

SOUČASNÉ TRENDY PREVENCE A LÉČBY DIABETES MELLITUS 1. TYPU

MUDr. Pavla Mendlová, MUDr. Stanislava Koloušková, CSc.

Pediatrická klinika FN Motol a 2. LF UK, Praha

Diabetes mellitus 1. typu je způsoben autoimunitní destrukcí beta buněk pankreatu produkujících inzulin. Dlouhý interval od nastartování autoimunitního procesu do manifestace diabetu a možnost vyhledání jedinců s vysokým rizikem rozvoje onemocnění na základě genetického vyšetření, stanovení autoprotilátek asociovaných s diabetem a vyšetření stavu glukózového metabolismu činí z tohoto onemocnění velmi atraktivní cíl prevence na všech třech jejích úrovních. Tento článek se podrobněji zabývá jednotlivými studiemi provedenými nebo v současnosti probíhajícími na poli prevence diabetu a možnostmi nahrazení či znovuoobnovení vlastní produkce inzulinu, tedy kauzální léčbou včetně transplantace ostrůvků, použití kmenových buněk a genové terapie.

Klíčová slova: diabetes mellitus 1. typu, predikce, prevence, kauzální léčba.

ACTUAL TRENDS IN PREVENTION AND TREATMENT OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Type 1. diabetes mellitus results from an autoimmune destruction of insulin producing pancreatic beta cells. Long interval between the start of the autoimmune process to the real manifestation and the possibility to identify subjects in high risk of the development of the disease based on their genetics, presence of diabetes related autoantibodies and the status of the metabolism of glucose make this disease very attractive target of the prevention on all of its three stages. This article lists in detail important projects of T1DM prevention carried on recently or currently under research and possibilities of replacement or renewal of the insulin self-production, i. e. the causal treatment including the islet transplantations, the stem cell and the gene therapy.

Key words: T1DM, prediction, prevention, causal therapy.

Pediatr. pro Praxi, 2007; 8(4): 222–226

Úvod

Diabetes mellitus 1. typu je celoživotní onemocnění, způsobené autoimunitní reakcí organismu zaměřenou proti beta buňkám Langerhansových ostrůvků produkujících inzulin a jejich následnou různě rychlou destrukcí. Náchylnost k tomuto typu reakce vlastního imunitního systému je geneticky podmíněna, za spouštěcí mechanismus jsou považovány dosud blíže neidentifikované faktory vnějšího prostředí.

S diagnózou DM 1. typu je léčeno asi 10% z celkového počtu diabetiků na světě, t. j. kolem 2 milionů pacientů. Onemocnění postihuje především osoby evropského původu, nacházíme jej tedy především v Evropě a Severní Americe. Geografická stratifikace incidence je velmi výrazná, např. finské dítě má 400× větší pravděpodobnost, že onemocní cukrovkou, než dítě z Japonska. Česká republika s incidencí 16,5/100 000 dětí/rok je srovnatelná s čísly americkými nebo anglickými, i u nás v posledních letech incidence výrazně stoupá, shodně s celosvětovými trendy. Globální vzestup incidence je v současnosti dokumentován kolem 3% ročně, v zemích s rychlým nárůstem incidence, kam patří i Česká republika, je až 6% ročně. Incidence se celosvětově zvyšuje především v dětském věku, a to zejména u dětí do čtyř let (7). Vzhledem ke stále rostoucím počtům pacientů a vysokému procentu dlouhodobých komplikací ani přes velký pokrok v léčbě není divu, že se mnoho týmů po celém světě intenzivně věnuje možnostem prevence a kauzální léčby diabetu.

