

Jacqueline D. Trudeau, Jan P. Dutz, Edith Arany, David J. Hill, Warren E. Fieldus, Diana T. Finegood

# Perspektywy w leczeniu cukrzycy Apoptoza komórek $\beta$ u noworodków Mechanizm wyzwalający chorobę autoimmunologiczną

Perspectives in Diabetes. Neonatal  $\beta$ -Cell Apoptosis. A Trigger for Autoimmune Diabetes?

U noworodków szczurów komórki  $\beta$  przechodzą fazę przebudowy (*remodeling*), w trakcie której obserwuje się fale apoptozy. Stosując łącznie model matematyczny oraz metody histochemiczne, wykazaliśmy, że apoptoza komórek  $\beta$  jest znacznie większa u noworodków niż u osobników dorosłych, osiągając szczyt około 2 tygodnia życia. Inne tkanki, włącznie z nerkami i tkanka nerwowa, również wykazują nasilenie apoptozy, co sugeruje, że jest to normalne zjawisko w procesie rozwoju. Wykazaliśmy, że nasilona apoptoza komórek  $\beta$  u noworodków jest również obecna w modelu zwierzęcym cukrzycy autoimmunologicznej i dotyczy szczurów rasy BB oraz myszy rasy NOD. Zwykle uważa się, że proces apoptozy nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej. Jednak ostatnie badania wskazują, że komórki ulegające apoptozie mogą: 1) prezentować antygeny autoreaktywne w pecherzykach powierzchniowych; 2) preferencyjnie aktywować komórki dendrytyczne i w ten sposób pobudzać rozwój specyficznych tkankowo limfocytów T; 3) indukować tworzenie autoprzeciwciał. Wyniki te wskazują, że w pewnych sytuacjach fizjologicznych apoptoza może rzeczywiście aktywować proces autoimmunologiczny. Zapoczątkowanie procesu autoimmunologicznego u myszy występuje zawsze około 15 dnia życia, nawet jeżeli proces rozwoju cukrzycy jest znacznie przyspieszony. Mając na uwadze wszystkie powyższe prze-

slanki, wysunęliśmy hipotezę, że nasilenie apoptozy u noworodków może być czynnikiem wyzwalającym proces autoimmunologiczny przeciwko komórkom  $\beta$ .

Apoptoza, określaną również jako programowana śmierć komórek, jest normalnym procesem odpowiadającym za przebudowę tkanek we wczesnym okresie rozwojowym oraz u osób dorosłych. W okresie rozwoju jest ona związana z różnorodnymi procesami, takimi jak: negatywna selekcja komórek grasicy, usuwanie struktur obecnych wyłącznie w okresie płodowym oraz kształtowanie różnych części ciała [1]. Ponadto apoptoza jest odpowiedzialna za homeostazę tkanek i eliminację nieczynnych, zbędnych lub szkodliwych komórek. U dorosłych szybkość proliferacji jest szacowana na 100 000 komórek na sekundę, apoptoza jest mechanizmem przeciwdziałającym nadmiernemu przerostowi tkanek [2]. Jest ona również odpowiedzialna za śmierć komórek poddanych takiemu stresowi komórkowemu, jak infekcja wirusowa lub narazenie na substancje toksyczne, może także uczestniczyć w rozwoju chorób degeneracyjnych [3].

Udział apoptozy w homeostazie tkanek jest zwykle niedoceniany, ponieważ nawet przy dużym nasileniu procesu jest on „histologicznie niewidoczny” [4]. Mimo że komórki ulegające apoptozie mają odmienną morfologię, ich szybkie usuwanie powoduje, że w danym momencie jedynie niewielka ich liczba może być sklasyfikowana jako apoptotyczne [1]. Ocenia się, że w rozwijającej się grasicy szczura około 97% komórek ulega apoptozie. Jednak w czasie badania histologicznego tylko 0,2% komórek

Przedrukowano za zgodą z: *Diabetes*; 2000; 49: 1-7

Copyright © 1998 by American Diabetes Association, Inc.

American Diabetes Association nie odpowiada za poprawność tłumaczenia z języka angielskiego

Diabetologia Praktyczna 2000, tom 1, nr 1, 55-64

Tłumaczenie: lek. med. Anna Korzon-Burakowska

Wydanie polskie: Via Medica

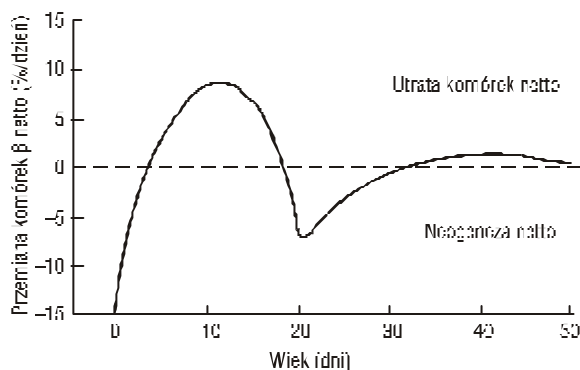
w danym momencie ma cechy apoptozy, co sugeruje, że szybkość ich usuwania mierzona jest w minutach [4]. Nawet w nerkach, gdzie odsetek komórek płodowych obumierających w mechanizmie apoptozy wynosi 50%, a szybkość ich usuwania jest szacowana na 1–2 h, nie więcej niż 3% spośród nich posiada typową morfologię komórek obumarłych w tym mechanizmie [4]. Ponieważ apoptoza jest trudna do wykrycia, jej wpływ na przebudowę tkanek płodowych wykazano tylko w kilku tkankach. Nasilenie apoptozy u noworodków stwierdzono także w tkance nerwowej [6–8], w nerkach [4], w kardiomiocytach i w tetnicach [9, 10], w męskich komórkach rozrodczych [1] i w korze nadnerczy [12].

W 1995 roku Finegood i wsp. [13], korzystając z modelu matematycznego opisującego dynamikę masy komórek  $\beta$ , badali nasilenie apoptozy komórek  $\beta$  trzustki u noworodków szczurów. Szybkość przyrostu masy komórek  $\beta$  jest zależna od szybkości tworzenia nowych komórek oraz od szybkości utraty innych. Nowe komórki są tworzone poprzez replikację obecnych komórek  $\beta$  lub różnicowanie komórek prekursorowych, co jest określane jako neogeneza. Utrata komórek zachodzi w procesie apoptozy lub martwicy, za które odpowiada silny stres mikrosrodowiska komórkowego [14]. Aby zrozumieć, w jaki sposób powiązane są ze sobą replikacja, neogeneza, śmierć komórki i przyrost masy komórek  $\beta$ , stworzyliśmy model przekształcen komórek  $\beta$  w równaniu równowagi masy:

$$\text{REP} + \text{NEO} - \text{UTRATA} = d(\text{liczba komórek } \beta)/dt$$

W równaniu tym REP oznacza szybkość replikacji komórek  $\beta$ , NEO — szybkość neogenezy komórek  $\beta$ , UTRATA — szybkość obumierania komórek  $\beta$  (liczba komórek  $\beta$ )/dt — szybkość zmiany liczby komórek  $\beta$  oceniana na podstawie masy komórek  $\beta$  oraz przeciętnej zmiany wielkości komórek  $\beta$  w czasie [13].

