

Észak-Közép-budai Centrum, Új Szent János Kórház és Szakrendelő, Budapest,¹ Pécsi Tudományegyetem, Pécs,² Phaim Pharma Ltd., London, Egyesült Királyság³

Inzulin A-lánca elleni autoreaktív T-sejtek izolálhatóak újonnan diagnosztizált 1-es típusú cukorbetegek véréből

Kis János Tibor dr.,⁽¹⁾ Engelmann Péter dr.,⁽²⁾ Orbán Tihamér dr.⁽³⁾

Összefoglalás

A T1DM-et az inzulint termelő hasnyálmirigy β -sejtjeinek T-sejt-függő pusztulása jellemzi. A feltételezett célantigének száma továbbra is növekszik, de nincs egyetértés az elsődleges antigén természetével kapcsolatban. Legnagyobb valószínűséggel ez az antigén maga az inzulin vagy a proinzulin. A teljes hosszúságú inzulin nagy dózisban nem alkalmazható intervenciós vizsgálatokban, annak metabolikus hatása miatt, ezért a pontos epitóp azonosítása elengedhetetlen. Korábban a hasnyálmirigy körülvevő nyirokcsomókból izoláltak és oligoklonálisan tenyésztettek T-sejteket, amelyek felismerték az inzulin A-láncának 1–15. aminosavát. A diabetesspecifikus autoantigéneket azonosító publikációk száma nagyon korlátozott. Ennek ellenére több klinikai vizsgálat során számos különféle antigént alkalmaztak a β -sejtek pusztulásának lassítása vagy blokkolása céljából. Feltételeztük, hogy újonnan diagnosztizált T1DM-es betegek perifériás véréből ezen autoreaktív T-sejtek azonosíthatóak. Célul tűztük ki továbbá, hogy meghatározzuk ezen sejtek antigénspecificitását.

■ **Kulcsszavak:** autoreaktív T-sejtek, T1DM

Insulin A-chain autoreactive T cells in newly diagnosed type 1 diabetic patients' blood

Summary: T1DM is characterized by the T cell dependent destruction of the insulin producing pancreatic β -cells. The number of suspected target antigens is still increasing, and there is no consensus regarding the nature of the pivotal antigen. One of the most verisimilar antigens is the insulin or the proinsulin itself. The full length insulin in high dose cannot be used by interventional studies, because of its metabolic effect, therefore the identification of the exact epitope is crucial. Earlier oligoclonally expanded T cells from T1DM subjects pancreas surrounding lymph nodes, which recognized the insulin A 1–15 epitope have been reported. The publications identifying the diabetic specific autoantigens are very limited. Nevertheless in numerous intervention trials several different antigens were used to slow or block the destruction of β -cells. We hypothesized that autoreactive T cells can be identified from the peripheral blood of newly diagnosed T1DM patients. We also aimed to determine the antigen specificity of these cells.

■ **Key words:** autoreactive T cell, T1DM

DIABETOLOGIA HUNGARICA 29 (№2) 99–103. 2021. június

DOI: 10.24121/dh.2021.9

Közlésre érkezett: 2021. március 7. • Közlésre elfogadva: 2021. április 23.

A levelezésért felelős szerző: **Dr. Kis János Tibor**

ÉKC Új Szent János Kórház
1125 Budapest, Diós árok 1–3.
E-mail: kis.janos@janoskorhaz.hu

Rövidítések

I: inzulin; **ndT1DM:** újonnan diagnosztizált T1DM (newly diagnosed T1DM); **PBMC:** perifériás vér mononukleáris sejt (peripheral blood mononuclear cell); **PI:** proinzulin; **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