Jedním z hlavních důvodů, proč je tak velká pozornost věnována možnostem prevence diabetu na různých úrovních, je pomalá progresse onemocnění a možnost detekce autoimunitního procesu probíhajícího ještě skrytě a bez příznaků. Od prvního stimulu, za který je považován dosud neidentifikovaný faktor zevního prostředí (jako „horký kandidát“ jsou v současnosti intenzivně studovány např. některé viry jako rubeola, enteroviry a rotaviry (2) nebo součásti potravy, jako například časná expozice bílkovinám kravského mléka), trvá celé měsíce, roky nebo až desetiletí, než postupně dojde k tak velkému poklesu počtu beta buněk (cca na 10–20% původního množství), že organismus již není schopen kompenzovat snížení produkce inzulinu a objeví se klinické symptomy, cukrovka se manifestuje. Již nějakou dobu před manifestací však máme možnost probíhající autoimunitní proces monitorovat jak na imunologické, tak metabolické úrovni (obrázek 1) (16). K rozvoji autoimunity dochází takřka výhradně u osob s genetickou predispozicí (koncordance monozygotických dvojčat činí asi 50%), doba od nastartování reakce k manifestaci diabetu je závislá na věku, čím mladší osoba, tím rychlejší průběh (1).

Z imunologického hlediska je diabetes 1. typu způsoben buněčně zprostředkovanou reakcí (linie Th 1 – buňky CD 4+ , CD 8+ a makrofágy) vůči různým antigenům beta buněk vedoucím k jejich destrukci (9). Buněčná reakce je doprovázena i sekundární reakcí humorální, postupně se objevují autoprotilátky asociované s diabetem, které se sice nepodílejí na poškození beta buněk, mohou však být

použity jako marker aktivity autoimunitního procesu (17). V pozdějších fázích preklinického diabetu pak můžeme vzhledem k již výrazněji klesajícímu počtu buněk produkujících inzulin nalézt snížení první fáze stimulované inzulinové produkce (FPIR, First Phase Insulin Response – součet hladin inzulinu v 1. a 3. minutě po intravenózní zátěži glukózou). Při dalším úbytku beta buněk dochází k porušení glukózové tolerance až k nálezům diabetické křivky při provedení orálního glukózového tolerančního testu, hyperglykemií nalačno a vlastní manifestací diabetu.

Víme, kdo je v riziku?

Umíme sledovat několik markerů použitelných pro predikci rozvoje diabetu, jejichž kombinací můžeme dosáhnout poměrně velmi exaktního odhadu rizika pro konkrétní osobu. Problém nicméně nastává při rozhodování, koho vyšetřovat, neboť používané testy nemají dostatečnou plošnou výtěžnost a poměr cost/benefit pro plošný screening. Základní podmínkou úspěšné prevence, i kdybychom hypoteticky již měli k dispozici nějakou léčbu použitelnou ještě před manifestací diabetu, tak stále zůstává vyvinutí metody predikce s dostatečnou senzitivitou a specificitou, aplikovatelnou na širší populaci. Pokud bychom například hypoteticky vyšetřovali všechny novorozence na přítomnost dvou hlavních rizikových HLA haplotypů DR4-DQ8 a DR3-DQ2 (13), identifikujeme sice přes 95% z těch, kteří někdy v pozdějším věku onemocní cukrovkou, ale také mnohem větší počet dětí, které ji nikdy nedostanou. Podobné je to i s markery humorální imunity (3).

Dobře definovanou skupinou s obecně zvýšeným rizikem jsou prvostupňoví příbuzní pacientů s již manifestovaným diabetem 1. typu, tedy jejich rodiče, děti nebo vlastní sourozenci. V rámci několika rozsáhlých mezinárodních projektů jsou u nich testovány a používány různé protokoly predikce. Doporučované postupy pro stanovení rizika vzniku diabetu 1. typu u prvostupňových příbuzných preferují pro screening první linie stanovení autoprotilátek asociovaných s diabetem (autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové GAD 65, autoprotilátky proti tyrozinofosfatáze IA-2 a protilátky proti inzulinu IAA identifikují asi 85 % jedinců, u kterých diabetes skrytě probíhá/vznikne v pozdějším věku). Pacienti pozitivní pro jednu či více autoprotilátek jsou dále vyšetřeni na genetické a metabolické markery, aby bylo možno riziko ještě přesněji definovat (4). Tento algoritmus nicméně není vhodný pro běžnou populaci vzhledem k výrazně nižším prediktivním hodnotám a používá se zatím pouze pro výzkumné účely k identifikaci vhodných kandidátů pro testování různých možností prevence diabetu 1. typu. Obrázek 2 ukazuje pro ilustraci postup vyšetření používaný na naší klinice v rámci projektu predikce diabetu k vyšetření dětí rodičů léčených pro diabetes nebo sourozenců diabetiků.

