

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium biomedicíny



MUDr. Marianna Durilová

Cytokinová polarizace u imunopatologicky podmíněných chorob

Cytokine polarisation in immunopathological disorders

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. MUDr. Kateřina Štechová, PhD.

Praha, 2014

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17.3.2014

MUDr. Marianna Durilová

Poděkování

Děkuji své školitelce doc. MUDr. Kateřině Štechové, PhD za odborné vedení a trpělivost, všem spoluautorům za spolupráci, pacientům a rodičům vyšetřovaných dětí za poskytnutí vzorků, a svému manželovi za podporu.

Abstrakt

Cytokiny jako primárními modulátory buněk imunitního systému hrají klíčovou roli v jejich vývoji a další aktivitě. Cytokinový profil mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) odráží tedy logicky děje, které se uplatňují v patogenezi onemocnění spjatého s nějakou imunologickou dysbalancí. **Ve své práci jsem se zabývala několika imunopatologickými stavy (diabetes mellitus 1. typu, autoimunitní tyreoiditida, alergická kolitida), u kterých je popisována cytokinová dysbalance. Snažila jsem se najít charakteristické rysy cytokinového profilu každého konkrétního onemocnění a poukázat na to, co je spojuje resp. odlišuje.**

K analýze cytokinového spektra byla použita metoda proteinové array a metoda ELISA. Vyšetřovaná byla produkce cytokinů mononukleárními buňkami periferní a pupečnickové krve *in vitro* (nativní, ale i po specifické stimulaci) a dále pak hladina cytokinů v mateřském mléce. První chorobou, na kterou jsem se zaměřila, byl **diabetes 1. typu** (T1D), kdy byli studováni jednak pacienti s touto chorobou (n = 10) a dále pak jejich prvostupňoví příbuzní (n = 9). Zvláštní skupinu prvostupňových příbuzných pak představovali novorozenci, jejichž jeden z rodičů je pro tuto chorobu léčen (n = 52). U pacientů v prediabetické fázi dominovala spontánní i poststimulační produkce Th1 asociovaných cytokinů (IFN- γ , TNF- β) zatímco v době stanovení diagnózy T1D jejich produkce poklesla a byla potlačena alespoň po dobu 2 let od stanovení diagnózy. Imunologický profil u nově diagnostikovaných pacientů se vyznačoval dominantní produkcí Th3/Tr1 asociovaných cytokinů (TGF- β a IL-10), ale současně i značnou produkcí prozánětlivých cytokinů (TNF- α a IL-6) a chemokinů (MCP-1 a MIG). Pouze buňky získané v prediabetické fázi od pacientů s vysoce rizikovým profilem byly schopné indukovat Th2 imunitní odpověď, a to zvýšenou produkcí IL-5 po stimulaci mitogenem (fytohemaglutininem).

Imunologická odpověď mononukleárních buněk plodu je ovlivněna hyperglykemií matky s T1D, ale i samotným autoimunitním prostředím matky, což může vést k nižšímu výskytu T1D u dítěte. Odpověď spíše ve směru Th1 byla přítomná u dětí diabetických otců a dále pak u perfektně kompenzovaných matek diabetiček.

Dalším studovaným imunopatologickým stavem byla **autoimunitní tyreoiditida** (AT) (47 pacientů s AT, 37 kontrol). Infekční patogeny se mohou podílet na etiopatogenezi autoimunitních nemocnění. Imunoregulační mechanismy by měly zabezpečovat prevenci chronické infekce, ale i prevenci přílišné agresivity, která může vést k patologické autoreaktivitě. Antigeny infekčních patogenů mohou ale vést k autoreaktivitě, jak bylo

pozorováno *in vitro* právě na produkci chemokinů a zánětlivých cytokinů (IL-6) u pacientů s AT v reakci na stimulaci PBMC specifickými antigeny bakterie *Helicobacter pylori* (HP).

Cytokiny v mateřském mléku jsou důležitými biologicky aktivními faktory, které nahrazují roli chybějících imunitních mechanismů novorozence a současně působící ve vyvíjejícím se imunitním systému kojeného dítěte. Jejich hladiny v mléku vykazují značnou interindividuální variabilitu a jejich dysbalance může souviset s rozvojem některých imunologicky podmíněných onemocnění. Významně vyšší hladina Th1 cytokinu IFN- γ spolu s nižší hladinou regulačního cytokinu TGF- β byla nalezena v mateřském mléku, které dostávali kojenci s alergickou kolitidou (n = 20) oproti zdravým kojencům (n = 20).

Mezi kandidátní cytokiny podílející se na nutričním programování kojenců patří adiponektin, leptin a AFABP, které jsou také označovány jako regulační hormony příjmu potravy a glukózo-lipidového metabolismu. Všechny tyto cytokiny byly přítomny v mateřském mléku po celé období 12 měsíců laktace. Hraničně pozitivní korelace byla nalezena mezi hladinou adiponektinu v mateřském mléku 6 měsíců po porodu a váhovým přírůstkem kojenců v průběhu prvního roku života. U adipofilinu, který je hlavní součástí membrány tukových kapének v mléku, korelace s výživovými parametry matek ani kojenců nebyla nalezena.

Závěrem lze konstatovat následující: společné pro studované autoimunitní choroby bylo tedy perzistentní prozánětlivé ladění imunitních reakcí pacientů. V případě analýzy mateřského mléka jsme pak potvrdili, že asociace mezi cytokinovým spektrem mateřského mléka a přítomností imunopatologické choroby (alergické kolitidy) je zřejmá.

Abstract

Cytokines as primary modulators of immune system cells play a key role in their development, maintenance and activity of each cell population. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells thus reflects the immunopathological events involved in pathogenesis of the disease. **Focus of my thesis was cytokine dysbalance in several immunopathological disorders (type 1 diabetes mellitus, autoimmune thyroiditis, allergic colitis) with the aim to find distinctive cytokine profile of each disorder and to point out common features and differences in these disorders.**

Protein array and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method were used for analysis of cytokines in breast milk and cytokines produced *in vitro* by peripheral and cord blood mononuclear cells spontaneously and after stimulation by autoantigens.

First immunological disorder to study was type 1 diabetes mellitus (T1D), where patients with T1D were studied (n = 10) as well as their first degree relatives (n = 9), with particular group of neonates whose one parent suffered from T1D (n = 52). In patients with T1D prediabetic phase was dominated by spontaneous and poststimulatory production of Th1-associated cytokines (IFN- γ , TNF- β) which dropped at the time of T1D manifestation and remained suppressed for at least two following years. Immunological profile of newly diagnosed patients with T1D was distinguished by dominant production of Th3/Tr1-associated cytokines (TGF- β and IL-10) and simultaneously a marked production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and chemokines (MCP-1 and MIG). Exclusively high risk relatives in prediabetic phase were able to induce Th2 type immunological response by increased production of IL-5 after nonspecific stimulation by mitogen (phytohemagglutinin). Immunological response of cord blood mononuclear cells is influenced by hyperglycaemia of the mother with T1D along with her autoimmune environment and this might lead to lower occurrence of T1D in the child. Th1-like immunological response was seen in children of diabetic fathers and in children of diabetic mothers with perfect compensation of their diabetes.

Infectious pathogens might play role in etiopathogenesis of autoimmune disorders. Mechanisms of immune regulation should avert chronic infection but at the same time prevent from excessive aggressivity which might lead to pathological autoreactivity. However, antigens of infectious pathogens might induce autoreactivity as was demonstrated on production of chemokines and inflammatory cytokines (IL-6) in patients with autoimmune

thyroiditis (AT) after stimulation with specific antigens of bacterium *Helicobacter pylori* (47 patients with AT vs. 17 controls).

Cytokines in breast milk are important biologically active factors which often compensate for missing immune mechanisms of the neonate and influence the developing immune system of the breastfed infant. Concentrations of cytokines in breast milk show great interindividual variability and cytokine dysbalance might contribute to the development of immunopathological disorders in infant. Significantly higher concentration of Th1 cytokine IFN- γ together with lower concentration of regulatory cytokine TGF- β was found in breast milk of mothers whose infants developed allergic colitis (n = 20) compared to healthy infants (n = 20). Adiponectin, leptin and AFABP, otherwise known as regulatory hormones of food intake and glucose and lipid metabolism, are candidate cytokines investigated as possible factors involved in nutritional programming of infants. These cytokines were detectable in breast milk until 12 months after delivery. Borderline positive correlation of adiponectin in breast milk at 6 months after delivery and weight gain of infant during the first year was found in our study. Adipophilin, which is the key factor in production and excretion of lipid droplets into breast milk, showed no correlation with nutritional factors of mothers nor infants.

In summary, it is concluded that there was a persistent proinflammatory tendency of immunological reactions common for all studied autoimmune disorders. In case of breast milk cytokine analysis it was confirmed that there is apparent association between cytokine spectrum of breast milk and the presence of immunopathological disorder (allergic colitis) in infant.

Obsah

Seznam zkratk	10
1. Teoretický úvod	14
1.1. Imunita a její složky	14
1.2. Cytokiny	17
1.2.1. Definice	17
1.2.2. Nomenklatura cytokinů	198
1.2.3. Cytokinové receptory	21
1.3. Cytokinová polarizace a současný pohled na dělení Th lymfocytů	23
1.4. Imunopatologie, u kterých se v patogenezi uplatňuje vychýlení polarizace imunitního spektra	31
1.4.1. Autoimunitní onemocnění	33
1.4.1.1. Diabetes mellitus 1. typu	36
1.4.1.2. Autoimunitní tyreoiditida	38
1.4.2. Alergická onemocnění	39
1.5. Ontogeneze imunitních reakcí, situace u novorozence	47
1.5.1. Ontogeneze imunity	47
1.5.2. Situace u novorozence	49
1.5.3. Reakce mononukleárních buněk pupečnickové krve (CBMC)	53
1.5.4. Mateřské mléko, jeho složení a význam pro imunitní systém a obranyschopnost dítěte	53
1.5.5. Vliv kojení na zdraví a vývoj dítěte	57
1.6. Teoretické poznámky k použité metodice	60
1.6.1. Možnosti detekce cytokinů	60
1.6.2. Použité metody	56
1.7. Klinické vyšetření v alergologii	61
2. Vlastní experimentální část	63
2.1. Seznam publikací, které jsou podkladem k disertační práci	63
2.2. Změna dominantního Th1 profilu v prediabetické fázi na Tr3 a protizánětlivý profil při manifestaci diabetu	64
2.3. Vliv mateřské hyperglykémie na reaktivitu mononukleárních buněk pupečnickové krve na diabetogenní autoantigeny	68

2.4. Autoimunitní tyreoiditida a reaktivita na antigeny <i>Helicobacter pylori</i>	73
2.5. Cytokinové spektrum mateřského mléka a eozinofilní kolitída kojence.....	78
2.6. Analýza adiponektinu, AFABP, leptinu a adipofilinu v mateřském mléce v průběhu 12 měsíců laktace	83
3. Shrnutí a závěr	89
4. Seznam použité literatury.....	93
5. Příloha.....	104

Seznam zkratek

AD	atopická dermatitida
ADRP	protein asociovaný s diferenciací tukové tkáně (adipose differentiation-related protein)
AFABP	adipocytární protein vázající mastné kyseliny (adipocyte fatty acid-binding protein)
AHR	aryl uhlovodíkový receptor (aryl hydrocarbon receptor)
AIHA	autoimunitní hemolytická anemie
AIRE	gen autoimunitního regulátoru
AITD	autoimunitní onemocnění štítné žlázy (autoimmune thyroid disease)
APC	buňka prezentující antigen (antigen presenting cell)
APT	atopický epikutánní test (atopy patch test)
AR	alergická rinokonjunktivitida (rinitida)
BCR	receptor B lymfocytů pro antigen (B cell receptor)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
BMP	kostní morfogenní protein (bone morphogenetic protein)
BDNF	mozkový růstový faktor (brain derived neurotrophic factor)
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CBMC	mononukleární buňka pupečnickové krve (cord blood mononuclear cell)
CN	kontrolní skupina, Helicobacter pylori negativní
CP	kontrolní skupina, Helicobacter pylori pozitivní
CTL	cytotoxický T lymfocyt
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DTH	pozdní přecitlivělost (delayed type hypersensitivity)
EGF	epiteliální růstový faktor (epithelial growth factor)
EK	eozinofilní kolitída
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
FLG	filagrin

GAD	dekarboxyláza kyseliny glutamové
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte colony–stimulating factor)
GDF	růstový diferenciační faktor (growth differentiation factor)
GIT	gastrointestinální trakt
GM-CS	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte-monocyte colony–stimulating factor)
GRO	growth regulated oncogene
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HGF	růstový faktor hepatocytů (hepatocyte growth factor)
HP	Helicobacter pylori
IA-2	proteinová tyrozinová fosfatáza
ICAM	mezibuněčná adhezní molekula (intercellular adhesion molecule)
IFN	interferon
IGF	insulinu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IPEX	imunodysregulace, polyendokrinopatie, enteropatie, X vázaná (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome)
JAK	Janusova kináza
kDa	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
LCPUFA	polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long chain polyunsaturated fatty acid)
LFA	adhezivní molekula leukocytů (leukocyte function associated antigen)
LIF	faktor inhibující růst leukemických buněk (leukemia inhibiting factor)
LPS	lipopolysacharid
LT	lymfotoxin
MCP	membránový kofaktorový protein (membrane cofactor protein)
M-CSF	faktor stimulující kolonie monocytů (monocyte colony–stimulating factor)
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (major histocompatibility komplex)
MIF	faktor inhibující makrofágy (macrophage inhibiting factor)
MIG	monokin indukovaný interferonem gama (monokine induced by gamma interferon)
MIP	chemotaktický faktor pro monocyty (macrophage inflammatory protein)

mRNA	informační ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
NGF	nervový růstový faktor (neuronal growth factor)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NOD myši	neobezní diabetické myši (nonobese diabetic mice)
PAF	faktor aktivující krevní destičky (platelet activating factor)
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (pathogen associated molecular patterns)
PBMC	mononukleární buňka periferní krve (peripheral blood mononuclear cell)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PHA	fytohemaglutinin (phytohemaglutinin)
PRR	receptor rozeznávající molekulové vzory (pattern recognition receptor)
RA	revmatoidní artritida
RANTES	chemotaktický faktor (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted).
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RS	roztroušená skleróza
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (reverse transcriptase polymerase chain reaction)
SCF	faktor kmenových buněk (stem cell factor)
SLE	systémový lupus erythematosus
SPT	kožní prick test (skin prick test)
STAT	transkripční protein (signal transducer and activator of transcription)
T1D	diabetes mellitus 1. typu
T2D	diabetes mellitus 2. typu
TCR	receptor T lymfocytu pro antigen (T cell receptor)
Tfh	folikulární pomocný T lymfocyt (follicular helper cell)
Th	pomocný T lymfocyt
THP	skupina pacientů s autoimunitní tyreoiditidou, Helicobacter pylori pozitivní
THN	skupina pacientů s autoimunitní tyreoiditidou, Helicobacter pylori negativní
TLR	receptor skupiny Toll (toll like receptor)
TG	tyreoglobulin
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrotising factor)

Tr	regulační T lymfocyt (regulatory T cell)
Treg	regulační T lymfocyt
TSH	hormon stimulující štítnou žlázu (thyroid stimulating hormone)
TSLP	tymový stromální lymfopoietin (thymic stromal lymphopoietin)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VIP	vazoaktivní střevní peptid (vasoactive intestinal peptide)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

1. Teoretický úvod

1.1. Imunita a její složky

Lidský organismus je denně vystaven působení nejrůznějších patogenů. Díky imunitnímu systému, který je tvořen složitou sítí buněk, molekul a dějů, je však chráněn před škodlivými faktory, a to jak vnějších (bakterie, viry), tak i vnitřních (maligní transformace). Základní funkcí imunitního systému je rozpoznání a následná eliminace cizorodého antigenu, vytvoření imunologické paměti a tolerance antigenů organismu vlastních. Schopnost autoregulace imunitního systému je důležitým rysem imunitní odpovědi a při jejím selhání dochází ke vzniku alergie nebo autoimunitních nemocí. Odpověď organismu vůči infekci způsobené patogeny, se nazývá imunitní odpověď.

Imunitní systém je tvořen dvěma základními typy mechanismů, které jsou nevyhnutelné v obraně organismu, a to mechanismy specifické a nespecifické imunity. Nespecifické mechanismy jsou považovány za vrozené a jsou okamžitě připraveny bojovat proti širokému spektru patogenů, ale neposkytují trvalou imunitu a nejsou specifické vůči patogenu. Na druhou stranu specifické mechanismy jsou získány v průběhu života, jsou specifické pro jednotlivé patogeny a jsou klíčové v ochraně před opakující se infekcí díky schopnosti vytvořit dlouhodobou imunitu. Vrozená a získaná imunitní odpověď spolu úzce souvisí a společně poskytují pozoruhodně efektivní obranný systém vůči většině patogenů, se kterými se organismus může setkat.

Díky schopnosti rozpoznávat určité společné strukturní nebo funkční rysy mnoha patogenů dokáže nespecifický imunitní systém porazit velké množství různorodých patogenů. Využívá přitom několik typů mechanismů. V první linii obrany poskytované nespecifickým imunitním systémem stojí mechanické a fyzikálně-chemické bariéry organismu. Kůže a sliznice respiračního a gastrointestinálního traktu představují mechanickou bariéru, která v spolupráci s fyzikálně-chemickými bariérami, jako jsou pot, trávicí enzymy, střevní flora, surfaktant, hlen, sliny a slzy zabraňuje vstupu a eliminuje mnoho infekčních agens z organismu. Pokud některé patogeny překonají tyto bariéry a vyvolají zánět, do boje se zapojí druhá obranná linie, kterou představují buňky nespecifického imunitního systému. Základním úkolem nespecifické imunitní odpovědi je opsonizace nebo fagocytóza patogenů, aktivace komplementové kaskády a iniciace prozánětlivé odpovědi. Tyto úkoly vykonávají specializované buňky, jako např. granulocyty (neutrofilové, eozinofily, bazofily a mastocyty),

přirozeně cytotoxické buňky (přirození zabíječi - Natural Killer (NK)), $\gamma\delta$ T buňky, NKT buňky a fagocytující buňky (neutrofil, dendritické buňky a makrofágy) (Turvey, S.E. and Broide, D.H. 2010).

Granulocyty jsou první z buněk, které odpovídají na infekci. Na svém povrchu exprimují několik chemokinových a cytokinových receptorů, díky kterým rychle migrují do místa infekce, kde sekretují granule s antimikrobiálním obsahem a cytokiny, jenž pomáhají rekrutovat a aktivovat další buňky imunitního systému (Nathan, C. 2006; Appelberg, R. 2007; Kumar, V. and Sharma, A. 2010).

NK buňky hrají významnou roli v rejekci tumorů a zabíjení buněk infikovaných virem. Exprimují několik povrchových receptorů rozpoznávajících cílové buňky, které současně neexprimují inhibiční ligandy. Při setkání NK buněk s takovými buňkami se NK buňky aktivují a uvolňují cytotoxické granule obsahující perforin a granzymy, které jsou schopny zabít tumorosní nebo infikované buňky. NK buňky také produkují velké množství interferonu-gama ($\text{IFN-}\gamma$) a interleukinu 4 (IL-4), které pak aktivují další buňky imunitního systému (Orr, M.T. and Lanier, L.L. 2010).

$\gamma\delta$ T buňky jsou malou podskupinou T buněk s receptorem T buněk (TCR) složeného z řetězce γ a δ , na rozdíl od konvenčních T buněk nesoucích TCR receptor s řetězci α a β . Receptor $\gamma\delta$ T buněk funguje jako receptor rozpoznávající charakteristické struktury patogenů (pattern recognition receptor, PRR) a proto $\gamma\delta$ T buňky nepotřebují pro rozpoznání antigenu prezentaci antigenu jinými buňkami, ale dokáží na něj přímo reagovat. Nicméně, $\gamma\delta$ T buňky mají mnoho funkcí, které jsou důležité i pro specifickou imunitu (Witherden, D.A. and Havran, W.L. 2011).

Také NKT buňky nelze jednoznačně přiřadit k nespecifickému nebo specifickému imunitnímu systému. Představují malou populaci T buněk, která současně nese znaky jak NK buněk, tak i konvenčních T buněk. Většina NKT buněk exprimuje specifický transkripční faktor PLZF a invariantní receptor T buněk nazývaný u lidí Va24. Tento receptor patří k receptorům rozpoznávajícím charakteristické struktury mikrobů (PRR) (v tomto případě glykolipidy) za účasti molekuly CD1 předkládající antigen. Po rozpoznání lipidů tímto receptorem secernují NKT buňky okamžitě cytokiny IL-4 a $\text{IFN-}\gamma$, které pomáhají řídit specifickou imunitní odpověď (Fox, L. et al. 2010).

Fagocyty jsou obdařeny schopností rozlišovat povrchové molekuly patogenu od povrchových molekul hostitele a po rozpoznání patogenu jej pohltnout. Jakmile je patogen uvnitř fagocytu, může se uplatnit několik mechanismů na jeho usmrcení. Součástí intracelulárních

kompartmentů fagocytu jsou antimikrobiální enzymy, proteiny a peptidy, které splynou s kompartmentem obsahujícím patogen a následně jej usmrcují. Fagocyty také produkují oxid dusnatý, superoxidový radikál a peroxid vodíku, který působí letálně na bakterie. Další funkcí fagocytů je právě klíčové propojení nespecifické a specifické imunitní odpovědi. Po pohlcení patogenu fagocylem dochází k jeho rozložení na menší peptidy, které jsou následně vázány na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) a tento komplex MHC s antigenem je transportován na povrch buňky, kde může aktivovat lymfocyty, a tak iniciovat specifickou imunitní odpověď (Stuart, L.M. and Ezekowitz, R.A. 2005; Blander, J.M. 2008; Procko, E. and Gaudet, R. 2009)

Schopnost rozlišovat cizorodé antigeny od hostiteli vlastních molekul je pro imunitní systém je rozhodující. Buňky nespecifického imunitního systému exprimují velké množství receptorů, které jsou schopny rozpoznat strukturální části charakteristické pro bakterie, viry, houby, parazity, tzv. molekulární vzory asociované s patogeny (pathogen associated molecular patterns, PAMP). Tyto receptory se označují PRR (pattern recognition receptors) a patří k nim např. receptory skupiny Toll (toll like receptors, TLR) a manózoový receptor na povrchu buněk a dále receptory skupiny NOD (NOD-like receptors) a RNA helikázy v cytoplasmě buněk (Kawai, T. and Akira, S. 2010; Kumagai, Y. and Akira, S. 2010). Po vazbě ligandu na PRR secernují buňky nespecifické imunity cytokiny a chemokiny, zvyšují expresi kostimulačních molekul na svém povrchu, zpracovávají a pak předkládají antigen buňkám specifického imunitního systému (Takeuchi, O. and Akira, S. 2010). Nejdůležitějšími buňkami prezentujícími antigen (APC, antigen presenting cells) jsou dendritické buňky a makrofágy (Rescigno, M. 2010).

Nejvýznamnější z buněk specifického imunitního systému jsou lymfocyty. T-lymfocyty jsou odpovědné za buněčnou imunitu, zatímco B-lymfocyty jsou odpovědné za protilátkovou imunitu.

T buňky se dělí do skupin podle exprese povrchové molekuly CD8 nebo CD4. CD8⁺ T buňky jsou cytotoxické T lymfocyty (CTL), které jsou díky svému cytotoxickému potenciálu důležité v obraně a eliminaci intracelulárních patogenů a dohledu nad tumory (Zhang, N. and Bevan, Michael J. 2011; Cox, M.A. et al. 2013). CD4⁺ T buňky se také nazývají pomocné T buňky (T helper cells, Th) jelikož poskytují pomoc jiným buňkám a řídí ostatní buňky a jejich efektorové funkce (Luckheeram, R.V. et al. 2012).

Hlavní funkcí B buněk ve specifické imunitní odpovědi je produkce protilátek. Receptory B buněk (BCR) rozpoznávají specifický antigen v nativní formě. Po navázání ligandu na BCR

dochází za asistence CD4⁺ buněk k diferenciaci B buněk na plasmatické buňky. Tyto buňky s krátkou životností produkují velké množství protilátek. Malý podíl plasmatických buněk přetrvává jako paměťové B buňky, jež jsou důležité při opakované infekci (Le Roux, D. and Niedergang, F. 2012).

B-lymfocyty dozrávají v kostní dřeni, zatímco u T-lymfocytů tento proces probíhá v tymu a až poté putují do periferních lymfatických orgánů, kde dále probíhá jejich diferenciaci po setkání s antigenem. Malá skupina CD4⁺ buněk je již diferencovaná při uvolnění z tymu, a to přirozené regulační T buňky (Treg) a přirozené zabíječské T buňky (NKT).

