

Otto Lehtinen

DIPP-TUTKIMUS: SYNNYNNÄISEN
IMMUNITEETIN OSUUS TYYPIN 1
DIABETEKSEN KEHITTYMISESSÄ

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2021

Otto Lehtinen

DIPP-TUTKIMUS: SYNNYNNÄISEN
IMMUNITEETIN OSUUS TYYPIN 1
DIABETEKSEN KEHITTYMISESSÄ

Biolääketieteen laitos / Fysiologia

Kevätlukukausi 2021

Vastuuhenkilöt: Jorma Toppari, Mari Vähä-Mäkilä

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun
alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LEHTINEN, OTTO:

DIPP-tutkimus: synnynnäisen
immunitetin osuus tyypin 1 diabeteksen
kehittymisessä

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 19 s.

Biolääketieteen laitos

Maaliskuu 2021

Tyypin 1 diabetes (T1D) on autoimmuunitauti, jossa haiman β -solujen tuhoutumisen seurauksena elimistö ei kykene enää tuottamaan insuliinia. T1D:n esiintyvyys ja ilmaantuvuus on kasvussa maailmanlaajuisesti. Sairastuminen T1D:een selittyy osaltaan perintökäijöillä, kuten kudostyyppiantigeenijärjestelmään kuuluvilla HLA-molekyyleillä. T1D:een voimakkaasti assosioituvia haplotyyppisiä ovat HLA-DR3-DQ2 sekä HLA-DR4-DQ8.

Syventävien opintojen kirjallisen työni käsittelee tyypin 1 diabeteksen ja synnynnäisen immunitetin yhteyttä. Työn ensimmäisellä puoliskolla kerron immunitetista sekä T1D:sta kirjallisuuskatseuksen pohjalta. Toisessa puoliskossa käsitelen suomalaislähtöistä T1D:n ennustamista ja ehkäisemistä tutkivaa DIPP-tutkimusta, joka on alallaan maailman laajin käynnissä oleva tutkimus. DIPP-tutkimukseen liittyen osallistuin kesällä 2017 DIPP-tutkimuksen osatutkimukseen, PAMP-tutkimukseen osallistuvien lapsien verinäytteiden jatkokäsittelyyn. Kyseessä oli kohorttinäytteiden kerääminen. Eristin näytteistä monosyytit, erilaistin ne makrofageiksi ja stimuloin näitä makrofageja erilaisilla PAMP-reagensseilla 4:n ja 24:n tunnin ajan. Stimulaation jälkeen säilöin näytteet myöhempää analysointia varten. Yhden näytteen käsittely kesti kaikkine vaiheineen kokonaisuudessaan noin seitsemän vuorokautta.

Erilaisten virusinfektioiden ja suolistomikrobiomin merkitystä T1D:n synnylle on tutkittu. DIPP-tutkimuksessa on muun muassa havaittu, että tyypin 1 diabetesta sairastavien lapsien ja terveiden lapsien suoliston mikrobiomissa voidaan todeta eroja. Lisäksi on kyetty osoittamaan enterovirusinfektioiden ja ensimmäisten diabetekseen liittyvien autovasta-aineiden assosiaatio.

Tyypin 1 diabeteksen hoito on kehittynyt merkittävästi, mutta taudin ehkäisemiseen ei ole vielä löydetty keinoja. DIPP-tutkimus onkin tässä suhteessa tärkeä tutkimus, sillä sen avulla toivotaan löytyvän T1D:n riskitekijöitä, joihin jatkossa voitaisiin mahdollisesti vaikuttaa. PAMP-tutkimus pyrkii selvittämään T1D:n kehittymiseen liittyviä signalointireittejä. Tällaisien signalointireittien löytyminen voisi mahdollistaa kyseisiin reitteihin vaikuttamisen ja siten voitaisiin vaikuttaa myös T1D:n kehittymiseen.

Sisällys

1. JOHDANTO	1
2. IMMUNITEETTI	1
2.1. SYNNYNNÄINEN IMMUNITEETTI	1
2.2.1. <i>Synnynnäisen immunitetin toimintaan osallistuvat solut</i>	2
2.2.3. <i>Tollin kaltaiset reseptorit</i>	3
2.2.4. <i>Komplementti</i>	5
2.1. HANKITTU IMMUNITEETTI	5
2.1.1. <i>T-solut</i>	6
2.1.2. <i>B-solut</i>	7
3. TYYPIN 1 DIABETES	8
3.1. EPIDEMIOLOGIA	8
3.2. PATOFYSIOLOGIA	8
3.3. VASTA-AINEET	9
3.4. RISKITEKIJÄT	10
3.5. DIAGNOSTIIKKA JA HOITO	11
4. DIPP-TUTKIMUS	12
4.1. YLEISTÄ	12
4.2. DIPP-PAMP -TUTKIMUS	12
4.3. LABORATORIOTYÖSKENTELY	14
5. POHDINTAA	15
LÄHTEET	17

1. Johdanto

Tyypin 1 diabetes (T1D) on parantumaton pitkäaikaissairaus, joka lukeutuu autoimmuunisairauksiin. T1D:ta sairastavan henkilön haiman insuliinia tuottavat β -solut lakkaavat toimimasta, jonka seurauksena kehittyy insuliinipuutos. Insuliinipuutos johtaa veren glukoosipitoisuuden suurenemiseen ja siten sairaudelle tyypillisiin oireisiin. Hoidon kulmakivenä ovat ihonalaiskudokseen annosteltavat pitkä- ja lyhytvaikutteiset insuliinit. T1D:n ilmaantuvuus väestössä on kasvanut. Suurinta ilmaantuvuus on Suomessa ja Sisiliassa. (Atkinson ym. 2014)

Sairauden taustalla vaikuttavat mekanismit ovat toistaiseksi huonosti tunnettuja. Ajatellaan, että autoimmuunivasteen kehittymiseen vaikuttavat sekä perintötekijät että ympäristötekijät. Tiedetään, että lapsen riski sairastua T1D:een on suurentunut, mikäli lapsen isä, äiti tai sisarus sairastaa T1D:ta. (Pociot ja Lernmark 2016) Ympäristötekijöiden suhteen kiinnostusta ovat herättäneet etenkin muun muassa virukset (Rewers ja Ludvigsson 2016). Esimerkiksi enterovirukset saattavat olla yhtenä vaikuttavana tekijänä β -solujen tuhoutumiseen johtavassa kaskadissa (Tauriainen ym. 2011).

Jotta T1D:n synnyn ehkäiseminen voisi onnistua, on sairauden etiologian ymmärtäminen tärkeää. Sairauden puhkeamisen estämällä välttyttäisiin sen aiheuttamilta kärsimyksiltä ja hoidon sekä sairauden aiheuttamien komplikaatioiden aiheuttamilta kustannuksilta. T1D onkin laajan tutkimuksen kohteena. Yksi merkittävimmistä tutkimuksista on suomalainen DIPP-tutkimus, jonka avulla pyritään selvittämään tapoja ennustaa ja ehkäistä T1D:n puhkeaminen.

2. Immunitaetti

2.1. Synnynnäinen immunitaetti

Synnynnäinen immunitaetti toimii ensilinjan puolustusmekanismina elimistöön pääseville patogeeneille. Toisin kuin hankittu immunitaetti, synnynnäisen immunitaetin toiminta on nopeaa, sillä sen ei tarvitse sopeutua tai ”oppia” toimimaan uudenlaisia patogeeneja vastaan. Synnynnäisen immunitaetin historia ulottuu nykytietämyksen mukaan jopa miljardin vuoden päähän ja se kehittyi arviolta 500-700 miljoonaa vuotta aikaisemmin kuin hankittu immunitaetti. Synnynnäisen immunitaetin toimintaan osallistuu monia eri soluja. Näihin soluihin lukeutuvat makrofagit, NK-solut (natural killer -solut), neutrofiilit, eosinofiilit, dendriittisolut, mast-solut, CD5+ B-solut ja verihiutaleet. Solujen lisäksi toimintaan osallistuvat muun muassa komplementti, sytokiinit, kemokiinit, interferonit ja defensiinit. (Chaplin 2010)

Synnynnäisen immunitaetin toiminta perustuu erilaisiin hahmontunnistusreseptoreihin (PRR, pathogen-recognition receptor). Nämä hahmontunnistusreseptorit tunnistavat mikrobien pinnalla olevia komponentteja, joista käytetään nimitystä PAMP (pathogen-associated molecular pattern). Hahmontunnistusreseptoreita esiintyy kaikkialla elimistössä eikä niillä ole immunologista muistia. Erilaiset hahmontunnistusreseptorit reagoivat spesifisti tiettyyn PAMP-kuviioon ja saavat siten aikaan tietyn antipatogeenisen vasteen. Hahmontunnistusreseptoreista kaikkein merkittävimpinä pidetään Tollin kaltaisia reseptoreita. (TLR, Toll-like receptor). (Akira ym. 2006; Koenderman ym. 2014)

2.2.1. Synnynnäisen immunitetin toimintaan osallistuvat solut

Kuten edellä jo mainitsin, synnynnäisen immunitetin toimintaan osallistuu monia eri soluja. Tässä kappaleessa käydään lyhyesti läpi myeloidiseen linjaan kuuluvia immuunipuolustuksen soluja, joita ovat neutrofiilit, eosinofiilit, basofiilit, monosyytit, makrofagit, dendriittisolut ja verihiutaleet. Näiden solujen lisäksi kerron NK-soluista.