Jak zabránit vzniku a rozvoji cukrovky?

Možné linie prevence můžeme rozdělit do tří kategorií dle doby použití vzhledem k průběhu autoimunitní reakce:

Primární prevence – plošná pro populaci s vysokým genetickým rizikem rozvoje diabetu, provedená však ještě před rozvinutím jakýchkoliv známek autoimunity (pozitivity autoprotilátek).

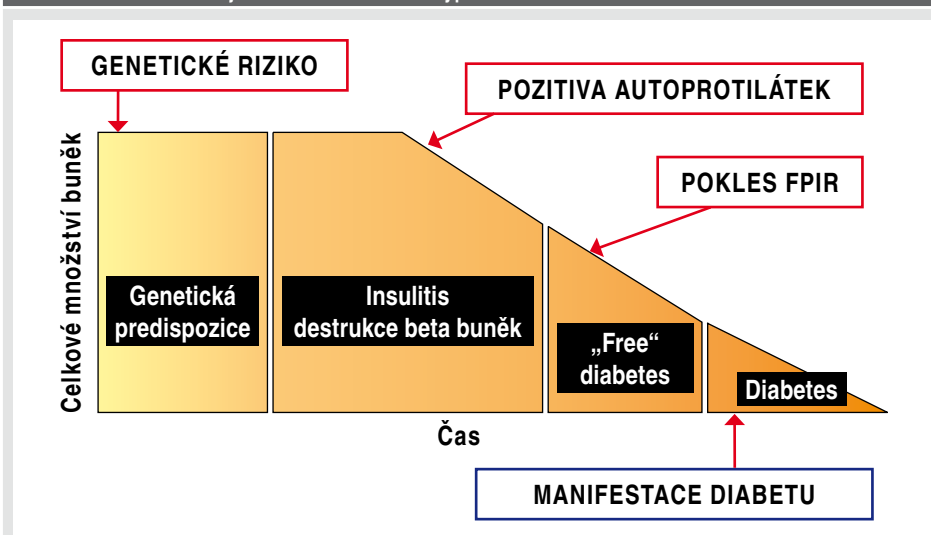
Sekundární prevence – zaměřená na zpomalení nebo lépe úplné zastavení destrukce beta buněk u euglykemických pacientů s pozitivními autoprotilátkami. Tento typ intervence se zaměřuje především na prvostupňové příbuzné stávajících diabetiků se sérologickými a/nebo metabolickými známkami již probíhající autoimunitní reakce, kteří představují dobře vyhledatelnou a vysoce motivovanou skupinu pro spolupráci na výzkumných projektech.

Terciární prevence – probíhá po manifestaci diabetu a je zaměřená na zachování co největšího množství ze zbývajících beta buněk po co nejdelší dobu, tedy prodloužení remise, zlepšení metabolické kontroly a snížení rizika pozdních komplikací, nebo dokonce regeneraci či nahrazení beta buněk již zničených. Do kategorie terciární prevence tak vlastně spadají také možnosti kauzální léčby diabetu. Pro zjištění a porovnání úspěšnosti jednotlivých metod se používá hladina C peptidu jako ukazatele vlastní, byť i jen zbytkové sekrece inzulinu.

