

## Markörer i blodet som förutsäger typ 1 diabetes

Autoimmuna sjukdomar är ett samlingsnamn på sjukdomar där det egna immunförsvaret attackerar kroppsegen vävnad, typ 1 diabetes (T1D) är en sådan livslång sjukdom. T1D uppstår till följd av att immunförsvaret i kroppen angriper och förstör de insulinproducerande kroppsegna cellerna, de så kallade Langerhanska cellöarna i bukspottskörteln vilket leder till total förlust av insulinproduktionen. Hormonet insulin hjälper kroppen att tillgodogöra sig energi i form av glukos från maten vilket därmed reglerar sockernivån i blodet. Utan insulin kan inte glukosen tas upp av cellerna och ansamlas därmed i blodet vilket leder till högt blodsocker som är både farligt och skadligt för kroppen. Första tecknen på T1D hos barn är stora mängder urin, ökad törst, trötthet och viktneidgång. Obehandlat högt blodsocker kan leda till ett livshotande tillstånd, kallat ketoacidosis som kan leda till medvetslöshet, koma och död. Sjukdomen uppträder vanligtvis under barndomen eller tonåren men kan också uppträda i vuxen ålder. Förekomsten av T1D har ökat under de senaste decennierna bland barn i hela världen. Idag finns inget botemedel och drabbade barn och vuxna behandlas flera gånger dagligen med insulininjektioner för att ersätta det kroppsegna insulinet och kunna överleva. Behandlingen är idag riktad på att hålla blodsockret på rätt nivå med hjälp av insulin, kost och en hälsosam livsstil för att förhindra komplikationerna orsakade av högt eller lågt blodsocker.

Den högsta förekomsten av T1D finns i Finland följt av Sverige. Detta beror på att folk i Norden har en viss medfödd benägenhet genom specifika arvsanlag vilket medför risk för att utveckla T1D. Den ökade risken kan härledas till vissa transplantationsantigener, så kallade HLA-gener vilka bidrar till omkring 50% av den genetiska risken och kodar för proteiner på immuncellers yta som presenterar fragment (antigen) till specifika vita blodkroppar och därmed aktiverar T-cellerna vilka utgör en viktig del i immunförsvaret mot virus. I Sverige bär 20% av befolkningen på riskanlag. Dock insjuknar endast 1,5% av dessa individer med ökad risk vilket tyder på andra hittills okända miljöfaktorer som tillsammans med ärftlig risk kan leda till sjukdomen. Virusinfektioner, rubbningar i mag- och tarmkanalen och kost är miljöfaktorer som i vissa studier kunnat kopplas till risken för att drabbas. Den autoimmuna processen som förstör de insulinproducerande beta-cellerna börjar månader till år före diagnos och karakteriseras av symtom som uppträder först då 90 % av beta-cellerna är förlorade och en omedelbar behandling med insulin krävs. Orsaken till sjukdomen är således okänd. Vår forskning går ut på att försöka lösa gåtan kring de hittills okända faktorerna som leder till T1D, samt att hitta markörer för att bättre förutsäga risk för sjukdom och förstå sjukdomsförloppet. Resultaten kan i framtiden användas till att förhindra den autoimmuna attacken eller bevara den kvarvarande funktionen av de insulinproducerande cellerna hos barn med förhöjd risk att drabbas.