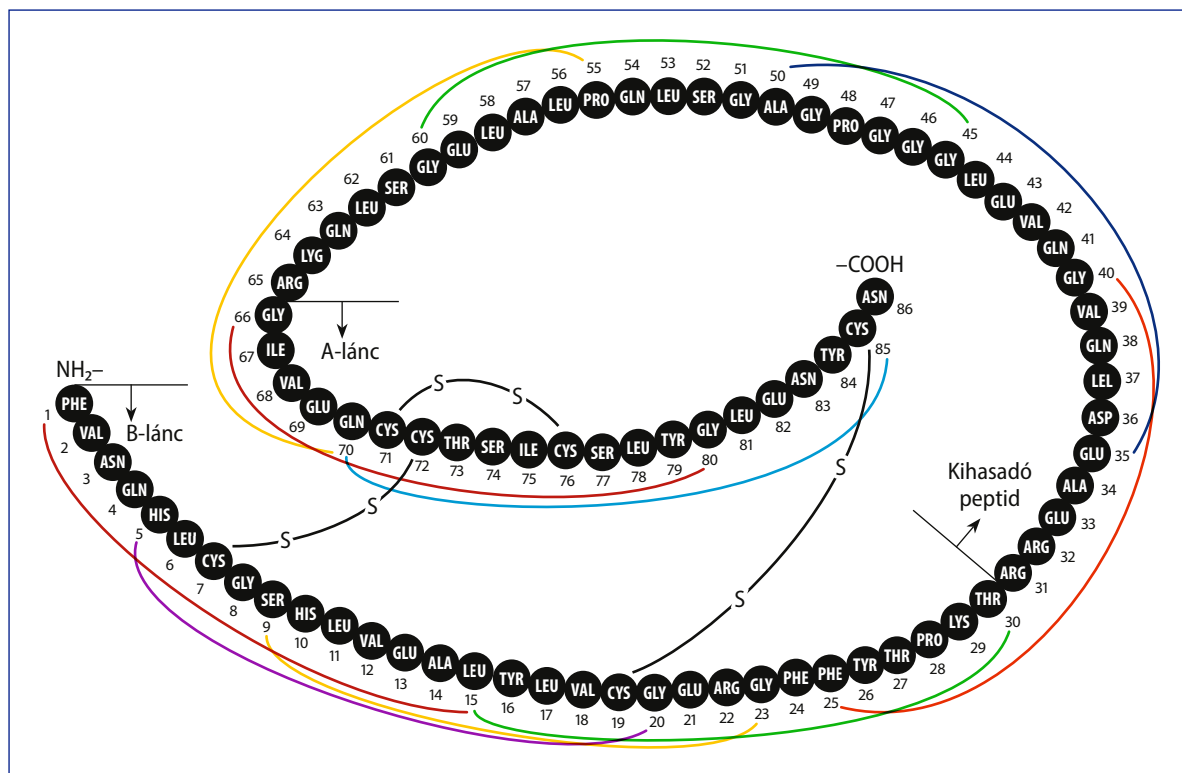
Az inzulinpumpa és a folyamatos glükózszenzor technikák fejlődésével a közeljövőben már Magyarországon is elérhetőek lesznek azok a kezelési rendszerek, amelyek a szenzor glükózatatok alapján önállóan módosítják az inzulin infúzióját. A fejlesztések a glükózmérés és az inzulinadás közötti kapcsolat zárása felé vezetnek. Az automatizált, egyre inkább zárt rendszerek közelíthetik T1DM-es betegeink szénhidrát-anyagcseréjét az egészséges egyénekre jellemző paraméterek felé.¹ A fejlődő technikák ellenére azonban a teljes életútra kiterjesztett euglykaemia elérése a betegeink jelentős részének még nem elérhető, bár mind az inzulinadás mind a glükózmérés egyre pontosabbá és kényelmesebbé válik, T1DM-es betegeink életminőségét a folyamatos külső inzulinigény, a glükózmonitorozás, a diéta és az életvezetés számtalan aspektusának (pl. sport, munkavállalás, családi, nemi élet stb.) tudatos, glükózközpontú vezetése egyértelműen rontja. Régi álmom a T1DM-es betegeink meggyógyítása (tercier prevenció), a T1DM kifejlődésének megelőzése még az anyagcsere-kisiklások előtt, de az immunológiai változások kialakulása után (szekunder prevenció), vagy akár azok előtt (primer prevenció).² Már több évtizede számos próbálkozás történt. Bár ezen vizsgálatok egy része mutatott pozitív eredményeket, átütő sikert nem értek el.³ Ennek sok oka lehet. A mai napig számos állatkísérlet történik a T1DM patogenezisének felderítésére, illetve a lehetséges kezelési formák meghatározására. Az T1DM kifejlődésének hátterében zajló folyamatokat érintő tudásunk mélysége azonban már túljutott az állatkísérleteken. Ma már kimondhatjuk, hogy nincs jó állatmodellünk a T1DM-es betegség kutatására.⁴ Jól mutatja ezt a tény is, hogy a modellállatokat már több tucat kezelési módszerrel ki tudjuk gyógyítani a T1DM-ből, de ezen kezelési módszerek mind kudarcot vallottak a humán klinikai tanulmányok során.⁴ Mivel az eddig befejezett klinikai, kuratív célzatú próbálkozások csak részeredményeket hoztak, illetve az egyes tanulmányok más és más módon prezentálták az eddig sajnos többnyire nem

