
389. Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR, Shattock M, Bottazzo GF, Holman R: UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet* 1997; 350:1288–1293.
390. Olmos PR, Hodgson MI, Maiz A, Manrique M, De Valdés MD, Foncea R et al. Nicotinamide protected first-phase insulin response (FPIR) and prevented clinical

- 
- disease in first-degree relatives of type-1 diabetics. *Diab Res Clin Pract* 2006; 71 : 320–333.
391. Elliott R.B., Chase H.P. Prevention or delay of type 1 (insulindependent) diabetes mellitus in children using Nicotinamide, *Diabetologia* 1991; 34: 362–365.
392. Greenbaum CJ, Kahn SE, Palmer JP: Nicotinamide's effects on glucose metabolism in subjects at risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes* 1996; 45: 1631-1634.
393. Ferrannini E, Mari A, Nofrate V, Sosenko JM, and Skyler JS, for the DPT-1 Study Group. Progression to Diabetes in Relatives of Type 1 Diabetic Patients: Mechanisms and Mode of Onset. *Diabetes* 2010; 59:679–685.
394. Sosenko JM, Skyler JS, Krischer JP, Greenbaum CJ, Mahon J, Rafkin LE, Cuthbertson D, Cowie C, Herold K, Eisenbarth G, Palmer JP, and the Diabetes Prevention Trial–Type 1 Study Group. Glucose Excursions Between States of Glycemia With Progression to Type 1 Diabetes in the Diabetes Prevention Trial–Type 1 (DPT-1). *Diabetes* 2010; 59:2386–2389.
395. Xu P, Beam CA, Cuthbertson D, Sosenko JM, Skyler JS, Krischer JP; DPT-1 Study Group. Prognostic accuracy of immunologic and metabolic markers for type 1 diabetes in a high-risk population: receiver operating characteristic analysis. *Diabetes Care*. 2012 Oct;35(10):1975-80.

---

## SKRAĆENICE

APĆ - antigen prezentujuće ćelije

DPT-1 – Diabetes Prevention Trial Type 1 Diabetes

ENDIT - The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial

FPIR- first phase of insulin response (prva faza insuinske sekrecije)

GAD - antitela na glutamat deksrboksilazu

HLA – human leukocyte antigen (humani leukocitarni antigen)

IA2 - antitela na tirozin fosfatazi sličan molekul

IAA – insulinska antitela

ICA – islet cell antibody (antitela na ćelije pankreasnih ostrvaca)

IFN $\gamma$  – interferon  $\gamma$

IL-1 – interleukin 1

IL-4 – interleukin 4

IVGTT-intravenski test tolerancije na glukozu

IZS – insulin-zavisno stanje

KR- klinička remisija

LADA- latent autoimmune diabetes in adults (autoimuni dijabetes u odraslih)

Ly – limfociti

MF – makrofazi

MHC- Major Histocompatibility Complex (glavni kompleks histokompatibilnosti)

nr PR- prvi rođaci pacijenata sa tipom 1 dijabetesa sa niskim rizikom za ispoljavanje bolesti

N-T1D – novootkriveni tip 1 dijabetesa

OGTT – oralni test tolerancije na glukozu

PR- prvi rođaci pacijenata sa tipom 1 dijabetesa

T1D – tip 1 dijabetesa

TCR – T ćelijski receptor

TGF $\beta$  – transforming growth factor  $\beta$  (transformišući faktor rasta  $\beta$ )

vr PR- prvi rođaci pacijenata sa tipom 1 dijabetesa sa visokim rizikom za ispoljavanje bolesti

---

Dr Tanja Miličić

## BIOGRAFIJA

Rođena je 28.oktobra 1971.godine u Užicu, a u Beogradu je završila osnovnu školu i gimnaziju sa odličnim uspehom.

Upisala se na Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 1990. godine, a diplomirala 1996.godine sa prosečnom ocenom 9.97.

Nakon diplomiranja i završenog lekarskog staža zaposlila se 2000. godine kao klinički lekar na Odeljenju za metaboličke poremećaje, intenzivirani tretman i ćelijsku terapiju u dijabetesu Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije, gde i sada radi. Specijalistički ispit iz interne medicine položila je 2001.godine sa odličnim uspehom, a subspecijalistički rad iz endokrinologije odbranila je 2005. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Magistarski rad pod nazivom " *Analiza povezanosti poremećaja subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita i razvoja bolesti u novootkrivenom tipu 1 dijabetesa*" (mentor Prof dr Nebojša Lalić), odbranila je 2005. godine, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Izabrana je u zvanje kliničkog asistenta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na predmetu Interna medicina 2012. godine.

Od početka rada na Klinici za endokrinologiju aktivno se uključila u naučne projekte. Do sada je autor ili koautor u više od 200 radova publikovanih u međunarodnim i domaćim časopisima i knjigama i izlaganih na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Učestvovala je kao istraživač saradnik u naučnoistraživačkim projektima finansiranim od strane Republičkog Ministarstva za nauku, u periodu od 1996. do danas.

Završila je nekoliko domaćih i stranih poslediplomskih kurseva iz oblasti dijabetologije. Govori i piše engleski jezik.

Član je Endokrinološke sekcije Srpskog lekarskog društva, Mediteranske grupe za studiju dijabetesa i Evropske asocijacije za studije o dijabetesu.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Тања Миличић

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„АНАЛИЗА ПОРЕМЕКАЈА СУБПОПУЛАЦИЈА ТЛИМФОЦИТА  
ПРВИХ РОБАКА ПАЦИЈЕНАТА СА ТИПОМ 1 ДИЈАБЕТЕСА КАО  
МАРКЕРА РИЗИКА ЗА НАСТАНАК БОЛЕСТИ“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 18. 10. 2013.

Тања Миличић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тања Миличић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада АНАЛИЗА ПОРЕКЕЛА СУБПОПУЛАЦИЈА ТИМОЦИТА

ПРВИК ПОБУЈА ПАЦИЈЕНАТА СА ТИПОМ 1 ДИАБЕТЕСА КАО

МЕНТОР МАРКЕРА РИЗИКА ЗА НАСТАНАК БОЛЕСТИ

Проф др Дебојца М. Лалић

Потписани Тања Миличић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 18. 10. 2013.

Тања Миличић

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„АНАЛИЗА ПОРЕМЕКАЈА СУБПОПУЛАЦИЈА ТИПФОРБИТА ПРвих РОБАКА ПАЦИЈЕНТА С ТИПОМ 1 ДИАБЕТЕСА КАО МАРКЕРА РИЗИКА ЗА НАСТАНАК БОЛЕСИ“  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 19. 10. 2015.

Ана Милић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.