T1D föregås av autoantikroppar som kan mätas genom ett enkelt blodprov. Dessa är antikroppar som kroppen bildar mot de insulinproducerande cellerna och utgör markörer för immunförsvarets attack mot de insulinproducerande cellerna. Det finns fyra sorters T1D autoantikroppar: IAA, GADA, IA-2A och ZnT8A. Förekomst av autoantikroppar markerar ökad risk för T1D och ju fler som utvecklas desto större risk har man. Tiden från första autoantikroppen till sjukdomsdebut varierar mellan månader och flera år där vuxna har den längsta fördröjningen medan barn insjuknar tidigare. Barn som har två eller fler autoantikroppar har en hög risk för att drabbas inom 5–10 år. Förloppet före T1D debut brukar delas in i tre steg för att bäst kunna förutsäga sjukdom och möjlighet att utföra fördröjande eller förebyggande kliniska studier. Första steget kännetecknas av utvecklingen av två eller fler autoantikroppar, steg 2 kännetecknas av en nedsatt glukostolerans. Nedsatt glukosintolerans innebär en försämrad funktion hos de insulinproducerande cellerna att producera insulin och hantera blodsockret. Den nedsatta glukostoleransen kan mätas med en sockerbelastning och utvärderas genom mått på glukos, insulin och C-peptid (biprodukt till insulin). En nedsatt glukostolerans innebär en stor förlust av de insulinproducerande cellerna. T1D debuterar vid steg 3 med klassiska T1D symtom och ca 90 procent av de insulinproducerande cellerna har förstörts. Tiden mellan de olika stegen varierar mycket mellan individer och kan ta dagar till år innan T1D diagnos.

Barnen som har studerats i denna avhandling är friska med förhöjd ärftlig risk för T1D i åldern 0–15 år och har deltagit i en longitudinell uppföljning i antingen The Diabetes Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) studien eller i Diabetes Prevention - Immune Tolerance 2 (DiAPREV-IT 2) studien.

TEDDY studien är en stor internationell forskningsstudie som genomförs i Finland, Sverige, Tyskland och USA. Målet med studien är att följa upp friska barn från födseln och tills de fyllt 15 år för att ta reda på olika miljöfaktorer som kan utlösa en autoimmunitet som i slutändan leder till diagnos av T1D. Nyfödda barn screenades med hjälp av navelsträngsblod för arvsanlag för T1D. Totalt 8676 barn med förhöjd ärftlig risk inkluderades i studien mellan 2004–2010. Barnen följs upp var tredje månad från födseln fram tills de fyllt 4 år därefter följs autoantikroppsnegativa barn var sjätte månad medan autoantikroppspositiva barn fortsätter att följas upp var tredje månad. Prover och information som samlas in vid besöken omfattar blodprover (för analys av antikroppar, olika celler, glukosmetabolism, arvsanlag och olika proteiner), urin, tånaglar, saliv, avföring, nässekret, vatten från hushållet, allmän hälsoundersökning, tillväxt och pubertetstecken, matdagböcker, information om fysisk aktivitet, medicinering samt viktiga livshändelser så som sjukdom.

DiAPREV-IT 2 är en klinisk studie med målet att förhindra T1D eller fördröja insjuknandet i T1D med hjälp av GAD-alum behandling som ska vänja kroppen vid GAD-antigenet genom att introducera immuntolerans. Studien planerades att inkludera 80 barn där hälften behandlades med GAD-alum injektion och ett dagligt tillskott av D-vitamin för att förstärka immunsystemet och hälften behandlades med en injektion av en overksam substans tillsammans med ett dagligt D-vitaminskott för att jämföra effekterna av behandlingen. Endast 26 barn hann inkluderas i studien innan resultat från en tidigare studie med samma GAD-alum behandling visade att behandlingen inte kunde fördröja eller stoppa insjuknandet och därför stoppades rekrytering till studien. Dessa 26 barn följdes i två år med regelbundna besök var tredje månad med olika prover däribland blodprover för att följa autoantikroppsutvecklingen och glukosmetabolismen.

Målet med denna avhandling var att hitta olika markörer i blodet som bättre förutsäger olika steg i sjukdomsprocessen samt öka kunskapen kring olika cellulära sjukdomsmekanismer vid autoimmunitet. Syftet med första studien var att undersöka om det fanns en relation mellan ändringar i blodbildningen dvs antalet vita och röda blodceller i blodet och positivitet för autoantikroppar eller antalet autoantikroppar hos svenska barn som deltar i TEDDY studien med eller utan autoantikroppar. Resultaten visade att barn som bär HLA gener med högst risk (HLA-DR3/DR4) och pojkar hade låga nivåer av neutrofiler (en viss typ av vita blodkroppar) jämfört med barn som inte hade utvecklat autoantikroppar. Medan barn med HLA-DR3/DR4 och flickor hade lägre antal av röda blodceller tillsammans med lägre röda blodcells parametrar (hemoglobin och hematokrit) som beskriver egenskaper hos cellen. Ju fler antikroppar desto lägre nivåer av neutrophiler och röda blodceller hos barnen.