Neutrofiilit ovat veressä ja muissa kudoksissa esiintyviä fagosytointiin erikoistuneita soluja. Ne fagosytoivat itseään pienempiä patogeeneja ja tämän jälkeen tuhoavat ne sisällään olevissa fagolysosomeissa. Neutrofiileja esiintyy suurissa määrin esimerkiksi bakteeri-infektioiden ja kudostuhon yhteydessä. Neutrofiilit kiertävät verenkierrossa noin 7-9 tunnin ajan ennen kuin ne siirtyvät muuhun kudokseen. Normaalitilassa niiden elinikä on noin 2-3 päivää. Ne eivät siis ole kovin pitkäikäisiä. (Nathan 2006)

Eosinofiilit osallistuvat suolistomatojen ja muiden parasiittien torjuntaan. Ne kykenevät siis tuhoamaan itseään suurempia kohteita toisin kuin neutrofiilit. Koska eosinofiilien tuotanto ja selviytyminen parantuvat interleukiini-5:n (IL-5) ansiosta, esiintyvät ne runsaslukuisina erilaisissa allergisissa reaktioissa. Neutrofiilien tapaan eosinofiilit ovat lyhytikäisiä. Niiden keskimääräinen elinikä on noin 4 päivää. (Konderman ym. 2014; Imuunologia 2011)

Basofiilit ovat merkittävässä roolissa allergisissa reaktioissa. Ne vapauttavat granuloistaan histamiinia ja lipidivälittäjäaineita, jotka saavat aikaan kudoksessa tulehdusta, ödeemaa ja sileän lihaksen supistumista. Basofiilit eivät kykene fagosytointiin eikä niillä ole kapasiteettia hyökätä suoraan patogeeneja vastaan. Basofiilien elinikä on samaa luokkaa kuin eosinofiileilla. (Cromheecke ym. 2014)

Monosyytit ovat makrofagien esiasteita. Luuytimen valmistuttuaan ne siirtyvät verenkiertoon, jossa ne jakautuvat ennen siirtymistä muihin kudoksiin. Päästyään kudokseen, ne erilaistuvat kyseiselle kudokselle spesifeiksi makrofageiksi. Verrattuna neutrofiileihin ja makrofageihin monosyytit ovat melko huonoja fagosytoijia. Niillä on kuitenkin muitakin tehtäviä, kuin pelkkä fagosytointi. Monosyytit kykenevät vaikuttamaan immuunisäätelyyn erittämällä suuria määriä sytokiineja. Lisäksi on huomattu, että ne voivat toimia prekursoreina antigeeneja esitteleville solulle. (Konderman ym. 2014; Imuunologia 2011)

Makrofagit kehittyvät siis eri kudoksiin siirtyneistä monosyyteistä. Näille soluille on annettu omia nimiä. Tästä esimerkkinä Kupfferin solut, jotka ovat maksassa toimivia makrofageja. Makrofagien tehtäviä ovat muun muassa fagosytoiminen sekä immuunisuppressio. On huomattu, että makrofagien aktivoituminen esimerkiksi akuutin inflammaation yhteydessä tapahtuu pian neutrofiilien aktivaation jälkeen. Ne voivat kuitenkin neutrofiilien elinikään verrattuna toimia kudoksessa pitkiäkin aikoja kroonisten inflammaatioiden ja infektioiden aikana. Niitä esiintyy myös kehon granulomatoottisissa prosesseissa. (Locati ym. 2013, Konderman ym. 2014)

Dendriittisolut vaikuttavat synnynnäisen ja hankitun immunitetin välillä. Ne poimivat sattumanvaraisesti antigeeneja, käsittelevät ne ja tämän jälkeen esittelevät ne T-soluille. Tähän liittyen dendriittisoluilla on ikään kuin kaksi vastakkaista tehtävää immuunipuolustuksessa: ne voivat indusoida immuunivasteen vierasta antigeenia kohtaan ja toisaalta ne voivat indusoida toleranssia

kehon omia antigeeneja kohtaan. Näiden tehtävien lisäksi dendriittisolut kykenevät myös erittämään sytokiineja. Dendriittisoluja esiintyy lähes kaikissa kudoksissa. (Konderman ym. 2014; Imuunologia 2011)

Verihiutaleiden tunnetuin tehtävä on osallistuminen veren hyytymiseen. Ne kuitenkin sisältävät esimerkiksi immunoregulaatiivisia proteiineja ja muita immuunivasteen välittäjiä. (Konderman ym. 2014; Imuunologia 2011)

NK-solut (natural killer cells) ovat nimensä mukaisesti erikoistuneet solujen tuhoamiseen. Ne kehittyvät luuytimessä IL-2:n, IL-15:sta ja luuytimen stroomasolujen vaikutuksen johdosta. Niitä on normaalitilanteessa vain vähän perifeerisessä veressä. NK-solut tunnistavat patogeeneja muun muassa Tollin kaltaisten reseptorien avulla. Näiden reseptorien avulla NK-solut kykenevät tunnistamaan erilaisia mikro-organismeja, kuten viruksia ja sieniä, ja kehittämään vasteen näille. NK-solujen sytotoksista aktiivisuutta inhiboidaan luokan I HLA-molekyylien (human leucocyte antigen) avulla. Tämä johtaa siihen, että NK-solut kykenevät tappamaan kehon omia soluja, joiden luokan I HLA-molekyyliexpressio on alentunut. (Konderman ym. 2014; Della Chiesa ym. 2014)

2.2.3. Tollin kaltaiset reseptorit

Tollin kaltaiset reseptorit ovat tyypin 1 integraalimembraanin glykoproteiineja. Niissä on ekstrasellulaarinen osa, joka sisältää vaihtelevia määriä paljon leusiinia sisältäviä toistuvia osia. Lisäksi niillä on sytoplasmisen signaalintiosa, joka on homologinen interleukiini-1:n vastaavaa osaa kohtaan. (Akira ym. 2006)

Ihmisillä Tollin kaltaisia reseptoreja on kymmenen kappaletta (TLR1-10) ja hiirillä 12 (TLR 1-9, 11-13). TLR:t voidaan jakaa erilaisia rakenteita tunnistaviin alaperheisiin pääsekvenssiensä sekä sijaintiensa perusteella. Solukalvolla sijaitsevaan alaperheeseen kuuluvat lipidejä tunnistavat TLR1, TLR2 ja TLR6. Toinen alaperhe sijaitsee solun sisäisillä kalvoilla. Siihen kuuluvat TLR7, TLR8 ja TLR9 ja nämä tunnistavat nukleiinihappoja. Myös TLR3 osallistuu nukleiinihappojen tunnistukseen. Toisaalta jotkin TLR:t kykenevät tunnistamaan erilaisia rakenteita. Tällainen on esimerkiksi TLR4, joka tunnistaa muun muassa lipopolysakkarideja (LPS), RS-viruksen (respiratory syncytial -virus) fuusioproteiineja ja fibronectiiniä, joilla kaikilla on toisistaan poikkeavat rakenteet. (Takeda ja Akira 2005; Akira ym. 2006)

Tollin kaltaisten reseptorien päätehtävät ovat tulehduksen induktio ja hankitun immunitetin synnyttämiseen osallistuminen. TLR-signaali voi johtaa voimakkaaseen sytokiinin tuotannon aktivoitumiseen. Tuotettavien sytokiinien joukkoon lukeutuvat esimerkiksi IL-6 sekä TNF- α . Nämä sytokiinit saavat aikaan adheesiomolekyylien aktivoitumisen sekä ympäröivien solujen kemokiinituotannon aktivoitumisen. Tämä houkuttelee tulehdusalueelle tulehdussoluja, kuten makrofageja ja neutrofiileja. Nämä solut tuhoavat patogeeneja esimerkiksi defensiinien avustuksella. TLR:n aktivoima AP-solu (antigeeniä esittelevä solu, antigen presenting cell) lisää pintamolekyyliensä ekspressiota ja aktivoi T-soluja. CD4⁺ -solut erilaistuvat Th1- tai Th2-soluiksi. Th1-solut tuottavat IFN- γ :aa ja toimivat siten antiviraalisen ja antimikrobiaalisen immuunipuolustuksen osana. Th2-solut tuottavat IL-4:ää ja IL-13:ta, jotka molemmat liittyvät

allergisiin reaktioihin tai puolustukseen suolistomatoja vastaan. TLR2- ja TLR5-agonistit voivat saada aikaan Th2-vasteen tietyissä olosuhteissa. Suurin osa TLR:ista kuitenkin stimuloivat AP-soluja tuottamaan Th1-sytokiineja, kuten IL-12 ja IL-18, tukemaan Th1-välitteistä immunitettä. (Takeda ja Akira 2005; Akira ym. 2006; Kaisho ja Akira 2006)