Imunitní systém je funkčně rozmanitý a dokáže vytvořit dokonalou odpověď proti nejrůznějším infekčním patogenům. Vznik imunitní odpovědi je ovšem podmíněn spoluprací buněk nespecifické imunity, jež rozeznávají chemické struktury charakteristické pro mikroorganismy, a T lymfocytů specifické imunity, které nesou specifické receptory pro daný patogen. Aktivace T lymfocytů závisí na interakci s profesionálními buňkami předkládajícími antigen (APC). Tyto specializované buňky nespecifické imunity jsou přímo aktivovány patogenem, který pohltí a následně ho vystaví na svém povrchu k prezentaci a aktivaci T buněk. T buňky poté prolifерují a spouštějí aktivaci dalších imunitních buněk nebo zabíjejí buňky infikované patogenem. Nejdůležitější z buněk aktivovaných T lymfocyty jsou B lymfocyty produkující protilátky. T lymfocyty odpovídají za to, jaký typ protilátek B buňky produkují a řídí i aktivitu ostatních imunitních buněk, čímž koordinují optimální průběh imunitní odpovědi na nejrůznější typy infekce. Na konci imunitní odpovědi podstupuje většina aktivovaných B a T buněk apoptózu, kromě paměťových buněk připravených reagovat v případě, že je organismus opět vystaven té samé infekci.

1.2. Cytokiny

1.2.1. Definice

Cytokiny jsou proteiny podobné hormonům, které umožňují buňkám imunitního systému komunikovat (podle názvu jde o protein produkovaný buňkou, který působí na jiné buňky). Cytokiny hrají integrální roli v regulaci imunitní odpovědi – její iniciaci, udržování a následné downregulaci. Jsou to malé proteiny (velikosti asi 15-25 kDa), které jsou produkovány obvykle jako odpověď na aktivační stimul a vazbou na specifické receptory indukují

odpověď. Sekrece těchto „tkáňových hormonů“ je krátkodobá (několik hodin až dní). Mohou působit autokrinně na buňky, které je produkují, parakrinně na přilehlé buňky, a některé i endokrinně ovlivňují chování vzdálených buněk po vstupu do krevního oběhu. Cytokiny jsou převážně solubilní molekuly, zároveň však existují i membránové formy. Typickým rysem cytokinů je pleiotropní účinek (působení na několik různých druhů buněk), působení v kaskádě (jeden cytokin indukuje tvorbu druhého) a redundance (jednotlivé cytokiny mohou být nahrazeny jinými). Koordinovaným působením různých cytokinů se synergickou nebo antagonickou aktivitou vzniká tzv. cytokinová síť. Cytokiny mohou mít velice široké spektrum účinku včetně účinku na buněčný růst, buněčnou diferenciaci, cytolytickou aktivitu efektorových buněk, apoptózu a chemotaxi. Porozumění účinku cytokinů je zásadní pro pochopení různých forem chování imunitního systému (Veerdonk, F.V.D. and Netea, M. 2013).

1.2.2. Nomenklatura a klasifikace

V současnosti chybí jednotný klasifikační systém cytokinů. Původní dělení na monokiny (cytokiny produkované monocyty a makrofágy) a lymfokiny (cytokiny produkované lymfocyty) se již považuje za poněkud obsoletní, jelikož se zjistilo, že cytokiny jsou produkovány mnoha různými buňkami.

Interleukiny jsou cytokiny produkované leukocyty působící na jiné leukocyty. Jednotlivé interleukiny byly identifikovány číslem vyjadřujícím pořadí, ve kterém byly objeveny (v současnosti IL-1 až 38) (Akdis, M. et al. 2011; Veerdonk, F.V.D. and Netea, M. 2013). Toto pojmenování nicméně nevyjadřuje jejich biologické vlastnosti. Navíc mnoho molekul, které patří k cytokinům, nebylo do této nomenklatury zahrnuto, ale zachovali si svůj původní název. Současný počet cytokinů není považován za konečný. Mezi cytokiny všeobecně řadíme interleukiny, chemokiny, interferony, transformující růstové faktory, faktory stimulující kolonie, faktory nekrotizující nádory a jiné růstové faktory.

Cytokiny lze klasifikovat *podle struktury* do několika skupin:

- a. **Hemopoiety** – obsahují ve své molekule 4 α -helikální úseky (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12 (podjednotka p35), IL-13, IL-15, IL-21, IL-23

- (podjednotka p19), IL-31, TSLP (thymic stromal lymphopoietin), G-CSF, GM-CSF, M-CSF, onkostatin M (OSM), LIF
- b. **Interferony a rodina IL-10** – obsahují 5 α -helikálních úseků (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29) (Zdanov, A. 2010)
 - c. **Rodina IL-1** – obsahují podobný úsek β soudek a váží se na receptory podobné imunoglobulinům. Vznikají jako cytoplazmatické prekurzory, jenž jsou sekretovány po proteolytické úpravě po přidatném zánětlivém stimulu (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18 (IL-1 γ), IL-1 δ , IL-36 α , IL-37, IL-36 β , IL-1 ϵ , IL-1Hy2, IL33, IL-38) (Veerdonk, F.V.D. and Netea, M. 2013)
 - d. **Rodina IL-12** – složená z nekovalentních heterodimerů dvou strukturně odlišných podjednotek (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35) (Hamza, T. et al. 2010)
 - e. **Rodina TNF** – mají tvar kompaktního „soudečku“ tvořeného antiparalelními úseky polypeptidového řetězce, většinou se vyskytují v trimerní formě a mnohé z nich jsou membránové molekuly (TNF, LT, TRAIL, OX40L, CD27L, CD30L, CD40L, FasL, CD70, 4-1BBL, RANK-L, APRIL, LIGHT, TWEAK, BlyS, BAFF) (Locksley, R.M. et al. 2001; Bodmer, J.L. et al. 2002)
 - f. **Rodina TGF- β** – dimery obsahující cystinový uzel kovalentně stabilizující jejich tvar (TGF- β 1,2,3; BMP (bone morphogenetic protein), růstové a diferenciacní faktory (GDF), aktiviny, inhibiny, Anti-Mülleriánský hormon (AMH) (Hinck, A.P. 2012)
 - g. **Chemokiny** – IL-8, MIP, MCP, RANTES a další malé molekuly (8-12 kDa), které lze podle uspořádání stabilizujících cystinových můstků rozdělit do skupin: CXC rodina, CC rodina, C rodina a C3CX. (Commins, S.P. et al. 2010)
 - h. **Rodina IL-17** – 6 strukturně podobných proteinů (IL-17A-IL-17F) obsahující neobvyklou sekvenci aminokyselin, kterou se liší od ostatních cytokinů (Gaffen, S.L. 2009; Commins, S.P. et al. 2010; Gaffen, S.L. 2011)
 - i. **Ostatní cytokiny** – strukturou nepodobné jiným cytokinům (IL-14, IL-16, IL-25, IL-32, IL-34, MIF a SCF).

Dělení cytokinů podle funkce.

Přestože jednotlivé cytokiny mohou mít více různých funkcí, lze je rozdělit do skupin podle jejich primární aktivity. Některé působí primárně jako růstové faktory pro T-lymfocyty nebo B-lymfocyty, jiné jako hlavní mediátory zánětu, zatímco jiné zánět a imunitní odpověď tlumí (Tabulka 1) (Dinarello, C.A. 2007). Funkční vlastnosti cytokinů jsou do určité míry dané

Funkční třída	Primární funkce	Ostatní účinky	Příklad
Lymfocytární růstové faktory	klonální expanze	polarizace Th1/Th2/Th17	IL-2, IL-4, IL-7, IL-17, IL-15
Th1 cytokiny	↑ Th1 odpověď	klonální expanze cytotoxických T buněk*	IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18
Th2 cytokiny	↑ Th2 odpověď	↑ produkce protilátek	IL-4, IL-5, IL-18, IL-25, IL-33
Th17 cytokiny	↑ Th17 odpověď, IFN- γ	autoimunitní odpověď	IL-17, IL-23, IFN- γ
Prozánětlivé cytokiny	↑ zánětlivé mediátory	↑ nespecifická imunitní odpověď	IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-12, IL-18, IL-23 MIF, IL-32, IL-33, CD40L
Protizánětlivé cytokiny	↓ zánětlivé geny	↓ smrtící účinky cytokinů	IL-10, IL-13, TGF- β , IL-22, IL-1Ra, IFN- α/β
Adipokiny	prozánětlivý	↓ autoimunitní odpověď, pro-atherogenní	IL-1 α , TNF- α , IL-6, leptin, adiponektin, resistin
Cytokiny signalizační dráhy gp130	růstové faktory	aktivace B buněk, akutní fáze	IL-6, CNTF, IL-11, LIF, CT-1
Nervové růstové faktory	↑ nervové/Schwannovy buňky	aktivace B buněk	BDNF, NGF
Cytokiny aktivující osteoklasty	resorpce kosti	stimulace imunitního systému	IL-3, IL-7, G-CSF, GM-CSF, M-CSF
Angiogenní cytokiny	neovaskularizace	pro-metastatické	VEGF, IL-1, IL-6, IL-8
Mezenchymální růstové faktory	fibróza	pro-metastatické	FGF, HGF, TGF- β , BMP
Interferony typu II	aktivace mikrořágů	↑ MHC II. třídy	IFN- γ
Interferony typu I	anti-virové, ↑ MHC I. třídy	protizánětlivé, antiangiogenní	IFN- α , IFN- β
Chemokiny**	↑ migrace buněk	↑ aktivace buněk	IL-8, MCP-1, MIP-1 α

Tabulka 1. Funkční skupiny cytokinů (Dinarello, C.A. 2007).

* Nezahrnuje solubilní cytokinové receptory sTNFRp55, sTNFRp75, sIL-1R typ II, protein vázající IL-18, osteoprotegerin

** Chemokinová rodina zahrnuje CC a CXC chemokiny

lokalizací jejich receptorů (např. receptor pro IL-33 se nachází pouze na mastocytech, zatímco receptory pro IL-1 a TNF- α lze najít téměř na každé buňce). Funkce cytokinů lze studovat

in vivo na zvířecích modelech (knock-out nebo transgenní myši) nebo *in vitro* v tkáňových kulturách.

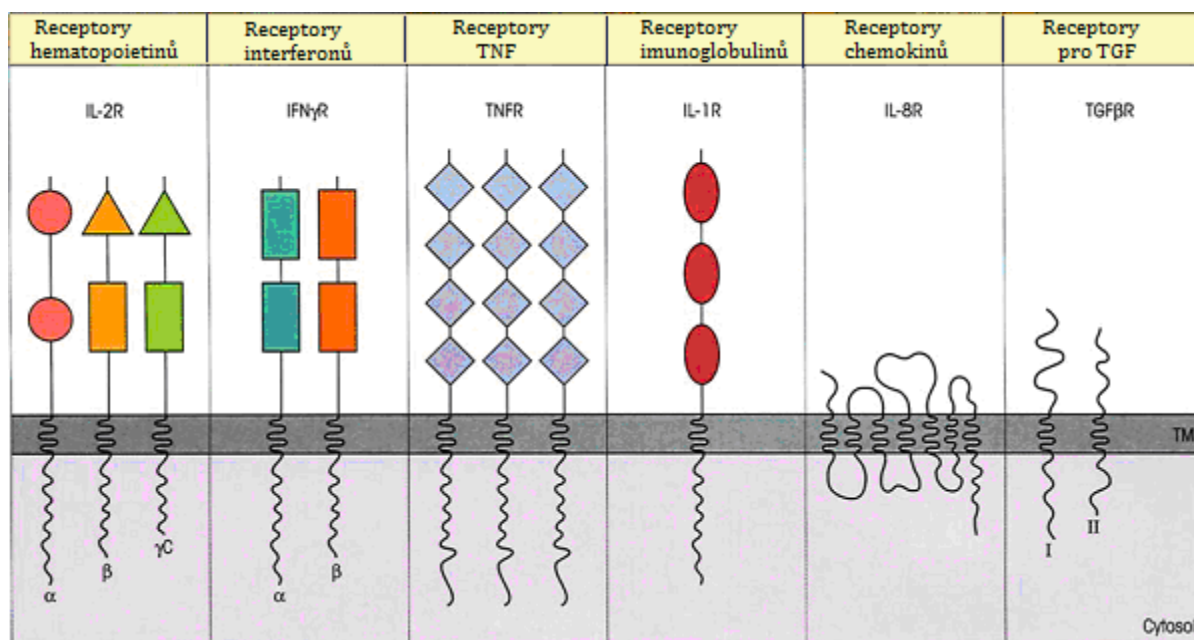
1.2.3. Cytokinové receptory

Receptory cytokinů jsou složeny ze 2-3 podjednotek, z nichž jedna je odpovědná za specifickou vazbu cytokinu a další za vazbu s nitrobuněčnými signalizačními molekulami. Po vazbě ligandu (cytokinu) dochází ke konformační změně a asociaci podjednotek receptoru a následně přenosu signálu do buňky.

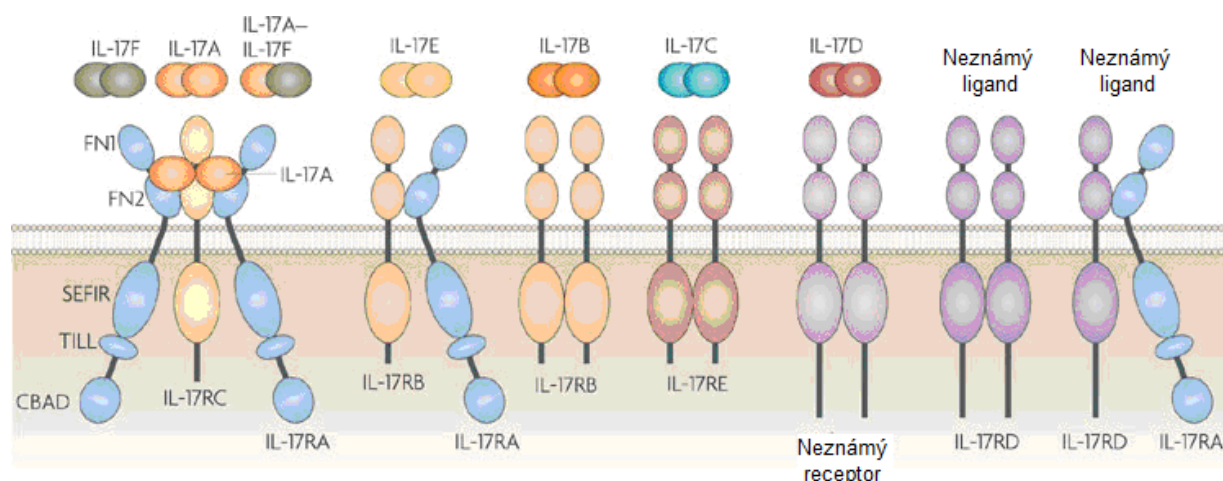
V současnosti se rozeznává **7 strukturálních skupin cytokinových receptorů** (Lee, S. and Margolin, K. 2011) (viz obrázek 1) :

- a. **Typ I (receptory hematopoietinů)** – obsahují 1 nebo 2 polypeptidové řetězce, které váží cytokin a další společně sdílený řetězec odpovědný za transdukcí signálu (γ C, β C nebo gp130)
- b. **Typ II (receptory interferonů a IL-10)** – obsahují 2 polypeptidové řetězce
- c. **Receptory TNF-** jejich polypeptidy jsou bohaté na cystein a po vazbě cytokinu trimerizují. Mají kostimulační nebo koinhibiční funkci. Patří k nim receptor pro CD27, CD30, CD40, CD120, LT- β .
- d. **Receptory imunoglobulinů** – obsahují extracelulární imunoglobulinovou doménu. Patří k nim receptor pro IL-1, IL-18, M-CSF a SCF (stem cell factor).
- e. **Receptory chemokinů** – cca 20 různých receptorů skládající se z G-proteinu asociovaným s transmembránovým segmentem polypeptidu, jenž prochází sedmkrát membránou. Zprostředkují aktivaci buňky a její migraci.
- f. **Receptory pro TGF** – obsahují cytoplasmatické části se serin/threonin kinázovou aktivitou
- g. **Receptor pro IL-17** – obsahuje 5 podjednotek IL-17RA – IL-17RE (obrázek 2) (Gaffen, S.L. 2009)

Společným rysem přenosu signálu do buňky u cytokinů je ligandem indukovaná dimerizace podjednotek cytokinového receptoru. Následuje aktivace signalizační dráhy, ve které hraje hlavní roli Janusovská rodina tyrozinkináz (JAK1, JAK2, JAK3 a TYK2) a transkripční faktor STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4,

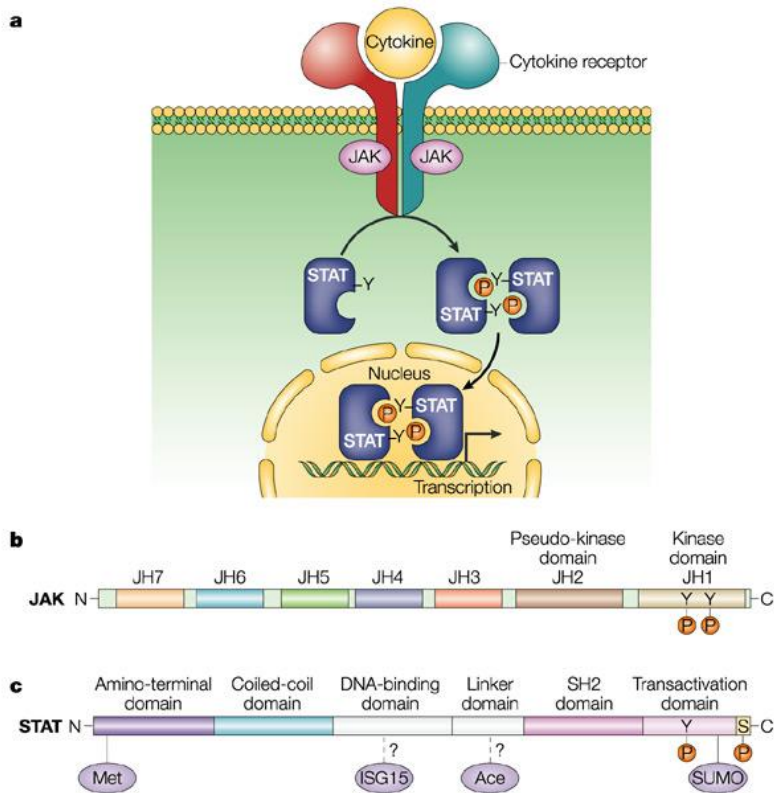


Obrázek 1. Skupiny cytokinových receptorů - hlavní strukturální rysy (Roitt, I.M. and Delves, P.J. 2001).



Obrázek 2. Receptor pro IL-17, vztahy mezi ligandem a receptorem a hlavní strukturální rysy (Gaffen, S.L. 2009).

STAT5A, STAT5B a STAT6), který přestupem do jádra buňky a svou vazbou aktivuje geny (Obrázek 3). Výsledkem vazby cytokinu na receptor a přenosu signálu do buňky je v závislosti na typu buňky, signálu a spolupůsobení dalších signálů ovlivnění buněčného cyklu, buněčného dělení, diferenciaci, indukce apoptózy nebo spuštění efektorových mechanismů (např. chemotaxe, degranulace atd.).

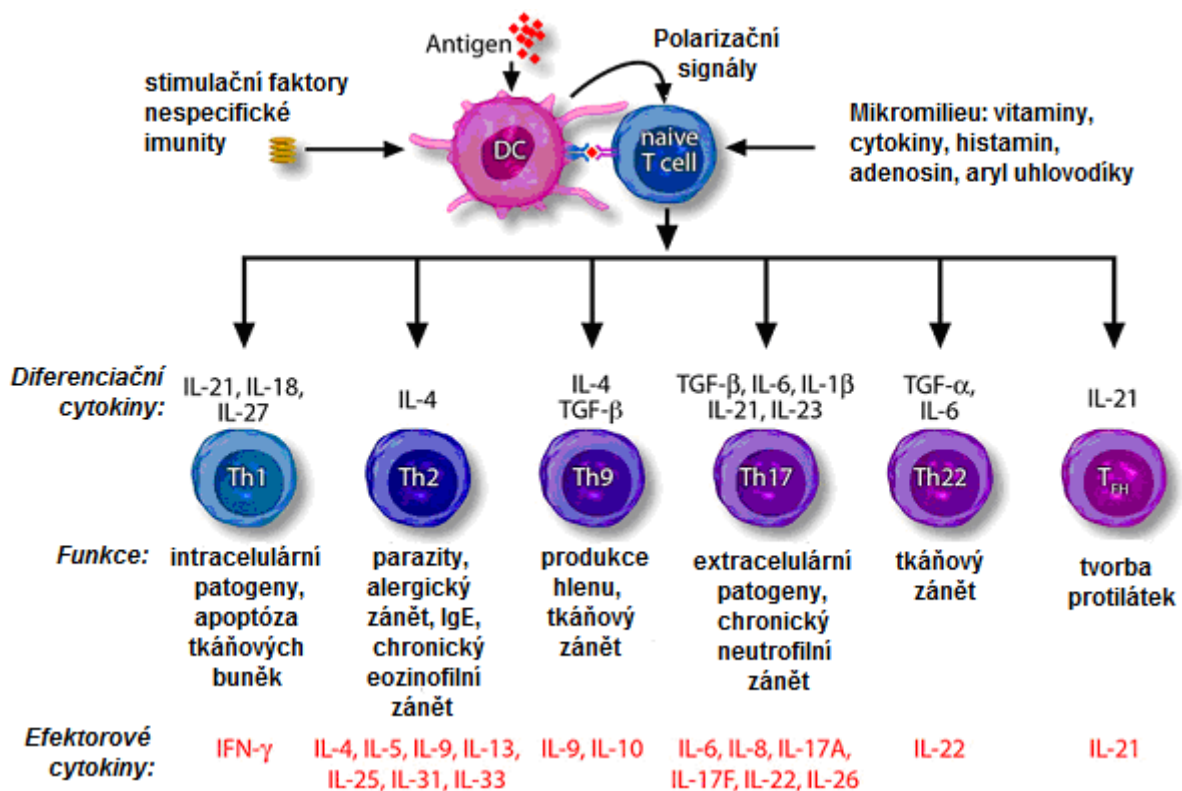


Obrázek 3. Signalizační dráha JAK-STAT (Shuai, K. and Liu, B. 2003)

- Po vazbě ligandu na receptor dochází k aktivaci JAK, která fosforyluje STAT proteiny. Následně fosforylované proteiny STAT dimerizují a přemísťují se do jádra, kde aktivují genovou transkripci.
- Struktura domén JAK.
- Struktura domén STAT.

1.3. Cytokinová polarizace a současný pohled na dělení Th lymfocytů

Cytokiny hrají zásadní roli v diferenciaci pomocných T buněk, při které se z naivních CD4⁺ T buněk (Th0) stávají efektorové T buňky. Tato funkce je zprostředkována přes signalizační dráhy, protože každý cytokinový receptor je asociovaný se specifickou JAK kinázou a specifickým STAT proteinem, na kterých závisí diferenciace a funkce jednotlivých buněčných linií Th. Po aktivaci zprostředkované přes receptor TCR se mohou naivní (prekurzorové) Th0 buňky diferencovat do několika hlavních efektorových linií (Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, Tfh a iTreg) podílejících se na různých typech imunitní odpovědi. Každá linie efektorových Th buněk exprimuje specifické transkripční faktory a produkuje specifický profil cytokinů, jež určují jejich efektorové funkce (obrázek 4).



Obrázek 4. Diferenční dráhy Th buněčných linií. V závislosti na přídatných faktorech při expozici antigenu, na stavu buněk a cytokinů v prostředí se naivní CD4+ T buňky mohou diferencovat do linií Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, nebo folikulární Th (T_{fh}). Tyto buněčné linie mohou podporovat různé typy zánětlivých odpovědí v závislosti na svém cytokinovém profilu, odpovědi na chemokiny a interakci s dalšími buňkami (Akdis, M. et al. 2012).

Diferenciace prekurzorových Th buněk do specifické buněčné linie závisí na určitém vzorci signálů, kterému jsou vystaveny během počáteční interakce s antigenem, jako jsou cytokinové prostředí, koncentrace antigenu, typ APC buněk a kostimulační molekuly. K aktivaci a diferenciaci Th buněk jsou nutné 3 různé signály od APC buněk. Prvním signálem je rozpoznání molekuly MHC s navázaným peptidem na APC buňkách pomocí receptoru TCR na prekurzorových Th buňkách. Druhým je kostimulační signál zprostředkovaný vazbou stimulačních molekul (upregulovaných APC buňkami) na kostimulační receptory Th buněk, v důsledku čehož jsou Th buňky dále stimulovány a aktivovány. Poslední signál představuje mikroprostředí cytokinů, které směřují diferenciaci Th buněk do specifické buněčné linie. V závislosti na síle signálu a konkrétních přítomných cytokinech při interakci APC a T buněk

dochází k aktivaci, proliferaci a diferenciaci prekurzorových Th buněk na efektorové T buňky.