Syftet med andra studien var att undersöka om den förändrade blodbildningen som påvisades i första studien påverkas av nedsatt funktion av de insulinproducerande cellerna som återspeglas i tester för långtidssockret i blodet så kallat HbA1c och sockerbelastningar. HbA1c är ett test som anger medelsockernivån i blodet över de senaste tre månaderna. Resultaten visade att en ökad HbA1c nivå över tid som återspeglar en nedsatt förmåga för kroppen att hantera blodsockret vilket leder till högt blodsocker är associerad med en lägre genomsnittlig hemoglobinmassa i blodcellen och en mindre storlek av den röda blodcellen (MCH och MCV) vilket tyder på lägre järndepåer i blodet. Lägre nivåer av röda blodceller, hemoglobin och hematokrit var associerade med en ökad blodsockernivå vid fasta. Dessa resultat tyder på nedsatt förmåga i kroppen för glukosmetabolism. Högre insulinnivåer vid fasta återspeglar en normal beta-cells funktion och är associerad med högre nivå av röda blodceller, hemoglobin, hematokrit, och MCH.

I den tredje studien ville vi undersöka om en ökning av HbA1c kunde förutsäga utvecklingen av en andra, tredje, fjärde antikropp eller T1D debut. Resultaten visade att en högre HbA1c nivå gav en högre risk för utveckling av T1D som kunde förutspås redan fem år innan T1D debut. HbA1c hade en snabbare stegring då antalet autoantikroppar ökade från en till tre. En lägre HbA1c nivå kunde förutsäga utvecklingen av autoantikroppstypen IA-2A som en andra eller fjärde autoantikropp. Ett intressant fynd är att utvecklingen av IA-2A är associerad med en mer aggressiv autoimmun attack mot de

insulinproducerande cellerna vilket kan leda till läckage av insulin från attackerade celler som i sin tur kan leda till lägre blodsocker och lägre HbA1c.

Syftet med studie fyra var att undersöka hur behandlingen med GAD-alum påverkar en typ av immunceller, T-cellerna. Resultaten visade en långtidspåverkan av GAD-alum på olika typer av T-celler som varade i två år efter behandling med GAD-alum. Barn som behandlats med GAD-alum hade lägre T-cells nivåer jämfört med barnen som fick en överksam behandling. Resultatet kan tyda på en ökad immuntolerans som medför en lägre autoimmunitet.

#### Sammanfattning

- Ändring i blodbilden hos barn med T1D autoantikroppar relaterade till kön och högrisk HLA gener kan ha framkallats av den autoimmuna processen i bukspottskörteln.
- Antalet neutrofiler sjunker med antalet autoantikroppar främst hos pojkar och barn som bär på den högsta HLA riskgenen.
- Lägre nivåer av röda blodceller, hemoglobin och hematokrit var associerade med flera autoantikroppar, främst hos flickor och barn med den högsta HLA riskgenen.
- Lägre nivåer av röda blodceller och hemoglobin är associerade med ökande autoantikroppsantal och en nedsatt funktion hos de insulinproducerande beta-cellerna. Nivåer av dessa kan därför optimeras för användning som markörer vid sidan av autoantikropparna för att förutsäga progressionen av sjukdomsförloppet.
- En förklaring till lägre nivåer av röda blodceller och neutrofiler med ökande antal autoantikroppar kan ha orsakats av subtila variationer i blodsockernivån i blodet som på ett okänt sätt påverkar blodbildningsprocessen (hematopoesen) i benmärgen.
- En ökad HbA1c nivå över tid kan användas för att förutsäga tiden för T1D debut.
- En snabb ökning av HbA1c uppträder vid övergången från en autoantikropp till tre autoantikroppar.
- Uppkomsten av IA-2A som den andra eller den fjärde autoantikroppen är associerad med en minskning av HbA1c.

Behandlingen med GAD-alum har en långtidseffekt på olika typer av T-celler, vilket tyder på en ihållande effekt eller immuntolerans som varar i minst två år.