Tollin kaltaisia reseptoreja esiintyy monissa immuunipuolustuksen soluissa kuten makrofageissa, dendriittisoluiissa, B-soluissa ja tietyissä T-soluissa. Niitä esiintyy myös joissain ei-immuunisoluissa kuten fibroblasteissa sekä epiteelisoluissa. TLR:t esiintyvät sekä ekstra- että intrasellulaarisesti. Solun pinnalla esiintyviä TLR:ta ovat TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ja TLR6. Muut TLR:t (3, 7, 8 ja 9) esiintyvät lähes aina intrasellulaarisissa rakenteissa. Niitä löytyy esimerkiksi endosomeista ja niiden ligandeista. (Akira ym. 2006)

TLR:t tunnistavat bakteereita eri tavoin. Yksi tapa on soluseinän komponenttien tunnistaminen. Gram-negatiivisten bakteerien LPS on näistä komponenteista tärkein immunostimulantti. LPS:n lipidiosa, josta käytetään nimitystä lipidi-A, on vastuussa suurimmasta osasta Gram-negatiivisiin bakteereihin liittyvistä patogeenisistä ilmiöistä. Tässä suurinta osaa näyttelee TLR4. On kuitenkin olemassa joitain Gram-negatiivisia bakteereja, jotka vaikuttavat enemmän TLR2:een kuin TLR4:ään. Myös Gram-positiivisten bakteerien soluseinät voivat stimuloida synnynnäistä immunitettä, vaikka ne eivät sisällä lipopolysakkarideja. Sen sijaan LTA (lipoteichoic acid) vaikuttaa vastaavalla tavalla. TLR2 näyttelee tässä suurinta roolia ja samalla se vaikuttaa TLR1:n ja TLR6:n toimintaan. Toinen tapa tunnistaa bakteereita liittyy flagelliiniin. Flagelliini on tärkeä proteiini monien bakteerien liikkeen mahdollistavissa falgelloissa. Flagelliinin tunnistamisesta vastaa TLR5, joka tunnistaa jatkuvaa D1-domainia. Se ekspressoituu epiteelisoluissa, monosyyteissä sekä epäkypsissä dendriittisoluiissa. Erityisen runsaasti sitä ekspressoituu keuhkoissa. Koska TLR5 esiintyy intestinaalisessa epiteelissä basolateraalaisesti, flagelliini tunnistetaan vasta kun bakteeri on levinnyt ympäri epiteeliä. Kolmas tapa bakteerien tunnistamiseen liittyy niiden DNA:han. DNA:n tunnistamisesta vastaa TLR9. TLR9 sijaitsee endosomissa, joten bakteerien DNA on kuljetettava sinne. Endosomissa vallitsevat olosuhteet johtavat kaksoiskierteisen DNA:n hajoamisen useiksi yksikierteisiksi CpG-rakenteita sisältäviksi osiksi, jotka reagoivat TLR9:n kanssa. Intrasellulaarisiin bakteereihin kuuluvien mykobakteerien soluseinän rakenteet aktivoivat eniten TLR2:ta ja jonkin verran TLR4:ää. Näiden lisäksi mykobakteerien DNA voi aktivoida TLR9:ää. (Akira ym. 2006)

Kuten bakteerien kohdalla, TLR:t käyttävät myös viruksien tunnistamiseen erilaisia keinoja. DNA-virusten, esimerkiksi herpes simplex virus 1:n, genomit sisältävät runsaasti CpG-DNA kappaleita. Nämä aktivoivat TLR9:ää, mikä taas aktivoi inflammatorisia sytokiineja sekä tyypin 1 interferonin (IFN) eritystä. Yksijuosteisen RNA:n tunnistamiseen osallistuvat TLR7 ja TLR8. Kaksijuosteisen RNA:n tunnistamiseen taas tapahtuu TLR3:n toimesta. Jotkin virukset tuottavat glykoproteiineja, joiden tunnistamiseen osallistuvat TLR 4 ja TLR2. (Akira ym. 2006)

Sienien soluseinissä ja solupinnoilla on useita PAMP-kuvioita. Näitä kuvioita tunnistavat TLR2 ja TLR4. TLR2:n aktivaatio suosii Th2-vasteen kehittymistä, mikä on erikoista, sillä puolustuksessa sieniä vastaan Th1-vaste on merkittävämmässä osassa. Ilmeisesti siis TLR2:n ja TLR4:n aktivoitumisen vaikutukset täydentävät toisiaan. TLR:t osallistuvat myös eräiden alkueläinparasiittien, kuten *Leishmania majorin* tunnistamiseen. Muun muassa molekyylien, kuten

glykoinositopifosfolipidien ja genomisen DNA:n, tunnistamiseen osallistuvat TLR2, TLR4 ja TLR9. (Akira ym. 2006)

2.2.4. Komplementti

Olellaisena osana synnynnäiseen immunitettiin kuuluu komplementti. Se osallistuu opsonisaation ja fagosytoosin kautta patogeeneiden tunnistamiseen ja tuhoamiseen. Komplementin rooli onkin suuri kemotaksiksessa ja tulehduksessa. Se lisää kemokiinien, sytokiinien ja muiden synnynnäisen puolustusmolekyylien erittymistä ja siten parantaa synnynnäisen immunitetin toimintaa. Komplementin toiminta perustuu C3 proteiiniin (complement component 3). Kun patogeeni aktivoi komplementin, C3b kiinnittyy patogeenin pintaan. Tämä johtaa folikulaaristen dendriittisolujen ja B solujen lisääntyneeseen antigeenitunnistukseen, hankitun immunitetin induktioon sekä vasta-aineiden ja reaktiivisten T-solujen tuottamiseen. (Konederman ym. 2014)

Komplementin aktivaatio voi tapahtua kolmen eri tien kautta: klassisen tien, lektiinitien tai vaihtoehtoisen tien. Klassista tietä aktivoivat pääasiassa antigeeni-vasta-aine -kompleksit, bakteerit ja niiden tuotteet sekä apoptoottiset ja nekroottiset solut. Tällöin tunnistuksesta vastaava molekyyli on C1q. Klassisen tien aktivoituminen johtaa edelleen C2- ja C4 -molekyylien aktivaatioon ja C3-konvertaasin aktivaatioon. Lektiniitie aktivoituu monimutkaisten hiilihydraattikompleksien toimesta. Sen välittäjinä toimivat erilaiset tunnistusmolekyylit, kuten MBL (Mannan binding lectin) ja fikolliinit. Kuten klassisessa tiessä, myös lektiinitieessä aktivaatio johtaa C2- ja C4 -molekyylien aktivaatioon ja edelleen C3-konvertaasin aktivaatioon. Vaihtoehtoisen tien aktivaatiota tapahtuu jatkuvasti ja spontaanisti. Aktivaatioon liittyy vesimolekyyliin sitoutunut C3, joka saa aikaan faktorien B ja D aktivaation. Näiden faktorien avulla muodostetaan C3-konvertaasi. (Koenderman ym. 2014; Mathern ja Heeger 2015)

2.1. Hankittu Immunitetti

Siinä missä synnynnäinen immunitetti vastaa patogeeneiden nopeasta havaitsemisesta ja eliminoimisesta, hankittu immunitetti on kehittynyt paljon kattavampaan ja tarkemmin säädeltyyn antigeenien tunnistamiseen. Hankitun immunitetin avulla elimistö kykenee havaitsemaan ja synnyttämään immuunivasteen immuunipuolustukselle aiemmin tuntemattomia patogeeneja vastaan. Kun immuunijärjestelmä on käsitellyt uuden antigeenin, elimistöön jää kyseisen antigeenin tunnistavia muistisoluja. Tämän ansioista antigeenin havaitseminen ja siihen reagoiminen on jatkossa nopeampaa. Tästä käytetään nimitystä immunologinen muisti. Hankitun immunitetin toiminta perustuu antigeeneja esittelevien solujen sekä T- ja B-solujen väliseen yhteistyöhön. (Bonilla ja Oettgen 2010)

2.1.1. T-solut

T-solut kehittyvät kateenkorvassa luuytimeistä tai sikiöajan maksasta peräisin olevista lymfoidisen esiasteen soluista. Ne erilaistuvat kahteen pääluokkaan, jotka ovat CD4⁺- ja CD8⁺-solut. CD4⁺-soluista käytetään myös nimitystä auttaja- T-solut ja CD8⁺-soluista nimitystä tappaja- T-solut. T-solujen välittämää immuunivastetta kutsutaan soluvälitteiseksi immuunivasteeksi. (Immunologia 2011)