Prvním zdrojem cytokinů jsou APC buňky a buňky nespecifické imunity. Navíc některé cytokiny produkované již vytvořenou T buněčnou linií mohou vytvářet pozitivní zpětnou vazbu, čímž významně posilují diferenciaci a imunitní odpověď.

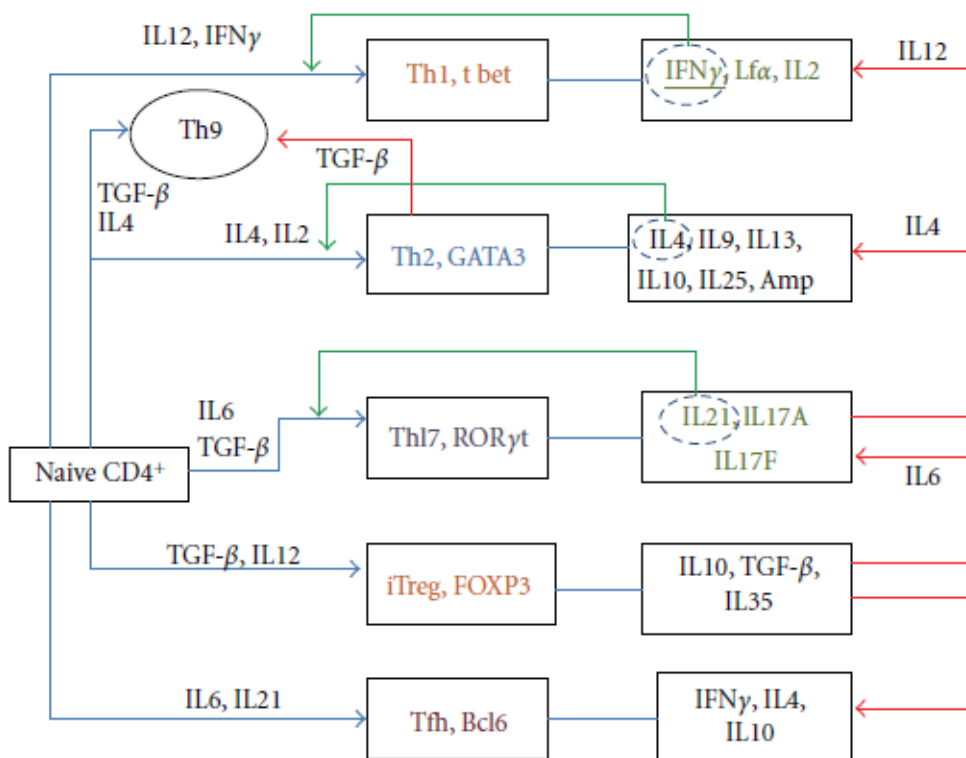
Původně se předpokládalo, že naivní CD4⁺ Th0 buňky se diferencují pouze do 2 podskupin, a to Th1 nebo Th2 (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. 1989; Coffman, R.L. 2006). Nicméně v nedávné době byly postupně objeveny další vymezené podskupiny Th buněk. Každá podskupina se vyvíjí v přítomnosti specifických cytokinů a specifických transkripčních faktorů. Již diferencované Th buňky exprimují transkripční faktory a cytokiny specifické pro danou buněčnou linii a odpovědné za jejich efektorovou funkci.

Pro diferenciaci Th1 buněčné linie je nutná přítomnost cytokinů IL-12 a IFN- γ . Při vzniku Th2 linie se může uplatnit více cytokinů: IL-4, IL-2, IL-7 a TSLP (tymový stromální lymfopoetin). TGF- β může indukovat vznik různých efektorových linií v závislosti na přítomnosti dalších cytokinů: spolu s IL-2 indukuje diferenciaci Treg, s IL-6 indukuje Th17, zatímco v přítomnosti IL-4 podporuje vznik Th9 buněk, a to buď přímo nebo reprogramováním Th2 buněk (Veldhoen, M. et al. 2008). Ve vývoji Th17 linie se v prvním kroku uplatňují cytokiny TGF- β a IL6, dále při autoamplifikaci IL-21 a při stabilizaci linie IL-23. Také IL-1 a TNF- α se významně uplatňují při diferenciaci Th17 (Bettelli, E. et al. 2007). Při vzniku Tr1 linie regulačních buněk se významně uplatňuje IL-27 a IL-10. Folikulární Th buňky (T_{fh}) vznikají za přítomnosti IL-6 a IL-21 (Luckheeram, R.V. et al. 2012).

Důležitým pravidlem diferenciaci Th buněk je, že jeden z charakteristických cytokinů produkovaný každou diferencovanou efektorovou buňkou je současně hlavním induktorem své buněčné linie, čímž vytváří pozitivní zpětnou vazbu. Mezi tyto cytokiny s efektem pozitivní zpětné vazby patří IFN- γ pro Th1, IL-4 pro Th2, IL-21 pro Th17 a TGF- β pro iTregs.

V podmínkách *in vivo* však rozhoduje o diferenciaci Th buněk složitá cytokinová síť. Všeobecně lze říci, že pro diferenciaci jedné linie efektorových buněk je nutný více než jeden cytokin a cytokiny, které podporují diferenciaci jedné linie mohou potlačovat vznik ostatních linií (obrázek 5). Navíc pokud jsou buňky simultánně nebo postupně vystaveny vlivu určité směsi cytokinů, které by za normálních okolností indukovali vznik různých linií, mohou za těchto okolností získat smíšený Th fenotyp (Zhu, J. and Paul, W.E. 2010).

Minimálně 2 typy transkripčních faktorů jsou nutné pro diferenciaci Th buněk, a to hlavní regulátory a STAT proteiny. Aktivita hlavních regulátorů je kontrolována jejich expresí, zatímco STAT proteiny jsou indukované cytokiny. Aktivace proteinu STAT je první odpovědí diferencující se T buňky na cytokinové prostředí a představuje nutný krok v založení fenotypu efektorových buněk. Hlavní transkripční faktory jednotlivých efektorových linií jsou T-bet/Stat4 pro Th1 linii, GATA-3/STAT6 pro Th2 linii, Foxp3/STAT5 pro iTreg, ROR γ t/STAT3 pro Th17 linii, PU.1 a IRF4/STAT6 pro Th9. Přestože jeden STAT protein je hlavní pro každou linii, další STAT proteiny ji také ovlivňují (Stritesky, G.L. and Kaplan, M.H. 2011) (Tabulka 2). Transkripční faktory navíc interagují navzájem na úrovni genů i proteinů a vytváří tak sofistikovanou transkripční regulační síť.



Obrázek 5. Vliv různých cytokinů na diferenciaci CD4⁺ T buněk. Modré šipky ukazují na diferenciaci naivních buněk v přítomnosti určitých cytokinů. Zelené šipky představují autoamplifikační fázi podporovanou cytokiny označené kroužkem. Plasticita podskupin T buněk pod vlivem specifických cytokinů je znázorněná červenými šipkami. U každé Th linie je zobrazen i hlavní regulátor transkripce. Bcl6 zatím nebyl prokázán jako hlavní regulátor, ale hraje významnou roli při diferenciaci Tfh. (Luckheeram, R.V. et al. 2012)

Buněčná linie	Cytokiny	Transkripční faktory	Inhibiční transkripční faktory
Th1	IL12, IFN-γ	<u>T bet</u> , STAT1, STAT4, Runx3, Eomes, Hlx	GATA3
Th2	IL-4 , IL-2	<u>GATA3</u> , STAT6, STAT5, STAT3, Gfi-1, c-Maf, IRF4	T-bet, Runx3
Th17	IL-6, IL-21 , IL-23, TGF- β	ROR γ t, STAT3, ROR α , Runx1, Batf, IRF-4, AHR	T-bet ⁺ Runx1, Smad3, Runx1 ⁺ FOXP3
Tfh	IL-6, IL-21	Bcl6, STAT3	
iTreg	TGF- β , IL-2	FOXP3, Smad2, Smad3, STAT5, NFAT, IRF4	
Th9	TGF- β , IL-4	IRF4	
Tr1	IL-27, IL-10	c-Maf, AhR	

Tabulka 2. Cytokiny a transkripční faktory charakteristické pro Th buněčné linie (hlavní regulátory jsou podtrženy) (Luckheeram, R.V. et al. 2012).

Th1 buňky jsou důležité v ochraně proti intracelulárním virovým a bakteriálním patogenům, u lidí speciálně v rezistenci vůči infekci mykobakteriemi. Hlavním cytokinem, který produkují je interferon-gamma (IFN- γ), dále pak lymfotoxin- α (LT- α), a interleukin 2 (IL-2). IFN- γ produkovaný Th1 buňkami aktivuje makrofágy a zvyšuje jejich fagocytární a mikrobicidní aktivitu. IL-2 podporuje proliferaci CD8⁺ buněk s cytolytickou aktivitou, paměťových CD8⁺ buněk a je nutný pro přežívání a aktivaci přirozených Treg. Abnormální aktivace Th1 buněk se považuje za klíčový moment při vzniku většiny orgánově-specifických autoimunitních onemocnění (Luckheeram, R.V. et al. 2012).

Th2 buňky hrají zásadní roli při eliminaci extracelulárních parazitů a při spolupráci s B lymfocyty. Produkují cytokiny IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10 a IL-25 a amphiregulin. IL-5 aktivuje eozinofily, které zabíjejí parazity, zatímco IL-4 a IL-13 stimulují kontrakci hladkých svalů a nadprodukcí hlenu napomáhají odstranění parazitů ze stěv a plic. IL-4 navíc indukuje izotopový přesmyk a produkci protilátek třídy IgE v B buňkách jakož i upregulaci IgE receptorů na mastocytech a bazofilech. Při opakovaném setkání s antigenem způsobují antigen-specifické IgE rychlou degranulaci mediátorů (serotonin, histamin) z těchto buněk a napomáhají tak k odstranění patogenu a rezistenci vůči infekci. IL-10 je protizánětlivý

cytokin, který inhibuje Th1 buňky a další buňky nespecifické imunity v rámci obnovení rovnováhy po eliminaci patogenu. IL-25 patří strukturně do rodiny IL-17 cytokinů (IL-17E), ale jeho hlavní funkcí je posilování Th2 buněčné odpovědi upregulací Th2 cytokinů. Významně se také uplatňuje v inhibici Th17 buněk a tak potlačuje vznik autoimunitních onemocnění. Amphiregulin je členem rodiny epidermálního růstového faktoru (EGF), který indukuje proliferaci epiteliálních buněk. Za patofyziologických okolností jsou Th2 buňky odpovědné za vznik alergického zánětu a astmatu (Paul, W.E. and Zhu, J. 2010; Luckheeram, R.V. et al. 2012).

T regulační buňky (Treg) se v organismu vyskytují jednak jako přirozené nTreg uvolňované z thymu, které exprimují transkripční faktor FOXP3, a dále pak jako indukovatelné iTreg, které se vyvíjejí v periferních orgánech lymfatického systému po setkání s antigenem a nesou expresní profil FOXP3+CD4+CD25+. Mezi regulačními buňkami se rozlišuje skupina buněk Tr1 produkující IL-10, která hraje významnou roli v potlačování zánětlivých a autoreaktivních procesů. Treg jsou důležité v udržování imunologické tolerance vůči autoantigenům i cizorodým antigenům. Potlačují imunitní odpověď po eliminaci patogenu z organismu, čímž chrání organismus vůči imunopatologickým reakcím. Hlavními efektorovými cytokiny Treg buněk jsou IL-10, TGF- β a IL-35. IL-10 je významný inhibiční cytokin a spolu s TGF- β účinně potlačuje produkci IgE a oslabuje tak alergický zánět. Chybění nebo oslabení funkce Treg může vést ke vzniku autoimunitních procesů (La Cava, A. 2008; Dons, E.M. et al. 2012).

Objev **Th17 buněk** byl významným krokem k úpravě původního paradigmatu Th1/Th2 a pomohl objasnit mnoho dějů, které byly původně připisovány Th1 buňkám (DTH a některé autoimunitní onemocnění) (Harrington, L.E. et al. 2005). Hlavní funkcí Th17 buněk je obrana proti plísním a extracelulárním bakteriím, zároveň se také významně uplatňují ve stimulaci zánětu u autoimunitních onemocnění, jako např. roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, psoriáza a další (Ghoreschi, K. et al. 2011; Peters, A. et al. 2011). Zjistilo se, že existují 2 podskupiny Th17 buněk, a to klasické Th17 buňky s převážně regulační funkcí a alternativní patogenní Th17 buňky, které se vyvíjejí v případě chybění TGF- β (Ghoreschi, K. et al. 2010). Th17 buňky produkují cytokiny IL-17A, IL-17F, IL-21 a IL-22. IL17 indukuje vznik prozánětlivých cytokinů a chemokinů a jeho receptory jsou lokalizovány kromě buněk imunitního systému také v krevotvorné tkáni, kůži, plicích, střevě a kloubech. IL-21 posiluje diferenciaci Th17 buněk, ale má pleiotropní účinky zahrnující aktivaci T buněk a NK buněk a indukci vývoje B buněk na plasmocyty a paměťové buňky. IL-22 je současně zánětlivým

faktorem a má ochranné účinky pro tkáň, jelikož se aktivně účastní slizniční obrany proti bakteriálním patogenům. Th17 buňky mají antagonistický vztah s Treg (Hemdan, N.Y.A. et al. 2012). V experimentálním modelu autoimunity hrají Th17 kritickou roli v iniciaci kaskády zánětlivých dějů v důsledku produkce cytokinů Th17 spektra ve tkáních (IL-17A, IL-17F a GM-CSF). Produkce těchto cytokinů vede ke vzniku agresivní zánětlivé odpovědi charakterizované infiltrací tkání polymorfonukleárními fagocyty, destrukcí extracelulární matrix a dalším známkám tkáňového zánětu. Pro udržení patogenetické linie Th17 se zdá být nutná přítomnost cytokinu IL-23 (El-Behi, M. et al. 2011).

Th9 buňky byly původně považované za podskupinu Th2 buněk, nicméně dnes jsou považovány za samostatnou skupinu. Mají prozánětlivé účinky, uplatňují se v boji proti střevním parazitům a některým nádorům, patofyziologicky při vzniku autoimunitních onemocnění a alergickém zánětu. Jejich přesná funkce pravděpodobně závisí na mikroprostředí dané tkáňe a dalších cytokinech Th buněk přítomných v místě zánětu. Produkují velké množství IL-9 a také IL-10. IL-9 se zásadně uplatňuje v imunopatogenezi astmatu, a to aktivací buněk jako jsou mastocyty, B buňky, eozinofily, neutrofilů a epitelální buňky dýchacích cest, dále pak hypersekrecí hlenu a uvolňováním chemoatraktantů. Th9 jsou považovány za hlavního činitele v patogenezi alergických onemocnění, zvláště pak astmatu (Jabeen, R. and Kaplan, M.H. 2012; Luckheeram, R.V. et al. 2012; Schmitt, E. et al. 2014).

Folikulární Th buňky (Tfh) s expresním profilem CXCR5+CD4+ jsou umístěny ve folikulární části lymfatické tkáňe, kde regulují produkci antigen-specifických protilátek. Pomocí kostimulačních molekul CD28, OX40 a ICOS a sekrecí IL-21 indukují vývoj B buněk na plasmatické buňky produkující protilátky a také vznik paměťových B buněk. Klíčovým regulátorem Tfh buněk je transkripční faktor BCL6. Tfh buňky vykazují značnou plasticitu a jsou schopny se dále diferencovat na Tfh1 produkující IFN- γ a vedoucí k tvorbě protilátek třídy IgG2a, Tfh2 produkující IL-4 a indukující tvorbu protilátek IgG1 a IgE a Tfh0 tvořící IL-10 a podporující tvorbu protilátek IgA. V současnosti jsou známy i další populace Tfh buněk, a to NK (NKTFH) a regulační TFR buňky. Patofyziologicky se Tfh buňky mohou uplatňovat při vzniku systémových autoimunitních onemocnění a některých lymfomů (Laurent, C. et al. 2010; Tellier, J. and Nutt, S.L. 2013)

Th22 buňky jsou zatím poslední objevenou skupinou Th efektorových buněk. Exprimují profil CCR6+CCR4+CCR10+ a jejich klíčovým transkripčním faktorem je protein AHR (aryl uhlovodíkový receptor). Produkují hlavně IL-22 a dále pak IL-26 a IL-13 (Eyerich, S. et al. 2009). Efektorové Th22 buňky se diferencují v přítomnosti cytokinů IL-6 a TNF- α

a za pomoci plasmacytoidních dendritických buněk (DC) (Duhon, T. et al. 2009). IL-22 patří do skupiny IL-10 cytokinů a je produkován také dalšími buňkami imunitního systému (Th1, Th17, NK). Jeho hlavní biologická funkce spočívá ve stimulaci nespecifické imunity, ochrany před poškozením tkání a posílení regenerace. Cílové receptory jsou umístěny na keratinocytech kůže, v buňkách ledvin a orgánech respiračního nebo gastrointestinálního systému (játra, pankreas). V závislosti na původu postižené tkáně a lokálním cytokinovým prostředím mohou Th22 hrát buď protektivní nebo patogenní roli v chronických zánětlivých onemocněních (Witte, E. et al. 2010; Akdis, M. et al. 2012).

Původně se považovala diferenciace T buněk po setkání s antigenem za definitivní, nicméně v poslední době bylo prokázáno, že určité podskupiny Th buněk vykazují plasticitu, zvláště pak buňky Treg a Th17, které mohou získat schopnost produkovat IFN- γ , pokud jsou vystaveny působení určitých stimulů. Tato heterogenita Th buněk je daná expresí přídatných transkripčních faktorů. V praxi může být plasticita Treg potenciálně riziková, pokud se Treg dokáže v příslušném cytokinovém prostředí přeprogramovat na buňky s prozánětlivým fenotypem, což může mít škodlivé důsledky. Aberantně fungující T buňky jsou asociovány s rozvojem četných autoimunitních a alergických patologických procesů (Nakayamada, S. et al. 2012).

Pro vývoj určité linie a posílení zánětlivé odpovědi je tedy potřeba mnoho signálů a komplexní cytokinová síť. Tato rovnováha pro a protizánětlivých signálů umožňuje jemné „vypilování“ imunitní odpovědi, která poskytne hostiteli ochranu vůči patogenu a současně zabrání ničivým účinkům zánětu. Aktivace, diferenciace a expanze jednotlivých efektorových linií je důsledně regulována aktivitou a expresí specifických transkripčních faktorů. Nepřiměřená regulace imunitní odpovědi na patogeny může vést k chronické infekci, zatímco nekontrolovaná odpověď může způsobit přebytné samopoškození tkání. Nežádoucí aktivace Th1, Th17 nebo Th2 buněk může také vyústit v orgánově specifické autoimunitní onemocnění nebo alergický zánět či astma. Pochopení této sítě cytokinů a transkripčních faktorů v průběhu diferenciace CD4⁺ T buněk je klíčové pro diagnostiku a léčbu mnoha imunitně zprostředkovaných onemocnění.

1.4. Imunopatologie, u kterých se v patogenezi uplatňuje vychýlení polarizace imunitního spektra

Za fyziologických podmínek existuje ve složitých interakcích mezi buňkami a solubilními mediátory imunitního systému dokonalá rovnováha, která chrání organismus vůči patologickým reakcím (Rizzi, M. et al. 2006; Mantovani, A. et al. 2007). V tomto kontextu hrají klíčovou roli cytokiny, které jsou primárními modulátory buněk imunitního systému a jako takové tedy hrají ústřední roli ve vývoji, udržování a aktivitě jednotlivých populací buněk imunitního systému.

Při přemrštěné imunologické odpovědi na vnější nebo vnitřní antigeny za patofyziologických podmínek dochází k poškození tkání nebo orgánů nebo snížení jejich funkce. Tyto procesy se všeobecně nazývají imunopatologické reakce a patří k nim např. alergie (reakce na vnější antigen) a autoimunitní onemocnění (reakce na autoantigen). Imunologové již léta používají klasifikaci imunopatologických reakcí podle Coombse a Gella (tabulka 3).

<i>Typ</i>	<i>Popis</i>	<i>Mediátory</i>	<i>Příklady</i>
I	Časná přecitlivělost	IgE, IgG4	Atopie, anafylaxe
II	Cytotoxická reakce	IgG, IgM, komplement	AIHA, Goodpasterův syndrom
III	Imunokomplexová reakce	IgG	Sérová nemoc, vaskulitidy
IV	Pozdní přecitlivělost (DTH)	T buňky	Kontaktní dermatitida, chronická rejekce

Tabulka 3. Klasifikace imunopatologických reakcí podle Coombse a Gella.

V patogenezi alergických a autoimunitních onemocnění se často uplatňuje dysregulace na úrovni cytokinů, nedostatečná funkce regulačních T buněk a nekontrolovaná aktivita určité buněčné linie (Th1, Th2, Th17, B buňky a jimi produkované specifické protilátky) (obrázek 6) (Veldhoen, M. et al. 2008; Shah, A. 2012).

Dlouhé roky byla uznávána hypotéza Th1/Th2 o existenci pouze 2 buněčných linií, které se navzájem regulují (posilují vlastní linii, zatímco potlačují druhou linii). V tomto schématu

figurovala Th1 imunitní odpověď mediovaná cytokiny produkovanými Th1 buňkami (IL-2, IFN- γ , TNF- α) a makrofágy (IL-1, IL-6, IL-12 a TNF- α), zatímco Th2 odpověď byla mediovaná cytokiny produkovanými buňkami Th2, jako IL-4, IL-5 a IL-13 (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. 1989; Coffman, R.L. 2006). Podle této hypotézy byla autoimunitní onemocnění připisována Th1 buňkám a atopické reakce (alergické reakce s elevací IgE) Th2 buňkám. Je dobře známo, že autoreaktivní Th1 buňky hrají klíčovou roli v autoimunitních nemocech jako revmatoidní artritida (RA), systémový lupus erythematosus (SLE), diabetes mellitus 1. typu (T1D), roztroušená skleróza (RS) a autoimunitní tyreoiditida. Nicméně dělení imunopatologií na Th1 a Th2 mediované není dostačující a jejich patofyziologie je mnohem složitější. V současnosti je již známo, že Th1 imunitní reakce byly jasně popsány i v atopických onemocněních a Th2 reakce se také uplatňují v autoimunitních procesech (Shah, A. 2012). Hypotéza Th1/Th2 měla i další nedostatky a nedokázala vysvětlit některé klíčové imunopatologické děje. S objevem Th17 buněk v roce 2005 (Harrington, L.E. et al. 2005) přišla první zásadní revize hypotézy Th1/Th2 (Bettelli, E. et al. 2007). Nová hypotéza Th17 pomohla objasnit buňkami zprostředkované poškození tkání u mnohých autoimunitních onemocnění i při mikrobiální infekci, které byly ve skutečnosti zprostředkované cytokiny IL-23 a IL-17 (osa IL-17/IL-23) (Steinman, L. 2007). Jejich účast v patogeneze nemocí byla prokázána u RS, RA, T1D, psoriázy a SLE, ale i v atopických nemocech (Wilke, C.M. et al. 2011).

V regulaci imunitních reakcí hrají klíčovou roli přirozené a indukované Treg, které tlumí přemrštěnou zánětlivou reakci na mikroorganismy nebo autoantigeny, a to tím, že potlačují aktivaci buněk nespecifické imunity, dále schopnost APC buněk prezentovat antigeny a také efektorové funkce Th1, Th2 a Th17 buněk. Nepřítomnost Treg buněk vede k závažné autoimunitě, jak je vidět u pacientů se syndromem IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome), kterým chybí transkripční faktor Treg buněk FoxP3 (d'Hennezel, E. et al. 2009). Tito pacienti produkují nadměrné množství Th1, Th2, Th17 cytokinů a IgE v porovnání se zdravými kontrolami (Chatila, T.A. 2009).

B-lymfocyty hrají významnou roli v patogenezi jak v atopických, tak i autoimunitních onemocněních, kde se mohou uplatňovat jako antigen prezentující buňky stimulující počáteční fázi imunitní odpovědi a aktivující efektorové T buňky, tak diferencované plasmatické buňky produkující specifické autoprotilátky (IgG nebo IgM) nebo pro alergen specifické IgE při atopických nemocech, ale i protilátky IgE v autoimunitních onemocněních (anti-citrulinové protilátky u RA, anti-GAD65 protilátky u T1D, protilátky proti receptoru

TSH u Gravesovy nemoci a anti-myelinové protilátky u RS). Regulační B buňky produkující IL-10 se významně uplatňují v regulaci zánětu tím, že podporují vývoj Treg a potlačují vývoj Th1 a Th17 buněk (Shlomchik, M.J. 2009; Pillai, S. et al. 2011).