U szczurów rasy Sprague-Dawley masa komórek  $\beta$  przyrasta prawie liniowo do około 100 dnia życia, za wyjątkiem okresu *plateau* wzrostu 5–20 dnia życia [13]. Replikacja komórek  $\beta$  w chwili urodzenia dotyczy około 10% komórek i spada wykładniczo do 2–3% dziennie u dorosłych szczurów. Po podstawieniu powyższych danych do równania, oceniliśmy, że za *plateau* wzrostu komórek  $\beta$  w 12 dobie życia odpowiedzialne jest nasilenie ich obumierania z maksymalną szybkością 9% dziennie (ryc. 1). Ponieważ szybkość neogenezy jest nieznaną, ten szacunek dotyczy utraty komórek „netto” (UTRATA – NEO), a zatem bezwzględna szybkość utraty komórek (UTRATA) może być wyższa.



**Rycina 1.** Przewidywanie utraty komórek netto oraz neogenezy netto u zdrowych szczurów rasy Sprague-Dawley [13]. Na osi Y oznaczono „przemiany komórek  $\beta$  netto”, co odpowiada różnicy szybkości neogenezy i szybkości utraty komórek. Wartości dodatnie wskazują, że całkowita szybkość utraty komórek jest wyższa niż tworzenie nowych komórek w procesie neogenezy. Przyrost masy komórek  $\beta$  jest zależny od przemian komórek  $\beta$  netto razem z szybkością replikacji komórek  $\beta$  (nie uwzględniono)

Dane szacunkowe uzyskane w modelu matematycznym potwierdzono dzięki przeprowadzeniu bezpośrednich badań histochemicznych, pozwalających wykryć komórki apoptotyczne. Zastosowano barwienie jodkiem propidyny, co pozwala na ocenę morfologiczną zjawiska apoptozy i stwierdzono nasilenie tego zjawiska w komórkach  $\beta$  u noworodków szczurów rasy Sprague-Dawley w porównaniu z osobnikami dorosłymi [15]. Wskaznik apoptozy osiągał szczyt w 13 dobie życia ( $3,5 \pm 0,4\%$ ), pokrywając się z *plateau* wzrostu masy komórek  $\beta$  oraz z maksymalnym nasileniem utraty komórek przewidywanym na podstawie naszego modelu. Odsetek komórek ulegających apoptozie był podwyższony u wszystkich noworodków (np.  $1,5 \pm 0,2\%$  w 2 dobie życia) w porównaniu z dorosłymi szczurami ( $0,4 \pm 0,1\%$  w 3 miesiącu życia). Petrick i wsp. [16], w oddzielnym badaniu przeprowadzonym u szczurów rasy Wistar, wykazali nasilenie apoptozy w komórkach wyspowych noworodków za pomocą metody znakowania naciego końca (NICK-END) dUTP (TUNEL). Szczyt zjawiska apoptozy przypadł na 14 dobie życia ( $13,2 \pm 3,4\%$ ) w porównaniu z  $5,9 \pm 1,2$  i  $0,2 \pm 0,1\%$  odpowiednio u szczurów 4-dniowych oraz dorosłych osobników. Powyższe wskaźniki histologiczne zjawiska apoptozy są jakościowym potwierdzeniem założeń teoretycznych nasilenia apoptozy komórek  $\beta$  na podstawie modelu matematycznego. Nie można jednak ocenić ilościowo częstości, z jaką apoptoza występuje w komórkach  $\beta$ , ponieważ nie znamy szybkości usuwania komórek, które uległy apoptozie. Nie wiemy również, z jakiego powodu wyniki otrzymywane w kolejnych badaniach

różnia się między sobą. Może to wynikać z niejednakowej szybkości usuwania komórek apoptotycznych zabarwionych jodkiem propidyny lub barwieniem TUNEL, a także nieznanym czasem, w jakim zabarwione komórki są widoczne. Podsumowując, wszystkie badania potwierdzają nasilenie apoptozy komórek  $\beta$  u noworodków, które występuje około 12–14 doby życia. Podobnie jak w innych tkankach, nie jest łatwo ocenić nasilenie utraty komórek  $\beta$ . Niemniej jednak, bardzo znaczne nasilenie tego procesu musi nastąpić przed momentem odstawienia od piersi, kiedy komórki  $\beta$  proliferują, a ich łączna masa się zwiększa. Na podstawie naszego modelu przewidujemy, że około 60% obecnych przy porodzie komórek  $\beta$  obumiera w fazie przebudowy. Szybkość usuwania komórek, które uległy apoptozie ogranicza możliwości potwierdzenia na podstawie oceny morfologicznej, kiedy to nasilenie ma miejsce. Pomimo tego wiadomo, że apoptoza nasila się 2-krotnie pomiędzy 1 a 2 tygodniem życia.

Czynnościowe znaczenie obecności fazy przebudowy w okresie noworodkowym jest nieznaną. W odniesieniu do innych układów, jak na przykład: meskie komórki rozrodcze, komórki mięśnia sercowego czy komórki kory nadnerczy, podobna fala apoptozy towarzysząca procesowi przebudowy tkanek, odpowiada zmieniającej się funkcji komórek jako reakcja na zmienione zapotrzebowanie [9, 11, 12]. W trzustce fala apoptozy występuje bezpośrednio przed odstawieniem od piersi i może przygotowywać komórki  $\beta$  do zmiany ich funkcji wraz ze zwiększeniem wymagań.