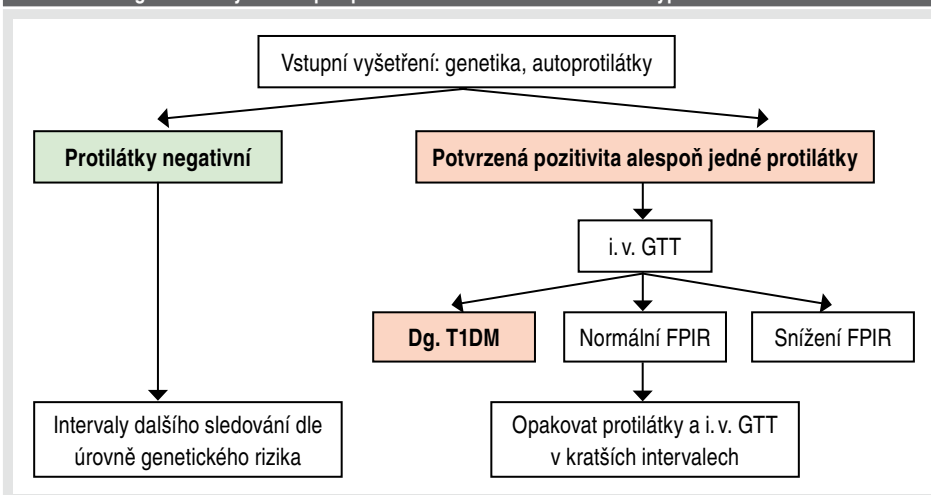
Primární prevence

V současnosti probíhá pouze jedna studie zaměřená na primární prevenci, **TRIGR** (Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk), testující možný vliv bílkovin kravského mléka podávaných v časném kojeneckém věku. Tato hypotéza je založena jednak na zvířecích modelech, kde při podávání hydrolyzovaného mléka došlo k nižší incidenci onemocnění u kmeňů hlodavců náchylných na diabetes, jednak na prospektivních studiích prokazujících nižší incidenci onemocnění u plně kojených dětí než u dětí záhy krmených umělou výživou. Jedná se o prospektivní randomizovanou dvojité zaslepenou studii se širokou mezinárodní účastí. Do studie jsou zařazováni novorozenci s rodičem a/nebo sourozencem léčeným pro diabetes 1. typu po potvrzení nosičství některého z rizikových genotypů. Studie plně podporuje kojení, jakmile však dítě potřebuje mléčný přírtek, dostává do věku 6–8 měsíců speciální nutriční přípravek dle randomizace (Nutramigen x běžný kojenecký přípravek na bázi kravského mléka). Děti jsou

Obrázek 1. Stadia rozvoje diabetes mellitus 1. typu



Obrázek 2. Algoritmus vyšetření pro predikci rizika vzniku diabetes 1. typu



pak sledovány až do věku 10 let. Údaje z pilotních studií vypadají slibně, nicméně první reálné výsledky s dostatečnou statistickou silou budou k dispozici až v roce 2012.

Vzhledem k velké atraktivitě nalezení bezpečné plošně aplikovatelné primární prevence byly opět na základě zvířecích modelů zahájeny dvě další pilotní studie jako podklad pro eventuální následný rozsáhlejší projekt, jedna založená na přidávání omega-3-mastné kyseliny DHA (kyseliny dokosahexenové) do kojenecké mléčné výživy, druhá na přidávání probiotických kmenů bakterií do stravy těhotných a kojících matek a následně jejich dětí v kojeneckém období.

Sekundární prevence

V blízké minulosti proběhlo a v současnosti probíhá několik studií na úrovni sekundární prevence, za nejdůležitější z nich jsou považovány nedávno dokončené projekty ENDIT, DPT-1 a dosud neuzaвершенá finská studie DIIPP.

ENDIT (European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial) – na zvířecích modelech bylo prokázáno, že vysoké dávky nikotinamidu působí jako pre-

vence rozvoje diabetu u náchylných kmenů. Hypotéza byla podporována i výsledky pilotní studie u ICA séropozitivních dětí. Dvojité zaslepená intervenční studie u prvostupňových příbuzných diabetiků s pozitivními ICA protilátkami v pětiletém sledování však neprokázala žádný pozitivní efekt podávání nikotinamidu v dávce 1,2 g/m²/d (max. 3 g/d) (10).