Tymový stromální lymfopoietin (TSLP) je cytokin produkovaný epiteliálními buňkami, dendritickými buňkami a mastocyty fungující jako hlavní přepínač, který podporuje vznik alergického a méně i autoimunitního zánětu, avšak může být i patofyziologickým pojítkem mezi těmito dvěma typy nemocí. TSLP stimuluje Th2 cytokinovou odpověď a expanzi Th2 paměťových buněk, a to hlavně upregulací IL-4 (Roan, F. et al. 2012).

1.4.1. Autoimunitní onemocnění

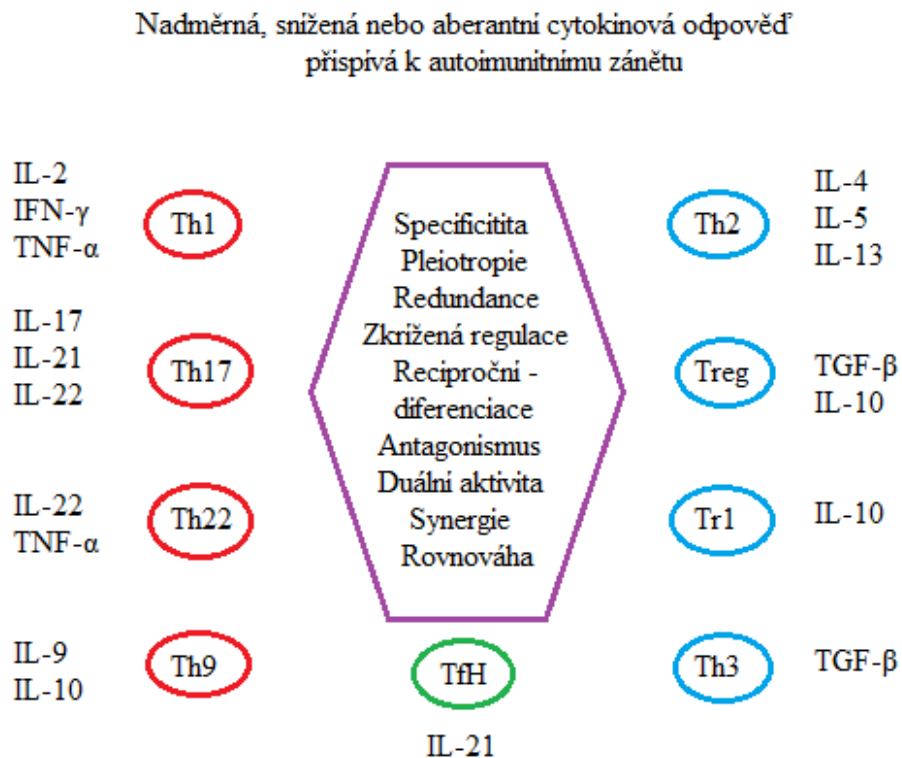
Imunitní systém přirozeně rozpoznává a eliminuje nejen cizorodé antigeny, ale i poškozené, staré, apoptotické či jinak pozměněné buňky organismu vlastní. Tato autoimunitní odpověď je však pod přísnou kontrolou genetických mechanismů rozpoznávajících antigen, buněčných interakcí a jejich případných výsledků. Mechanismy udržující imunitní odpověď vůči vlastním antigenům ve fyziologických mezích se nazývají autotolerance. Autoimunitní onemocnění představuje patologický stav, kdy při autoimunitní odpovědi namířené proti vlastnímu antigenu dochází k poškození tkání. Může být spuštěno vlastním nebo cizorodým antigenem a v jeho patogenezi se většinou uplatňují T i B buněčné reakce. Základní kritéria autoimunitního onemocnění jsou dle klasické definice dle Witebského a Rosea identifikace autoantigenu a mechanismů vedoucích k poškození vlastních tkání (buněčné nebo protilátkové) a vznik analogického onemocnění při experimentální reprodukci patologických dějů *in vitro* nebo *in vivo* po přenosu sérových faktorů nebo buněk (Witebsky, E. et al. 1957).

Autoimunitní onemocnění vznikají v důsledku komplexní souhry genetických, environmentálních a endogenních faktorů. Přes značné pokroky ve výzkumu, u většiny autoimunitních onemocnění zůstávají děje, které spouštějí autoimunitu, nepochopené. Navíc také není jasné, jestli autoimunita vyplývá primárně z poruchy imunitního systému, jestli je sekundární při změnách cílových orgánů, nebo obojí. Podmínkou vzniku autoimunitních onemocnění je prolomení autotolerance, která je zabezpečovaná na dvou úrovních, a to centrální a periferní.

Selekce T lymfocytů v tymu je klíčovým dějem v jejich vývoji a je to děj závislý na interakci se stromálními buňkami tymu, které T lymfocytům prezentují tkáňově specifické antigeny. Za prezentaci různých autologních antigenů v tymu je odpovědný gen autoimunitního regulátoru (AIRE). Je to autosomálně recesivní gen, při jehož mutacích dochází k nedostatečné prezentaci autoantigenů v tymu a vznikají tak různé kombinace autoimunitních endokrinních onemocnění. Část autoreaktivních T lymfocytů je tedy destruovaná již v tymu, přičemž další mechanismy autotolerance se uplatňují v periférii. Při setkání T buněk se specifickým antigenem bez kostimulačních signálů se T lymfocyt dostává do stavu funkčního útlmu, který nazýváme klonální anergie. Z tohoto stavu však může být T lymfocyt “probuzen”, pokud dostane vhodný nespecifický kostimulační signál např. z poraněné tkáně. Při prezentaci antigenu na MHC komplexu v podprahovém množství jej T lymfocyt nerozpoznává a dochází k tzv. imunologické ignoranci. Ignorance může být také překonána, a to při dobré dostupnosti antigenu, jako např. při jeho prezentaci infikujícím mikroorganismem. Autoimunita může být také zpuštěna produkcí protilátek proti peptidům po jejich translaci anti-sense vláknem DNA, kdy sense vlákno translatuje auto-antigen. Tyto protilátky pak pro změnu indukují vznik anti-idiotypových protilátek, které mohou zkříženě reagovat s autoantigenem. Nakonec je tolerance na periférii zabezpečována aktivní regulací T regulačními buňkami. Přirozené regulační buňky (nTreg) uplatňují svůj tlumivý efekt v přímém kontaktu buněk a jejich membránových molekul, jako např. CTLA4. Indukované Treg (iTreg) ke své funkci nepotřebují přímý kontakt, protože produkují solubilní cytokiny s tlumivým účinkem, jako např. IL-10 a TGF- β . Treg buňky s oslabenou inhibiční kapacitou byly nalezeny u některých autoimunitních onemocnění a dobře známý je i vznik letálního autoimunitního onemocnění u lidí s IPEX syndromem, kdy je defektní funkce Treg v důsledku mutace jejich transkripčního faktoru FOXP3. Na aktivní účasti v regulaci autoimunitní odpovědi se podílejí i NKT buňky.

Vznik autoimunitního onemocnění po autoimunitní odpovědi závisí jak na kvalitě imunitní odpovědi tak i dostupnosti příslušného antigenu. Podle expresního profilu autoantigenů lze autoimunitní onemocnění rozdělit na orgánově specifické a systémové. Orgánově specifické autoimunitní onemocnění jsou charakterizované vznikem lymfocytů s autoreaktivitou vůči antigenům omezeným na určitou tkáň. Prolomení periferní tolerance pak vede k aktivaci autoreaktivních lymfocytů a jejich přilákání do cílové tkáně, kde dojde k jejímu poškození. Systémová autoimunita vzniká, když jsou autoantigeny rozmístěny na mnoha tkáních

organismu rozpoznané autoreaktivními lymfocyty. Následně dochází ke vzniku humorální i buněčné imunitní odpovědi (Comerford, I. et al. 2014).



Obrázek 6. Podskupiny T buněk a jejich efektorové cytokiny v patogenezi autoimunitních onemocnění. Rovnováha v aktivitě různých podskupin efektorových a regulačních T buněk je nutná pro účinnou imunitní odpověď, která je současně přiměřená vyvolávajícími stimuly. Přehnaná, příliš slabá nebo aberantní cytokinová odpověď významně přispívá k autoimunitnímu zánětu, který je podkladem autoimunitních onemocnění. Podskupiny Th1, Th17, Th22, a Th9 (vlevo) obecně řídí patogenní efektorovou odpověď, zatímco Th2, CD4+CD25+Foxp3+ Treg, Tr1 secernující IL-10 a Th3 secernující TGF- β (vpravo) zprostředkovávají regulační odpověď. Tfh se uplatňují v aktivaci B buněk v lymfatické tkáni. Zobrazeny jsou primární cytokiny secernované podskupinami T buněk a vlastnosti jednotlivých podskupin T buněk a cytokinů (střed), které hrají roli v určité fázi autoimunitních onemocnění. (Moudgil, K.D. and Choubey, D. 2011).

Přesné spouštěcí mechanismy, při kterých dochází k porušení tolerance vůči vlastním antigenům, jakož i následné děje vedoucí k indukci autoimunitní odpovědi zůstávají u mnohých přirozeně se vyskytujících autoimunitních onemocnění zatím nezodpovězené. V současnosti se usuzuje, že autoimunitní onemocnění vzniká v důsledku kombinace

genetické predispozice, poruše přirozených mechanismů tolerance a spouštěčů působících ze zevního prostředí. Mnoho pokusů na zvířatech i zkušenosti z lékařské praxe ukazují na přítomnost prozánětlivých cytokinů, které přispívají k iniciaci a propagaci autoimunitního zánětu, zatímco protizánětlivé cytokiny napomáhají k regresi zánětu a zotavení z akutní fáze nemoci (Moudgil, K.D. and Choubey, D. 2011). V patomechanismu autoimunitních onemocnění se uplatňují hlavně složky specifického imunitního systému. Často však nelze jasně oddělit poškození tkání způsobené autoprotiilátkami od buňkami zprostředkovaných reakcí, ve kterých se uplatňují zejména autoreaktivní Th1 nebo Th17 buňky, ale i Th9 a Th22 buňky. Nicméně svoji účast při autoimunitních onemocněních může mít i nespecifický imunitní systém, např. při mutaci některých receptorů PRR nebo jejich částí (Comerford, I. et al. 2014).

1.4.1.1. Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu (T1D) je onemocnění způsobené nedostatkem insulínu v důsledku destrukce beta buněk pankreatu, které produkují insulín, autoimunitním zánětem. Nejčastěji se manifestuje v dětském věku, ale jedna čtvrtina případů je diagnostikovaná až v dospělosti.

Incidence T1D se liší v závislosti na geografii, věku, pohlaví a rodinné anamnéze a roli hrají i faktory zevního prostředí. Celosvětová incidence T1D je udávána od 0,1 až 37/100 000 dětí mladších 15 let, má vzestupný trend (v Evropě, na středním východě a v Austrálii ročně o 2-5%), a to zejména u dětí mladších 5 let. Rozdíly v jednotlivých zemích světa jsou 50-100násobné. Všeobecně lze říct, že riziko T1D stoupá se zeměpisnou šířkou (vzdáleností od rovníku) a nejvíce se vyskytuje v severní Evropě (Levitsky, L.L. and Misra, M. 2013). V České republice měla incidence T1D v dětské populaci (0-15 let) také vzestupný trend, a to od 6,8/100 000/rok v roce 1989 až na 18,5/100 000/rok v roce 2009 (Cinek, O. 2010), přičemž od roku 2001 je incidence stabilizovaná (Cinek, O. et al. 2012; Tellier, J. and Nutt, S.L. 2013). V dětství jsou obě pohlaví postižena stejně, ale v rané dospělosti jsou častěji postiženi muži. První vrchol manifestace T1D je ve věku 4-6 let a druhý vrchol v rané pubertě (10-14 let) (Levitsky, L.L. and Misra, M. 2013).

Riziko T1D je vyšší u dětí s pozitivní rodinnou anamnézou. Celoživotní riziko vzniku T1D je významně zvýšené u blízkých příbuzných pacienta s T1D, a to přibližně 6% u dětí, 5%

u sourozenců a 50% u jednovaječných dvojčat (ve srovnání s běžnou populací, kde je celoživotní riziko vzniku T1D 0,4% u lidí bez rodinné zátěže). Jedná se o dědičnost polygenní, přičemž nejsilnější vliv mají geny HLA komplexu (polymorfismus genů HLA-DQ α , HLA-DQ β , HLA-DR), dále inzulinový gen, gen PTPN22 a CTLA-4.

Některé faktory zevního prostředí byly také asociovány s rizikem vzniku T1D, ačkoliv o jejich vlivu se diskutuje. Jedná se o virové infekce (enteroviry, konkrétně Coxsackie typ B, virus rubeoly), nutriční faktory (délka kojení, expozice kravskému mléku v kojeneckém věku, nitráty a nitrity, nedostatek vitamínu D) a perinatální faktory (vyšší věk matky, preeklampsie, novorozenecká žloutenka v důsledku inkompatibility krevních skupin, porod císařským řezem).

Schopnost molekul MHC komplexu II. třídy prezentovat antigeny je částečně dána pořadím aminokyselin ve svém α a β řetězci. Výměna aminokyselin na jedné či dvou klíčových pozicích může významně zvýšit nebo snížit vazbu příslušných autoantigenů. Nejznámější autoantigeny, které pravděpodobně hrají důležitou roli při vzniku nebo progresi autoimunitního zánětu v ostrůvcích pankreatu jsou dekarboxyláza kyseliny glutamové (GAD), insulin, protein asociovaný s insulinem (IA-2) a zinkový transportér ZnT8.

Pro studium patogeneze T1D se používají NOD myši (neobézní diabetické myši), u kterých spontánně vzniká autoimunitní diabetes velice podobný lidskému diabetu. Hlavním aktérem v inzulitidě u NOD myší se zdají být IFN- γ pozitivní T buňky, tedy Th1 buňky, které infiltrují pankreas. Podání protilátek proti IFN- γ těmto myším zpomaluje destrukci buněk ostrůvků. Progrese inzulitidy na druhou stranu začíná paralelně se zvýšeným uvolňováním cytokinů IL-18 a IL-12, které jsou oba silnými induktory IFN- γ . V konečném důsledku se ale na destrukci beta buněk podílí i autoreaktivní cytotoxické CD8⁺ T buňky a také Th2 buňky, které se účastní konverze B buněk na plasmatické buňky produkující autoprotilátky. Později se vyvine nerovnováha mezi autoreaktivními efektorovými T buňkami a regulačními T buňkami, která nakonec vede k destrukci beta buněk. Spouštěcí faktory této autoimunitní odpovědi zatím nejsou příliš známé, ale předpokládá se, že by se mohly uplatňovat například tzv. molekulární mimikry při homologii mezi GAD a některými infekčními patogeny, jako např. virus Coxsackie B (Van Belle, T.L. et al. 2011).

U geneticky predisponovaných jedinců tedy může jeden nebo více faktorů zevního prostředí spustit autoimunitní zánět, který vede k destrukci pankreatických beta buněk. Tento proces obvykle probíhá po dobu několika měsíců nebo let, během kterých je pacient asymptomatický. Zatímco genetické markery jsou přítomné již od narození, imunologické

markery je možné detekovat po vzniku autoimunitního zánětu a metabolické markery nemoci až poté, kdy dojde k destrukci dostatečného množství beta buněk, což ale může být ještě před nástupem symptomatické hyperglykémie.

T1D se většinou manifestuje typickými příznaky vyplývajícími z hyperglykémie, jako jsou polyurie, polydypsie, váhový úbytek, letargie. U dětí mladších 6 let a v oblastech s nízkou dostupností zdravotní péče je často první manifestací T1D diabetická ketoacidóza (Pietropaolo, M. 2013).

1.4.1.2. Autoimunitní tyreoiditida

Autoimunitní onemocnění štítné žlázy (AITD) je orgánově specifickým autoimunitním onemocněním, zahrnujícím několik klinických jednotek, a to fokální tyreoiditidu, Hashimotovu tyreoiditidu, atrofickou tyreoiditidu, poporodní tyreoiditidu, tichou tyreoiditidu a Gravesovu nemoc. Společným jmenovatelem všech klinických jednotek je různý stupeň infiltrace štítnice lymfocyty, které jsou společně s okolními lymfatickými uzlinami a kostní dření zdrojem autoprotilátek.

AITD postihují asi 5% celkové populace. Hashimotova tyreoiditida (chronická autoimunitní tyreoiditida) je nejčastější příčinou snížené funkce štítné žlázy v oblastech s dostatečným přísunem jodu. Až 10% populace trpí selháním štítné žlázy, přičemž prevalence stoupá s věkem. Klinicky je Hashimotova tyreoiditida charakterizována postupným selháním funkce štítné žlázy a/nebo vznikem strumy v důsledku destrukce štítné žlázy autoimunitním zánětem, při kterém dochází k apoptóze epiteliálních buněk štítné žlázy. Téměř všichni pacienti mají vysoké sérové hladiny protilátek proti jednomu nebo více antigenům štítnice, difusní infiltraci štítnice lymfocyty a destrukci folikulů (Davies, T.F. 2013).

AITD vzniká v důsledku vzájemného působení genetických, endogenních a environmentálních faktorů. Významnou asociaci s AITD vykazují imunoregulační geny, a to hlavně HLA-DR3, CTLA-4, PTPN22, CD40, IL-2RA, FCRL3 a geny specifické pro štítnici (tyreoglobulin - TG, receptor pro hormon stimulující štítnou žlázu - TSHR). Genetické faktory hrají ve vývoji AITD dominantní roli (cca 80%), zatímco zbylých 20% tvoří environmentální faktory, jako expozice záření, nadměrný příjem jodu, deficit selenu, kouření, infekce (virové či bakteriální) nebo léky (amiodaron, litium, IL-2, IFN- α , vysoce aktivní antiretrovirální terapie, humanizovaná monoklonální protilátka antiCD52 Campath-

1H). Z endogenních faktorů má velký význam růstový spurt v dětství a pubertě, těhotenství, menopauza, stárnutí a ženské pohlaví (Saranac, L. et al. 2011; Orgiazzi, J. 2012).

Štítná žláza produkuje celou škálu imunologicky aktivních faktorů a má specifické požadavky na stopové prvky pro produkci hormonů, což pravděpodobně způsobuje vyšší náchylnost na ke vzniku AITD (Saranac, L. et al. 2011). Počáteční inzult, který spouští autoimunitní zánětlivý proces není dosud znám a pravděpodobně je individuální. Autoimunitní reakce může vzniknout mechanismem molekulární mimikry nebo polyklonální aktivací T buněk za účasti exprese HLA antigenů buňkami štítné žlázy a aktivací apoptózy jejich buněk interakcí Fas-Fas ligandu. V patogenezi AITD se uplatňuje jak buněčná, tak i protilátková imunitní odpověď a v konečném důsledku i buňky samotné štítné žlázy. T buňky reagují s autoantigeny a po aktivaci produkují cytokiny, které aktivují další buňky imunitního systému. Th2 buňky podporují tvorbu autoprotilátek B buňkami, zatímco Th1 buňky se zapojují do destrukce buněk štítné žlázy aktivací cytotoxických buněk. Jako autoantigeny slouží tkáňově specifické membránové receptory, enzymy nebo sekretované hormony, z kterých nejdůležitější jsou tyreoglobulin, tyreoidální peroxidáza, a receptor pro hormon stimulující štítnou žlázu. Poté, co se buňky štítné žlázy stanou cílem autoimunitní odpovědi, začínají samy interagovat s imunitním systémem a pravděpodobně hrají poměrně důležitou roli v progresi nemoci. IFN- γ uvolněný lokálně z makrofágů a lymfocytů indukuje expresi molekul MHC II. třídy na buňkách štítné žlázy, jakož i molekul MHC I. třídy, které zvyšují riziko jejich rozpoznání cytotoxickými CD8⁺ T buňkami. IFN- γ spolu s TNF- α a IL-1 zvyšují expresi mezibuněčné adhezní molekuly ICAM-1 a antigenu asociovaného s funkcí leukocytů LFA-3 na buňkách štítnice. Tyto adhezní molekuly urychlují interakci s lymfocyty a přispívají k rozvoji prozánětlivého prostředí. Buňky štítné žlázy produkují i další růstové faktory a cytokiny (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18), které potencují a udržují zánět. Cytokiny navíc působí i na výstelku cév štítné žlázy, a tak spolu s lokálně produkovánými chemokiny a adhezními molekulami podporují přísun dalších buněk imunitního systému (Weetman, A. 2003).

1.4.2. Alergická onemocnění

Alergie je reakce přecitlivělosti navozená imunologickými mechanismy. Antigen schopný vyvolat alergickou reakci se nazývá **alergen**. **Atopie** je osobní a/nebo rodinná dispozice, stát

se, většinou v dětství nebo dospívání, přecitlivělým a tvořit IgE protilátky jako odpověď na běžnou expozici alergenům, obvykle proteinům. Výsledkem je, že se u takových jedinců mohou vyvinout typické příznaky astmatu, rinokonjunktivitidy nebo ekzému. U atopiků se v průběhu let často vyvíjí tzv. atopický pochod, kdy v prvních letech života dominují gastrointestinální a kožní symptomy charakteru ekzému způsobené potravinovými alergeny, zatímco později dominují spíše astma a rinitida vyvolané inhalačními alergeny (Johansson, S.G. et al. 2004).

Alergie může být zprostředkována protilátkami nebo buňkami a v rozvoji alergické reakce se mohou uplatnit všechny typy imunopatologických reakcí (přecitlivělosti) dle Coombse a Gella. Ve většině případů patří protilátky specificky odpovědné za alergickou reakci k třídě IgE a u těchto jedinců mluvíme o IgE zprostředkované alergii. Alergická reakce probíhá ve 2 fázích – fáze senzibilizace a efektorová fáze.

Atopické reakce, alergická rinitida, alergické astma a anafylaxe patří k přecitlivělosti I. typu. Při prvním setkání s alergenem (senzibilizaci) dochází k rozpoznání alergenu APC buňkami, jeho prezentaci a následné aktivaci lymfocytů převážně Th2 s produkcí protilátek IgE. IgE protilátky se následně váží na vysokoafinní receptory na mastocytech a bazofilech. Při opakované expozici se IgE naváže na antigen, dochází ke spojení s vysokoafinními receptory, což vede k degranulaci mastocytů a bazofilů a uvolnění jejich mediátorů. Takto uvolněné primární mediátory (zejména histamin, heparin) způsobí okamžitou imunologickou odpověď, která je odpovědná za akutní fázi alergické reakce (vazodilatace, spasmus hladkých svalů průdušek, stimulace nervových zakončení). Za několik hodin dochází k uvolnění sekundárních mediátorů (prostaglandiny, leukotrieny), které způsobí chemotaxi a příliv dalších zánětlivých buněk imunitního systému (zvláště eozinofilů, bazofilů, neutrofilů a Th buněk) do míst exponovaných alergenem. Eozinofily, lymfocyty a neutrofilové produkují cytotoxické mediátory, jež způsobují poškození tkání. Pozdní fáze se pak může změnit na chronický zánět a probíhat bez závislosti na vyvolávajícím alergenem (Hořejší, V. and Bartůňková, J. 2009).

Studie na dvojčatech prokázaly velký podíl dědičnosti na etiologii alergických onemocnění a atopii, udávaný na 33-76%. Asi 30% fenotypové variability alergií je vysvětlováno vlivem zevního prostředí a zbylých 70% jinými faktory, jako je např. epigenetika. Kandidátní geny uplatňující se v rozvoji alergických onemocnění jsou geny ovlivňující Th2 imunitní odpověď, cytokiny a jejich receptory způsobující izotypový přesmyk na IgE (IL4RA, IL5, IL13, FCER1A), chemokiny a jejich receptory (CX3CR1, CCXCR1, CCR2), geny HLA systému

(HLA; HLA-DPB1, HLA-DQB1), reakce s lipoxygenázou a cyklooxygenázou (CYSLTR1, LTC4S...) (Averbeck, M. et al. 2007).

Významný nárůst alergických onemocnění v posledních letech poukazuje na značný vliv faktorů zevního prostředí při jejich vzniku, jako je zejména kouření, znečištění ovzduší a životní styl.

V prevenci vzniku alergických onemocnění má význam kojení a také přirozený kontakt s běžnými mikroby. Podle tzv. hygienické hypotézy, která vysvětluje nárůst alergických onemocnění ve vyspělých zemích, vedlo zlepšení hygieny v prvních letech života a nedostatek expozice infekčním agens (bakteriím, virům a parazitům) k nedostatečné stimulaci Th1 a nadměrné aktivaci Th2 imunologické odpovědi. Na druhou stranu opakované respirační infekce v prvních letech života mohou vést k bronchiální reaktivitě a zvyšovat tak predispozici pro vznik astmatu (Hořejší, V. and Bartůňková, J. 2009).