### Czy duże nasilenie zjawiska apoptozy komórek $\beta$ u noworodków wpływa na inne procesy oprócz przebudowy tkanki?

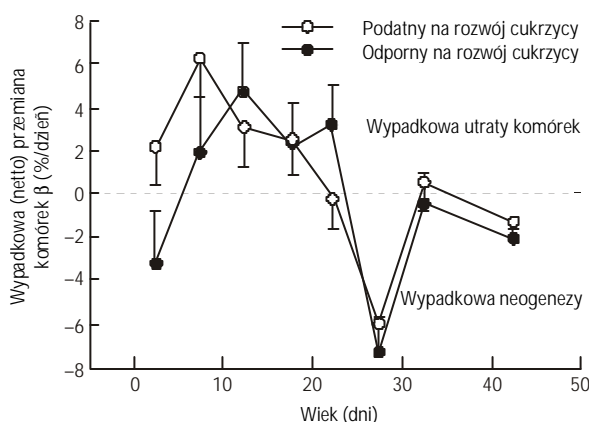
Napływ komórek immunologicznych do wysp Langerhansa występuje do 15. doby życia myszy NOD oraz myszy NOD transgenicznych, u których stwierdzono przyspieszony rozwój cukrzycy autoimmunologicznej [17–20]. Zwiększenie napływu komórek autoimmunologicznych jest zgodne w czasie z nasileniem zjawiska apoptozy u zdrowych szczurów. Dotychczas apoptozę uważano za proces niezapalny, jednak w wielu badaniach wskazano na możliwość powiązania procesu immunologicznego z apoptozą. W niniejszym artykule stawiamy hipotezę, że fala apoptozy u noworodków może wyzwalac proces autoimmunologiczny skierowany przeciwko komórkom  $\beta$ . Duże nasilenie tego zjawiska stanowi źródło antygenów i umożliwia ich prezentację dla układu od-

pornosciowego, co u osób genetycznie wrażliwych wyzwała powstawanie limfocytów T skierowanych przeciwko komórkom  $\beta$ .

### Czy u zwierząt fala apoptozy w okresie noworodkowym towarzyszy autoimmunologicznej cukrzycy eksperymentalnej?

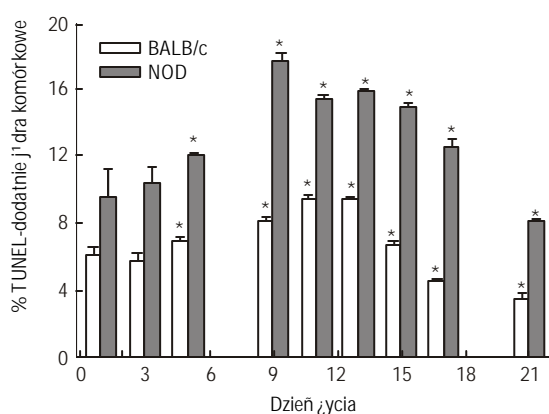
Aby ustalić, w jaki sposób nasilona apoptoza komórek  $\beta$  noworodków może przyczynić się do rozwoju reakcji autoimmunologicznych, najpierw oceniliśmy dynamikę wymiany komórek  $\beta$  w okresie noworodkowym, badając zwierzęta eksperymentalne, u których spontanicznie rozwija się cukrzyca autoimmunologiczna: szczury BB oraz myszy NOD. Cukrzyca autoimmunologiczna występuje u około 70–80% osobników narzonego szczepu BBdp, charakteryzując się silnym naciekaniem wysp trzustkowych przez komórki jednojądrzaste, co nazywane jest zapaleniem wysp, *insulitis* [21]. Wykorzystując nasz model, stwierdziliśmy nasilenie apoptozy u noworodków szczurów BB (ryc. 2) [22]. Fala nasilenia apoptozy przewidywana pomiędzy 5–25 dniem życia z podobnym nasileniem występuje zarówno u szczurów rasy BBdp, jak i u odpornej na rozwój cukrzycy odmiany BBdr.

Cukrzyca autoimmunologiczna rozwija się u 80–90% osobników zenskich myszy NOD i u 10–40%



**Rycina 2.** Wypadkowa obumierania komórek i wypadkowa neogenezy u młodych szczurów wrażliwych na cukrzycę (BBdp) i odpornych na cukrzycę (BBdr) karmionych mieszkanką BioBreeding. Wykres utworzono na podstawie masy komórek  $\beta$  oraz szybkości replikacji oszacowanej na podstawie modelu Finegooda i wsp. [13]. Nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy szczurami szczepu BBdp a BBdr niezależnie od wieku. Nie wykryto cech *insulitis* przed osiągnięciem 25 dnia życia, bardzo łagodny proces *peri-insulitis* u szczurów wrażliwych na rozwój cukrzycy stwierdzano pomiędzy 25 a 50 dniem życia

osobników męskich około 4–6 miesiąca życia. Nacieki jednojadrzastych komórek w obrębie wysp stają się widoczne około 5 tygodnia życia [23]. Wykorzystując metodę TUNEL, obserwowaliśmy (EA, DJH) nasilenie apoptozy komórek  $\beta$  ze zwiększeniem liczby komórek apoptotycznych, poczynając od 5 dnia życia zarówno u myszy NOD, jak i w kontrolnej grupie BALB/c (ryc. 3). Zwracał uwagę istotnie niższy wskaźnik apoptozy u myszy BALB/c w porównaniu ze wskaźnikiem apoptozy u myszy NOD w całym okresie noworodkowym, co sugeruje, że nasilenie apoptozy w tym modelu cukrzycy autoimmunologicznej jest większe. Obydwa badania potwierdzają obecność fali apoptozy komórek  $\beta$  u zwierząt, u których rozwija się cukrzyca autoimmunologiczna. Badając dwa bardzo różne gatunki gryzoni za pomocą dwóch różnych metod, wykazaliśmy nasilenie zjawiska apoptozy komórek  $\beta$ , które zmniejsza się mniej więcej w okresie odstawienia noworodków od pierśi. Na podstawie dokonanej analizy stwierdziliśmy, że u szczurów obu szczepów, BBdp i BBdr, nasilenie apoptozy było podobne. Odmienne zachowywał się wskaźnik apoptozy u myszy, był on zwiększony u osobników NOD podatnych na rozwój cukrzycy w porównaniu ze wskaźnikiem u zdrowych myszy BALB/c. Wyniki badań nie potwierdzają, czy rozwój cukrzycy autoimmunologicznej jest zależny od nasilenia apoptozy u różnych ras, czy też inaczej zachowują się szczury BB i myszy NOD.



**Rycina 3.** Apoptoza komórek  $\beta$  (% TUNEL-dodatnich jader komórkowych) jako funkcja wieku samic myszy NOD i BALB/c. Preparaty barwiono zestawem ApopTag do detekcji perdesydzazy w celu wykrycia apoptozy jader, a następnie hematoksyliną Carazziego. Komórki TUNEL-dodatnie i TUNEL-ujemne zliczano z 5 preparatów od każdego zwierzęcia ( $n = 5$ , wiek 1–17 dni,  $n = 3$ , wiek 21 dni). Stwierdzono różnice pomiędzy myszami BALB/c a NOD w każdym wieku ( $p < 0,001$ ). \* Różnica znamionowa statystycznie od 1 dnia życia ( $p < 0,001$ )

### Czy apoptoza odpowiada za wyzwalanie autoagresji?

Apoptoza dotychczas uznawana była za proces niezapalny. Kolejne jej etapy obejmują tworzenie pecherzyków z błony komórkowej, kurczenie się cytoplazmy, kondensację jądra komórkowego, fragmentację DNA i oddzielenie od otaczających komórek. Wiele tworzonych i połączonych z błoną komórkową ciałek apoptotycznych jest fagocytowanych przez sąsiednie komórki oraz przez wyspecjalizowane komórki fagocytujące bez uwalniania zawartości do otoczenia. Uważa się, że apoptoza nie indukuje reakcji immunologicznej [14]. Odmienne przebiega proces martwicy, zapoczątkowywany obrzękiem organelli komórkowych, który prowadzi do pęknięcia błony komórkowej i wypływu zawartości komórki [1].