átütő eredményeket, egy egységes szempontrendszer bevezetése javasolt, amely alapján az egyes tanulmányok eredményei egymással is összehasonlíthatóak lehetnének.⁵ További problémát jelent, hogy az inzulintermelő β -sejtek pusztulása T-sejt-mediált folyamat.^{6,7,8} A sejt immunválasz vizsgálata sokkal nehezebb, a mindennapi klinikai gyakorlatban csaknem lehetetlen. A jelenleg használt szigetsejtellenes autoantitestek vizsgálata gyakran nélkülözhetetlen a cukorbetegség hátterében álló autoimmun folyamat igazolásában, de tudnunk kell, hogy ezek az autoantitestek a β -sejtek pusztulásához nem is feltétlenül szükségesek. Ezt jól példázza az agammaglobulinaemiás T1DM-es beteg esete is.⁹ Ha kuratív gyógymódot keresünk a T1DM-re, akkor csak olyan kezelések jönnek szóba, amelyek mellékhatásai elhanyagolhatóak, hiszen a T1DM-es betegek a betegség kezdetén többnyire egyébként egészségesek, életkilátásaik, betegségük túlélése kiváló, igaz jelenlegi tudásunk szerint egy életre szóló fegyelmet, glükózmérést és inzulinadást igényel. A gyakori vélemény szerint a kuratív készítmény valószínűleg többkomponensű lesz, amely nagy valószínűséggel tartalmazni fog olyan molekulákat, amelyeket a T2DM kezelése során használunk, biztonságosak és β -sejt-védő hatásúak, mint például a GLP1-RA-k. Alkotója lesz valamilyen immunmoduláló molekula, amely vagy az antigénprezentáció, vagy a jelátvitel mechanizmusaiába avatkozik be (a-CD3, a-CD20).^{10,11} Ugyanakkor T1DM-specifikus antigént is fog tartalmazni, ami révén a tervezett koktél antigénspecifikus is lenne, és remélhetőleg toleranciát vált ki.¹² Érdekes módon azonban nem ismert a T1DM-specifikus antigén. Számos egyéb antigén mellett a GAD és az inzulin, illetve annak előalakjai a leginkább gyanúsított antigének. Kent SC és mtsai újonnan diagnosztizált, majd balesetben elhunyt T1DM-es betegek hasnyálmirigy körüli nyirokcsomóiból izolált T-sejteket, amelyeket in vitro felszaporított. Ezek a sejtek az inzulin A-láncának 1–15. aminosavát tartalmazó peptideket ismerték fel.¹³ Munkacsoportunk megkísérelte a szigetsejtellenes T-sejteket a perifériás vérben is meghatározni.

Módszerek

Hat újonnan diagnosztizált T1DM-es beteget (ndT1DM) és 6 egészséges egyént vontunk be a vizsgálatba. Minden betegnél történt a diagnózis megerősítése céljából autoantitest-vizsgálat. Az inzulinellenes autoantitesteket kétfajta technikával vizsgáltuk, mértük a GAD és az IA2 elleni autoantitesteket is. Az inzulinellenes autoantitesteket csak azon betegeknél értékeltük, akik kevesebb mint két hete kaptak először inzulint. Minden beteg minimum egy autoantitestre pozitív volt. Csak azon betegeket vontuk be a vizsgálatba, akiknél kevesebb mint 3 hónap telt el a diagnózis és a vérvétel között. A betegek életkora 18–35 (átlag: 27,7) év volt. A BMI átlaga 23,5 kg/m², a C-peptid átlaga 0,73±0,07 nmol/l, a HbA_{1c} átlaga 9,1%, a napi összes inzulin dózis átlaga: 21±0,02 E volt. Az egészségesek életkora, testsúlya hasonló volt, mindegyik antitestre negatívak voltak.