Atopická dermatitida, resp. atopický ekzém je silně svědivé, obvykle léta trvající zánětlivé kožní onemocnění, spojené s alergickým astmatem a sennou rýmou u jedince atopické konstituce (Johansson, S.G. et al. 2004).

Celosvětová prevalence atopické dermatitidy (AD) stoupla 3násobně od roku 1960 a v současnosti představuje u dětí 5-20%, přičemž prevalence v USA je 10-20%. Z epidemiologických studií vyplývá, že prevalence je ovlivněna sociálními a ekonomickými faktory, které způsobují vyšší výskyt AD ve velkoměstech, u lidí černé rasy a u lidí s vyšším vzděláním (Eichenfield, L.F. et al. 2012).

AD se vyskytuje ve 3 formách specifických svým vzhledem a věkovým rozložením. Pro všechny stadia je společná suchá kůže a pruritus (svědění), v důsledku chronického škrabání vznikají sekundární změny kůže. Průběh je často komplikován sekundární infekcí, která bývá do kůže zanesena škrabáním. Kojenecká forma začíná mezi 2. a 6. měsícem věku na tvářích a čele, odkud se může šířit na celé tělo. Kožní léze jsou červené, s drobnými pupínky a puchýřky na povrchu, mohou mokvat a pokrývat se stroupky a šupinami. Vyrážka je úporně svědivá, způsobující značný neklid dítěte. Velký význam při exacerbaci AD v tomto věku mají zejména potravinové alergenů, a to kravské mléko, vejce a citrusové plody. Dětská forma je typická pro předškolní a školní věk, ekzém je lokalizován do loketních a podkolenních jamek, na krk, zápěstí a hřbety rukou. Kůže již nemokvá, ale je hrubá, drsná, s oděrkami po škrabání. Dospělá forma má podobnou lokalizaci jako v dětském věku, kůže

však více svědčí, je zhrubělá a rozpraskaná (lichenifikovaná) a typické zhoršování přichází s psychickým stresem (Čapková, Š. et al. 2005).

Podle tradičního modelu patogeneze byla AD primárně poruchou funkce imunitního systému, při které buňky imunitního systému (Langerhansovy buňky, T buňky) vytvářejí zánětlivou odpověď na faktory zevního prostředí. Tato teorie však v současnosti ustupuje do pozadí a výzkum posledních 20 let ukazuje na AD jako na výsledek porušené bariérové funkce epidermis kůže v důsledku vnitřních strukturních a funkčních abnormalit kůže. Podle tohoto modelu se AD vyvíjí „zvenku dovnitř“, přičemž primárním defektem je abnormální epidermální bariéra. Mutace některých genů u pacientů s AD byly asociovány s defektem bariérové funkce.

Epidermální kožní bariéra je první obrannou linií organismu vůči škodlivým patogenům zevního prostředí. Je tvořena vrstvou kůže nazývanou stratum corneum, jejíž funkcí je mimo jiné prevence invaze patogenů zevního prostředí do organismu a kontrola ztrát vody přes epidermis. Stratum corneum má v závislosti na anatomické lokalizaci 10-30 vrstev keratinocytů diferencovaných na bezjaderné korneocyty, které mají místo plasmatické membrány velké molekuly proteinů tvořící nepropustnou vrstvu, tzv. zrohovatělý obal. Právě stratum corneum zabezpečuje optimální hydrataci epidermis, která je klíčovým faktorem pro udržení intaktní bariéry. Permeabilita epidermis je daná složitými interakcemi korneocytů, strukturálních proteinů (např. filagrin, FLG), regulačních enzymů a lipidů. Jakékoliv narušení těchto složek v důsledku vrozeného defektu, traumatu, snížené vlhkosti, změny pH nebo infekce může ovlivňovat efektivní bariérovou funkci epidermis. Bylo prokázáno, že deficit filagrinu oslabuje adhezi stratum corneum, umožňuje transepidermální ztráty vody a způsobuje dysregulaci kožního pH, v důsledku čehož dochází ke zvýšení kožní permeability. Mutace FLG genu se ztrátou funkce byly asociovány s rozvojem AD. Navíc pacienti s AD a mutací FLG mají závažnější a více perzistentní AD, zvýšené riziko časně senzibilizace a četné alergie a astma (Eichenfield, L.F. et al. 2012).

Při porušení epidermální bariéry přicházejí antigeny do kontaktu s buňkami imunitního systému, což vede k uvolnění prozánětlivých faktorů a následně ke vzniku dermatitidy. Cytokiny hrají důležitou roli v zánětu atopické kůže. Při akutní AD se uplatňují zejména Th2 cytokiny (IL-4, IL-13) ovlivňující tvorbu protilátek IgE a expresi adhezních molekul. Další cytokiny s prozánětlivým účinkem, které byly asociovány s AD, jsou TSLP a IL-31.

Obranná funkce kůže je také ovlivněna přítomností antimikrobiálních peptidů nespecifické imunity v kůži - jejich relativní nedostatek byl prokázán u pacientů s AD a pravděpodobně je

asociován s kolonizací kůže stafylokokem, která je u pacientů s AD velice častá. V normální kůži je produkce antimikrobiálních peptidů podporována cytokiny IL-17 a IL-22 secernovaných Th17 buňkami. V atopické kůži je však tento efekt rušen přítomností Th2 cytokinů. To může vést k nižší koncentraci antimikrobiálních peptidů v atopické kůži a následně kolonizaci stafylokokem. *Stafylococcus aureus* a jeho superantigeny hrají významnou roli při exacerbaci AD.

Pacienti s AD mají v závislosti na aktivitě nemoci různě vysoké sérové hladiny IgE protilátek, což by mohlo svědčit pro to, že systémová Th2 imunitní odpověď může souviset s dysfunkcí epidermální bariéry a penetraci faktorů zevního prostředí, spíše než pro vnitřní imunologickou přecitlivělost. Otázkou zůstává, jestli defekt této bariéry umožňuje sekundární změny v imunologické odpovědi, které vedou ke vzniku AD a dalších atopických onemocnění (Weston, W.L. and Howe, W. 2013).

Alergická rinokonjunktivitida (AR) zahrnuje příznaky imunologicky zprostředkované reakce přecitlivělosti na nosní sliznici a očních spojivkách. Většina případů je zprostředkovaná protilátkami IgE. V závislosti na trvání příznaků se rozlišuje intermitentní a perzistující rinokonjunktivitida (Johansson, S.G. et al. 2004). Mezi typické projevy patří svědění, kýchání, zvýšená sekrece a/nebo blokáda nosních průduchů, které jsou často doprovázené svěděním očí, nosu a patra. Dalšími příznaky mohou být zadní rýma, kašel, podrážděnost a únava. Tyto příznaky mohou velice znepríjemňovat život - často vedou k poruchám spánku, oslabené výkonnosti ve škole, v práci nebo při běžných denních aktivitách. Intermitentní nebo sezonní rinitida je obvykle způsobena pyly stromů, trav nebo bylin a má předvídatelný výskyt v určitém ročním období, zatímco perzistentní rinitida je nejčastěji způsobena alergeny domácího prostředí (prach, roztoči, plísňe, zvířecí srst).

AR je častým onemocněním, postihujícím 10-30% dětí i dospělých v USA a dalších průmyslových zemích. Její prevalence stoupá zvláště ve městských oblastech. Mezi rizikové faktory vzniku AR patří atopie v rodině, mužské pohlaví, narození v pylové sezoně, prvorozenost, časná užívání antibiotik, pasivní kouření v prvním roce života (matka kuřačka), expozice domácím alergenům, sérová hladina IgE vyšší než 100 IU/ml před 6. rokem života a přítomnost alergen specifických IgE. AR se typicky vyvíjí po několika letech expozice alergenům a předchází jí senzibilizace, tedy přítomnost IgE protilátek proti vzdušným alergenům v séru. U dětí vzniká senzibilizace postupně vůči alergenům, kterým je vystaveno (nejdříve prach, roztoči, později pyly). AR se objevuje až po 2. roce života, obvykle přetrvává

v dětství a často se objevuje v kombinaci s jinými atopickými nemocemi. Asi 50% pacientů s astmatem má současně AR.

AR je typickým onemocněním zprostředkovaným Th2 buňkami. Setkání s alergenem vede k aktivaci Th2 buněk, uvolněním jejich cytokinů (IL-4, IL-5, IL-13), tvorbě IgE protilátek a přilákání mastocytů, eozinofilů, bazofilů a dalších buněk do místa zánětu. Histamin je dominantním mediátorem odpovědným za akutní příznaky AR – sekreci hlenu, vazodilataci a kongesci nosní sliznice, zvýšenou cévní permeabilitu a edém, jakož i dráždění nervových zakončení spojené s kýcháním. Kromě vazoaktivních faktorů produkují mastocyty i cytokiny (GM-CSF, TNF- α , TGF- β , IL-1 až IL-6, a IL-13), které vedou k chemotaxi a infiltraci nosní sliznice eozinofily a podporují další produkci IgE. Eozinofily a mastocyty se svými produkty vzájemně potencují a způsobují poškození tkáně. Pozdní fáze alergické reakce je základem pro přechod do chronicity (deShazo, R.D. and Kemp, S.F. 2013).

Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, na němž se účastní mnoho buněk, zvláště žírné buňky, eozinofily a T lymfocyty. U citlivých jedinců je zánět příčinou opakovaných stavů hvízdavého dýchání, zkráceného dechu, dechové tísně a kašle, zvláště v noci a/nebo časně ráno. Příznaky jsou většinou spojeny s variabilní obstrukcí dýchacích cest, která je alespoň částečně reverzibilní spontánně nebo po léčbě. Zánět je také příčinou zvýšené bronchiální reaktivity na řadu podnětů. Podle přítomnosti IgE na běžné alergeny lze astma rozdělit na alergické a nealergické. Alergické astma je zprostředkováno imunologickými mechanismy. Podle trvání příznaků se astma označuje jako intermitentní nebo perzistující (Johansson, S.G. et al. 2004).

V roce 2004 trpělo astmatem odhadem 300 milionů lidí na světě a předpokládá se, že do roku 2025 tento počet vzroste na 400 milionů. Prevalence astmatu v jednotlivých regionech světa je v rozmezí 1-18%, v nejmypělejších zemích světa kolem 10%, v České republice je odhadovaná na 8% (Kašák, V. 2011). Výskyt astmatu stoupá současně s urbanizací a převzetím západního životního stylu. Vzestup prevalence astmatu je spojen se vzestupem atopické senzibilizace a se vzestupem prevalence jiných alergických onemocnění jako je AD a AR. Odhaduje se, že astma je příčinou 1 z 250 úmrtí na světě a mnohým z těchto případů by šlo předejít při optimální dostupnosti zdravotní péče. Astma představuje značnou ekonomickou zátěž jak přímou (hospitalizace, léky), tak nepřímou (praceneschopnost) (Masoli, M. et al. 2004; Litonjua, A.A. and Weiss, S., T. 2013).

Genetická predispozice a expozice faktorům zevního prostředí jsou zásadními rizikovými faktory ve vývoji alergického astmatu. Astma se častěji vyskytuje u atopiků a mezi významné faktory zevního prostředí patří senzibilizace na domácí alergeny, expozice alergenům v pracovním prostředí, aktivní i pasivní kouření, kouření matky v prenatálním období dítěte, obezita, atd. Respirační infekce virového nebo bakteriálního původu jsou známým spouštěčem astmatu, ačkoliv podle některých studií mají respirační infekce v raném dětství spíše protektivní charakter proti astmatu (Litonjua, A.A. and Weiss, S., T. 2013).

Na patogenezi astmatu se podílí množství zánětlivých buněk - mastocyty, eozinofily, lymfocyty a jejich produkty. Zánět dýchacích cest u astmatu je zprostředkován Th2 buněčnou odpovědí a je provázen tkáňovou eozinofilií, remodelací stěny a změněnou funkcí dýchacích cest. Patognomickým symptomem pro astma je bronchiální hyperreaktivita, která je způsobená přemrštěnou reverzibilní obstrukcí dýchacích cest v důsledku stahů hladkého svalstva. Na remodelaci dýchacích cest se podílí zejména epitel, fibroblasty, hladký sval a endotel za účasti mediátorů a cytokinů. Progrese k rozvinutému astmatu závisí na různých genetických, environmentálních a infekčních faktorech.

U alergického astmatu je zánět v dýchacích cestách klíčovým dějem, který vede k remodelaci a poškození dýchacích cest. Dominantní roli v tomto zánětu hrají Th2 buňky a Th2 cytokiny (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 a GM-CSF), které řídí diferenciaci a maturaci mastocytů a eozinofilů, přilákání bazofilů a izotypový přesmyk v B buňkách k produkci IgE protilátek. IL-4 je důležitý pro alergickou senzibilizaci a produkci IgE, IL-5 je nutný pro prožívání eozinofilů, IL-13 má pleiotropní účinky na plíce, včetně vývoje bronchiální hyperreaktivita a remodelaci dýchacích cest (Holgate, S.T. 2012).

Aktivované eozinofily v dýchacích cestách produkují leukotrieny a faktor aktivující destičky, které způsobují kontrakci hladkého svalstva, dále cytokiny GM-CSF, TGF- α a β a některé interleukiny, které se účastní remodelace a fibrózy dýchacích cest. Toxické produkty granul eozinofilů, jako např. hlavní bazický protein, neurotoxin derivovaný z eozinofilů, eozinofilní peroxidáza, eozinofilní kationický protein, mohou poškodit epitel a nervová zakončení v dýchacích cestách.

Mastocyty produkují bronchokonstrikční mediátory, jako histamin, některé prostaglandiny a leukotrieny, a uvolňují TNF- α , který se podílí na aktivaci a přísunu dalších imunitních buněk, změně funkce a růstu hladkého svalstva dýchacích cest. Bazofily produkují histaminy, leukotrieny a cytokiny IL-4 a IL-13 (Liu, M. 2013).

Výzkum posledních let ukazuje, že i jiné populace efektorových Th buněk se podílejí na patogenezi astmatu. Th17 buňky podporují přísun neutrofilů do dýchacích cest, bronchiální hyperreaktivitu a potencují Th2 buňkami zprostředkovaný eozinofilní zánět (Lloyd, C.M. and Hessel, E.M. 2010). Cytokin Th9 linie IL-9 byl nalezen v plicní tkáni astmatiků a pravděpodobně hraje významnou roli v regulaci a potencování alergického zánětu a remodelaci stěny dýchacích cest. Nicméně IL-9 může být produkován i jinými buňkami a jeho původ, jakož i role Th9 buněk u astmatu, zatím není objasněna (Xing, J. et al. 2011).

NKT buňky jsou schopny svým invariantním receptorem rozpoznat glykolipidové antigeny (např. rostlinných pylů) a vzápětí produkovat cytokiny IL-4 a IL-13, které se účastní zánětu v dýchacích cestách a produkci IgE protilátek (Umetsu, D.T. and DeKruyff, R.H. 2010).

Nespecifický imunitní systém se také významně podílí na rozvoji alergického zánětu v dýchacích cestách, a to jak účastí PRR receptorů (TLR4 na povrchu epitelálních buněk dýchacích cest), dendritických buněk i neutrofilů (Liu, M. 2013).

V patogenezi astmatu se mohou navíc uplatňovat i alternativní cesty aktivace Th2 buněčné odpovědi, což by mohlo vysvětlovat heterogenicitu astmatu jako nemoci. Faktory poškozující plicní epitel (včetně alergenů, jejich proteáz a patogenních mikrobů) vedou k produkci cytokinů jako IL-33, IL-25 a TSLP, jež podporují Th2 buněčnou imunologickou odpověď v dýchacích cestách s produkcí velkého množství cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13 (West, E.E. et al. 2012).

Eozinofilní kolitída (EK) neboli alergická kolitída je benigní onemocnění kojeneckého věku projevující se přítomností čerstvé krve v stolici u jinak zdravých dětí. Prevalence není známa. Obvykle se manifestuje v prvních 6 měsících života, zejména u plně kojených dětí (60%) nebo dětí krmených mléčnou formulí. V etiopatogenezi zánětu se uplatňuje imunologická reakce na potravinový alergen, která vede k zánětlivým změnám v tlustém střevě s typickou infiltrací eozinofilů. Mechanismus imunologické odpovědi není v případě EK jasný a řadí se mezi non-IgE reakce. V drtivé většině případů se jako alergen uplatňuje bílkovina kravského mléka a v 60% se jedná o plně kojené děti, přičemž alergen požitý matkou přestupuje do mateřského mléka (β -laktalbumin). Mezi rizikové faktory vzniku EK patří nezralost imunitního systému, porušená permeabilita střeva a další faktory, které aktivují fokální imunitní systém, jako je genetická predispozice v kombinaci se senzibilizujícími alergeny v potravě. Diagnóza je založená na anamnéze, klinickém vyšetření a vymizení příznaků po eliminaci suspektního alergenu ze stravy při současném vyloučení jiných příčin

enterorrhagie. Na potvrzení diagnózy by měl být proveden eliminačně-expoziční test. Laboratorní alergologické testy nejsou totiž příznačné, ale někdy je přítomná eozinofilie. Léčba spočívá v dočasné eliminaci alergenu ze stravy, v případě plně kojených dětí eliminaci kravského mléka ze stravy matky, nebo používáním mléčné formule s extenzivním hydrolyzátem či aminokyselinovým preparátem kravského mléka. Prognóza je velice dobrá, do 1-3 let života většinou dojde k navození tolerance.

EK je tedy typickou potravinovou alergií, přičemž bílkovina kravského mléka je jedním z prvních alergenů, se kterým se dítě po narození setkává. Potravinová alergie je abnormální reakce slizničního imunitního systému gastrointestinálního traktu (GIT) na požitý alergen. Projevy potravinové alergie se všeobecně mohou lišit od mírných reakcí až po těžký šok a jejich lokalizace může být v GIT, ale i na kůži a v respiračním systému. Imunologický mechanismus lze jednoznačně připsat pouze reakcím zprostředkovaným IgE protilátkami spojenými s aktivací mastocytů (I. typ přecitlivělosti), u ostatních reakcí se mechanismus pouze předpokládá. Z patogenetického hlediska lze potravinové alergie rozdělit na reakce zprostředkované IgE, non-IgE reakce a smíšený typ. U smíšeného typu se předpokládá alergický etiopatogenetický základ, protože více než polovina pacientů jsou atopici.

Alergická kolitida se řadí k non-IgE reakcím. U tohoto typu reakcí dochází k prvním projevům alergie s určitou latencí po požití alergenu. Dosud nebyl objasněn patogenetický mechanismus, ale předpokládá se účast T buněk, pravděpodobně deficit TGF- β 1 a excesivní TNF- α (Maloney, J. and Nowak-Wegrzyn, A. 2007; Bone, J. et al. 2009)

1.5. Ontogeneze imunitních reakcí, situace u novorozence

1.5.1. Ontogeneze imunity

Vývoj imunitního systému plodu úzce souvisí s vývojem krvetvorby. První primitivní buňky odvozené z mezodermy se objevují ve žlutkovém váčku již kolem 18. dne gestace, poté migrují do přední oblasti primitivního proužku embrya a vyvíjejí se z nich progenitory erytroidní řady, z kterých vznikají progenitory granulocyto-makrofágové řady a progenitory megakaryocytů. Tyto hematopoetické kmenové buňky mají schopnost kolonizovat játra (hepatální období krvetvorby od 6.-8. týdne gestace) a posléze zabezpečují dlouhodobou krvetvorbu v kostní dřeni. Přesun hematopoetických kmenových buněk do kostní dřene se

děje kolem 20. gestačního týdne a je zprostředkován chemokinem CXCL12 produkovaným stromálními buňkami kostní dřeně, jehož receptor se nachází na hematopoetických kmenových buňkách. Brzlík (thymus) se vyvíjí z 3. faryngálního vaku a výchlípků, ze které vznikají epitelové buňky a dřeň thymu. Od 8. gestačního týdne je thymus kolonizován hematopoetickými kmenovými buňkami a ve 20. týdnu je vývoj thymu ukončen. T buňky se vyvíjejí v thymu od 16.-20. týdne v těsném kontaktu s epiteliálními buňkami thymu a migrují do periferie, kde vytvářejí periferní pool T buněk. Thymopoéza přetrvává až do dospělosti, ačkoliv v pomalejším tempu oproti neonatálnímu období. Sekundární lymfatické orgány, jako slezina, lymfatické uzliny a Peyerovy plaky vznikají od 12. gestačního týdne. Pro založení lymfatické tkáně v průběhu embryogeneze jsou nevyhnutelné interakce mezi hematopoetickými buňkami a stromálními buňkami, ale pro její vývoj v tomto období není potřeba externích stimulů. Výsledkem interakce těchto dvou typů buněk je upregulace adhezních molekul a chemokinů, nevyhnutelných pro příliv hematopoetických kmenových buněk do lymfatických uzlin. T buňky se objevují v lymfatických uzlinách od 14. gestačního týdne a od 17. týdne lze najít v primárních folikulech B buňky obklopené folikulárními dendritickými buňkami. Po narození a expozici novým antigenům dochází k plynulému přísunu B buněk, T buněk i monocytů do lymfatické tkáně. Slizniční lymfatická tkáň nosní sliznice, slzných kanálků a tenkého střeva vzniká až postnatálně za účasti stimulace imunitního systému kolonizujícími bakteriemi.

Jako první z buněk nespecifické imunity se objevují fagocytující buňky – nejdříve monocyty, které jsou již kolem 18.-20. gestačního týdne schopny respiračního vzplanutí (produkují vysoké koncentrace superoxidového radikálu), poté neutrofilů, kterých exponenciálně přibývá po 31. týdnu a po narození jsou dominantním typem leukocytů. Kromě schopnosti respiračního vzplanutí jsou ale monocyty i neutrofilů funkčně nezralé. Fetální dendritické buňky jsou rovněž nezralé (myeloidní DC produkují méně IL-12, který je klíčový pro propojení nespecifické a specifické imunity a plasmacytoidní DC produkují málo IFN- α). Počet NK buněk stoupá rovnoměrně s gestačními týdny a nejvyšší hladiny dosahuje při narození, pak začne postupně klesat a ustálí se kolem 5. roku života. Nicméně jejich cytotoxicita je významně oslabená v důsledku nízkých hladin aktivačních cytokinů. Jednotlivé složky komplementu jsou sníženy na 10-70% oproti dospělému věku, ale rychle se normalizují. Nespecifická imunita se vyvíjí v průběhu prvních let života, přičemž evolučně staré funkce, jako např. respirační vzplanutí, se vyvinou jako první. Většina mechanismů

nespecifické imunity dosáhne zralosti v předškolním věku, ale až v období dospívání dosáhne své plné kapacity.

Počet lymfocytů stoupá v prenatálním období lineárně s gestačním věkem a po narození narůstá ještě více. Počet T buněk začne klesat po prvním roce života a normalizuje se v školním věku. Přes jejich vysoký počet je však funkčnost T buněk významně oslabená, např. i díky nízké produkci IL-2. U plodu je výrazná polarizace buněčné odpovědi na Th2, čehož důkazem je nízká produkce IFN- γ T buňkami. Na druhou stranu v pupečnickové krvi lze najít vysoké hladiny Treg se silnou supresorovou funkcí. Prenatální imunitní odpověď je celkově řízena cytokiny potlačujícími imunitní odpověď. T buněčná odpověď je u plodu a novorozence odkloněna směrem k potlačování cytotoxicity a trpí nedostatkem antigenní stimulace. Zánět je pro plod nežádoucím dějem potenciálně vedoucí k předčasnému porodu nebo potratu, a proto jsou fetální buňky imunitního systému méně reaktivní a produkce zánětlivých mediátorů je nízká. Funkčnost buněk se zlepšuje v průběhu prvního roku života, ale po celé dětství přetrvává „nezkušenost“ T buněk.

Počet B buněk vykazuje podobnou kinetiku jako počet T buněk. Při narození je 95% B buněk nezralých oproti 10% nezralých buněk v dospělosti. Nezralé B lymfocyty exprimují povrchový imunoglobulin IgM a po setkání s antigenem se funkčně inaktivují, čím je zabezpečena tolerance vůči antigenům v období intrauterinního vývoje. Produkce specifických protilátek u plodu začíná kolem 20. gestačního týdne, ale hladina protilátek IgM a IgA plodu je za normálních okolností až do porodu neměřitelná a zvýšení IgM bývá známkou intrauterinní infekce. IgG se začíná tvořit až po porodu pod vlivem antigenních stimulů, protilátkovou imunitní odpověď novorozence však kompenzují IgG matky, které přestupují placentou již od 8. gestačního týdne aktivním transportem (Bartůňková, J. 2002; Ygberg, S. and Nilsson, A. 2012).