Martwica jest zwykle związana z rozwojem miejscowego odczynu zapalnego z udziałem makrofagów, pobudzeniem i proliferacją limfocytów linii T i B, wydzielaniem cytokin wzmacniających proces zapalny.

Niedawno wykazano, że proces apoptozy może jednak indukować reakcję immunologiczną. Wspólna hodowla *in vitro* komórek apoptotycznych oraz dendrytycznych spowodowała prezentację antygenów oraz pobudzenie obu głównych zespołów odpowiedzi komórkowej (MHC) ograniczone do klasy I [Class I-restricted]  $CD8^+$  Limfocyty T [24, 25] i MHC ograniczone do klasy II  $CD4^+$  Limfocyty T [25, 26]. W innym badaniu, również makrofagi potrafiły zaprezentować antygen z komórek apoptotycznych i aktywować  $CD8^+$  Limfocyty T (27). Uchimura i wsp. [28] stwierdzili, że inkubacja komórek apoptotycznych z makrofagami pochodzącymi z otrzewnej powodowała większe wydzielanie cytokin ( $T_H1$ ) nasilających proces zapalny w porównaniu z inkubacją z komórkami nieulegającymi apoptozie, chociaż Fadok i wsp. [29] wykazali, że inkubacja makrofagów oraz komórek apoptotycznych pobudza wydzielanie cytokin przeciwzapalnych ( $T_H2$ ).

Badania *in vivo* również potwierdzają przyczynową zależność pomiędzy obecnością komórek ulegających apoptozie oraz aktywacją odpowiedzi immunologicznej. Mevorach i wsp. [30] wykazali niedawno, że u myszy uogólniony kontakt (*systemic exposure*) zgodnych antygenowo (syngenicznych) tymocytów ulegających zjawisku apoptozy pobudza produkcję autoprzeciwciał uczestniczących w rozwoju układowego tocznia rumieniowatego (SLE). Autoprzeciwciała izolowane z surowicy chorych z SLE często wiążą epitopy powstałe w wyniku apoptozy [31]. Casciola-Rosen i wsp. [32] wiążą zjawiska apoptozy i autoagresji z faktem, że antygeny pobudzają

ce produkcji autoprzeciwciał w SLE występują w zespołach pecherzyków powierzchniowych dwu odległych populacji komórek tworzących keratynę i ulegających apoptozie. Kurts i wsp. [33] wykazali, że niszczenie tkanek przez limfocyty T, prawdopodobnie wywołane zjawiskiem apoptozy [34], odsłoniło zwykle niedostępne antygeny, aktywujące z kolei nieuczulone (*naïve*) limfocyty T. Sugeruje się także, że uwalniane w trakcie zjawiska apoptozy fosfolipidy, są bodźcem antygenowym prowadzącym do produkcji przeciwciał skierowanych przeciw fosfolipidom [35]. Badanie to dostarcza danych sugerujących, że śmierć komórek poprzez apoptozę może zapoczątkować odpowiedź immunologiczną, która u podatnych osobników skierowana zostanie przeciw własnym antygenom.

### **Czy apoptoza komórek $\beta$ prowadzi do rozwoju cukrzycy o podłożu autoimmunologicznym?**

W wielu badaniach wykazano, że apoptoza komórek  $\beta$  może wyprzedzać rozwój *insulitis* w eksperymentalnej cukrzycy typu 1. O'Brian i wsp. [36] dokonali ilościowej oceny u myszy, którym wielokrotnie podawano małe dawki toksycznej dla komórek  $\beta$  streptozotocyny (STZ). Apoptoza nasiliła się i osiągnęła pierwszy szczyt 5. dnia po rozpoczęciu podawania substancji, natomiast w 9. dniu badania wystąpiły cechy zapalenia wysp trzustki. Ponowny szczyt apoptozy pojawił się w 11. dniu, gdy obserwowano nacieki złożone z limfocytów w komórkach  $\beta$ . Dane te sugerują, że wywołana STZ apoptoza uruchomiła odpowiedź immunologiczną, która prowadziła do obumierania komórek  $\beta$ , chociaż poddawano w wątpliwą specyficzność tej odpowiedzi [37, 38]. O'Brian i wsp. [39] stwierdzili również, że apoptoza komórek  $\beta$  wyprzedza zapalenie wysp trzustki u myszy NOD. Zjawisko to obserwowano także u myszy w transgenicznym modelu przyspieszonej cukrzycy [18, 19]. Nadmierna transgeniczna ekspresja czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) w komórkach  $\beta$  wiązała się z apoptozą komórek 7–10-dniowych, która występowała kilka dni przed pojawieniem się nacieków z komórek T [18]. Apoptoza komórek  $\beta$  trzustki wyprzedzała również *insulitis* u myszy NOD, u których występowała nadmierna ekspresja diabetogennych limfocytów T [19]. Chociaż w powyższych badaniach nie wykazano związku przyczynowego pomiędzy apoptozą komórek  $\beta$  i rozpoczęciem procesu zapalnego wysp trzustki, związek czasowy tych dwóch zjawisk przemawia za naszą hipotezą, że apoptoza komórek  $\beta$  może wywoływać cukrzycę o mechanizmie autoimmunologicznym.

Dodatkowych dowodów na istnienie związku czasowego pomiędzy występującą u noworodków falą apoptozy a następującym potem procesem zapalnym wysp trzustki dostarczają badania na zwierzęcych modelach przyspieszonej cukrzycy o podłożu autoimmunologicznym. Modele te zostały utworzone poprzez nasiloną ekspresję limfocytów T specyficznych przeciwko wyspom trzustkowym [40, 41], poprzez transgeniczną ekspresję stymulującej molekuly B7 [42] lub TNF- $\alpha$  [18] w wyspach oraz poprzez podawanie cyklofosfamidu [43] albo anty-CTLA-4 [20]. W powyższych modelach czas potrzebny do rozwoju cukrzycy jest znacznie skrócony, hiperglikemia może pojawiać się nawet w 17. dniu [20]. Pomimo szybkiego rozwoju choroby zapalenie wysp trzustkowych pojawia się zwykle w stałym czasie, czyli 15. dnia [18–20]. Zjawiska tego nie badano szczegółowo w żadnej z prac. Fakt, że rozpoczęcie procesu zapalnego nie występuje przed upływem 15 dni sugeruje, że jest to moment krytyczny, w którym pewne istotne zjawiska. Fala apoptozy komórek  $\beta$  zachodząca występująca u noworodków pojawia się w takim właśnie czasie, co pozwala przypuszczać, że może ona rozpoczynać proces autoimmunologiczny.