DPT-1 (Diabetes Prevention Trial Type 1) – inzulin a proinzulin jsou považovány za hlavní kandidáty na specifický antigen beta buněk, proti kterému je spouštěna autoimunitní reakce. Z výsledků testů na zvířecích modelech i z pilotní studie provedené u příbuzných diabetiků s vysokým rizikem rozvoje onemocnění se zdálo, že parenterálně podávaný inzulin může zabránit nebo opozdit manifestaci diabetu, rozsáhlá studie DPT-1 toto bohužel nepotvrdila. Studie měla dvě větve, do první z nich byli zařazeni příbuzní diabetiků s rizikem rozvoje onemocnění nad 50 % v příštích 5 letech, do druhé příbuzní s pětiletým rizikem 26–50 %. První skupina dostávala inzulin 2x denně subkutánně v dávce 0,125 UI/kg a 1x měsíčně intravenózně (kontrolní skupina byla pouze sledována, placebo nebylo podáváno). Ve druhé větvi studie

pacienti dostávali inzulin perorálně, 7,5 mg krystalického inzulinu denně, kontrolní skupina dostávala placebo. Po pěti letech sledování nebyly prokázány žádné rozdíly v rozvoji diabetu u skupiny s parenterálním ani perorálním podáváním inzulinu, nicméně malý efekt ve srovnání s placebo skupinou byl pozorován alespoň u části skupiny s perorální intervencí, u nichž byly zjištěny vysoké vstupní titry IAA (6).

DIIPP (Diabetes Prevention and Prediction Project) – studie zahájená ve Finsku v roce 1994 vyhledává děti s diabetickým rodičem a/nebo sourozencem. Po potvrzení rizikového genotypu jsou tyto děti pravidelně screenovány na rozvoj autoprotilátek asociovaných s diabetem. V případě positivity protilátek je rodinám nabízena možnost sekundární prevence. Tým studie DIIPP navázal na výše zmíněnou hypotézu o důležitosti inzulinu jako hlavního antigenu automunitní reakce, a tedy možnost zastavit progresi diabetu navozením imunologické tolerance organizmu k němu, podávají proto těmto rizikovým subjektům inzulin intranazálně (kontrolní skupina dostává placebo). Výsledky studie dosud nejsou známy.

Terciární prevence

Pro zastavení nebo alespoň zpomalení destrukce zbytku beta buněk, přítomných při manifestaci diabetu, je nutné nějakým způsobem ovlivnit probíhající autoimunitní zánět, potlačit ho, změnit reakci zodpovědných imunitních buněk nebo znovu navodit imunologickou toleranci. Možných přístupů je mnoho.

Nespecifická imunosupresiva

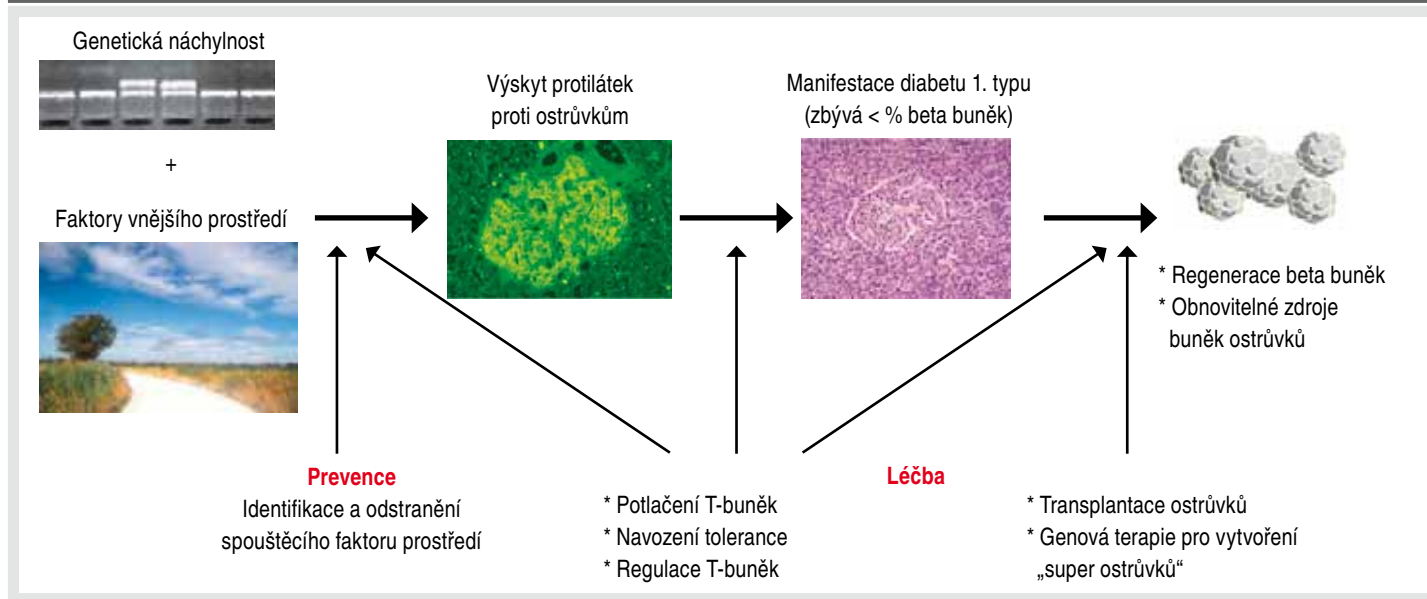
V 80. letech studie s podáváním cyklosporinu, azathioprinu a kortikoidů prokázaly účinnost imunosupresiv při „léčbě“ nově manifestovaného diabetu, nicméně ochranný účinek pro beta buňky nepřetrvával po vysazení imunosupresiv a vedlejší účinky jejich podávání nebyly slučitelné s trvalým podáváním, od této linie tedy bylo rychle ustoupeno (8). Výzkum je nyní směřován na specifitější způsoby potlačení aktivity T buněk zodpovědných za rozvoj diabetu.

