

Abstrakt

Úvod: Diabetes mellitus je polygenní onemocnění, na jehož vzniku se určitou měrou podílí i environmentální faktory. Vrozená imunita spouští nespecificky první obranné reakce po proniknutí patogenu do organismu, zároveň však nadměrná stimulace složek vrozené imunity může zapříčinit vznik autoimunitních onemocnění, mezi které patří i diabetes 1. typu. Složkami vrozené imunity jsou kromě jiných i Toll-like receptory (TLRs) patřící do skupiny struktur rozeznávajících konzervované molekulární struktury charakteristické pro patogeny. Toll-like receptory jsou hojně exprimovány monocyty, které produkují prolaktin (PRL) mající imunostimulační funkci. Pro objasnění role přirozené imunity v patogenezi diabetu jsme sledovali expresi mRNA i proteinu TLR2 a TLR4. Expresi PRL jsme sledovali pouze na úrovni mRNA. Monocyty jsme pomocí průtokové cytometrie rozdělili na klasické (CD14++) a neklasické (CD14+) a sledovali jejich procentuální zastoupení a míru exprese CD14 antigenu na jejich povrchu. Dílčím cílem této diplomové práce byla optimalizace stimulací monocytů pro plánovanou studii funkce mimohypofyzárního prolaktinu in vitro a určení vhodnosti využití buffy coatů zdravých dárců jako zdravé kontroly.

Materiál a metody: Pro sledování exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 bylo do studie zahrnuto 30 pacientů s autoimunitním diabetem (AD), 16 s diabetem 2. typu (T2D), 25 nediabetických pacientů (nonDM), 25 buffy coatů a 24 zdravých kontrol zpracovaných metodou Real Time PCR s PGK1 jako endogenní kontrolou. Na detekci povrchových proteinů bylo zpracováno 19 AD, 8 T2D, 6 nonDM pacientů a 24 zdravých kontrol. Buffy coaty uvedé výše byly použity pouze pro studii porovnání exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 buffy coatů a zdravých kontrol. Pro optimalizační pokusy byly prezentovány výsledky získané zpracováním plné krve od 5 zdravých jedinců.

Výsledky: Pacienti s AD vykazovali zvýšenou expresi mRNA TLR2 oproti zdravým kontrolám, na úrovni proteinu však nebyl tento jev pozorován. Expresi mRNA TLR4 nebyla zvýšena u AD pacientů oproti kontrolám, a to ani na úrovni proteinu, kde byla dokonce oproti kontrolám nižší. U pacientů s AD nedošlo ke zvýšení exprese mRNA PRL oproti zdravým kontrolám. Pacienti s AD mají oproti zdravým kontrolám méně CD14++ i CD14+ buněk, ale na jejich povrchu bylo detekováno více CD14 molekul než u zdravých kontrol. Expresi všech sledovaných markerů se lišila u skupiny buffy coatů zdravých dárců krve a zdravých jedinců odebraných standardním způsobem do systému Vacuette®.

Závěr: Ačkoli jsou TLRs důležitou složkou vrozené imunity, v rámci naší studie nebyly zaznamenány zásadní rozdíly v expresi mRNA ani proteinu v monocytech AD pacientů a zdravých kontrol. Snížené počty CD14⁺⁺ a CD14⁺ monocytů u AD a T2D pacientů a naopak významně vyšší exprese CD14 proteinu u těchto skupin oproti kontrolám značí, že právě monocyty by mohly hrát důležitou roli v patogenezi diabetu. Porovnáním exprese mRNA buffy coatů zdravých dárců krve a zdravých kontrol jsme zjistili signifikantní rozdíly v expresi PRL, TLR2 a TLR4, a proto se domníváme, že není vhodné použití buffy coatů jako zdravých kontrol.

Klíčová slova: diabetes, monocyty, vrozená imunita, Toll-like receptory, prolaktin