### **Dlaczego proces autoimmunologiczny skierowany przeciwko komórkom $\beta$ nie rozpoczyna się przed upływem 15 dni życia?**

Aby rozpoczął się atak autoimmunologiczny u podatnych genetycznie osobników, autoantygeny komórek  $\beta$  muszą stać się dostępne dla komórek prezentujących antygeny (APC, *antigen presenting cells*). APC, wraz z właściwymi molekułami stymulującymi, mogą wówczas indukować proliferację limfocytów T [44]. Proces autoimmunologiczny nie może zostać uruchomiony, jeżeli antygen nie jest dostępny lub jest go za mało, jeżeli nie ma APC lub nie są one w stanie zaprezentować antygeny oraz jeżeli nie można aktywować limfocytów T. Pewien wgląd w te możliwości uzyskaliśmy dzięki pracy Höglunda i wsp. [45]. Wykazali oni, że limfocyty T 10-dniowej myszy są w pełni funkcjonalne. Limfocyty T CD4<sup>+</sup>specyficzne dla komórek  $\beta$  trzustki pochodzące od 10-dniowej transgenicznej myszy, wśród których znajdował się znaczny odsetek limfocytów T z receptorami specyficznymi dla komórek  $\beta$  limfocytów T (BDC 2.5 TCR) skutecznie uległy pobudzeniu po przeniesieniu do organizmów dorosłych myszy, u których nie występowały zwykle limfocyty T (Ca<sup>0</sup>/NOD). Jednak limfocyty T pochodzące od dorosłych transgenicznych myszy BDC 2.5 TCR, które przeniesiono do biorców

Ca<sup>+</sup>/NOD nie uległy proliferacji w trzustkowych węzłach chłonnych. Obserwacja ta sugeruje, że w trzustce 20-dniowego zwierzęcia jest niewystarczająca ilość antygeny stymulującego limfocyty T albo jest on niedostępny, albo też APC są niedostępne albo nie mogą zaprezentować antygeny. Niemniej jednak w 15. dniu życia limfocyty T w trzustkowych węzłach chłonnych ulegają aktywacji i widoczne są pierwsze objawy zapalenia wysp trzustkowych [45]. Aktywacja limfocytów T 10–15 dnia życia pozwala sądzić, że w tym czasie albo antygen staje się dostępny dla funkcjonalnych APCs lub komórki te stają się funkcjonalne.

Dodatkowe informacje pochodzą z badań Höglunda i wsp. [45]. Badacze sugerują, że APC u 10-dniowych zwierząt są już w stanie prezentować antygen. Komórki T CD8<sup>+</sup> specyficzne dla albuminy jajowej (OVA, *ovalalbumin*) niestykające się dotychczas z żadnym bodźcem przeniesiono do organizmu 10-dniowej myszy transgenicznej, u której stwierdzano ekspresję białka OVA na szczyrimy promotorze insuliny (RIP-OVA, *rat insulin promoter*). U tych myszy występuje znaczna ekspresja białka OVA na komórkach  $\beta$  i w nerkach [46]. Stwierdzono proliferację limfocytów T w węzłach chłonnych okolicy nerki, co pozwala sądzić, że APC 10-dniowego zwierzęcia mogą aktywować komórki T CD8<sup>+</sup>. Co dziwne, nie stwierdzono proliferacji limfocytów T w węzłach chłonnych okolicy trzustki. Prawdopodobnie istnieje związek z tą okolicą różnica w działaniu APC lub zależna od narządu różnica w dostępności antygeny dla prezentacji. Powyższe dane sugerują, że proces autoimmunizacji nie rozpoczyna się przed upływem 15. dnia życia, ponieważ antygeny występują w niedostatecznej ilości lub niedostępny jest antygen powodujący stymulację specyficznych dla komórek  $\beta$  trzustki limfocytów T, mniej prawdopodobny jest brak limfocytów T lub brak funkcji czy dostępności APC. Występująca u noworodków fala apoptozy, która pojawia się w tym okresie może być źródłem wcześniej niedostępnego antygeny.

### **Czy apoptoza rozwojowa tłumaczy zależne od narządu różnice w dostępności autoantygeny?**

W nerkach noworodków obserwowano fale apoptozy występujące w trakcie rozwoju [4]. Apoptoza w brodawkach rdzenia stwierdzono w 2 dniu życia noworodka u < 1% komórek. Indeks apoptozy zwiększył się do 3,2% w 6–7. dniu życia, a w 14. dniu obniżył się < 0,2%. W strefie nefrogennej in-

deks apoptozy był najwyższy (2,7%) w późniejszych stanach zarodkowych i spadł poniżej 0,2% w 14 dniu życia. Tak więc, w przeciwieństwie do trzustki, apoptoza rozwojowa w nerkach osiąga apogeum przed upływem 10. dnia życia. Jeśli do aktywacji limfocytów T wymagana jest obecność pochodzącego z apoptozy rozwojowej autoantygeny, wówczas w 10. dniu życia nastąpi proliferacja limfocytów T w nerkach, a nie w trzustce. Jak wspomniano, kiedy niestykające się dotychczas z żadnym bodźcem specyficzne dla OVA limfocyty T przeniesiono do 10-dniowych transgenicznych organizmów myszy RIP-OVA, okazało się, że proliferują one w węzłach chłonnych nerek, ale nie obserwuje się tej proliferacji w węzłach chłonnych trzustki. Apoptoza rozwojowa zależna od narządu może wyjaśniać różnice w dostępności autoantygenów i następującej później aktywacji komórek T.

Dysponujemy znaczną liczbą danych, które mogą świadczyć o istnieniu związku pomiędzy apoptozą komórek  $\beta$  a rozpoczęciem procesu autoimmunizacyjnego. Apoptoza komórek  $\beta$  wyprzedza pojawienie się zapalenia wysp trzustki w cukrzycy spontanicznej, wywołanej i w modelu przyspieszonej cukrzycy o podłożu autoimmunologicznym. Uważa się, że w modelach spontanicznych u gryzoni moment rozpoczęcia procesu autoimmunologicznego jest ustalony na około 15. dzień życia, po wystąpieniu fali apoptozy komórek  $\beta$ . Fale rozwojowej apoptozy występują nie tylko w trzustce, jednak czas ich wystąpienia jest specyficzny dla danego narządu, a różnice w apoptozie w poszczególnych narządach korelują z różnicami w aktywacji limfocytów T. Obserwacje te sugerują, że rozwojowe fale apoptozy, a zwłaszcza fale w okresie noworodkowym, mogą być źródłem autoantygenów niezbędnych do rozpoczęcia skierowanej przeciw komórkom  $\beta$  odpowiedzi autoimmunologicznej.