Použití (modifikovaných) antigenů pankreatických ostrůvků

Alterovaná peptidická liganda – zprvu slibná studie používající alterovanou peptidickou ligandu inzulinu B: 9–23 bez přidání adjuvans nebo jiné imunomodulace neprokázala žádný její vliv na zastavení progresu diabetu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Pilotní studie používající celou molekulu **GAD65** (dekarboxylázy kyseliny glutamové) a imunomodulační peptid p277 odvozený z **HSP-60** (Heat Shock Protein) vykazují pozitivní účinky na zachování sekrece C-peptidu u čerstvě manifestovaných pacientů.

Obrázek 3. Možnosti prevence a léčby diabetu (11)



Anti CD3225 léčba – podávání monoklonálních protilátek proti CD3+ buňkám prokázalo kladný efekt na zvířecích modelech díky změně dynamiky populací regulačních T buněk, použití u lidí však bránily významné vedlejší účinky způsobené masivním uvolňováním cytokinů. Nedávno úspěšně testovaná humanizovaná modifikovaná monoklonální autoprotilátka, označovaná hOKT3 gl (Ala-Ala), tyto nežádoucí účinky nemá a v malé randomizované studii při intravenózním podávání po dobu 14 dnů bylo potvrzeno zlepšení sekrece C peptidu oproti kontrolní skupině, které přetrvává déle než 1 rok od jednorázové léčby. Podobná studie s jinou antiCD3 protilátkou ChAglyCD3 prokázala zachování reziduální funkce beta buněk nejméně po dobu 18 měsíců od léčby, efekt byl největší u pacientů s největší zachovalou masou beta buněk při manifestaci (12).

Antithymocytární globulin (ATG) – antithymocytární globulin je používán při orgánových transplantacích. Při podání časně po manifestaci diabetu však byl zjištěn pozitivní vliv na zpomalení progresu autoimunity na zvířecích modelech i v malém pilotním projektu na lidských subjektech. Byla proto zahájena větší randomizovaná studie, která má prokázat, zda čtyřdenní intravenózní podávání ATG navodí imunologickou toleranci a prodlouží vlastní sekreci inzulínu u pacientů s nově diagnostikovaným diabetem 1. typu.

Anti CD20 léčba – rituximab, anti CD 20 monoklonální protilátka s úspěchem používaná v léčbě protilátkami zprostředkovaných autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, systémový lupus erytematodes apod.), je další z léčiv v současné době testovaných v pilotních studiích.