A PBMC-ket (perifériás vér mononukleáris sejtek) friss vérből, Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Uppsala, Svédország) gradiens-centrifugálással nyertük, mint ahogy az a standard protokollban is szerepel. A sejteket 96 lyukú lemezekre osztottuk szét, mindegyik lyukba 150000 sejtet helyeztünk el. Minden betegtől származó sejtet mindegyik antigénnel 3 külön lyukban tenyésztettük. A 3-3 lyukban antigén nélkül mint negatív kontrollt, tetanusztoxoidot két különböző koncentrációjában mint pozitív kontrollt használtunk. A vizsgált antigének a proinzulin (PI), az inzulin, az inzulin B-lánca, a GAD fehérje és az inzulint átfedő peptidek voltak. A szintetizált peptidek proinzulinmolekulán lévő helyzetét az 1. ábra mutatja. Az antigének mennyisége milliliterenként az alábbiak voltak: 10 µg és 30 µg PI esetén, 10 µg és 30 µg I, 1 µg és 5 µg GAD esetében, 25 µg és 50 µg B esetében és 40 µg átfedő peptidek esetén. A sejtek tenyésztése RPMI médiumban (RPMI + 10%



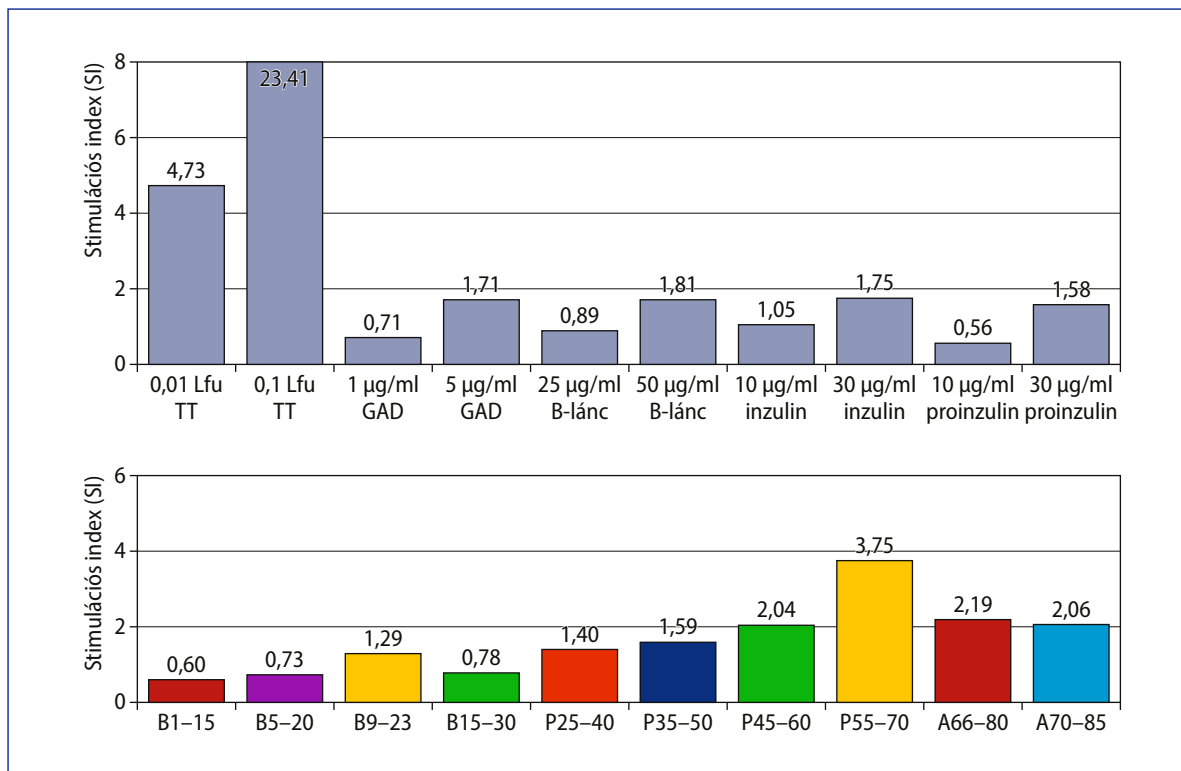
1. ábra. Az általunk használt 14-15 aminosav-hosszúságú átfedő (overlapping) peptidek a teljes proinzulinmolekulán ábrázolva. A különböző színek jelentik az egyes átfedő peptidszakaszokat