### **Dlaczego nie u wszystkich występuje cukrzyca o podłożu autoimmunologicznym?**

Apoptoza stwierdzano zarówno w badaniach na zwierzętach ze skłonnością do cukrzycy, jak i opornych na te choroby. Jeżeli fala apoptozy u noworodków jest źródłem antygeny niezbędnego do aktywacji specyficznych dla komórek  $\beta$  limfocytów T, dlaczego nie u wszystkich zwierząt dochodzi do rozwoju *insulitis*, zapalenia wysp? W okresie noworodkowym apoptoza występuje w większym nasileniu niż w okresie dorosłości. Rozpoczęcie procesu zapalne-



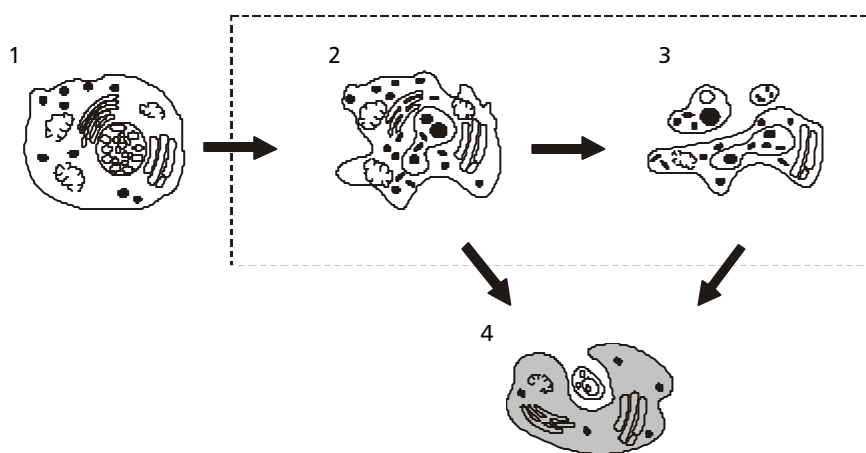
go wysp zbiega się ze szczytem fali apoptozy komórek  $\beta$  u noworodków, co sugeruje, że tempo apoptozy może mieć duże znaczenie. Obserwowaliśmy w okresie noworodkowym 1,5–3-krotnie większą liczbę TUNEL-dodatnich komórek  $\beta$  u myszy NOD w porównaniu z myszami BALB/c (ryc. 3), co pozwala sądzić, że w tym modelu rozwój procesu autoimmunologicznego u myszy NOD zależy od szybkości apoptozy. Znaczenie tempa apoptozy potwierdzają również obserwacje Rovere'a i wsp. [25], którzy wykazali, że liczba komórek z apoptozą wpływa na odpowiedź immunologiczną. Wspólna hodowla komórek z apoptozą i komórek dendrytycznych w stosunku 5:1 spowodowała aktywację zarówno komórek T CD4<sup>+</sup>, jak i CD8<sup>+</sup>, której towarzyszyło wydzielanie prozapalnych (T<sub>H</sub>1) cytokin, interleukiny 1- $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Aktywacji komórek T oraz towarzyszącej jej sekrecji cytokin nie stwierdzono przy proporcji komórek z apoptozą do komórek dendrytycznych wynoszącej 1:1.

Chociaż tempo apoptozy może być istotne, stwierdzenie, że istnieje podwyższona liczba TUNEL-dodatnich komórek  $\beta$  u myszy NOD (ryc. 3) jest sprzeczne z naszą obserwacją, dotyczącą podobnych fal apoptozy komórek  $\beta$  u podatnych i opornych na cukrzycę szczurów BB (ryc. 2). Ten paradoks może wynikać z różnych mechanizmów powstawania choroby u szczurów BB i u myszy NOD, ale także może być skutkiem różnic metodologicznych. Dodatnie badanie TUNEL zwykle odzwierciedla nasilenie apoptozy. Jednak okres, w którym obserwowano to zja-

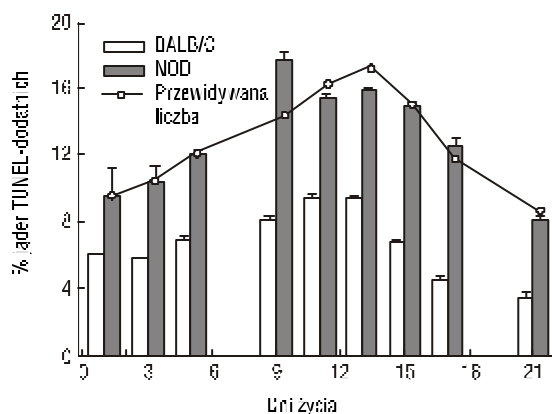
wisko, zależy nie tylko od nasilenia samej apoptozy, ale również od szybkości usuwania rozpadających się komórek (ryc. 4). Zwiększenie liczby komórek TUNEL-dodatnich nie koniecznie musi odpowiadać nasileniu apoptozy, lecz może być spowodowane spowolnieniem procesu usuwania. Rycina 5 przedstawia sytuację, w której wzrost liczby komórek TUNEL-dodatnich u myszy NOD w porównaniu z myszami BALB/c może być spowodowany 50-procentowym zwolnieniem szybkości procesu usuwania.

U szczurów rasy BB wrażliwych oraz odpornych na rozwój cukrzycy, odmiennie niż w przypadku myszy NOD, stosując model szacunkowy, nie stwierdziliśmy różnic w szybkości śmierci komórek  $\beta$ . Metoda oparta na modelu szacunkowym nie zależy od obecności zmian morfologicznych komórek, a zatem nie zależy również od szybkości usuwania resztek rozpadających się komórek. Przy założeniu, że fala apoptozy komórek  $\beta$  u noworodków jest taka sama, elementem różnicującym zwierzęta wrażliwe na cukrzycę oraz odporne na jej rozwój jest szybkość usuwania pozostałości komórek apoptotycznych, co potwierdzają wyniki naszych badań szczurów BB i myszy NOD.