Probíhají také další malé studie s novými imunosupresivními a imunomodulačními látkami (mykofenolát mofetil, monoklonální protilátky proti alfa podjednotce IL-2 receptoru, aj.)

Výsledky mnoha těchto pilotních projektů vypa-
dají slibně, bude nicméně nutné provedení velkých kontrolovaných multicentrických studií k potvrzení účinnosti jednotlivých imunomodulačních agens a zjištění jejich potenciální toxicity a bezpečnosti dlouhodobého používání.

Kauzální léčba

Diabetes mellitus 1. typu je definován jako ztráta schopnosti organismu produkovat inzulín. Kauzální terapie by tedy bylo znovuobnovení vlastní sekrece inzulínu, ať již stimulací vzniku vlastních buněk produkujících inzulín nebo jejich transplantací v některé formě. Na rozdíl od výše zmíněného výčtu experimentálních postupů jsou některé formy této léčby již aplikovány i v klinické praxi.

Transplantace pankreatu a transplantace ostrůvků

Transplantace pankreatu, ať již samotného nebo v kombinaci s ledvinou, je už po dlouhá léta relativně úspěšným terapeutickým zásahem indikovaným u pacientů s těžkými dlouhodobými komplikacemi, především diabetickou nefropatií a retinopatií. Jako každá orgánová transplantace nicméně vyžaduje doživotní imunosupresi se všemi riziky z toho vyplývajícími, počet transplantovaných je také limitován počtem dárců. Alternativním postupem jsou nově zaváděné transplantace pankreatických ostrůvků injikovaných do portálního řečiště, přes menší invazivitu výkonu však byly výsledky až do nasazení takzvaného Edmontonského protokolu imunosuprese (15) velmi neuspokojivé. V současnosti všechna

centra transplantující ostrůvky používají tento protokol kombinující daclizumab, sirolimus a tacrolimus, a dosahují tak v průměru 55% pacientů plně nezávislých na inzulínu 1 rok od transplantace. Na vysokém procentu ztracených graftů se kromě standardní allogenní reakce podílí také přetrvávající aktivní autoimunitní reakce. I když po pěti letech je plně inzulín independentní jenom kolem 10% transplantovaných, přes 80% ze všech pacientů stále vykazuje nějakou vlastní sekreci C peptidu, a tedy výrazně lepší metabolickou kontrolu a signifikantní snížení rizika krátkodobých i dlouhodobých komplikací (14). Vedle nežádoucích účinků dlouhodobé kombinované imunosuprese i zde hlavním limitem zůstává nedostatek dárců, pro jednoho příjemce je totiž potřeba extrahovat buňky od dvou i více dárců dle kvality pankreatu. Pro možnost většího rozšíření transplantace ostrůvků bude nutné nalézt další zdroj buněk pro tento typ transplantace vhodných.

Regenerace beta buněk, léčba kmenovými buňkami, genová terapie

Možnost získání většího množství buněk produkujících inzulín je důležitým tématem nejen jako zdroj materiálu pro transplantace ostrůvků, ale především jako lákavá možnost přímé kauzální léčby diabetu nahrazením buněk autoimunitním procesem již zničených.

Probíhají experimenty s diferenciací nových beta buněk z různých pankreatických tkání po jejich dediferenciaci, z multipotentních pankreatických prekurzorů i cíleným množением beta buněk již nějakou cestou regenerovaných. Kmenové buňky, ať již embryonální nebo dospělé, nabízejí další potenciální zdroj pro diferenciaci beta buněk. Při použití dospělých kmenových buněk z jiných linií by navíc nedocházelo k autorejekcím, protože by mohly být použity

přímo autologní kmenové buňky pacienta. Podobná strategie léčby je založena na přeměně jiných somatických buněk na buňky produkující inzulin, jmenovitě hepatocytů po vložení genu pro inzulin pod kontrolou promotorového genu pro myší inzulin. Buňky ostrůvků se sníženou imunogenicitou, pocházející z transgenních prasat, jsou připravovány k prvním klinickým testům u lidí jako další možnost (5).