CD4⁺-solut erilaistuvat edelleen eri alaluokkien soluiksi. Erilaistumisvaihtoihin lukeutuvat T_{H1}-, T_{H2}-, T_{H17}- T_{reg}- ja T_{FH}-solut. Erilaistuminen tietyksi soluksi riippuu siitä, mikä sytokiini on vaikuttamassa erilaistumiseen. IL-12 ja IL-18 saavat aikaan erilaistumisen T_{H1}-soluksi, IL-4 saa aikaan erilaistumisen T_{H2}-soluksi, IL-6 ja IL-21 saavat aikaan erilaistumisen T_{FH}-soluksi, IL-6 yhdessä TGF- β :n kanssa saavat aikaan erilaistumisen T_{H17}-soluksi ja TGF- β /retinoiinihappo saavat aikaan erilaistumisen T_{reg}-soluksi. T_{H1}- ja T_{H2}-solujen tehtäviin immuunipuolustuksessa lukeutuvat muun muassa makrofagien avustaminen bakteerien ja parasiittien eliminaatioissa. T_{H1}-solut kykenevät valmistamaan IFN γ :aa, joka aktivoi makrofageja tuhoamaan intrasellulaarisia bakteereja. T_{H2}-solut taas tuottavat IL-4:ää, joka aktivoi makrofageja erilaisten parasiittimatojen vastaiseen toimintaan. T_{H17}-solut toimivat immuunipuolustuksessa siten, että ne rekrytoivat neutrofiileja ja osallistuvat epiteelin luontaiseen puolustukseen. Niiden tuottama IL-17 houkuttelee neutrofiileja ja IL-33 taas indusoi antimikrobiaalisten peptidien tuotantoa. T_{reg}-solujen tehtävänä immuunipuolustuksessa on immuunivasteiden hillitseminen. Niiden inhiboiva vaikutus perustuu niiden solupinnalla oleviin molekyyliin ja sytokiineihin, kuten IL-10:een. T_{FH}-solujen tehtävä immuunipuolustuksessa on B-solujen auttaminen vasta-ainetuotannossa. Ne tuottavat IL-21:tä ja IL-4:ää sekä ekspressoivat CD40L:ää ja ICOS:ia, jotka auttavat B-soluja tuottamaan korkean affiniteettiä vasta-aineita. Kuten CD4⁺-solut, myös CD8⁺-solut erilaistuvat. Ne erilaistuvat sytotoksiksi T-lymfosyyteiksi (CTL), joista myös käytetään jo edellä mainittua nimitystä tappaja- T-solut. Näiden solujen tehtävänä immuunipuolustuksessa on tappaa viruksen tai jonkin maligniteetin valtaamat solut. (Surh ja Sprent 2008; Bonilla ja Oettgen 2010)

Jotta T-solut kykenevät toimimaan immuunipuolustuksessa, on niiden ensiksi aktivoiduttava. Tähän aktivaatioon vaaditaan kolmea eri signaalia. Tällä tavoin T-solujen aktivaatio on hallitumpaa kuin jos aktivoitumiseen vaadittaisiin vain esimerkiksi yksi signaali. Ensimmäinen signaali aiheutuu antigeenin sitoutumisesta T-solureseptoriin. Tästä käytetään myös nimitystä antigeenin esitleminen. Tämä T-solulle esiteltävä antigeeni muokataan jostain mikrobissa esiintyvistä proteiineista. Antigeeni ei sellaisenaan kiinnity T-solureseptoriin, vaan se esitellään MHC-rakenteeseen (major histocompatibility complex) kiinnittyneenä. CD4⁺-soluille antigeeni esitellään MHC II -rakenteeseen kiinnittyneenä, kun taas CD8⁺-soluille esittely tapahtuu MHC I -rakenteen avulla. Antigeenin esittelystä vastaa antigeenia esittelevä solu (APC) ja näitä soluja esiintyy imusolmukkeissa. Kyseisiin soluihin lukeutuvat dendriittisolut, B-solut sekä makrofagit. Tämän ensimmäisen signaalin tarkoituksena on antigeenispesifisyys, eli immuunivasteen kohdentaminen oikeaa patogeenia vastaan. Toinen signaali on niin sanottu kostimulaattorisignaali. Siinä antigeenia esittelevän solun pinnalla olevat B7-rakenteet sitoutuvat CD28-reseptoreihin. B7-rakenteiden aktivaatioon vaaditaan mikrobirakenteiden aiheuttama antigeenia esittelevän solun aktivaatio. Kolmas signaali on T-solujen erilaistumisen kannalta tärkeä sytokiinireseptorien aktivaatio. Ne ohjaavat T-solujen erilaistumista,

josta olen jo aiemmin tässä kappaleessa kertonut. Kun T-solu vastaanottaa kaikki kolme signaalia, käynnistyy hankitun immuniteetin toiminta patogeeneja vastaan. (Surh ja Sprent 2008; Bonilla ja Oettgen 2010)

2.1.2. B-solut

B-solut ovat luuytimen hematopoieettisista kantasoluista muodostuvia lymfosyyttejä. B-solujen tehtäviin lukeutuvat muun muassa vasta-aineiden tuotto sekä muistisoluina ja antigeeneja esittelevinä soluina toimiminen. B-solujen välittämää immuunivastetta kutsutaan humoraaliseksi immuunivasteeksi. (Bonilla ja Oettgen 2010)

T-solujen tapaan myös B-solut erikoistuvat tietyn linjan soluiksi. B1 B-solut tuottavat IgM-luokan luonnollisia vasta-aineita, polyreaktiivisia IgA- vasta-aineita ja matalan affiniteetin vasta-aineita T-soluista riippumattomille antigeeneille. MZ B-solut (marginal zone B-cells) tuottavat luonnollisia IgM- vasta-aineita, sulkevat kiinni otettuja antigeeneja follikkeleihin ja osallistuvat T-soluista riippuviin ja riippumattomiin vasteisiin veressä syntyviä antigeeneja kohtaan. FO B-solut (follicular B-cells) tuottavat kaikkia immunoglobuliini-isotyyppejä, valmistavat pitkäikäisiä B-muistisoluja ja plasmasoluja sekä osallistuvat T-soluista riippuviin vasteisiin. (Hoffman ym. 2016)

B-solujen aktivaatio riippuu useista kontakteista ja sytokiinistimulaatioista, jotka saadaan aktivoituneilta soluilta. Nämä tekijät vaikuttavat siihen, tuleeko B-solusta joko muistisolu tai vasta-aineita tuottava plasmasolu. Tämä aktivaatio voi tapahtua sekä T-soluista riippuvalla että riippumattomalla tavalla. T-soluista riippumattomassa aktivaatiossa tärkeitä tekijöitä ovat niin sanotut TI-antigeenit (T-independent antigens). Jotkin molekyylit, kuten tietyt lektiinit, kykenevät indusoimaan kypsien B-solujen proliferaation ja vasta-ainetuotannon. Näistä käytetään nimitystä TI-tyypin 1 antigeenit. Jotkin makromolekyylit sisältävät toistuvia molekulaarisia kuvioita, jotka voivat vuorovaikuttaa useiden immunoglobuliinireseptorien kanssa. Ne voivat saada aikaan aktivoivan signaalin, joka voi yhdessä sytokiinien tai muun dendriittisolun tarjoaman solukontaktin avulla aikaansaada B-solun kehittymisen muisti- tai plasmasoluksi. Näistä käytetään nimitystä TI-tyypin 2 antigeenit. T-soluista riippuvassa aktivaatiossa B-solujen aktivoituminen perustuu sen saamiin signaaleihin. Näitä signaaleihin kuuluu kaksi päätyyppiä. Ensimmäinen signaali syntyy, kun antigeeni linkittää yhteen B-solun pinnan immunoglobuliinireseptoreja. Tämä linkitys saa aikaan intrasellulaaristen signaalireittien aktivaation. Se mahdollistaa interaktion T-solujen kanssa ja siten aktivaation vaatiman toisen signaalin vastaanoton. Toiseen aktivaatiosignaaliin liittyy se, että B-solut ovat aktiivisia antigeenien esittelijöitä ja ekspressoivat pinnallaan peptidejä MHC II -molekyylien yhteydessä. Nämä peptidit voivat olla lähtöisin B-solun pinnan immunoglobuliinireseptoriin sitoutuneesta antigeenista. Kun B-solu on yhteydessä kyseiselle peptidille spesifiin, antigeenia esittelevän solun aktivoimaan CD4+ T-soluun, tämä T-solu kykenee aktivoimaan kyseisen B-solun muisti- tai plasmasoluksi. (Hoffman ym. 2016; Bonilla ja Oettgen 2010)

3. Tyypin 1 diabetes

3.1. Epidemiologia

Kuten jo edellä mainitsin, tyypin 1 diabetes (T1D) on autoimmuunisairaus ja se kuuluu yleisimpiin lapsuusaikana diagnosoitaviin kroonisiin sairauksiin (Gale 2005). Vaikka monet autoimmuunisairaudet ovat yleisempiä naisilla, tyypin 1 diabetesta esiintyy lähes yhtä paljon sekä naisilla että miehillä. Esiintymispiikkejä on havaittu 5-7 vuoden ikäisillä ja lähellä puberteetti-ikää olevilla. (Atkinson ym. 2014)