1.5.2. Situace u novorozence

V průběhu intrauterinního vývoje je imunitní odpověď plodu aktivně potlačovaná, protože zánětlivé reakce (produkce prozánětlivých cytokinů TNF a IL-1) by mohly vést k předčasnému ukončení těhotenství. Narození dítěte ovšem znamená z imunologického hlediska rapidní změnu - přechod ze sterilního prostředí dělohy do zevního světa, kde se

organismus musí chránit před škodlivými patogeny, ale současně i kolonizovat komenzálními bakteriemi.

Intrauterinní imunitní odpověď plodu byla polarizovaná ve směru Th2 a charakterizovaná nízkou produkcí cytokinů IFN- α , IFN- γ , IL-12, vyšší produkcí IL1b, IL6, IL23 a mnohem více IL-10. Regulační CD4+CD25+Treg buňky plodu inhibují Th1 imunitu a udržují periferní toleranci jsou zvláště četné a funkčně schopné při porodu. Tato polarizace však dělá novorozence náchylného vůči mikrobiálním infekcím a oslabuje žádoucí imunitní odpověď při očkování, a proto musí dojít k přesměrování polarizace na Th1. Po narození a s přibývajícím věkem imunitní odpověď dozrává. Podle hygienické teorie může opakovaná a častá expozice mikrobům tento proces maturace urychlit, posilovat polarizaci Th1 na úkor Th2 a působit tak preventivně proti vzniku alergických nemocnění.

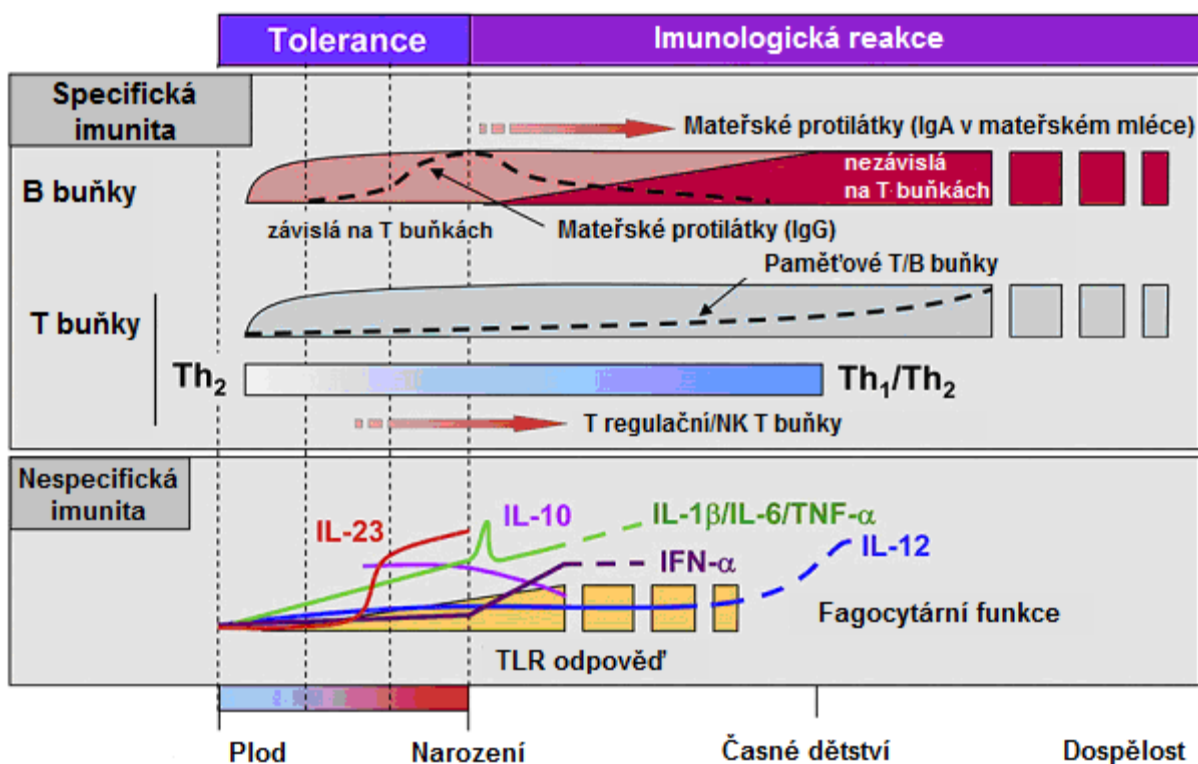
Protože v průběhu intrauterinního vývoje chyběla antigenní stimulace, imunologická odpověď novorozence stojí často na mechanismech nespecifické imunity. Přes relativně vysoké hladiny buněk nespecifické imunity jsou ale tyto buňky často funkčně nezralé. Nedostatečná fagocytární odpověď novorozence spočívá v nepřiměřeném počtu aktivovaných neutrofilů v místě infekce, nedostatečné rezervě fagocytů v případě těžké akutní infekce a pravděpodobně i dalších abnormálně fungujících imunostimulačních nebo imunoregulačních procesech. U novorozence produkce určitých cytokinů monocyty a dendritickými buňkami v reakci na stimuly (IL-6, IL-10 a IL-23) převyšuje jejich produkci u dospělých, nicméně oproti monocytům dospělého jedince produkují monocyty novorozence všeobecně méně cytokinů při reakci na infekční stimuly. Až kolem 3. roku života produkují stejné hladiny TNF- α a IL-6, ale pořád nižší hladiny dalších cytokinů IFN- γ a IL-12. Po narození je typická neutrofilie, s normalizací hladin po 72 hodinách, která je daná nerovnováhou mezi jejich zásobou v kostní dřeni a v periférii. Neutrofily novorozence mají však nižší expresi adhezivních molekul, nižší chemotaktickou schopnost a motilitu a nižší schopnost produkovat baktericidní faktory, jako např. laktoferin. Tato schopnost bývá ještě více snižena u předčasně narozených novorozenců. Dendritické buňky novorozence jsou rovněž nezralé a produkují málo IL-12, čímž vážně aktivace specifické imunitní odpovědi. Počet dendritických buněk po narození stoupá a kolem 5. roku života se zdvojnásobí. Počet NK buněk je nejvyšší při narození, do 5. roku života klesá, ale jejich cytotoxická aktivita je snižena, pravděpodobně v důsledku nízkých hladin aktivačních cytokinů (Bartůňková, J. 2002; Levy, O. 2007).

Cytotoxické CD8+ T buňky novorozence jsou pomalé v odpovědi a vyžadují více stimulů ke své aktivaci. Novorozenec má v důsledku nedostatečné antigenní stimulace v prenatálním období také nízké hladiny paměťových T i B buněk. Nedostatečná funkce T-lymfocytů novorozence spočívá především v jejich nezralosti – nižší produkci cytokinů, nízké cytotoxické aktivitě, omezené proliferaci při setkání s antigenem, slabé stimulaci produkce protilátek a izotopového přesmyku a nedostatečné stimulace fagocytární aktivity (Lawrence, R.M. and Pane, C.A. 2007).

Produkce specifických protilátek začíná po porodu při antigenní stimulaci. Novorozenec produkuje velice nízké hladiny protilátek, navíc s omezenou specificitou. Jako první produkuje protilátky IgM. Protilátková odpověď vůči určitým specifickým antigenům dozrává velice pomalu – např. vůči polysacharidům, což způsobuje nedostatečnou imunitní odpověď proti opouzdřeným bakteriím (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*). Tento jev je částečně vysvětlován nedostatečně vytvořenou marginální zónou sleziny, kde za normálních okolností probíhá imunitní odpověď na polysacharidové antigeny nezávisle na T buňkách; dále nižšími hladinami komplementového receptoru CD21 na B buňkách a nízkou aktivitou komplementu. Funkční protilátková odpověď novorozence je kompenzována protilátkami IgG matky, které zejména ve třetím trimestru gravidity prostupují transplacentárně k plodu a později protilátkami IgA a IgG v mateřském mléce. Transplacentární přestup protilátek je aktivním transportem zprostředkovaným neonatálním Fc receptorem na syncytiotrofoblastech placenty. Mateřské protilátky IgG představují imunologickou paměť matky a chrání dítě do 6. měsíce života, kdy začíná fungovat efektivní tvorba IgG protilátek u dítěte (Ygberg, S. and Nilsson, A. 2012).

Vývoj slizniční imunity novorozence je úzce spjatý s kolonizací střeva komenzálními bakteriemi. Kolonizace střeva je ovlivněna mnoha faktory, jako např. gestační věk dítěte, způsob porodu (chirurgický vs. přirozený), strava novorozence a genetické faktory. Hlavním zdrojem kolonizujících bakterií je bakteriální flóra matky. Jako první proto kolonizují střevo *Escherichia coli*, *Enterococcus species* a *Streptococcus species*, po kterých následují obligatorní anaeroby. U kojených dětí pak převažuje *Bifidobacterium species*, zatímco u dětí krmených mléčnou formulí převažuje *Bacteroides species* (Ruemmele, F. et al. 2009). Během této časně kolonizace se produkty mikrobů ve střevním lumen (lipopolysacharid gramnegativních bakterií) vážou na TLR receptory (konkrétně TLR4) na epiteliálních buňkách střeva, čím tlumí signalizaci přes tyto receptory a brání škodlivé zánětlivé odpovědi ve střevě. Toto je jedním z důležitých mechanismů navození orální tolerance u novorozence,

který umožňuje dítěti tolerovat proteiny v potravě. Slizniční imunita může být modifikovaná mateřským mlékem, které obsahuje sekreční IgA (sIgA), IgG, imunomodulační cytokiny (TGF- β , IL-10), antibakteriální peptidy, imunitní buňky a prebiotické faktory. Sekreční IgA je odrazem antigenní stimulace v lymfatické tkáni střeva a dýchacích cest matky a je velice reaktivní vůči patogenům. Imunitní buňky v mateřském mléce produkují cytokiny, které stimulují vývoj buněk produkujících IgA u novorozence. Mateřské mléko má tedy imunomodulační vlastnosti na střevo kojence, které indukují subklinickou infekci a postupně navozují paměť vůči patogenům, zatímco potlačují zánět (Lawrence, R.M. and Pane, C.A. 2007; Verhasselt, V. 2010).



Obrázek 7. Vývojové změny imunitního systému. Schéma ilustruje přechod od stavu imunologické tolerance plodu a postupné dozrání hlavních složek nespecifické a specifické imunity v důsledku expozice mikroorganismům a dalším faktorům zevního prostředí po narození. Specifická imunita (horní část): Mateřské protilátky IgG prostupují transplacentárně zejména v poslední fázi gravidity, po narození je dítě chráněno mateřskými protilátkami (IgA) v mateřském mléce. Protilátková odpověď dítěte plně dozrává později v dětství. T buňky novorozence jsou predominantně směřované k Th₂ odpovědi a při narození je velké zastoupení Treg a NK buněk. Nespecifická imunita (spodní část): tvorba prozánětlivých (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23) a protivirových cytokinů (IFN- α) je u předčasně narozených novorozenců silně potlačena, zatímco produkce protizánětlivého cytokinu IL-10 je relativně vysoká v poslední fázi gravidity a při narození (Sharma, A.A. et al. 2012).

1.5.3. Reakce mononukleárních buněk pupečnickové krve (CBMC)

Buňky pupečnickové krve se vyvíjejí v chráněném prostředí a z imunologického hlediska jsou naivní. Buněčnou složku pupečnickové krve tvoří především lymfocyty a monocyty. Pupečnicková krev má srovnatelnou populaci B lymfocytů a nižší celkový počet T-lymfocytů (CD3+), ale vyšší podíl CD4+/CD8+ buněk v porovnání s periferní krví dospělého člověka. V pupečnickové krvi je také hojně zastoupení NK buněk a nižší počet CD56+ cytotoxických T-lymfocytů. Relativní nezralost buněk pupečnickové krve v porovnání s buňkami dospělého jedince je daná vyšším zastoupením nezralých lymfocytů (CB45RA+) a nižším počtem zralých paměťových T lymfocytů (CD45RO+). V porovnání s buňkami dospělého jedince produkují buňky pupečnickové krve celkově nižší hladiny cytokinů, přičemž produkují více protizánětlivých cytokinů (IFN- γ), IL-4 a IL-10 než prozánětlivého IL-2. I díky této imunologické nezralosti vykazují buňky pupečnickové krve nízkou incidenci reakci štetu proti hostiteli a přenosu virů. Pupečnicková krev obsahuje značnou populaci hematopoetických kmenových/progenitorových buněk, které mají podle mnohých prací za určitých specifických podmínek schopnost vývoje v jakýkoliv typ buňky. V kombinaci s nízkou imunogenicitou jsou proto velice lákavým objektem výzkumu v transplantologii (Newcomb, J.D. et al. 2007).

1.5.4. Mateřské mléko, jeho složení a význam pro imunitní systém a obranyschopnost dítěte

Mateřské mléko (MM) je unikátním produktem organismu savců, který zabezpečuje optimální výživu pro novorozeného jedince. Význam mateřského mléka a kojení ovšem zdaleka nespočívá pouze v jeho nutriční hodnotě, ale posledních 30 let je mateřské mléko fascinujícím objektem v oblasti imunologického výzkumu. V kritickém období po narození mateřské mléko (pasivně) kompenzuje obrannou funkci nezralého vyvíjejícího se imunitního systému novorozence, zatímco současně stimuluje jeho vývoj.

Objem a složení MM odpovídá právě aktuálním potřebám dítěte a mění se v průběhu laktace od kolostra přes přechodné mléko (7-14 dní po porodu) k zralému mléku s již relativně stabilním složením. Kromě časového odstupu od porodu ovlivňuje složení MM i četnost porodů matky, objem produkovaného MM, frekvence kojení, strava a stav výživy samotné

matky, jakož i její zdraví, nemoci nebo stres. Je tedy pochopitelné, že existují značné interindividuální rozdíly v složení mateřského mléka.

Energetický obsah mateřského mléka je 67 kcal/100 ml a stoupá v průběhu laktace. Obsah **proteinů** v MM při narození dítěte je cca 2.3 g/dl, postupně klesá a asi měsíc po porodu se ustálí na 1.8 g/dl a celkově zabezpečuje 8% energetického příjmu dítěte. Na rozdíl od kravského mléka obsahuje lidské MM větší podíl lépe stravitelných proteinů syrovátky (70% vs. 18%) a méně kazeinů (30% vs. 82%). Hlavním proteinem syrovátky lidského MM je laktalbumin, zatímco hlavním proteinem kravského mléka je potenciálně alergizující laktoglobulin. Další důležité proteiny jsou laktoferin, lysozym a sekreční imunoglobulin A. Podrobnou funkční analýzu proteinů mateřského mléka provedli italští vědci, přičemž u více než 100 popsaných proteinů prokázali, že jejich biologická funkce se neomezuje pouze na energetický zdroj a antimikrobiální účinky, ale i na její aktivní účast při stimulaci růstu tkání novorozence a vývoje správně fungujícího imunitního systému (D'Alessandro, A. et al. 2010). Asi 20% dusíku MM je uloženo mimo proteiny, a to v nukleotidech, volných aminokyselinách a močovíně. **Nukleotidy** jsou důležité pro buněčné funkce (energetický metabolismus, produkce nukleových kyselin, druzí poslové v signálních drahách, koenzymy) a jsou zvláště důležité v situacích se zvýšenou metabolickou aktivitou (onemocnění, růst atd.). **Lipidy** tvoří přibližně 50% energetické hodnoty MM. Trávení lipidů MM je usnadněno jejich organizací do tukových kapének, a to gastrickou lipázou stimulovanou žlučovými solemi. Unikátnost lipidů MM spočívá ve vysokém obsahu mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (LCPUFA) (kyselina arachidonová, a dokosaheptaenová, deriváty esenciálních mastných kyselin, kyselina linoleová a linolenová), které kromě jiného zlepšují kognitivní funkce, růst a zrak. Obsah lipidů v MM je velice variabilní - stoupá v průběhu laktace, mění se v průběhu dne, dokonce i v průběhu krmení (tzv. zadní mléko má vyšší obsah lipidů než přední mléko).

Sacharidy MM jsou zastoupené převážně laktózou a oligosacharidy. Laktóze je připisována měkčí konzistence stolice kojených dětí, osídlení střeva nepatogenní střevní flórou a lepší absorpce minerálů. Oligosacharidy jsou významným prebiotickým faktorem.

Koncentrace vápníku a fosforu MM je relativně stálá, a přestože je nižší než v umělém mléce, jeho vstřebávání je lepší z MM než z umělého mléka. Hladina železa, zinku a mědi klesá v průběhu laktace, ale v období prvních 6 měsíců je pro dítě dostačující. Hladina vitaminů v MM závisí na zásobě vitaminů v těle matky a mezi běžné deficity vitaminů kojenců v tomto

období patří deficit vitamínu K a D, u matek veganek pak i vitamínu B12 (Schanler, R.J. 2013).

MM obsahuje celou řadu dalších biologicky aktivních látek, jako jsou hormony (prolaktin, oxytocin, adrenokortikotropný hormon, hormon stimulující štítnou žlázu, růstový hormon, tyroxin, kortisol a inzulin), růstové faktory (EGF, IGF-1, HGF), neuropeptidy (neurotensin, substance P, somatostatin a vazoaktivní střevní peptid (VIP)), cytokiny a další. Bioaktivní faktory v MM mají přímou i nepřímou antimikrobiální aktivitu, stimulují vývoj imunitního systému kojence a moduluji jeho imunitní odpověď, mají protizánětlivé účinky a podporují růst a vývoj tkání.

V průběhu prvních let života se imunitní systém dítěte vyvíjí pod nepřetržitým působením nových antigenů při denním kontaktu s mikroby. V tomto klíčovém období poskytuje MM kojenci četné chybějící bioaktivní faktory, které zastupují imunologickou ochranu na úrovni sliznic, moduluji imunitní odpověď nebo stimulují růst, čímž podporují vývoj slizničních bariér a imunitního systému kojence (tabulka 4).

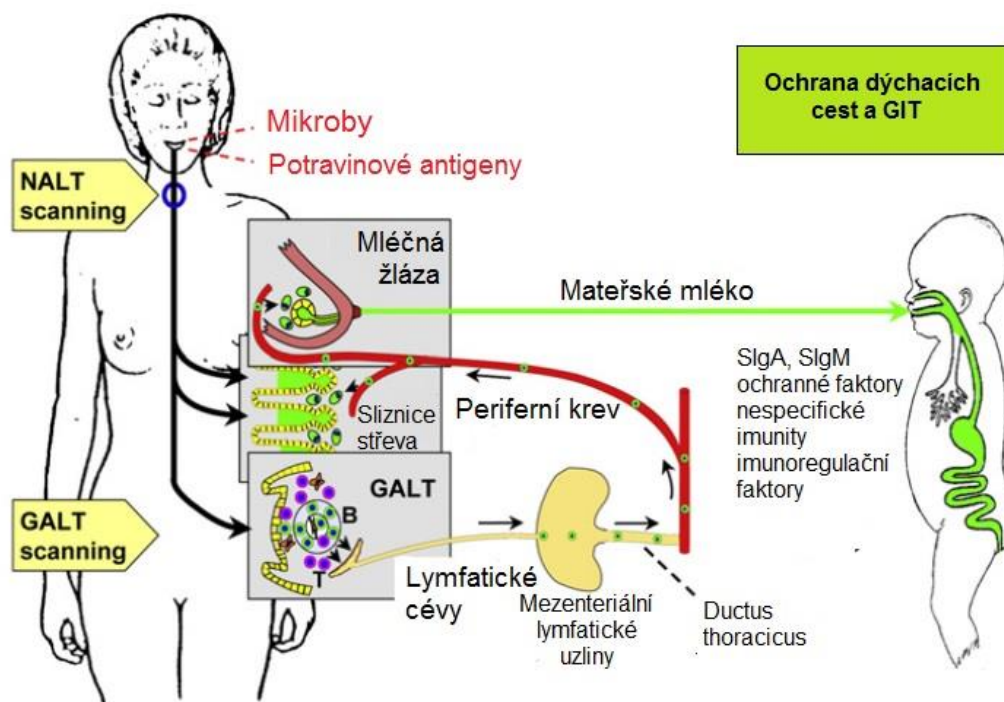
Mléčná žláza je v období laktace integrální součástí slizničního imunitního systému matky a protilátky přítomné v MM jsou odrazem antigenní stimulace slizničního imunitního systému (MALT) střeva i dýchacích cest matky (tzv. enteromamární systém) (Kleinman, R.E. and Walker, W.A. 1979). Sekreční protilátky MM jsou tedy specificky cílené proti infekčním patogenům, s kterými přichází do styku matka a velice pravděpodobně tedy i její dítě v prvních týdnech života. Kojení tak představuje geniální imunologické propojení matky a dítěte (obrázek 8).

Jako součást nespecifické imunity mohou také fungovat prebiotika, volné mastné kyseliny, monoglyceridy, antimikrobiální peptidy a glykany MM, ale i další faktory které stimulují dozrávání gastrointestinálního epitelu jako bariéry (bifidus faktor, lysozym, laktoperoxidáza, laktoferin, lipoproteinová lipáza a EGF). Antimikrobiální složky MM jsou odolné vůči trávicím enzymům kojence a jsou schopny účinkovat na sliznicích jeho gastrointestinálního, respiračního i močového traktu. Mezi proteiny s antimikrobiální aktivitou patří imunoglobuliny, laktoferin, lysozym, α -laktalbumin, kazein. Volné mastné kyseliny a monoglyceridy fungují jako detergenty a způsobují lýzu virů, bakterií a prvoků. Protizánětlivé účinky mají enzymy MM (žlučové soli, kataláza, glutathion peroxidáza), ale i vitaminy A, C a E, které fungují jako zametači volných kyslíkových radikálů. Mateřské mléko obsahuje celou řadu cytokinů a jejich receptorů, které mají prozánětlivé, ale i protizánětlivé a imunomodulační účinky, i když důkazy o funkci některých cytokinů

u kojence chybí. Imunitní systém novorozence není schopný produkce cytokinů v dostatečném množství, které by zabezpečilo ochranu hostitele. V porovnání s dospělým člověkem tvoří buňky novorozence menší množství cytokinů TNF- α , GM-CSF a značně méně cytokinů IL-3, -4, -8, -10, IFN- γ . Předpokládá se, že biologická funkce těchto faktorů, jejichž produkce je u novorozence vývojově opožděna, může být částečně zastoupena biologicky aktivními faktory mateřského mléka. Některé cytokiny MM jsou rezistentní vůči trávicím enzymům novorozence a přežívají neporušené cestu gastrointestinálním traktem kojence nebo jsou produkovány současně s antiproteázami, které interferují s proteolýzou. Leukocyty MM jsou z 90% neutrofily a makrofágy, aktivně fagocytující a zabíjející mikroby. Lymfocyty mohou přispívat k antimikrobiální ochraně produkcí cytokinů a protilátek IgA. Mnoho dalších faktorů MM má pravděpodobně výhodné, ale doposud neobjasněné funkce (některé specifické buňky, vitaminy, nukleotidy, enzymy, rozpustné molekuly se strukturou podobnou receptorům, např. sCD14, sTLR2) (Chirico, G. and Gasparoni, A. 2009; Ballard, O. and Morrow, A.L. 2013; Liu, B. and Newburg, D.S. 2013).

Rozpustné faktory
<ul style="list-style-type: none"> • Složky specifické imunity: sIgA, IgA, IgG, IgM, IgE, IgD, volná sekreční komponenta, anti-idiotypové protilátky • Cytokiny, chemokiny a receptory: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, IFN-γ, TNF-α, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, GRO-α, MCP-1, TGF-β1 a 2, sCD14, TLR, sFas, sFasL • Antigeny histokompatibilního komplexu • Složky nespecifické imunity: komplement, chemotaktické faktory, properdin, interferon, α-fetoprotein, protistafylokokové faktory, lektin vážící manózu, β-defensin-1, antiadhezivní molekuly (oligosacharidy, muciny, laktadherin, glykolipidy a glykosaminoglykany, kasein), tukové kapénky, hormony a růstové faktory (prolaktin, kortizol, insulin, tyroxin, prostaglandiny, EGF, VEGF, NGF, TGF, erythropoetin), antivirové faktory (mastné kyseliny a monoglyceridy), MIF, α-laktalbumin. • Proteiny s funkcí nosičů: laktoferin, transferin, protein vážící vitamin B12, protein vážící steroidy • Enzymy: lysozym, lipoproteinlipáza, leukocytární enzymy, anti-proteázy, acetylhydroláza PAF • Jiné: nukleotidy, nosiči, LCPUFA • Prebiotika, Bifidus faktor, Oligosacharidy
Buňky
<p>Celkový počet: kolostrum $1-3 \times 10^6$/ml; zralé mléko $\sim 1 \times 10^5$/ml Typy: makrofágy $\sim 60\%$, neutrofily $\sim 25\%$, lymfocyty $\sim 10\%$, epiteliální buňky</p>

Tabulka 4: Imunologické a ochranné složky mateřského mléka (Chirico, G. and Gasparoni, A. 2009)



Obrázek 8. Propojení slizniční imunity matky a dítěte. Efektorové B buňky migrují ze střevní lymfatické tkáně (GALT) přes lymfatické cévy a periferní krev do mléčné žlázy. Tato distribuce prekursorových plasmatických buněk pro IgA je klíčová pro lokální produkci SIgA a méně i SIgM protilátek specifických proti střevním a respiračním antigenům (mikroorganismům a exogenním proteinům) do MM. Kojené dítě tímto mechanismem přijímá v MM příslušné sekreční protilátky proti mikroorganismům kolonizujícím jeho sliznice a ochrana jeho dýchacích cest a trávicího traktu (GIT) je zabezpečena podobnými protilátkami jakými jsou chráněny sliznice matky (Brandtzaeg, P. 2010).