hőinaktivált humán szérum + 1% penicillin/streptomycin) történt 7 napig. Az aktivációt tríciummal (^3H) jelölt timidin beépülésével mértük.

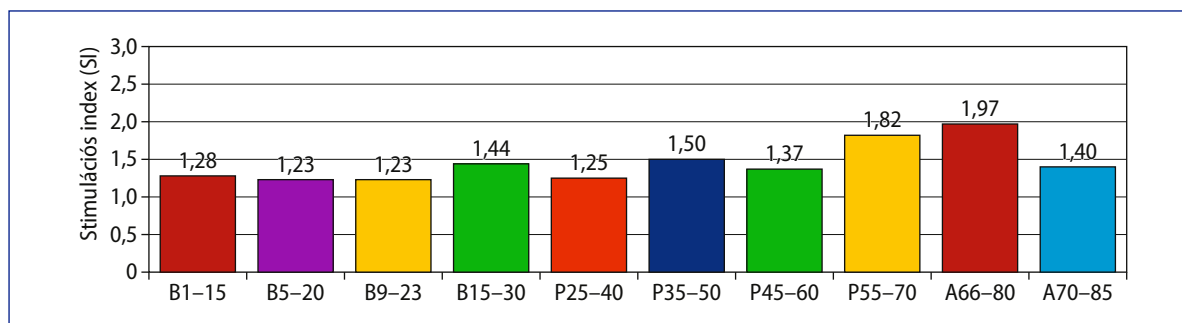
Eredmények és következtetés

Vizsgálatunk során csak az ndT1DM-es betegektől származó sejteknél találtunk autoantigén elleni reakciót. Ezen sejtek esetében a T1DM-hez köthető antigének közül a legmagasabb aktivációt azon átfedő inzulinpeptidekkel mértük, amelyek az A-lánc első 5 aminosavát tartalmazzák (2. ábra). Egészséges egyénekből származó limfociták nem ismerték fel a vizsgált antigének egyikét sem. Az ndT1DM-es betegekből származó PBMC-k a proinzulin csaknem ugyanazon részét azonosították, mint a pancreas környéki nyirokcsomóból származó T-sejtek *Kent SC* vizsgálatában

(3. ábra).¹³ Az autoreaktív T-sejtek koncentrációja a perifériás vérben rendkívül alacsony, ezért megtalálásukhoz érzékeny tesztet kellett alkalmazni. Az aktivált sejtek szaporodásának, DNS-kettőződésének mérésére a ^3H -mal jelölt timidin bizonyult a legérzékenyebbnek. Kísérletünk erőssége, hogy a friss vérmintából izolált mononukleáris sejtek a lehető legkevesebb manipuláción estek át, míg *Kent SC* és munkacsoportja egy-egy sejtől indult ki, azokat in vitro felszaporítva végezte el a vizsgálatokat.¹³ A kevesebb manipuláció véleményünk szerint kevésbé befolyásolja az eredményeket. A β -sejtek pusztulását elindító immunfolyamat során egyes elméletek szerint kezdetben csak egy vagy néhány antigénnel szemben veszítik el a toleranciát a leendő T1DM-es betegek. A β -sejtek pusztulása során újabb és újabb antigének ellen indul immunválasz (antigén spreading), aminek egy eredménye a gyakorlatban is mérhető