Tyypin 1 diabeteksen insidenssi ja prevalenssi vaihtelevat melko paljon. Vaihtelu on maakohtaista. T1D on kaikkein yleisin Suomessa, jossa vuosittain sairastuneita on yli 60/100 000. Seuraavana tulee Sardinia, jossa vastaava luku on noin 40/100 000. Joissain maissa T1D on selvästi harvinaisempi. Tällaisia maita ovat esimerkiksi Kiina, Intia ja Venezuela, joissa insidenssi on luokkaa 0.1/100 000. On kuitenkin mielenkiintoista huomata, että erot naapurimaiden välillä voivat olla yllättävän suuria. Esimerkiksi Virossa insidenssi on vain alle kolmannes Suomen insidenssistä, vaikka maiden etäisyys toisistaan on vain runsaat 50 kilometriä. (Atkinson ym. 2014)

Tyypin 1 diabeteksen insidenssi on kasvanut maailmanlaajuisesti. Suomessa T1D:n insidenssi on kasvanut vuodesta 1988 alkaen vuosittain noin 3.6% vuoteen 2005 asti. Vuonna 2005 Suomessa mitattiin maailmanlaajuisesti korkein insidenssi alle 15-vuotiailla lapsilla, 64.2/100 000. Vuotta 2005 on seurannut tasannevaihe, jonka aikana insidenssissä ei ole tapahtunut merkittäviä muutoksia. (Harjutsalo ym. 2013) Myös työikäisillä on havaittu vastaavia insidenssin muutoksia. Vuosien 1992 ja 2007 välillä 18-64 -vuotiaiden suomalaisten tyypin 1 diabeteksen insidenssi kasvoi yhteensä 35%. Naisten keskuudessa kasvu oli 39% ja miesten keskuudessa 33%. (Hakkarainen ym. 2017)

3.2. Patofysiologia

Sairastuminen tyypin 1 diabetekseen on seurausta haiman insuliinia tuottavien β -solujen autoimmuunituhosta. On havaittu, että hiljattain T1D:een sairastuneilla noin 70% β -solusaarekkeista ei eritä lainkaan insuliinia ja noin 20% saarekkeista on tulehtuneita. Toisaalta usein on sanottu, että oireet ilmenevät vasta, kun 90-95% β -soluista on menetetty ja diagnoosi tehdään vasta, kun reilu kaksi kolmasosaa saarekkeista on täysin vailla β -soluja. (Atkinson ym. 2014)

Tällä hetkellä ollaan sitä mieltä, että suurinta roolia β -solujen tuhossa näyttelevät CD8+ T-solut, sillä näiden solujen määrä haiman vaurioituneissa alueissa on suurin. Muita patogeenien kannalta merkittäviä soluja ovat makrofagit (CD68+), CD4+ T-solut, B-lymfosyytit (CD20+) ja plasmasolut (CD138+). Yllättävää kyllä, FOXP3+ -solut ja NK-solut (natural killer -solut) ovat harvinaisia näissä leesioissa. (Atkinson ym. 2014)

Tarkkaa tietoa tai varmuutta siitä, mitkä kaikki tekijät loppujen lopuksi johtavat elimistön hyökkäämiseen omia β -solujaan vastaan, ei vielä ole. Yhtenä merkittävimpana vaihtoehtona pidetään synnynnäisen immunitetin aktivaatiota, joka johtaa autoimmuuniprosessin käynnistävään

signalointiin (Pino ym. 2010). Tähän liittyen etenkin Tollin kaltaisten reseptorien osuutta T1D:n patofysiologiassa on tutkittu ja tutkitaan edelleen. On esimerkiksi kyetty osoittamaan, että tyypin 1 diabetesta sairastavien monosyyteissä TLR2:n ja TLR4:n ekspresio on terveiden henkilöiden monosyytteihin verrattuna lisääntynyt (Devaraj ym. 2008). Eläinmalleissa on taas havaittu, että esimerkiksi hiirillä, joilta puuttuu TLR9, on alentunut riski sairastua T1D:een (Wong ym. 2008). Tollin kaltaisilla reseptoreilla on siis luultavasti monia eri rooleja tyypin 1 diabeteksen synnyssä.

3.3. Vasta-aineet

Tyypin 1 diabetesta sairastavilla esiintyy monia vasta-aineita. Saarekesoluvasta-aineet (ICA, islet cell autoantibodies) koostuvat lähinnä Langerhansin saarekkeiden solunsisäisiä rakenteita tunnistavista IgG1-molekyyleistä, jotka eivät ole β -soluille spesifisiä. Matalia saarekesoluvasta-ainetasoja todetaan myös terveillä eivätkä ne ennusta kohonnuttua riskiä sairastua tyypin 1 diabetekseen, jos muita riskitekijöitä ei ole todettu. Suuret saarekesoluvasta-ainemäärät taas liittyvät β -solutuhoon. (Siljander ym. 2009) Tyypin 1 diabetekseen sairastumisen jälkeen nämä vasta-ainetasot kuitenkin laskevat (Schlosser ym. 2010).

Insuliiniautovasta-aineet (IAA, insulin autoantibodies) ovat yleensä ensimmäisinä ilmaantuvia vasta-aineita ja niiden pitoisuuksien nopea suureneminen on seurausta β -solutuhosta. (Yu ym. 2000) Hiljattain T1D:een sairastuneista 20-60 % on IAA-positiivisia. Toisaalta on todettu, että normaaliväestössäkin IAA-positiivisia on 0.9-3.3 %. (Kimpimäki ym. 2002)

Glutamaattidekarboksylaasivasta-aineet (GADA, glutamic acid decarboxylase antibodies) ilmaantuvat yleensä IAA-positiivisuuden jälkeen. Nämä vasta-aineet ovat harvinaisempia alle murrosikäisillä lapsilla kuin murrosikäisillä tai aikuisilla. (Tuomi ym. 1993) On todettu, että GADA-positiivisuus ennustaa tulevaisuuden insuliinihoidon tarvetta. Toisin kuin aiemmin mainitut vasta-aineet, GADA-positiivisuus voi säilyä diagnoosin asettamisen jälkeen jopa vuosien ajan. Hiljattain T1D:een sairastuneista 20-90 % on GADA-positiivisia. GADA-positiivisuus on yleistynyt hieman vanhemman normaaliväestön keskuudessa, mutta tämän merkitys riskiin sairastua T1D:een on vielä epäselvä. (Siljander ja Knip 2011)

Insulinoomavasta-aine 2 (IA-2A) -positiivisuus ilmaantuu tyypillisesti viimeisenä edellä mainittuihin vasta-aineisiin verrattuna. Ajatellaan, että sen löytyminen kertoo pitkälle edenneestä taudista. Joskus IA-2A todetaan ensimmäisenä positiivisena vasta-aineena. Nämä tapaukset ovat kuitenkin harvinaisia ja muiden vasta-aineiden ilmaantuminen ja muu laajempi autoimmuuniaktivaatio seuraavat usein IA-2A:n ilmaantumista nopeasti. (Kimpimäki ym. 2002)

Sinkin kuljetukseen osallistuva proteiini-8 mahdollistaa sinkin kuljettamisen β -soluihin. Tätä proteiinia kohtaan on olemassa vasta-aineita (ZnT8A, autoantibodies against zinc transporter 8), joita on todettu T1D:ta sairastavilla lapsilla. Kyseiset vasta-aineet ilmaantuvat IAA-positiivisuutta myöhemmin. Diagnoosihetkellä arviolta 60-70 %:lla T1D:ta sairastavista todetaan ZnT8A-positiivisuus. (Achenbach ym. 2009)

3.4. Riskitekijät

Tyypin 1 diabeteksen ajatellaan johtuvan useiden tekijöiden summasta. Yksittäistä laukaisevaa tekijää ei ole kyetty osoittamaan. Aiheuttaviin tekijöihin lukeutuvat geneettiset tekijät, immunologiset tekijät sekä ympäristötekijät. (Satarupa ym. 2013)

On todettu, että tyypin 1 diabetesta sairastavaan perheeseen syntyneellä lapsella on kohonnut riski sairastua tyypin 1 diabetekseen. Äidin sairastaminen aiheuttaa noin 3 % riskin ja isän sairastessa riski on noin 5 %. Mikäli sisaruksella on todettu tyypin 1 diabetes, riski nousee noin 8 %:iin. Tähän riskiin liittyy olennaisena osana ihmisen kudostyyppiintigeenijärjestelmä, joka koostuu HLA-molekyyleistä (human leukocyte antigen). Ne ovat solujen pinnalla esiintyviä glykoproteiineja, joiden tehtävä on esitellä peptidejä T-soluille. Vieraan peptidin tunnistaminen käynnistää immuunivasteen. Tyypin 1 diabetekseen voimakkaasti assosioituvia haplotyyppijä ovat HLA-DR3-DQ2 sekä HLA-DR4-DQ8. Nämä haplotyyppit voivat esiintyä joko yksinään tai yhdessä. Skandinaviassa tyypin 1 diabetekseen sairastuneista lapsista lähes 90 %:lla on toinen tai molemmat näistä haplotyypeistä. (Pociot ja Lernmark 2016)