1.5.5. Vliv kojení na zdraví a vývoj dítěte

Kromě zabezpečování optimální výživy má MM přímé výhody pro zdraví kojence v době kojení, ale potenciálně i dlouhodobé výhody přesahující období kojení. Mezi přímé výhody v období kojení patří zlepšení funkce GIT a ochrana před akutními infekcemi.

Zrání GIT novorozence je podporováno některými složkami MM, které podporují růst a motilitu GIT, snižují riziko nekrotizující enterokolitidy a gastrointestinálních infekcí. Mezi tyto faktory patří hormony (kortizol, somatomedin-C, IGF, insulin, hormony štítné žlázy), růstové faktory (EGF), mediátory GIT (neurotensin, motilin), volné aminokyseliny (taurin, glutamin), protizánětlivé faktory (IL-10, polynenasycené mastné kyseliny), enzymy (acetylhydroláza faktoru aktivujícího destičky (PAF)), protilátky IgA a IgG. Mateřské mléko

bylo tradičně považováno za sterilní tekutinu, nicméně v posledních letech několik studií potvrdilo, že kolostrum a MM jsou významným zdrojem komensálních a probiotických bakterií pro střevo kojence, a to např. rod *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* a *Bifidobacterium*. Ke kolonizaci střeva těmito bakteriemi napomáhají i oligosacharidy MM s prebiotickým účinkem, které jsou nejvíce zastoupeny v kolostru. Bakterie MM mohou snižovat výskyt a závažnost infekcí u kojence, a to několika mechanismy, jako jsou kompetitivní exkluze, produkce antimikrobiálních faktorů nebo podpora funkce střevní bariéry zvýšením produkce hlenu a snížením střevní permeability. Navíc můžou napomáhat správné maturaci imunitního systému kojence (Goldman, A.S. 2000; Fernández, L. et al. 2013).

Epidemiologické studie jednoznačně prokázaly snížení morbidity u kojených dětí a ochranný účinek MM před vznikem infekčních nemocí v době kojení, jako jsou akutní střevní a respirační infekce, akutní a rekurentní otitidy a močové infekce. Tento efekt může přetrvávat i po ukončení kojení až do 1 roku života (Schanler, R.J. 2013). Ochranný efekt je zprostředkován pasivním transportem imunoglobulinů sIgA vůči specifickým mikrobům, laktoferinu, a cytokinů, jako např. IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-8 a dalších faktorů v MM, čímž je kompenzována nedostatečná Th1 funkce kojence. Sekreční IgA váží mikroby na sliznicích dítěte a brání aktivaci prozánětlivé odpovědi, zatímco laktoferin ničí mikroby a také potlačuje zánět (Brandtzaeg, P. 2003; Lawrence, R.M. and Pane, C.A. 2007).

Předmětem diskusí jsou ovšem i pozitivní účinky kojení přetrvávající do dalších let v dětství a dokonce až do dospělosti. Podle teorie programování se předpokládá, že faktory ovlivňující mladého jedince v kritickém období vývoje, určují rizika vzniku nemocí později v dospělosti života (Cottrell, E.C. and Ozanne, S.E. 2008). Byl zkoumán protektivní účinek před vznikem civilizačních onemocnění, jako je hypertenze, vysoký cholesterol, obezita, diabetes mellitus 2. typu, ale i pozitivní vliv na intelektuální vývoj. Nicméně podle poslední systematické review WHO žádný z těchto protektivních účinků nebyl jednoznačně prokázán (Horta, B.L. and Victora, C.G. 2013).

Podle některých studií může mít kojení pro dítě dlouhodobý ochranný efekt před vznikem imunologicky podmíněných onemocnění, jako jsou např. céliakie (Szajewska, H. et al. 2012), zánětlivá střevní onemocnění (Barclay, A.R. et al. 2009), diabetes mellitus 1. typu (Frederiksen, B. et al. 2013) a alergická onemocnění (Kramer, M.S. 2011). Různé studie však zatím přinesly kontroverzní výsledky a rovněž se nepodařilo objasnit mechanismus této ochrany. Vzhledem k tomu, že v patogenezi těchto onemocnění se uplatňuje porucha

v indukci tolerance, jednou z hypotéz vysvětlujících ochranný efekt kojení je indukce tolerance vůči specifickému antigenu prostřednictvím MM. Bylo prokázáno, že v MM se objevují antigeny, které hrají významnou roli u imunologicky podmíněných onemocnění, jako např. insulin (Tiittanen, M. et al. 2006), gliadin (Chirido, F.G. et al. 1998), potravinové či respirační alergeny (Palmer, D.J. and Makrides, M. 2006). Množství těchto antigenů kolísá interindividuálně a příčina tohoto kolísání není známa, nicméně závisí velkou mírou na expozici samotné matky těmto antigenům. Před vstupem antigenů do MM přes prsní žlázu jsou však antigeny zpracovány v trávicím traktu matky způsobem, který může ovlivnit jejich tolerogenicitu (tzv. enteromamární okruh) (Newburg, D.S. and Walker, W.A. 2007). Navíc spolu s antigenem přijímá kojenec v MM i určité biologicky aktivní faktory, které jsou schopny toleranci indukovat, jako např. sekreční IgA, α -linolénová kyselina a cytokiny jako TGF- β , IL-10, IL-4, IL-8 (Verhasselt, V. 2010).

Vztah kojení k alergickým onemocněním je v současnosti velice diskutovaným tématem a výsledky studií jsou zatím kontroverzní. Epidemiologické studie zabývající se touto tematikou jsou často komplikované určitou bias, jelikož z etických důvodů není možná randomizace novorozenců ke kojení nebo kmení mléčnou formulí, a rodiny, ve kterých matka preferuje kojení se mohou lišit v různých okolnostech. Podle aktuálních informací exkluzivní kojení alespoň 3-4 měsíce není silně asociováno s nižší incidencí atopického ekzému u kojenců jak s nízkým, tak i s vysokým rizikem. Kojení je spojováno s nižší incidencí recidivujících pískotů v prvních 2 letech života, a to pravděpodobně v důsledku snížení výskytu respiračních infekcí v tomto období. Na druhou stranu mezi kojením a pískoty v pozdějším věku již nebyla prokázána souvislost. Vliv kojení na vznik alergické rhinitidy nelze vzhledem k nedostatečnému počtu studií hodnotit. Podle některých autorů může exkluzivní kojení v prvních 4 měsících života snížit riziko alergie na bílkovinu kravského mléka v časném dětském věku, nicméně dlouhodobější efekt na další typy potravinové alergie není jasný (Fleischer, D.M. 2013). Jedním z důvodů, proč výzkum v této oblasti zatím nepřinesl žádné závěry, je komplexnost složek MM, jakož i interakce střevního prostředí a imunitního systému novorozence.

1.6. Teoretické poznámky k použité metodice

1.6.1. Možnosti detekce cytokinů

Jak již bylo zmíněno, cytokiny jsou proteiny produkované v organismu většinou v malém množství, a proto metody k jejich stanovení musí mít vysokou senzitivitu. Stanovení cytokinů je možné provádět *in vivo*, *ex vivo* nebo *in vitro*. *In vivo* se cytokiny vyšetřují v krvi či v jiné tělesné tekutině nebo ve tkáni pacienta. *In vitro* stanovení znamená testování schopnosti buněčné populace produkovat cytokiny po stimulaci specifickým antigenem. Při testování *ex vivo* jsou buňky z periferní krve kultivovány a stimulovány *in vivo* a cytokiny se stanovují v supernatantu *in vitro*. Přítomnost cytokinů v buňkách lze prokázat metodami molekulární analýzy nebo imunologické analýzy.

Při molekulární analýze je detekována mRNA cytokinů, která je sice v klidovém stavu buňky jen málo exprimovaná, avšak po stimulaci dojde k transkripci cytokinových genů a zpomalení degradace mRNA. Tuto mRNA lze posléze kvantitativně stanovit pomocí RT-PCR v reálném čase. Pomocí genových čipů lze stanovit celou sadu cytokinových genů, přičemž se nejdříve provede reverzní transkripce mRNA do značené cDNA.

Imunologická analýza (immunoassay) je založena na specificitě imunoglobulinů, kterými jsou detekovány cytokiny. Cytokiny lze měřit pomocí metody proteinové array, dále pomocí metody ELISA, ELISPOT nebo průtokové cytometrie (Cytokine bead secretion assay). Průtoková cytometrie umožní stanovit procenta buněk produkujících cytokiny, jež byly předem intracelulárně barevně označeny (Maecker, H.T. 2008).

1.6.2. Použité metody

ELISA. Metoda ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) umožňuje kvantitativní stanovení vybraného proteinu v séru nebo jiné tělní tekutině. Pro detekci cytokinu se používá tzv. sendvičová ELISA metoda. Na mikrotitrační destičce jsou navázány specifické protilátky proti vybranému cytokinu. Po nanesení zkoumaného vzorku (sérum, supernatant) se cytokin váže na tyto protilátky s vysokou afinitou. V dalším kroku je přidána detekční protilátka, která se váže na jiný epitop primární imobilizované protilátky a rozpoznává navázaný cytokin. Na detekční protilátce může být kovalentně navázán enzym (např. křenová peroxidáza) anebo může být sama rozpoznávaná sekundární protilátkou, která je vázaná na enzym biokonjugací.

Mezi každým krokem je destička promyta roztokem, který odplaví cytokiny a protilátky, jenž nejsou specificky navázané. Po posledním promytí je přidán enzymatický substrát, který po reakci s enzymem vytvoří barevný signál, jenž lze detekovat na spektrofotometru a jehož intenzita je proporční množství detekovaného cytokinu.

Proteinová microarray. Proteinová microarray nebo proteinový čip je metoda, která umožňuje detekovat velké množství proteinů najednou. Na povrchu čipu, kterým je sklíčko, nitrocelulózoová membrána nebo mikrotitrační destička, jsou imobilizované různé specifické protilátky proti jednotlivým cytokinům. Po inkubaci se vzorkem a vazbě cytokinů na protilátky je v dalším kroku přidána směs enzymaticky značených detekčních protilátek. Detekce probíhá pomocí fluorescence nebo chemiluminiscence. Jednotlivé detekční metody pro proteinovou array musí poskytnout vysoký signál pro cytokin a zároveň nízký signál pozadí. Nejčastěji se používá značení fluorescenční barvičkou, ale používají se i fotochemické a radioizotopové značky.

1.7. Klinické vyšetření v alergologii

Diagnostika a léčba alergie patří do rukou alergologa/klinického imunologa. Základem při alergickém vyšetření je podrobná **anamnéza**, se zaměřením na možnost zjištění genetické predispozice (výskyt atopie v rodině), rizikových faktorů zevního prostředí (domácí prostředí, kontakt se zvířaty, kouření, škodliviny v prostředí), rizikových faktorů při narození a v dětství (perinatální komplikace, délka kojení, tolerance umělé výživy, nemocnost), historii nemocí atopického pochodu (atopický ekzém v dětství) a suspektních alergických reakcí, jakož i jejich podrobný popis.

Po anamnéze následuje **klinické vyšetření** pacienta se zaměřením na příznaky alergických nemocí (kožní projevy, nutriční stav, poslech plic, atd.).

Diagnostické testy možno provádět *in vivo* a *in vitro*, používají se i specifické provokační testy a vyšetření plicních funkcí.

Z **kožních testů** jsou dostupné Skin Prick testy (SPT), které stanovují reakci časně přecitlivělosti, intradermální testy detekující časný a zčásti i pozdní typ přecitlivělosti, a epikutánní testy detekující reakci přecitlivělosti pozdního typu zprostředkované antigen-specifickými T lymfocyty (kontaktní ekzém). Atopické epikutánní testy (Atopy Patch Tests, APT) se používají u atopického ekzému nebo potravinové alergie. V porovnání s testy časně přecitlivělosti (SPT, specifické IgE) mají APT nižší senzitivitu, ale vyšší specifitu.

Za normálních okolností je hladina **IgE protilátek v séru** nízká. Ke zvýšení může dojít fyziologicky při parazitárních infekcích a patologicky v reakcích časné přecitlivělosti. IgE v séru jsou pouze určitou částí celkových IgE v organismu, který je převážně vázán na povrchu mastocytů nebo bazofilů. Typicky je hladina IgE zvýšená u atopického ekzému. Podrobněji lze diagnostikovat přecitlivělost proti určitému alergenu pomocí specifických IgE. Zvýšení sérových hladin IgE je vždy nutno posuzovat v kontextu anamnézy, typu daného alergenu, příznaků alergické choroby a případně dalších souběžných onemocnění. Pozitivní výsledek velmi často odráží spíše senzibilizaci než skutečnou alergii.

Test aktivace bazofilů je spíše experimentální a doplňkovou metodou používanou při diagnostice časné přecitlivělosti. Nejvíce se využívá při diagnostice časné přecitlivělosti na alergeny blanokřídlého hmyzu, zkouší se i u lékových nebo potravinových alergií. Principem metody je stanovení exprese aktivačních znaků na povrchu bazofilů pomocí průtokové cytometrie po jejich inkubaci s alergenem.

Eozinofilní kationický protein je produkován aktivovanými eozinofily a je markerem eozinofilního (nejčastěji alergického) zánětu. Využívá se při diagnostice a monitoraci alergického astmatu a typicky zvýšený je i u atopického ekzému.

Tryptáza je mediátorem alergické reakce, je uvolňována z mastocytů ve tkáních po expozici alergenu. Její stanovení se využívá při diagnostice anafylaktických reakcí.

Při diagnostice alergického astmatu se kromě výše zmíněných testů používá vyšetření funkce plic (spirometrie), bronchodilatační test a bronchoprovokační testy. Míru zánětu v plicích ukazuje vyšetření vydechovaného oxidu dusnatého (FENO), který je produkován různými buňkami plic v rámci zánětlivé reakce. Kromě astmatu bývá zvýšen i u některých respiračních infekcí nebo u kuřáků. Již méně je využívána rinomanometrie (vyšetření nosní průchodnosti) a nazální provokační test.

Potravinové provokační testy jsou nejspolehlivější při diagnostice potravinových alergií. Jsou to tzv. eliminačně-expoziční testy, což znamená, že po vyřazení podezřelé potravině z jídelníčku na určitou stanovenou dobu následuje opětovná expozice dané potravině podle protokolu v postupně se zvyšujících dávkách, přičemž se sledují případné reakce. Podle míry zaslepení můžeme testy rozdělit na otevřené, jednoduše zaslepené a dvojité zaslepené, placebem kontrolované (Double Blind Placebo Controlled Food Challenge, DBPCFC). Poslední typ je považován za zlatý standard diagnostiky potravinové alergie (Cantani, A. 2008).

2. Vlastní experimentální část

2.1. Seznam publikací, které jsou podkladem k disertační práci

- 1) **Switch from a dominant Th1-associated immune profile during the pre-diabetic phase in favour of a temporary increase of a Th3-associated and inflammatory immune profile at the onset of type 1 diabetes.**
Ryden A, Stechova K, Durilova M, Faresjö M.
Diabetes Metab Res Rev. 2009 May;25(4):335-43.
- 2) **Influence of maternal hyperglycaemia on cord blood mononuclear cells in response to diabetes-associated autoantigens.**
Stechova K, Spalova I, Durilova M, Bartaskova D, Cerny M, Cerna M, Pithova P, Chudoba D, Stavikova V, Ulmannova T, Faresjö M.
Scand J Immunol. 2009 Aug;70(2):149-58.
- 3) **Reactivity to Helicobacter pylori antigens in patients suffering from thyroid gland autoimmunity.**
Stechova K, Pomahacova R, Hrabak J, Durilova M, Sykora J, Chudoba D, Stavikova V, Flajsmanova K, Varvarovska J.
Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2009 Sep;117(8):423-31.
- 4) **Is there any relationship between cytokine spectrum of breast milk and occurrence of eosinophilic colitis?**
Durilova M, Stechova K, Petruzalkova L, Stavikova V, Ulmannova T, Nevorál J.
Acta Paediatr. 2010 Nov;99(11):1666-70.
- 5) **Adiponectin, AFABP, and leptin in human breast milk during 12 months of lactation.**
Bronsky J, Mitrova K, Karpisek M, Mazoch J, Durilova M, Fisarkova B, Stechova K, Prusa R, Nevorál J.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011 Apr;52(4):474-7.
- 6) **Development of High-Sensitive ELISA Method for Detection of Adipophilin Levels in Human Colostrum and Breast Milk**
Mitrova K, Karpisek M, Durilova M, Dragusin LG, Nevorál J, Bronsky J
J Clin Lab Anal. 2014 Feb 27.

2.2. Změna dominantního Th1 profilu v prediabetické fázi na Th3 a protizánětlivý profil při manifestaci diabetu

Cíl studie

Popis imunologického profilu periferních mononukleárních buněk (PBMC) u pacientů s T1D před a při klinické manifestaci T1D, a dále 1 a 2 roky po jejím nástupu.

Metodika

Vyšetřovanou skupinu tvořilo 10 dětí s T1D, jež byly vyšetřeny při manifestaci T1D a poté s odstupem 1 a 2 roky. Kontrolní skupinu tvořilo 10 zdravých dětí s rizikovým genotypem a 9 dětí s vysokým rizikem manifestace T1D do 5 let. Z periferní žilní krve subjektů byly izolovány mononukleární buňky (PBMC). Cytokiny produkované *in vitro* spontánně a po stimulaci specifickými (GAD65) a nespecifickými (fytohemaglutinin, PHA) antigeny byly stanoveny pomocí proteinové microarray a chemiluminiscence (IL-7 jako zástupce naivních T- buněk, Th1 cytokiny IFN- γ a TNF- β , Th2 cytokin IL-5, Th3 cytokin TGF- β , T regulační cytokin IL-10 a prozánětlivé cytokiny TNF- α , IL-6 a chemokiny MCP-1, MIG).

Výsledky

- Th1 odpověď (IFN- γ , TNF- β): jak spontánní tak i poststimulační sekrece dominovala v prediabetické fázi a poklesla v době manifestace T1D
- Th2 odpověď (IL-5): nejvyšší byla u vysoce rizikových dětí
- Th3 odpověď (TGF- β , IL-10): výrazná u nově diagnostikovaných T1D s klesajícím trendem s délkou onemocnění
- Prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-6): vzplanutí u nově diagnostikovaných T1D
- Prozánětlivé chemokiny (MCP-1, MIG): vysoká sekrece u dětí s T1D při manifestaci, přetrvávala až do 2 let po manifestaci

U pacientů s vysokým rizikem vzniku diabetu dominovala produkce Th1 asociovaných cytokinů, jak spontánně, tak i po specifické stimulaci diabetogenním autoantigenem. Naopak mitogen PHA indukoval produkci Th2 cytokinů pouze v této skupině.

Pacienti s čerstvou manifestací T1D vykazovali cytokinový profil asociovaný s Th3 a masivní spontánní i poststimulační produkci prozánětlivých cytokinů, která ovšem s časovým odstupem od manifestace nemoci slábla.

Diskuse

Studium patogeneze nemoci T1D u lidí je velkou výzvou, jelikož většina imunologických dějů se odehrává před manifestací onemocnění a k dispozici jsou většinou pouze buňky periferní krve. Při vzniku tohoto autoimunitního onemocnění hrají klíčovou roli 3 důležité děje: nejdříve dochází k aktivaci T buněk reaktivních vůči beta buňkám pankreatu, vzniká imunologická odpověď, která má prozánětlivý charakter a současně dochází k selhání v imunoregulaci autoreaktivní odpovědi. V patogenezi T1D hraje centrální roli imunologická odpověď se zvýšenou produkcí Th1 cytokinů, jako IFN- γ , IL-2, TNF- β . Tento Th1 asociovaný imunologický profil jsme pozorovali u dětí s vysokým rizikem (40%) rozvoje T1D do 5 let, a to jak spontánní produkci, tak i po stimulaci autoantigenem GAD65. Vzplanutí cytokinu IFN- γ u vysoce rizikových jedinců převyšující jeho sekreci u zdravých dětí a také u dětí s čerstvým záchytem T1D bylo pozorováno i v předchozí práci spoluautorů (Karlsson, M.G. et al. 2000). V souladu s tímto pozorováním jsou i výsledky dalších studií dokladující pokles spontánní i indukované produkce IFN- γ v období navazujícím na manifestaci onemocnění (Mayer, A. et al. 1999; Halminen, M. et al. 2001; Kukreja, A. et al. 2002; Lohmann, T. et al. 2002; Avanzini, M.A. et al. 2005).

Při manifestaci T1D jsme zaznamenali potlačení Th1 asociované imunologické odpovědi. Tento nálezní navazuje na předchozí výsledky spoluautorů, a to korelaci snížené Th1 imunitní odpovědi se zvýšeným rizikem rozvoje T1D – pokles sekrece IFN- γ a poměru IFN- γ /IL-4 po antigenní stimulaci v období těsně před manifestací nemoci (Karlsson Faresjö, M.G.E. and Ludvigsson, J. 2005; Hedman, M. et al. 2006). Poměr mitogenem indukované Th1 odpovědi a C peptidu u jedinců s vysokým rizikem rozvoje T1D odráží intenzifikovanou autoimunitní reakci vůči zbývajícím funkčním beta buňkám pankreatu. V období manifestace T1D je vztah mezi C-peptidem a Th1 imunitní odpovědí inverzní. S odstupem jednoho roku po manifestaci nemoci dochází opět k posílení Th1 odpovědi pravděpodobně v důsledku destrukce zbývajících beta buněk.

Výhradně u dětí s vysokým rizikem rozvoje T1D byly PBMC schopny indukovat Th2 imunitní odpověď produkcí IL-5 po stimulaci mitogenem. Toto pozorování je též v souladu s předchozím pozorováním spoluautorů, kteří u zdravých jedinců s vysokým rizikem rozvoje T1D našli schopnost přesmyku a proměny Th1 na více protektivní Th2 imunologický profil v přítomnosti autoantigeny GAD65 a inzulínu (Karlsson, M.G. et al. 2000). Tento přesmyk Th1/Th2 rovnováhy směrem k produkci Th2 cytokinů a evokaci Treg buněk byl rovněž zaznamenán u NOD myši po imunizaci peptidy GAD65 (Tian, J. et al. 1996; Quinn, A. et al.

2001), ale i u dětí s čerstvým záchytem T1D při léčbě GAD65 (Diamyd) (Ludvigsson, J. et al. 2008).

Zatímco u zdravých jedinců s vysokým rizikem rozvoje T1D dominovala produkce Th1 cytokinů, při manifestaci T1D dominovali v imunologickém profilu cytokiny Th3/Tr1 (TGF- β a IL-10) ve vztahu k sekretovanému C-peptidu. TGF- β hraje zásadní roli při vzniku buněčné linie indukovaných FOXP3+ i přirozených Treg buněk (Rubtsov, Y.P. and Rudensky, A.Y. 2007). U pacientů s rozvinutým onemocněním byly nalezeny vysoké hladiny TGF- β v oblastech zánětu a zvýšená sekrece IL-10 (Lohmann, T. et al. 2002), nicméně také byl popsán imunoregulační defekt se sníženou funkcí Treg (Lindley, S. et al. 2005).

V období manifestace T1D byla rovněž zaznamenána vysoká produkce prozánětlivých cytokinů (TNF-alfa a IL-6) a chemokinů (MCP-1 a MIG), a to jak spontánní, tak i po stimulaci specifické (autoantigenem GAD65) i nespecifické. IFN- γ indukuje v ostrůvcích pankreatu tvorbu chemokinu MIG (Cardozo, A.K. et al. 2003), což vysvětluje jejich společnou pozitivní korelaci. S progresí insulitidy dochází v ostrůvcích pankreatu také k zvýšené expresi MCP-1 u NOD myši (Chen, M.C. et al. 2001). Spekuluje se o tom, že přítomnost makrofágů produkujících MCP-1 v ostrůvcích pankreatu může přilákat buňky imunitního systému a posilovat místní zánětlivou reakci, která může posléze vést k další destrukci beta buněk, jelikož MCP-1 pozitivní buňky ostrůvků poskytují signály chemokinům mimo ostrůvků s cílem přesměrování leukocytů z vaskulárního prostoru do ostrůvků (Chen, M.C. et al. 2001; Reddy, S. et al. 2006). Soustředění autoreaktivních lymfocytů do místa zánětlivé tkáně je určující známkou četných perzistentních orgánově specifických autoimunitních onemocnění a v současnosti se různé terapeutické strategie těchto onemocnění zaměřují právě na blokádu migrace lymfocytů.