Resztki komórek ulegających apoptozie są usuwane drogą fagocytozy [47]. Komórki zdolne do fagocytozowania komórek  $\beta$  to: makrofagi, komórki dendrytyczne oraz prawdopodobnie sąsiadujące komórki  $\beta$  [47]. Stopień udziału poszczególnych komórek fagocytycznych w tym procesie nie jest poznany. Fak-



**Rycina 4.** Ocena morfologiczna apoptozy w różnych etapach tego procesu. 1) Prawidłowa morfologia komórki; 2) Początkowe stadia apoptozy, obejmujące tworzenie pecherzyków błony komórkowej, zagęszczenie cytoplazmy i fragmentację DNA; 3) Fragmentacja komórki na wiele ciałek apoptotycznych, zwykle małych o dużym zagęszczeniu cytoplazmy; 4) ostatecznie komórki apoptotyczne są wchłaniane przez fagocyty i unicestwiane. Fagocyty rozpoznają komórki apoptotyczne we wczesnej (2) i w późnej (3) fazie apoptozy. Liczba komórek ulegających w danej chwili apoptozie, ocenianej w mikroskopie świetlnym z zastosowaniem tradycyjnych technik barwienia jest uzależniona od nasilenia procesu apoptozy (1→2) oraz szybkości usuwania (2→4, 3→4). Zazwyczaj widoczne są komórki w 3 i 4 fazie (zaznaczone szarym polem). Wzrost szybkości zjawiska apoptozy i/lub zwolnienie procesu usuwania zwiększa liczbę komórek identyfikowanych tą metodą



**Rycina 5.** Liczbe komórek TUNEL-dodatnich u myszy NOD można przewidzieć na podstawie 50-procentowego obniżenia szybkości usuwania komórek, które uległy apoptozie. Liczba komórek TUNEL-dodatnich jest zależna od równowagi pomiędzy nasileniem apoptozy a szybkością usuwania komórek apoptotycznych. Nasilenie procesu apoptozy oraz szybkość usuwania komórek u zdrowych myszy BALB/c została oszacowana na podstawie zmian liczby komórek TUNEL-dodatnich u myszy BALB/c w kolejnych dniach życia (□). Przy założeniu, że nasilenie procesu apoptozy u myszy NOD i w grupie kontrolnej myszy BALB/c będzie podobne oraz przy 50% redukcji szybkości usuwania znacznika TUNEL, przewidywana liczba wybarwionych znacznikiem TUNEL komórek u myszy NOD (↔) jest podobna do faktycznie uzyskanej (■).

tem potwierdzającym, że różnice w rozwoju cukrzycy autoimmunologicznej uzależnione są od uposledzonego usuwania resztek komórek ulegających apoptozie, jest obserwowane uposledzenie funkcji fagocytarnej u myszy NOD oraz u szczurów BB. Zaburzenia fagocytozy obserwowane u myszy NOD to: gorsze rozpoznawanie cząsteczek, które uległy opsonizacji [48], zmniejszone wydzielanie cytokin i ekspresji MHC klasy I [49] oraz mniej efektywne przygotowanie i prezentacja materiału antygenowego [50]. Makrofagi NOD produkują również niezwykle duże ilości prostaglandyn E2, co powoduje zahamowanie czynności makrofagów i komórek dendrytycznych [51]. Dodatkowo, myszy u NOD występuje mniej makrofagów niż u zdrowych myszy [49]. Zmieniona funkcja komórek dendrytycznych była również obserwowana u szczurów BB [52, 53]. Zaburzone usuwanie resztek komórek apoptotycznych podczas nasilenia fali apoptozy komórek  $\beta$  u noworodków może wyjaśnić mechanizm zwiększenia liczby komórek TUNEL-dodatnich. Zwolnione usuwanie pozostałości komórek apoptotycznych może być przyczyną uwalniania immunogennej zawartości komórek, ponieważ występuje zjawisko wtórnej martwicy komórek apoptotycz-

nych [14]. Nasilenie apoptozy w połączeniu z uposledzeniem procesu APC prowadzi do prezentacji epitopów komórek  $\beta$  dla układu immunologicznego, co w konsekwencji uruchamia odpowiedź immunologiczną. Sądymy, że zaburzona funkcja fagocytarnej u noworodków wrażliwych na rozwój cukrzycy jest podstawowym czynnikiem, pod wpływem którego komórki  $\beta$  stają się celem ataku autoimmunologicznego. Uposledzone usuwanie komórek, które uległy apoptozie zostało uznane za czynnik etiologiczny rozwoju autoimmunologicznej choroby SLE [54].

## Streszczenie

W niniejszym artykule rozważamy rolę procesu apoptozy komórek  $\beta$  u noworodków w wyzwalaniu cukrzycy autoimmunologicznej. Wcześniej już wykazaliśmy, że nasilenie apoptozy komórek  $\beta$  występuje u zdrowych szczurów [13]. Podobne nasilenie apoptozy obserwuje się u myszy NOD oraz u szczurów BB, ze szczytem około 13. dnia życia (ryc. 2 i 3). Zainicjowanie procesu zapalenia wysp (*insulitis*) w modelu przyspieszonej cukrzycy autoimmunologicznej u myszy występuje zawsze około 15. dnia życia, bezpośrednio po znaczący nasileniu procesu apoptozy komórek  $\beta$  [18–20]. Mimo że apoptoza była uważana za proces nieaktywujący reakcji zapalnych, obecnie jest wiele prac dowodzących niezbieżnie, że apoptoza może wyzwalac gwałtowne reakcje układu odpornościowego [25–33, 35]. Wszystkie te dane sugerują, że fala apoptozy komórek  $\beta$  u noworodków może być źródłem antygenów niezbędnych do rozpoczęcia autoagresji.

## Podziękowania

Niniejsza praca była finansowana z grantu dla D.T.F. (MT 13 446) przyznanego przez *Medical Research Council of Canada*, J.D.T. był wspierany przez stypendium studenckie z *Medical Research Council of Canada*, D.J.H. był wspierany przez *The Canadian Diabetes Association* i *Juvenile Diabetes Foundation International*.

Autorzy są wdzięczni członkom  *$\beta$ -Cell Apoptosis Network* (założonej przez *Medical Research Council of Canada* i *Juvenile Diabetes Foundation International*): Doktorom C.B. Vercherowi, R. Tanowi, J. Chantler, Robertowi Kornelukowi, P. Santamarii i J.F. Elliotowi za twórczą i skłaniającą do przemyśleń dyskusję. Dziękujemy doktorom Vercherowi i Tanowi za krytyczną ocenę manuskryptu.