Ympäristötekijöistä erilaisten virus- ja bakteeri-infektioiden, suoliston mikrobien, ravinnon, rokotteiden ja hygienian osuutta tyypin 1 diabetekseen on pohdittu ja tutkittu. Viruksista etenkin enterovirusien osuudesta T1D:n kehitykseen on vahvaa näyttöä. Esimerkiksi DIPP-tutkimuksessa on osoitettu enterovirusinfektioiden ja ensimmäisten diabetekseen liittyvien autovasta-aineiden assosiaatio. DIPP-tutkimuksessa tutkittu virus oli ryhmään B kuuluva Coxsackievirus. (Sioofy-Khojine ym. 2018) Bakteerien kohdalla tutkimus on keskittynyt suoliston mikrobistoon. NOD-hiirillä (non-obese diabetic) tehtyjen tutkimusten perusteella on todettu, että suoliston mikrobistolla on merkittävä vaikutus tyypin 1 diabeteksen kehityksessä. Suoliston mikrobistoa on tutkittu myös ihmisillä ja on todettu, että tyypin 1 diabetesta sairastavilla mikrobisto on kapeakirjoisempi ja epävakampi terveisiin kontrolleihin verrattuna. (Gülden ym. 2015) Esimerkiksi T1D:n tapausverrokkitutkimuksessa kontrolliryhmällä todettiin suolistossa enemmän *Streptococcus thermophilus* -lajia sekä *Lactococcus lactis* -lajia. Tapausryhmällä taas todettiin enemmän muita lajeja, kuten *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Roseburia hominis* ja *Alistipes shahii*. (Vatanen ym. 2018)

Eräs havainto, joka DIPP-tutkimuksessa on tehty, liittyy ulostemikrobistossa esiintyvään *Bacteroides dorei* -lajiin. Huomattiin, että hieman ennen serokonversiota edellä mainitun bakteerilajin määrä lisääntyi ulostemikrobistossa. Epäselvää on kuitenkin vielä, mikä *B. dorein* rooli on T1D:een liittyen. Onko se taustalla vaikuttamassa T1D:n kehittymiseen vai ovatko T1D:een liittyvät autoimmunteettimuutokset *B. dorein* määrän lisääntymisen taustalla. Nämä asiat ovat vielä epäselviä ja vaativat lisätutkimuksia. (Davis-Richardson ym. 2014) Toinen mielenkiintoinen suolistomikrobistoon liittyvä havainto liittyy siihen, kun verrattiin *Bacteroides dorei* ja suolistomikrobistossa yleisesti esiintyvän *Escherichia coli* -bakteerin lipopolysakkaridien kykyä stimuloida immuunijärjestelmää. Kokeessa NOD-hiirille injektoidiin *in vivo* joko *E. coli* tai *B. dorein* LPS-molekyylejä. Todettiin, että *E. coli* LPS-molekyylejä saaneilla hiirillä saatiin esiin endotoksiinitoleranssia ja sen lisäksi näiden hiirien insidenssi diabetekselle laski. (Vatanen ym. 2016) Nämä molemmat tutkimustulokset ovat mielenkiintoisia esimerkkejä siitä, kuinka immunitettiin vaikuttavat tekijät voivat mahdollisesti vaikuttaa T1D:n kehittymiseen.

Ravintoon liittyen on tutkittu muun muassa imetyksen, lehmänmaidon, kiinteiden ruokien, viljojen, D-vitamiinin ja monityydyttymättömien rasvahappojen osuutta T1D:n kehitykseen.

On ajateltu, että imettäminen saattaisi suojata T1D:n kehittymiseltä. Tutkimuksissa ei kuitenkaan olla pystytty osoittamaan tätä väitettä oikeaksi. Lehmänmaidon proteiinien on taas ajateltu lisäävän riskiä T1D:n kehittymiseen. Tätäkään väitettä ei monien tutkimusten jälkeen olla kyetty osoittamaan varmuudella todeksi. (Knip ja Simell 2012) Lehmänmaidon lisäksi gluteenin on arveltu lisäävän riskiä T1D:n kehittymiseen. Tutkimuksissa on päädytty samaan tulokseen kuin lehmänmaidon kanssa, eli varmaa yhteyttä gluteenin ja T1D:n välille ei olla kyetty osoittamaan. Esimerkiksi DIPP-tutkimuksessa tätä yhteyttä ei löytynyt, mutta sen sijaan juuresten löydettiin lisäävän riskiä saarekeautoimmunitetille alle 4 kuukauden ikäisillä (Virtanen ym. 2011). D-vitamiinin ja monityydyttymättömien rasvahappojen on ajateltu imetyksen tavoin vähentävän riskiä sairastua T1D:een. Asiaa on kuitenkin tutkittu, eikä kummankaan kohdalla ole saatu vakuuttavaa näyttöä riskin vähenemisestä. (Rewers ja Ludvigsson 2016)

3.5. Diagnostiikka ja hoito

Tyypin 1 diagnosoinnissa oleellista on veren glukoosipitoisuuden mittaaminen. Diagnostisena rajana pidetään yli 7 mmol/l paastoarvoa tai muutoin, esimerkiksi sokerirasituksen jälkeen, vähintään arvoa 11,1 mmol/l. Myös glykoitunutta hemoglobiinia (Hb_{1c}) käytetään diagnostiikassa, sillä se kertoo glukoositasosta pitkällä aikavälillä. Diagnostisena rajana aikuisilla pidetään arvoa 48 mmol/mol. Lapsipotilailla diagnosoiminen vaatii aina hyperglykemian osoittamisen.

Koska rajat ovat samat myös tyypin 2 diabetekselle, voi erotusdiagnostiikka näiden kahden taudin välillä olla joskus vaikeaa. Diagnostiikkaa helpottaa tieto, että T1D puhkeaa tyypillisesti lapsena tai nuorena. Toisaalta tautia diagnosoidaan aikuisillakin ja arviolta puolet T1D:ta sairastavista diagnosoidaan vasta aikuisiässä. Tämän takia on kehitetty uusia tautiluokituksia, kuten LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults).

Tyypin 1 diabeteksen hoito perustuu ihonalaisesti annosteltavaan insuliiniin, koska sairaan henkilön haima ei itse kykene riittävässä määrin tuottamaan insuliinia. Käytössä on tyypillisesti pitkävaikutteinen insuliini, joka vaikuttaa öisin ja aterioiden välissä. Pitkävaikutteista insuliinia pistetään käytettävän valmisteeseen mukaan 1-2 kertaa päivässä. Annosmäärä säädetään verestä mitattujen paastosokeriarvojen perusteella. Aterioiden yhteydessä käytetään nopeavaikutteista insuliinia eli niin sanottua ateriainsuliinia. Pistettävä insuliinimäärä lasketaan ruoan sisältämän hiilihydraattimäärän mukaan. Insuliini annostellaan joko pistoksin tai taudin hoitoon kehitetyllä insuliinipumpulla ihonalaisrasvaan. (Atkinson ym. 2014; Insuliininpuutosdiabetes, Käypä hoito -suositus, 2020)

4. DIPP-tutkimus

4.1. Yleistä

DIPP-tutkimus on suomalainen tyypin 1 diabeteksen ennustamista ja ehkäisyä tutkiva projekti. Siihen osallistuvat Turun, Tampereen sekä Oulun yliopistolliset keskussairaalat. Tutkimus on ollut toiminnassa vuodesta 1994 lähtien eli nyt jo neljännesvuosisadan ajan. Tutkimukseen on tähän mennessä osallistunut yli 20000 kohonneen sairastumisriskin lasta, joista yli 500:lla on todettu diabetes. DIPP-tutkimus onkin laajuudeltaan ja kestoaltaan yksi merkittävimmistä tyypin 1 diabeteksen ennustamista ja ehkäisyä selvittävistä tutkimuksista.

Tutkimuksessa pyritään vanhempien suostumuksella rekrytoimaan mukaan vastasyntyneitä, joilla todetaan kohonneeseen T1D:n riskiin liittyviä HLA-genotyypppejä. Näistä pitkäaikaiseen seurantaan valitaan vastasyntyneitä, joilla todetaan tiettyjä *HLA-DQB1* -haplotyypppejä. Vastasyntyneiden näytteet otetaan napaverinäytteestä synnytyksen yhteydessä.

Seurannassa diabetekseen liittyviä autovasta-aineita mitataan perifeerisestä verinäytteestä. Mitattavat autovasta-aineet ovat *ICA*, *GADA*, *IAA*, *IA2A* ja *ZnT8*. Seurattavilta lapsilta mitataan veren vasta-ainemääriä kolmen kuukauden välein kahden vuoden ikään saakka ja siitä lähtien kuuden kuukauden tai kolmen vuoden välein 15 vuoden ikään saakka. Mikäli vasta-aineita löytyy, käynnit tapahtuvat jatkossa kolmen kuukauden välein.