Přestože by mnoho těchto strategií mohlo přinést slibnou možnost alternativní kauzální léčby diabetu 1. typu, nelze doufat, že i po překonání všech technických obtíží budou při trvale probíhající autoimunitní reakci bez vhodné imunomodulace dlouhodobě úspěšné. Bude nutné se tedy zaměřit na možnost produkce buněk méně imunoreaktivních a nějakým způsobem provedenou blokádu autoreaktivních T lymfocytů.

Závěr

Jsme zatím stále ještě na míle vzdáleni objevení zázračné pilulky pro léčbu diabetu, nicméně z již získaných podrobných poznatků o průběhu tohoto onemocnění můžeme vytyčit dva hlavní směry pátrání po jeho účinné a definitivní léčbě (obrázek 3).

První z linií možné obrany je prevence rozvoje autoimunity jako takové. Tato velmi atraktivní, byť ambiciózní strategie by mohla být reálná, pokud se podaří identifikovat spouštěcí faktory prostředí a ty následně eliminovat. V druhé linii se můžeme snažit zastavit a zvrátit průběh již probíhajícího autoimu-

nitního procesu, nejlépe v kombinaci s regenerací a/nebo novotvorou beta buněk. Navození imunologické tolerance expozicí různým antigenům beta buněk, změna nastavení imunitního systému použitím regulačních T lymfocytů i nových imunomodulancí budou zbraně použité v této linii. Soustředěné výzkumné úsilí na mnoha frontách, od epidemiologie po molekulární biologii, od experimentů na tkáňo-

vých kulturách po velké klinické studii, přináší dobré podklady pro naději a důvěru, že kauzální léčba tohoto závažného celoživotního onemocnění s celosvětově stále stoupající incidencí je již na obzoru.

MUDr. Pavla Mendlová

Pediatrická klinika FN Motol a 2. LF UK
V Úvalu 84, 150 00 Praha 5
e-mail: pavla_mendlova@centrum.cz

Literatura

1. Atkinson M, Eisenbarth G. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; 358: 750–754.
2. Bach JF. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2005; 25: 74–80.
3. Bingley PJ, Williams AJK, Bonifacio E. Prediction of IDDM in the general population. Strategies based on combination of autoantibody markers. *Diabetes* 1997; 46: 1701–1710.
4. Bingley PJ, Williams AJK, Gale EAM. Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. *Diabetes Care* 1999; 22: 1796–1801.
5. Casu A, Trucco M, Pietropaolo M. A look to the future: prediction, prevention and cure including islet cell transplantation and stem cell therapy. *Pediatr Clin N Am* 2005; 1779–1804.
6. DPT-1 Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with T1DM. *N Engl J Med* 2002; 346: 1685–1691.
7. EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes. *Lancet* 2000; 355: 873–876.
8. Feutren G, Papoz L, Assan R et al. Cyclosporin increase the rate and length of remissions in insulin dependent diabetes of recent onset. Results of a multicenter double blind trial. *Lancet* 1986; 2: 119–124.
9. Foulis AK, McGill M, Faurquaharson MA. Insulinitis in T1DM in man – macrophages, lymphocytes and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 1991; 165: 97–101.
10. Gale EA, Bingley PJ, Emmet CL et al. ENDIT: a randomised controlled trial of intervention before onset of T1DM. *Lancet* 2004; 363: 25–31.
11. Gillespie K. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ* 2006; 175(2): 165–170.
12. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset T1DM. *N Engl J Med* 2005; 352: 2598–2608.
13. Nerup J, Platz P, Andersen OO et al. *Lancet* 1974; 2: 864–866.
14. Ryan EA, Patty BW, Senior PA et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060–2069.
15. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA et al. Islet transplantation in seven patients with T1DM using a glucocorticoid free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230–238.
16. Skyler JS. Prediction and prevention of type 1 diabetes: progress, problems and prospects. *Clin Pharmacol Ther.* 2007; 81(5): 768–771.
17. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E et al. Combined use of autoantibodies in T1DM. Combinatorial Islet autoantibody workshop. *Diabetes* 1998; 47: 1857–1866.