## PISMIENICTWO

1. Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C.: Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347–354.
2. Vaux D.L., Korsmeyer S.J.: Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245–254.
3. Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K.: The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 1999; 10: 629–639.
4. Coles H.S.R., Burne J.F., Raff M.C.: Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 1993; 118: 777–784.
5. Shortman K., Egerton M., Spangrude G.J., Scollay R.: The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* 1990; 2: 3–12.
6. Van den Steen P., Van Lommel A., Lauweryns J.M.: Effects of postnatal age and of thymectomy on hamster pulmonary neuroendocrine system and aspects of programmed cell death. *Cell Tissue Res.* 1997; 290: 553–567.
7. Spreafico R., Frassoni C., Arcelli P., Selvaggio M., De Biasi S.: In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. *J. Comp. Neurol.* 1995; 363: 281–295.
8. Oppenheim R.W.: Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 1991; 14: 453–501.
9. Kajstura J., Mansukhani M., Cheng W., Reiss K., Krajewski S., Reed J.C., Quaini F., Sonnenblick E.H., Anversa P.: Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp. Cell Res.* 1995; 219: 110–121.
10. Cho A., Courtman D.W., Langille B.L.: Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ. Res.* 1995; 76: 168–175.
11. Wang R., Nakane P.K., Koji T.: Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 1250–1256.
12. Spencer S.J., Mesiano S., Lee J.Y., Jaffe R.B.: Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 1110–1115.
13. Finegood D.T., Scaglia L., Bonner-Weir S.: Dynamics of b-cell mass in the growing rat pancreas: estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 1995; 44: 249–256.
14. Wyllie A.H.: Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull.* 1997; 53: 451–465.
15. Scaglia L., Cahill C.J., Finegood D.T., Bonner-Weir S.: Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinol.* 1997; 138: 1736–1741.
16. Petrik J., Arany E., McDonald T.J., Hill D.J.: Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 1998; 139: 2994–3004.
17. Fujino-Kurihara H., Fujita H., Hakura A., Nonaka K., Tarui S.: Morphological aspects on pancreatic islets of non-obese diabetic (NOD) mice. *Virchows. Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1985; 49: 107–120.
18. Green E.A., Eynon E.E., Flavell R.A.: Local expression of TNF in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity* 1998; 9: 733–743.
19. Kurrer M.O., Pakala S.V., Hanson H.L., Katz J.D.:  $\beta$ -Cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 213–218.
20. Lühder F., Hoglund P., Allison J.P., Benoist C., Mathis D.: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 427–432.
21. Mordes J.P., Desemone J., Rossini A.A.: The BB rat. *Diabetes Metab. Rev.* 1987; 3: 725–750.
22. Fieldus W.E., Field C.J., Finegood D.T.: Net cell death contributes to remodeling of the b-cell mass in the neonatal BioBreeding rat. *Diabetes* 1999; 48 (supl. 1): A249.
23. Delovitch T.L., Singh B.: The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 1997; 7: 727–738.
24. Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj N.: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86–89.
25. Rovere P., Vallinoto C., Bondanza A., Crosti M.C., Rescigno M., Ricciardi-Castagnoli P., Rugarli C., Manfredi A.A.: Cutting edge: bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J. Immunol.* 1998; 161: 4467–4471.
26. Inaba K., Turley S., Yamaide F., Iyoda T., Mahnke K., Inaba M., Pack M., Subklewe M., Sauter B., Sheff D., Albert M., Bhardwaj N., Mellman I., Steinman R.M.: Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 2163–2173.
27. Bellone M., Iezzi G., Rovere P., Galati G., Ronchetti A., Protti M.P., Davoust J., Rugarli C., Manfredi A.A.: Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J. Immunol.* 1997; 159: 5391–5399.
28. Uchimura E., Kodaira T., Kurosaka K., Yang D., Watanabe N., Kobayashi Y.: Interaction of phagocytes with apoptotic cells leads to production of pro-inflammatory cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 239: 799–803.
29. Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A., Freed P.W., Westcott J.Y., Henson P.M.: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit pro-inflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE $_2$ , and PAF. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 890–898.
30. Mevorach D., Zhou J.L., Song X., Elkun K.B.: Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 387–392.
31. Utz P.J., Hottelet M., Schur P.H., Anderson P.: Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 843–854.
32. Casciola-Rosen L.A., Anhalt G., Rosen A.: Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1317–1330.
33. Kurts C., Miller J.F.A.P., Subramaniam R.M., Carbone F.R., Heath W.R.: Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 409–414.
34. Kägi D., Ledermann B., Bürki K., Zinkernagel R.M., Hengartner H.: Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: mechanisms and significance. *Immunol. Rev.* 1995; 146: 95–115.
35. Pittoni V., Isenberg D.: Apoptosis and antiphospholipid antibodies. *Semin. Arthritis Rheum.* 1995; 28: 163–178.
36. O'Brien B.A., Harmon B.V., Cameron D.P., Allan D.J.: Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J. Pathol.* 1996; 178: 176–181.
37. Gerling I.C., Friedman H., Greiner D.L., Shultz L.D., Leiter E.H.: Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in NOD-scid/scid mice in the absence of functional lymphocytes. *Diabetes* 1994; 43:433–440.
38. Elliot J.I., Dewchand H., Altmann D.M.: Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 109: 116–120.
39. O'Brien B.A., Harmon B.V., Cameron D.P., Allan D.J.: Apoptosis is the mode of beta-cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes* 1997; 46: 750–757.

40. Verdaguer J., Schmidt D., Amrani A., Anderson B., Averill N., Santamaria P.: Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1663–1676.
41. Katz J.D., Wang B., Haskins K., Benoist C., Mathis D.: Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993; 74: 1089–1100.
42. Wong S., Guerder S., Visintin I., Reich E.P., Swenson K.E., Flavell R.A., Janeway C.A. Jr.: Expression of the co-stimulator molecule B7-1 in pancreatic beta-cells accelerates diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 1995; 44: 326–329.
43. Augstein P., Elefanti A.G., Allison J., Harrison L.C.: Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclo-phosphamide-accelerated diabetes. *Diabetologia* 1998; 41: 1381–1388.
44. Banchereau J., Steinman R.M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245–252.
45. Höglund P., Mintern J., Waltzinger C., Heath W., Benoist C., Mathis D.: Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 331–339.
46. Kurts C., Heath W.R., Carbone F.R., Allison J., Miller J.F.A.P., Kosaka H.: Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 923–930.
47. Savill J.: Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Bri. Med. Bull.* 1997; 53: 491–508.
48. Luan J.J., Monteiro R.C., Sautes C., Fluteau G., Eloy L., Fridman W.H., Bach J.F., Garchon H.J.: Defective Fc gamma RII gene expression in macrophages of NOD mice: genetic linkage with up-regulation of IgG1 and IgG2b in serum. *J. Immunol.* 1996; 157: 4707–4716.
49. Serreze D.V., Gaskins H.R., Leiter E.H.: Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice. *J. Immunol.* 1993; 150: 2534–2543.
50. Piganelli J.D., Martin T., Haskins K.: Splenic macrophages from the NOD mouse are defective in the ability to present antigen. *Diabetes* 1998; 47: 1212–1218.
51. Atkinson M.A.: Mechanisms underlying the loss of self tolerance in NOD mice. *Res. Immunol.* 1997; 148: 301–306.
52. Delemarre F.G., Simons P.J., de Heer H.J., Drexhage H.A.: Signs of immaturity of splenic dendritic cells from the autoimmune prone biobreeding rat: consequences for the in vitro expansion of regulator and effector T cells. *J. Immunol.* 1999; 162: 1795–1801.
53. Tafuri A., Bowers W.E., Handler E.S., Appel M., Lew R., Greiner D., Mordes J.P., Rossini A.A.: High stimulatory activity of dendritic cells from diabetes-prone BioBreeding/Worcester rats exposed to macrophage-derived factors. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 2040–2048.
54. Pablos J.L., Gomez-Reino J.J.: Defective phagocytosis in systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998; 28: 864–865.