4.2. DIPP-PAMP -tutkimus

PAMP-tutkimus on DIPP-tutkimuksen osatutkimus, jossa pyritään selvittämään synnynnäisen immunitetin osuutta tyypin 1 diabeteksen synnyssä. Kyseessä on tapaus-kontrolli -tutkimus. Tutkimuksessa arvioidaan tiettyjen infektiotekijöiden vaikutusta T1D:n kehittymiseen sairastumisriskin omaavilla henkilöillä sairauden eri vaiheissa. Tarkoituksena on löytää uusia markkereita, joita voitaisiin tulevaisuudessa hyödyntää arvioitaessa riskiä sairastua T1D:een. Lisäksi tutkitaan mitkä tietyt synnynnäisen immunitetin tekijät voisivat selittää esidiabeteksen syntyä ja kehittymistä kliiniseksi T1D:ksi sekä tapoja ehkäistä tämä kehitys. Tutkimuksessa keskitytään tollin kaltaisten reseptorien signalointireittien tutkimiseen ja näiden reittien aktivaation vaikutukseen T1D:n synnyssä.

Tutkimus käynnistyi vuonna 2009 Turussa. Tutkimukseen rekrytoitiin vuosina 2010-2014 355 lasta, jotka ovat osallistuneet DIPP-tutkimukseen. Tutkimukseen osallistuvilta lapsilta otetaan laskimoverinäytteitä 3-12 kuukauden välein ja näytteistä erotellaan makrofagit. Makrofageja stimuloidaan tietyillä PAMP-rakenteilla, jotta voidaan selvittää erilaisten synnynnäiseen immunitettiin liittyvien signalointireittien aktivoitumista. Tutkimuksessa keskitytään TLR-signaaloinnin tutkimiseen ja PAMP-rakenteiden aiheuttaman inflammatorisen vasteen tutkimiseen. Inflammatorista vastetta tutkitaan mittaamalla solujen transkription muutoksia, epigeneettisiä vaikutuksia ja sytokiini tuotantoa. Makrofagien toiminnan tutkimiseksi analysoidaan myös autofagiaprosessia.

Tutkimuksessa käytettävät PAMP-rakenteet:

PAMP	Konsentraatio	Aktiivinen TLR/reitti
Pam3CSK4	1 µg/ml	TLR1/2
Poly(I:C)	30 µg/ml	TLR3
Poly(I:C) transfected	30 µg/ml	RIG-I/MDA-5
LPS <i>E.coli</i>	100 ng/ml	TLR4
Flagellin <i>S. typhimurium</i>	1 µg/ml	TLR5
Zymosan	10 µg/ml	TLR6/TLR2
Imiquimod	1 µg/ml	TLR7
ssRNA40	1 µg/ml	TLR8
CpG DNA	10 µg/ml	TLR9

Tutkimukseen osallistuvat lapset on jaettu neljään eri ryhmään seuraavalla tavalla:

Geneettisen riskin ryhmä 1. Lapset, joilla on geneettinen riski kehittää T1D ja joilla on todettu vähintään 2 autovasta-ainetta viimeisimmässä näytteessä.

Geneettisen riskin ryhmä 2. Lapset, joilla on toistuvasti todettu vähintään 2 autovasta-ainetta yli vuoden ajan, mutta jotka eivät ole kehittäneet T1D:ta.

T1D-ryhmä. Lapset, joilla on aiemmin todettu useita autovasta-aineita, ja jotka ovat viimeisen vuoden sisällä kehittäneet kliinisen T1D:n.

Kontrolliryhmä.

- i. Lapset, joilla on geneettinen riski T1D:een, mutta jotka ovat toistuvasti autovasta-ainenegatiivisia.
- ii. Terveet lapset, joilla ei ole riskiä T1D:een.

Geneettisen riskin ryhmistä käytetään lyhennettä AB+ eli vasta-ainepositiivinen ryhmä (autoantibody positive). Kontrolliryhmästä käytetään vastaavasti lyhennettä AB- eli vasta-ainenegatiivinen ryhmä (autoantibody negative). Jokaista AB+ -ryhmän tutkittavaa kohtaan on valittu kaksi kontrollitutkittavaa AB- -ryhmästä, jotka vastaavat tutkittavaa iän, sukupuolen ja HLA:n osalta. Kaiken kaikkiaan T1D-ryhmässä tutkittavia on 68, AB+ -ryhmässä 60 ja AB- -ryhmässä 227, yhteensä siis 355.

Tutkimus on merkittävä ja sillä on monia etuja muihin vastaaviin tutkimuksiin verrattuna. Tutkimuksessa käytetään spesifejä bakteri- ja virusrakenteita immuunipuolustuksen selektiiviseksi aktivoimiseksi kokonaisten mikro-organismien sijaan. Toisena etuna voidaan mainita se, että tutkimuksessa käytetään TLR-ligandipaneelia, joka kattaa kaikki TLR1-9 -reaktiotiet solujen stimuloimiseksi. Tämä mahdollistaa saman kohortin käyttämistä immuunisignaalintireittien perusteellista tutkimista varten. Näin ollen signaalintireittien vaikutusta T1D:n kehitykseen kyetään arvioimaan tarkemmin. Koska PAMP-tutkimus on niin sanottu ”high through put”-menetelmällä toteutettu, ovat näiden tutkimusten tulokset tilastollisesti vahvoja. Jotta tähän lopputulokseen päästään, täytyy näytteiden määrä olla riittävän suuri.

4.3. Laboratoriotyöskentely

Työskentelin noin kahden kuukauden ajan laboratoriossa kesällä 2017. Tehtäväni oli PAMP-tutkimukseen osallistuvien verinäytteiden käsittely, toisin sanoen kohorttinäytteiden kerääminen. Käsiteltävät näytteet oli otettu joko saman päivän aikana kuin näytteiden käsittely laboratoriossa aloitettiin tai edeltävänä päivänä. Seuraavassa kuvaan näiden näytteiden käsittely niiltä osin, kun itse osallistuin niiden käsittelemiseen.

Tutkittavien verinäytteistä eristetään monosyytit ja erilaistetaan ne makrofageiksi. Eristämiseen käytetään Ficoll-plus -menetelmää (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Ruotsi). Erilaistamisen jälkeen makrofageja stimuloidaan erilaisilla PAMP-reagensseilla 4:n ja 24:n tunnin ajan.

Monosyyttien eristäminen aloitetaan sentrifugoimalla hepariiniveriputkia (2 kpl) 10 min 1800 rpm ilman jarrua. Erottunut plasma otetaan talteen 1,8 ml nestetyyppiampulleihin (2 ampullia/näyte) ja säilötään pakastimeen. Punasolujen päälle lisätään Versene-1x-PBS -liuosta 1:1, käytännössä noin 5 ml. Putkia käännellään muutama otteeseen sekoittamisen varmistamiseksi. Annostellaan valmiiksi noin 4 ml Ficoll-gradienttiliuosta 15 ml falcon-putkiin. Valutetaan valmistettu laimennos Ficoll-liuoksen päälle, noin 4 ml kumpaankin putkeen. Sentrifugoidaan putkia 30 minuuttia 1400-1500 rpm ilman jarrua, lämpötila 18-20 °C. Sentrifugoinnin jälkeen kerätään lymfosyytit Ficoll-liuoksen päältä pasteur-pipetillä 15 ml Falcon (sarsted)-putkeen, jossa on valmiin 8 ml steriiliä PBS-versene -liuosta. Sentrifugoidaan jälleen, 10 minuuttia 1400-1500 rpm jarrulla (1. pesu). Tämän jälkeen kaadetaan PBS-liuos pois. Suspensoidaan putken pohjalla oleva solunappi tasaiseksi 12 ml:ssa PBS-liuosta, ei tarvitse olla PBS-versene -liuosta. Sentrifugoidaan 10 minuuttia 1400-1500 rpm jarrulla (2. pesu). Kaadetaan PBS-liuos pois ja suoritetaan 3. pesu kuten 2. pesu. Kaadetaan PBS-liuos pois ja suspensoidaan solut 3 ml:aan magrophage-SFM (+pen. strept.) -mediumiin (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

Suoritetaan solulaskenta 10 µl solususpensionäytteestä. Näyte sekoitetaan 90 µl:aan tryptan blue -väriä. Pipetoidaan noin 10 µl värjättyä solususpensiota Bürkerin laskukammioon. Lasketaan solut kahdesta A-ruudusta ja lasketaan näiden keskiarvo.

Kun on saatu selville solujen määrä, lasketaan mihin tilavuuteen sentrifugista tullut solunappi halutaan suspensoida. Yhteen 24-kuoppalevyn kuoppaan halutaan noin 1,5 miljoonaa monosyyttia ja kuoppaan käytettävä tilavuus on 0,5 ml. Solut suspensoidaan magrophage-SFM -mediumiin, johon on lisätty penisilliiniä 0,6 µl/ml ja streptomysiiniä 60 µl/ml. Laitetaan solususpensiota kuoppalevyn kuoppiin 0,5 ml/kuoppa ja asetetaan kuoppalevy 45-60 minuutin ajaksi 37 °C lämpökaappiin. Tämän jälkeen poistetaan nonadherentit solut autoklavoidulla pasteur-pipetillä, joka on huuhdottu 70% etanolilla. Pestään kuopat kolmesti PBS-liuoksella noin 1-1,5 ml/pesu. Lisätään kuoppiin 0,5 ml/kuoppa macrophage-SFM -mediumia, johon on lisätty 10 mg/ml GM-CSF, penisilliiniä 0,6 µl/ml ja streptomysiiniä 60 µl/ml. Kasvatetaan adherentteja soluja 6-7 päivää edellä mainitussa mediumissa, medium vaihdetaan joka toinen päivä. Tuore medium vaihdetaan päivä ennen stimulaatioita ja samana päivänä ennen stimulaatioita. Ennen stimulaatioiden suorittamista annetaan solujen tasaantua 2-3 tunnin ajan.