2. ábra. Egy tipikus antigénspecifikus T-sejt-prolifерációs vizsgálat eredménye T1DM-es betegben – A) az egyes antigének (TT: tetanusztoxoid, GAD, B-lánc, inzulin, PI: proinzulin) és B) az overlapping peptidek mellett mért sejtprolifерáció mértéke placebohoz hasonlítva



3. ábra. A vizsgálatban részt vevő összes (N=6) ndT1DM-es páciens átfedőpeptid-stimulációs adata

szigetsejtellenes autoantitestek megjelenése.¹⁴ Véleményünk szerint, ha létezik az elsődleges antigén, akkor annak meghatározása kulcsfontosságú. A T1DM megelőzésére, progressziójának megállítására vagy késleltetésére, vagy visszafordításának eléréséhez szükséges ennek ismerete, el kell érni

az ezzel szembeni immuntoleranciát. Várhatóan az immunrendszer modulálása akkor fog a legkevesebb mellékhatással járni, ha az antigén specifikus lesz. Eredményeink szerint a vizsgált antigének közül az inzulin A-láncának kezdeti szakasza a legígéretesebb aspiráns.

Irodalom

- Boughton CK, Hartnell S, Allen JM, Fuchs J, Hovorka R: Training and support for hybrid closed-loop therapy. *J Diabetes Sci Technol* 2020; 1932296820955168. DOI: 10.1177/1932296820955168
- Primavera M, Giannini C, Chiarelli F: Prediction and prevention of type 1 diabetes. *Fron Endocrinol* 2020; 11: 248. DOI: 10.3389/fendo.2020.00248
- Orban T, Kis JT: Prevention of type 1 diabetes mellitus using a novel vaccine. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2011; 2: 9-16. DOI: 10.1177/2042018810390546
- Atkinson MA, Roep BO, Posgai A, Wheeler DCS, Peakman M: The challenge of modulating β -cell autoimmunity in type 1 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019; 7(1): 52-64. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30112-8
- Orban T, Orban NT, Jalahej H, Daubeney PEF: A novel quantitative approach to staging and assessing recovery from type 1 diabetes mellitus: The Type 1 Diabetes Mellitus Metabolic Recovery Index. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 992. DOI: 10.3390/ijms21030992
- Orban T, Kis J, Szereday L, Engelmán P, Farkas K, Jalahej H, et al.: Reduced CD4+ T-cell-specific gene expression in human type 1 diabetes mellitus. *J Autoimmun* 2007; 28(4): 177-187. DOI: 10.1016/j.jaut.2007.01.002
- Orban T, Farkas K, Jalahej H, Kis J, Treszl A, Falk B, et al.: Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy. *J Autoimmun* 2010; 34(4): 408-415. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.10.005
- Kis J, Engelmán P, Farkas K, Richman G, Eck S, Lolley J, et al.: Reduced CD4+ subset and Th1 bias of the human iNKT cells in Type 1 diabetes mellitus. *J Leukoc Biol* 2007; 81(3): 654-662. DOI: 10.1189/jlb.1106654
- Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, et al.: Development of Type 1 Diabetes despite Severe Hereditary B-Cell Deficiency. *N Engl J Med* 2001; 345(14): 1036-1040. DOI: 10.1056/nejmoa010465
- Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al.: Rituximab, B-Lymphocyte Depletion, and Preservation of Beta-Cell Function. *N Engl J Med* 2009; 361(22): 2143-2152. DOI: 10.1056/nejmoa0904452
- Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, et al.: An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in relatives at risk for type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2019; 381(7): 603-613. DOI: 10.1056/nejmoa1902226
- Skyler JS: Toward primary prevention of type 1 diabetes. *JAMA* 2015; 313(15): 1520-1521. DOI: 10.1001/jama.2015.2054
- Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, et al.: Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature* 2005; 435(7039): 224-228. DOI: 10.1038/nature03625
- Zhang L, Eisenbarth GS: Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes* 2011; 3(1): 48-57. DOI: 10.1111/j.1753-0407.2010.00102.x