Stimulaatioissa käytettävät aineet on asetettu järjestykseen prioriteetin mukaan seuraavasti (suluissa mikä ligandi kyseessä):

1. Nolla
2. ODN2216 (CpG DNA) 4h (TLR9)

3. ODN2216 (CpG DNA) 24h (TLR9)
4. Flagellin 4h (TLR5)
5. Flagellin 24h (TLR5)
6. Poly I:C 4h (TLR3)
7. Poly I:C 24h (TLR3)
8. IMQ 4h (TLR7)
9. IMQ 24h (TLR7)
10. PAM3CSK4 4h (TLR2)
11. PAM3CSK4 24h (TLR2)
12. Zymosan 4h (TLR2)
13. Zymosan 24h (TLR2)
14. LPS 4h (TLR4)
15. LPS 24h (TLR4)
16. ORN02 4h (TLR8)
17. ORN02 24 h (TLR8)

Stimulanttien lisäämisen jälkeen kuoppalevy viedään lämpökaappiin. Näytteet kerätään talteen 4:n ja 24:n tunnin kohdalla ja säilötään pakastimeen myöhempää analysointia varten.

5. Pohdintaa

Tyypin 1 diabeteksen hoito ja seuranta kehittyvät jatkuvasti. Hoidossa käytetään kerran tai kaksi kertaa päivässä pistettävää perusinsuliinia sekä aterioiden yhteydessä pistettävää ateriainsuliinia. Seurannan osalta on määritelty tietyin väliajoin seurattavat seikat, esimerkiksi pitkäaikaisverensokeri HbA1c sekä silmänpohjakuvaukset. Tarvittaessa veren glukoosipitoisuuden seurannassa voidaan käyttää myös sensoreja, jotka automaattisesti mittaavat potilaan kudossokeripitoisuutta.

T1D:n kannalta ongelmaksi kuitenkin muodostuu tautiin sairastumisen ehkäiseminen. Nykyään lääketieteessä ehkäisevän toiminnan tärkeyttä korostetaan. Jos taudin riskitekijöistä tai laukaisevista tekijöistä ei ole riittävästi tietoa, on taudin ehkäiseminen ymmärrettävästi hankalaa. Tämä pitää paikkansa T1D:n kohdalla. Asiaa kuitenkin tutkitaan ahkerasti ja yhtenä merkittävänä tutkimuksena tällä alalla on DIPP-tutkimus, joka on kestoltaan ja laajuudeltaan maailman suurin. DIPP-PAMP - tutkimus taas muodostaa ainutlaatuisen tutkimusaineiston synnynnäisen immunitetin osuuden tutkimista ja selvittämistä varten. PAMP-tutkimuksesta mielenkiintoisen tekee se, että tutkimuksen avulla saadaan selville mitkä makrofagisolujen geenit aktivoituvat lapsilla, jotka joko sairastuvat tai eivät sairastu T1D:een. Geenitutkimuksen lisäksi myös jo edellä mainittu signaalointireittien tutkiminen on olennainen osa PAMP-tutkimusta. Tavoitteena on löytää T1D:n kehittymiseen liittyviä signaalointireittejä. Tällaisten signaalointireittien löytäminen avaisi mahdollisuuden etsiä vaikutuskohteita kyseisistä signaalointireiteistä. Siten voitaisiin toivottavasti vaikuttaa myös T1D:n kehittymiseen.

Tutkimuksen jatkuessa on tulevaisuuden toiveissa löytää T1D:een sairastumiseen liittyviä tekijöitä, joihin kyetään vaikuttamaan. Toiveissa on, että tällaisiin tekijöihin vaikuttamalla voisi merkittävästi

laskea sairastuvuutta T1D:een. On hyvinkin mahdollista, että tulevaisuudessa on esimerkiksi kehitetty rokote, joka pienentää riskiä sairastua T1D:een.

Lähteet

- Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, Winkler C, Pflüger M, Illig T, Bonifacio E ja Ziegler AG. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes. *Diabetologia* 2009;52:1881-1888
- Akira S ja Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;7:499-511
- Akira S, Uematsu S ja Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783–801.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS ja Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014;383:69-82
- Bonilla FA ja Oettegen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:33-40
- Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:3-23
- Cromheecke JL, Nguyen KT, Huston DP. Emerging role of human basophil biology in health and disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14:408
- Davis-Richardson AG, Ardisson AN, Dias R, Simell V, Leonard MT, Kemppainen KM, Drew JC, Schatz D, Atkinson MA, Kolaczowski B, Ilonen J, Knip M, Toppari J, Nurminen N, Hyöty H, Veijola R, Simell T, Mykkänen J, Simell O ja Triplett EW. *Bacteroides dorei* dominates gut microbiome prior to autoimmunity in Finnish children at high risk for type 1 diabetes. *Front Microbiol* 2014;5:1-11
- Della Chiesa M, Marcenaro E, Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A. Human NK cell response to pathogens. *Semin Immunol* 2014;26:152-160
- Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC ja Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:578–583
- Gale EA. Type 1 diabetes in the young: the harvest of sorrow goes on. *Diabetologia* 2005;48:1435–1438
- Gülden E, Wong FS ja Wen L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol* 2015;159:143-153
- Hakkarainen P, Sund R, Arffman M, Koski S, Hänninen V, Moilanen L ja Räsänen K. Working people with type 1 diabetes in the Finnish population. *BMC Public Health* 2017;17:805
- Harjutsalo V, Sund R, Knip M ja Groop PH. Incidence of type 1 diabetes in Finland. *JAMA* 2013;310:427-428
- Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11:137-154
- Immunologia*. Duodecim. 2011

- Insuliinipuutosdiabetes. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Sisätautilääkäreiden yhdistyksen ja Diabetesliiton Lääkärineuvoston asettama työryhmä. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, Helsinki. 2020. www.kaypahoito.fi Viitattu 8.10.2020
- Kaisho, T. ja Akira, S. Toll-like receptor function and signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006;117:979-987
- Kimpimäki T, Kulmala P, Savola K, Kupila A, Korhonen S, Simell T, Ilonen J, Simell O ja Knip M. Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4572–9.
- Knip M ja Simell O. Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2 a007690
- Koenderman L, Buurman W ja Daha MR. The innate immune response. *Immunology Letters* 2014;162:95–102
- Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol* 2013;120:163-184
- Mathern DR ja Heeger PS. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:1636-1650
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006;6:173-82
- Pino SC, Kruger AJ ja Bortell R. The Role of Innate Immune Pathways in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:126–130
- Pociot F ja Lernmark Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet* 2016;387:2331-2339
- Rewers M ja Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet* 2016;387:2340-2348
- Schlosser M, Mueller PW, Törn C, Bonifacio E, Bingley PJ ja Participating Laboratories. Diabetes antibody standardization program: evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia* 2010;53:2611–20
- Siljander H ja Knip M. Autovasta-aineet tyypin 1 diabeteksessa. *Lääkärilehti* 2011;66:3745-3750
- Siljander HT, Simell S, Hekkala A, Lähde J, Simell T, Vähäsalo P, Veijola R, Ilonen J, Simell O ja Knip M. Predictive characteristics of diabetes-associated autoantibodies among children with HLAconferred disease susceptibility in the general population. *Diabetes* 2009;58:2835–42
- Szablewski L. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Int Immunopharmacol* 2014;22:182-191
- Surh CD ja Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 2014;26:152-160
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14

Tauriainen S, Oikarinen S, Oikarinen M ja Hyöty H. Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Semin Immunopathol* 2011;33:45-55

Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W ja Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a noninsulindependent onset of disease. *Diabetes* 1993;42:359-62

Vatanen T, Franzosa EA, Schwager R, Tripathi S, Arthur TD, Vehik K, Lernmark Å, Hagopian WA, Rewers MJ, She JX, Toppari J, Ziegler AG, Akolkar B, Krischer JP, Stewart CJ, Ajami NJ, Petrosino JF, Gevers D, Lähdesmäki H, Vlamakis H, Huttenhower C ja Xavier RJ. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature* 2018;562:589-594

Vatanen T, Kostic AD, d’Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, Yassour M, Kolde R, Vlamakis H, Arthur TD, Hämäläinen AM, Peet A, Tillmann V, Uibo R, Mokurov S, Dorshakova N, Ilonen J, Virtanen SM, Szabo SJ, Porter JA, Lähdesmäki H, Huttenhower C, Gevers D, Cullen TW, Knip M ja Xavier RJ. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell* 2016;165:842-853.

Wong FS, Hu C, Zhang L, Du W, Alexopoulou L, Flavell RA ja Wen L. The role of Toll-like receptors 3 and 9 in the development of autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunology of Diabetes V: Ann. N.Y. Acad. Sc* 2008;1150:146-148

Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K ja Eisenbarth GS. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1701-6