Minimálně po dobu 2 let po manifestaci T1D zůstává Th1 imunitní odpověď suprimovaná. Podobné výsledky přinesla jiná studie našich spoluautorů (Karlsson Faresjö, M. et al. 2006). Stimulace mitogeny a částečně i antigenem (GAD65) ovšem vedla ke zvýšené produkci Th1-asociovaných cytokinů u dětí s T1D 1 rok po manifestaci nemoci.

Přínosem naší studie je možnost porovnání imunologické odpovědi mezi dětmi s T1D a zdravými dětmi s již probíhajícím autoimunitním procesem. Naše výsledky potvrzují předchozí pozorování spoluautorů dominance Th1 imunitní odpovědi v období před manifestací T1D. Výhodou je longitudinální sledování dětí s T1D od záchytu nemoci po dobu dalších 2 let, která nám umožňuje zkoumat imunologickou odpověď v poslední fázi autoimunitního procesu.

U dětí s vysokým rizikem pro rozvoj T1D jsme tedy pozorovali imunologický profil s dominancí Th1 cytokinů, který byl potlačen při manifestaci nemoci. Zdá se, že po klinické manifestaci onemocnění se imunitní systém snaží přizpůsobit a zvyšuje svoji odpověď na dostupné antigeny a autoantigeny, čímž dochází k posílení imunitní odpovědi zahrnující cytokiny Th1 spektra, prozánětlivé cytokiny a chemokiny. S časem ovšem dochází k vyčerpání antigenem stimulované imunitní odpovědi, což může být posledním znakem autoimunitního procesu směřovaného proti beta buňkám pankreatu produkujících insulin, jehož produkce vyhasíná, jakmile jsou poslední z těchto buněk zničeny.

Monitorování cytokinové odpovědi by mohlo být využíváno při snaze o modifikaci imunologické odpovědi léčbou, která by zahrnovala právě zablokování cytokinů důležitých v patogenetickém procesu nemoci, jako např. IL-1 (Larsen, C.M. et al. 2007; Krishnamurthy, B. et al. 2008), molekul T buněk (CD3) (Keymeulen, B. et al. 2005) a CD40 (Klein, D. et al. 2008; Vaitaitis, G.M. and Wagner, D.H., Jr. 2008) nebo vystavení imunitního systému relevantním autoantigenům, jako např. insulin (Bresson, D. et al. 2006), heat-shock protein 60 (Raz, I. et al. 2001) nebo GAD65 (Ludvigsson, J. et al. 2008) ve snaze indukovat toleranci. Nakonec naše výsledky spolu s poznatkem o lépe zachovalé sekreci C peptidu u dětí s T1D léčených GAD65 vedou k hypotéze, že časné potlačení dominantního Th1 imunologického profilu může mít vliv na klinický výsledek.

2.3. Vliv mateřské hyperglykémie na reaktivitu mononukleárních buněk pupečnickové krve na diabetogenní autoantigeny

Cíl

Cílem studie bylo zjistit, jestli autoimunitní prostředí matky a samotná nemoc T1D (hyperglykémie) ovlivňuje specifickou imunitní odpověď plodu.

Z předchozích studií je známo, že děti, které se narodili před manifestací T1D u matky, mají větší riziko vzniku T1D než děti narozené až po její manifestaci (Warram, J.H. et al. 1991; Harjutsalo, V. et al. 2006). Je tedy expozice diabetu matky *in utero* protektivním faktorem pro dítě? Již v tomto období přece probíhá imunologický priming a u dětí matek s T1D se našel vyšší podíl CD4CD25⁺ T regulačních buněk v pupečnickové krvi oproti kontrolám. Studovali jsme tedy vliv hyperglykémie *in vivo*, jakož i *in vitro* na cytokinovou produkci mononukleárních buněk pupečnickové krve, a to jak spontánní, tak i po stimulaci specifickými diabetogenními autoantigeny.

Metodika

Vyšetřovanou skupinu tvořilo 40 novorozenců matek s T1D a 12 novorozenců s otcem s T1D. Matky s T1D byly rozděleny do 2 skupin podle kompenzace diabetu ve 3. trimestru gravidity na matky s výbornou kompenzací (HbA1c < 4.5%, žádná závažná epizoda hypo/hyperglykémie a téměř normální MAGE index (mean amplitude of glycemic excursion) (n = 15) a matky s přijatelnou kompenzací diabetu (n = 25). Kontrolní skupinu tvořilo 10 novorozenců matek s jiným typem diabetu (gestační neboli T2D) a 25 novorozenců s negativní anamnézou autoimunitního onemocnění v rodině.

Mononukleární buňky plodu byly izolovány z pupečnickové krve (CBMC) a kultivovány s diabetogenními autoantigeny (GAD65, IA-2, proinsulin), s fytohemaglutininem (PHA, pozitivní kontrola) a v samotném médiu bez přítomnosti antigenů (negativní kontrola).

Pomocí proteinové microarray byla následně v supernatantu analyzována produkce 23 vybraných cytokinů a chemokinů (GM-CSF, G-CSF, GRO, GRO- α , IL-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8, -10, -13, -15, IFN- γ , MCP-1, -2, -3, MIG, RANTES, TGF- β , TNF- α a TNF- β). Produkce cytokinů IL-2, -4, -6, -7, -10, -13, -IFN- γ a TNF- β byla také kvantifikována pomocí ELISA metody.

V dalším kroku jsme studovali efekt různých koncentrací glukózy po různě dlouhou dobu na produkci cytokinů a chemokinů: 2,5 mmol/l (nízká koncentrace), 4,5 mmol/l (normální koncentrace), 12 mmol/l (středně vysoká koncentrace), 17 mmol/l (vysoká koncentrace). Krátkodobý efekt abnormální koncentrace glukózy byl sledován pomocí 2 hodin pre-inkubace a následně 70 hodin kultivace v médiu s normální koncentrací glukózy a dlouhodobý efekt byl sledován při kultivaci CBMC v médiu s abnormální koncentrací glukózy po dobu 72 hodin.

Výsledky

Pozorovali jsme jednoznačný vliv koncentrace glukózy *in vitro* na spontánní i autogenně stimulovanou sekreci cytokinů a chemokinů: zatímco nízká koncentrace glukózy (imitující sérovou hypoglykémii) neměla výrazný vliv na jejich produkci, vysoká koncentrace glukózy (imitující sérovou hyperglykémii) působící po celou dobu kultivace (72 hodin) měla na jejich produkci významný vliv, a to konkrétně vedla k nízké sekreci Th1 a Th3 cytokinů.

Horší kompenzace mateřského diabetu byla spojena s nízkou spontánní sekrecí cytokinů a chemokinů CBMC buňkami, ale vyšší produkcí prozánětlivých cytokinů a růstových faktorů po stimulaci autoantigeny. Toto pozorování je však pravděpodobně nespecifické a nesouvisí s autoimunitním prostředím matky.

Po specifické stimulaci autoantigeny stoupla produkce Th1 cytokinů (IL-2, IFN- γ a TNF- β) v CBMC ve skupině dětí s otcem diabetikem a také s matkou s T1D a výbornou kompenzací diabetu, a to zejména ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině dětí s otcem diabetikem byla produkce Th1 cytokinů spojena s produkcí Th2 cytokinů (IL-5, IL13).

Diskuse

Vyvíjející se imunitní systém plodu je pod vlivem mateřského prostředí. V případě matky s T1D se jedná jak o vliv autoimunitního prostředí, tak i vliv samotného diabetu, a to hlavně mateřské hyperglykémie. V této studii jsme analyzovali vliv těchto 2 aspektů na reaktivitu imunitních buněk plodu na autoantigeny.

Jak ve zde prezentované, tak v předchozí studii spoluautorů jsme zaznamenali, že CBMC jsou schopny za určitých podmínek reagovat na diabetogenní autoantigen predominantní produkcí Th1 cytokinů (Bohmova, K. et al. 2007). Studie jiných autorů zabývající se CBMC u diabetických matek přinesly spíše protichůdné výsledky - vzestup, pokles anebo žádnou změnu v počtu lymfocytárních populací ve srovnání s kontrolní skupinou. Manfras et al. prokázali, že imunitní prostředí matky s T1D (v porovnání s matkou s gestačním diabetem)

nemá zásadní vliv na repertoár TCR imunitních buněk pupečnickové krve plodu (Manfras, B.J. et al. 2004). Na druhou stranu existují údaje o primingu a zvýšené frekvenci regulačních CD4+CD25+ T buněk v pupečnickové krvi novorozenců narozených matkám s T1D (Holm, B.C. et al. 2006). Vzestup regulačních buněk koreloval s titrem protilátek antiGAD. Autoři této studie také pozorovaly zvýšenou koncentraci prozánětlivých cytokinů v pupečnickové krvi dětí narozených matkám s T1D a gestačním diabetem, související se stupněm metabolické kontroly. Zvýšenou frekvenci Treg buněk v pupečnickové krve však autoři přičítali expanzi této buněčné populace *in utero* a nezaznamenali její imunosupresivní efekt.

V kontrolní skupině dětí bez rodinné zátěže jsme pozorovali všeobecně nízkou spontánní i indukovanou produkci cytokinů i chemokinů s výjimkou poststimulační produkce IL-8 a IL-15, která byla signifikantně vyšší v porovnání se skupinou dětí matek s T1D. Podobně nízkou spontánní i poststimulační produkci cytokinů jsme pozorovali ve skupině matek s horší kompenzací T1D, což si vysvětlujeme jako nespecifický jev, který může být ovlivněn epizodami mateřské hyperglykémie. Kvůli limitovanému počtu matek s jinými formami diabetu nebylo možné tuto skupinu rozdělit podle kompenzace diabetu a můžeme tedy jenom spekulovat o tom, že nízká spontánní a vysoká poststimulační produkce cytokinů a chemokinů v této skupině by mohla souviset s hyperglykemií matky. K tomuto vysvětlení nás vede i pozorování efektu koncentrace glukózy na spontánní i antigenem indukovanou sekreci cytokinů a chemokinů *in vitro* v druhé části naší studie. Zatímco nízká koncentrace glukózy v médiu (simulující hypoglykémii) neměla vliv na produkci cytokinů a chemokinů CBMC, při vyšší koncentraci glukózy v médiu po celou dobu kultivace (72h) (simulující hyperglykémii) došlo k výrazné změně produkce cytokinů i chemokinů. Matky s T1D jsou obvykle zkušenější v managementu diabetu a udržení glykémie pod kontrolou a častěji používali monitor pro kontinuální kontrolu glykémie než matky s jinými typy diabetu.

Vliv hyperglykémie na imunitní systém je předmětem zájmu klinického výzkumu zejména na jednotkách intenzivní péče nebo v diskusích o vlivu diabetu na rozvoj aterosklerózy. Akutní krátkodobá hyperglykémie má vliv na všechny hlavní komponenty imunitního systému. U pacientů s diabetem dochází při hyperglykémii k elevaci prozánětlivých cytokinů, zvláště TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, zatímco podání insulínu vede k opačnému efektu. Základní funkce neutrofilů jako chemotaxe a fagocytóza jsou při hyperglykémii oslabené (Turina, M. et al. 2005). Esposito et. al. prokázali, že akutní hyperglykémie vede k vzestupu hladin IL-6, TNF- α a IL-8 i v kontrolní skupině pacientů a u pacientů s poruchou glukózové tolerance, a to zejména v důsledku akutní hyperglykemické špičky spíše než při trvalé hyperglykémii.

Podle autorů je tento efekt hyperglykémie zprostředkován oxidativním stresem, přičemž pozorovali, že glutation jako silný antioxidant měl schopnost kompletně zabránit vzestupu hladin cytokinů u zdravých lidí (Esposito, K. et al. 2002). V souladu s těmito výsledky je naše pozorování, že horší kontrola diabetu matky byla spojena s nižší spontánní produkcí cytokinů a chemokinů mononukleárními buňkami pupečnickové krve, ale vyšší produkcí prozánětlivých cytokinů a růstových faktorů po stimulaci autoantigeny. Tento jev je pravděpodobně nespecifický a nesouvisí s autoimunitním prostředím matky.

Vliv hyperglykémie diabetické matky na vývoj plodu je dobře znám. Již před početím dítěte, ale i v průběhu celého těhotenství, je velká snaha o dobrou kontrolu diabetu matky, jelikož metabolická kontrola významně zlepšuje vývoj dítěte. Pokud je diabetes pod dobrou kontrolou v prvních 8 týdnech těhotenství, riziko malformací plodu se snižuje na stejné procento, jako při normálním těhotenství. Na stupni kontroly diabetu matky v průběhu těhotenství také přímo závisí přežívání, makrosomie a hypoglykémie novorozence (Nelson, R.L. 1986). Hales a Barker vytvořili teorii programování plodu, která se zakládá na tom, že v kritickém období vývoje plodu vede působení určitého stimulu k procesu s dlouhodobým účinkem na plod (Hales, C.N. and Barker, D.J.P. 2001). V současnosti se hovoří o tzv. metabolické paměti. Za normálních okolností dochází v těhotenství k potlačení Th1 imunitní odpovědi a podobně i u matek s T1D je Th1 imunitní odpověď potlačena a rovnováha Th1/Th2 posunuta směrem k ochrannému typu Th2. Na zvířecích modelech však bylo prokázáno, že u makrosomních a obesních potomků diabetických matek je Th1/Th2 rovnováha posunuta k upregulaci prozánětlivé Th1 odpovědi, která může vést k potenciálně prozánětlivému a diabetogennímu stavu, o čemž svědčí hyperglykémie a hyperinsulinemie v dospělosti u těchto potomků (Soulimane-Mokhtari, N.A. et al. 2005). Otázkou zůstává, jestli a jaký vliv má hyperglykémie např. na prezentaci antigenů, jeho zpracování a specifickou imunitní odpověď.

Produkce všech zkoumaných Th1 cytokinů (IL-2, IFN- γ , TNF- β) CBMC po stimulaci autoantigenem byla zvýšená u dětí otce s T1D a také u dětí matek s T1D a výbornou kompenzací diabetu, a to zejména v porovnání s kontrolní skupinou novorozenců. Th1 odpověď u dětí otců s T1D byla spojena s produkcí Th2 cytokinů (IL-5, IL-13). Naše závěry jsou tedy limitovány na skupinu dětí matek s T1D, jelikož matky s T2D a gestačním diabetem nemohly být rozděleny podle kompenzace diabetu matky vzhledem k jejich nízkému počtu.

Hyperglykémie matky v těhotenství vede k hyperglykémii plodu a následně k vyšší aktivitě a produkci insulinu v beta buňkách pankreatu plodu (Schwartz, R. and Teramo, K.A. 2000),

a tím jejich vyšší „viditelnosti“ pro imunitní systém. Následně by mohlo dojít paradoxně k nižší reaktivitě buněk imunitního systému plodu na diabetogenní autoantigeny, podobně jako jsme to pozorovali v naší studii. Na druhou stranu tyto buňky plodu současně vykazují vyšší prozánětlivou aktivitu a mají vyšší riziko rozvoje diabetické fetopatie. Na udržení normální glykémie v průběhu těhotenství je v současnosti dostupná možnost používání monitorů pro kontinuální monitoraci glykémie (Voormolen, D.N. et al. 2013). Nicméně autoimunitní prostředí matky, ve kterém se plod vyvíjí, nelze ovlivnit a znalosti o jeho vlivu na imunitní systém plodu chybí.

Vliv na produkci cytokinů CBMC plodu mají kromě mateřské hyperglykémie a autoimunitního prostředí i další faktory, jako je např. způsob porodu (chirurgický nebo přirozený, spontánní nebo indukovaný hormony). Přestože byla snaha o rovnoměrnou selekci ve sledovaných skupinách, u matek s T1D probíhal porod častěji císařským řezem nebo po hormonální indukci (prostaglandiny). Sledované skupiny se nelišily v dalších aspektech, jako je věk matky, BMI matky před těhotenstvím a její váhový přírůstek v průběhu těhotenství nebo dávka insulínu.

Naše výsledky tedy svědčí pro to, že hyperglykemické i autoimunitní prostředí matky s T1D může vést k nižšímu výskytu T1D u dětí.

2.4. Autoimunitní tyreoiditida a reaktivita na antigeny *Helicobacteria pylori*.

Helicobacter pylori (HP) kolonizuje gastrointestinální trakt již v dětství a ve většině případů se jedná o bezpříznakovou infekci. Jako patogen se uplatňuje při vzniku chronické gastritidy, žaludečních a dvanáctíkových vředů, lymfomu slizniční lymfatické tkáně anebo karcinomu žaludku. Přítomnost HP ovšem bývá spojována se vznikem orgánově specifických protilátek a je považován za spouštěcí faktor při manifestaci některých autoimunitních onemocnění (Guariso, G. et al. 2004). Pro manifestaci onemocnění jsou zásadní faktory virulence patogena a genetická variabilita některých hostitelských obranných mechanismů.

Pacienti s HP pozitivní chronickou gastritidou produkují množství protilátek namířených proti antigenům žaludku (Weetman, A.P. 2004; Weetman, A.P. 2004; Egan, B.J. et al. 2007), např. Lewis antigen typ 2 (Lewis x and Lewis y, Le x, y), které ovšem sdílejí podobnou strukturu s antigeny lipopolysacharidového (LPS) pouzdra HP a současně jsou přirozeně exprimovány na různých buňkách hostitelského organismu, kromě jiného i na epitelálních buňkách exokrinních žláz, jako jsou štítná žláza a pankreas (Sheu, S.M. et al. 2007). Spojitost AT s HP infekcí je však sporná.

Cíl

Cílem studie bylo zjistit, zda má infekce *Helicobacterem pylori* (HP) stimulační vliv na vznik autoimunitní tyreoiditidy (AT).

Metodika

Vyšetřovanou skupinu tvořilo 47 pacientů (žen) s AT, kteří byli rozděleni do dvou skupin na HP pozitivní (THP, n = 17), a HP negativní (THN, n = 30). Kontrolní skupinu tvořilo 17 HP negativních (CN) a 17 HP pozitivních (CP) jedinců.

Pozitivita či negativita HP byla stanovena detekcí antigenu HP ve stolici a sérových protilátek proti HP ve třídě IgG a IgA. Sedm THP pacientů mělo známky chronické akutní gastritidy při endoskopickém vyšetření.

Periferní mononukleární buňky (PBMC) pacientů s AT a zdravých kontrol byly kultivovány v buněčném médiu po dobu 72 hodin bez antigenů (negativní kontrola, bazální produkce cytokinů) a s buněčnými antigeny celého HP nebo HP LPS (specifická stimulace) a fytohemaglutininem (pozitivní kontrola). Následně byla analyzována produkce cytokinů a chemokinů pomocí proteinové array (23 cytokinů a chemokinů: GM-CSF, G-CSF, GRO,

GRO- α , IL-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8, -10, -13, -15, IFN- γ , MCP-1, -2, -3, MIG, RANTES, TGF- β , TNF- α a TNF- β).

Výsledky

Ve skupinách s HP pozitivitou (THP a CP) došlo po stimulaci HP i jeho LPS k masivní produkci chemokinů a ve skupině THP ke zvýšení tvorby prozánětlivých cytokinů, zejména IL-6. HP negativní zdravé kontroly (CN) měli všeobecně nízkou bazální produkci cytokinů a chemokinů, ale po specifické stimulaci zvýšenou produkcí IFN- γ (Th1) jakož i TGF- β (regulační). Na druhou stranu, produkce dalšího regulačního cytokinu IL-10 a Th2 cytokinů IL-5 po specifické stimulaci poklesla.

Diskuse

V této studii jsme zkoumali reaktivitu mononukleárních buněk periferní krve na antigeny *Helicobacter pylori* a jeho lipopolysacharid obsahující antigeny, které se také objevují na některých buňkách a tkáních lidského organismu (žaludek, štítná žláza).

Infekce HP patří mezi běžné bakteriální infekce rozšířené po celém světě. Přestože k osídlení *Helicobacterem* dochází již v dětství, většina dětí zůstává asymptomatická. Socioekonomický status má vliv na primoinfekci HP; je známo, že u lidí s lepším socioekonomickým zázemím dochází k osídlení HP později v životě (Andersen, L.P. 2007; Egan, B.J. et al. 2007). V České republice je prevalence infekce HP v asymptomatické dětské populaci 7,1%, je tedy jedna z nejnižších v Evropě, zatímco u dětí s dyspepsií bez prokázaného žaludečního vředu je tato prevalence asi 25%. Podobně jako ve světě je prevalence vyšší u lidí s nižším socioekonomickým statutem (Sykora, J. et al. 2004; Sykora, J. et al. 2009). Co se týče prevalence infekce HP u dětí s autoimunitní tyreoiditidou, v dostupné literatuře je jen málo údajů. Italská studie prokázala 26,7% prevalenci (Larizza, D. et al. 2006), jiná studie 20,9% (Segni, M. et al. 2004). Podobnou prevalenci pozorovali spoluautoři v kohortě náhodně vybraných pacientů s autoimunitní tyreoiditidou (20,7%), která byla vyšší oproti skupině zdravých věkově porovnatelných jedinců (6,1%) (Sykora, J. et al. 2004; Sykora, J. et al. 2009). V zde prezentované studii nebyly nalezeny rozdíly v socioekonomickém stavu mezi sledovanými skupinami. Údaje o prevalenci infekce HP u pacientů s jiným typem autoimunitního onemocnění jsou různorodé (Kalabay, L. et al. 2002). Studie se liší ve velikosti vyšetřovaného vzorku, charakteristikách pacientů i v metodách detekce HP. Na našem pracovišti jsme provedli screening infekce HP u pacientů s T1D, která byla 20%

(nepublikovaná data). Italské studie prokázaly nižší incidenci infekce HP u pacientů s T1D, přičemž ale používali jiné metody detekce HP (Gasbarrini, A. et al. 1998; Candelli, M. et al. 2003). Nelze tedy zevšeobecnit tvrzení, že prevalence infekce HP je vyšší u určitých autoimunitních onemocnění, pro toto tvrzení je potřeba dalších studií.

Druhá věc k diskusi je samotná autoreaktivita vůči HP a její následky a celková polarizace imunitního systému směrem k Th1 či Th2 imunitní odpovědi. Úloha infekčních agens v patogenezi autoimunitních onemocnění je velice diskutována. Přestože existují různé teorie, zde diskutujeme rozvoj autoimunitního onemocnění na základě všeobecného přesměrování reaktivity imunitního systému. Tato reaktivita může být ovlivněna dialogem mezi patogenem a imunitním systémem hostitele, který je určitým směrem geneticky predisponován. HP osídluje povrchovou hlenovou vrstvu sliznice žaludku a do samotné sliznice neproniká. V jeho přítomnosti se spouští důležitá lokální zánětlivá reakce, ale současně je indukována i systémová imunitní odpověď hostitelského organismu s produkcí chemokinů, cytokinů a stimulací adhezních molekul, které se mohou podílet na rozvoji dalších onemocnění lokalizovaných již v jiných orgánech (Egan, B.J. et al. 2007). Za optimálních podmínek je předpokladem „úspěšné“ kolonizace žaludku HP určitá rovnováha Th1/Th2 odpovědi (Bergman, M.P. et al. 2004). Ze zvířecích modelů je známo, že akutní infekce HP je charakterizována Th1 odpovědí (Mattapallil, J.J. et al. 2000), zatímco při chronické infekci HP produkují T buňky v žaludku jak Th1, tak i Th2 cytokiny (D'Elios, M.M. et al. 1997). Objasnění schopnosti HP řídit imunitní odpověď a odklonit ji směrem Th1 nebo Th2 přinesli Bergman et al., když prokázali, že HP má schopnost vypnout či zapnout své Lewis (Le) antigeny pocházející z LPS pouzdra. Konkrétně varianty HP Le⁺ interagují s dendritickými buňkami žaludku a váží se na jejich lektin, přičemž dochází k zablokování Th1 imunitní odpovědi. Navíc bylo popsáno, že v biopsiích žaludku s Le⁺ HP je snižena tvorba prozánětlivého cytokinu IL-6 (Bergman, M.P. et al. 2004). Podobným způsobem vazby na lektin typu C jsou schopny interagovat s dendritickými buňkami i jiné infekční patogeny, jako např. HIV virus (Geijtenbeek, T.B. et al. 2000) nebo *Leishmania mexicana* (van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T.B. 2003). Pro technické problémy nebylo možné v naší studii určit variantu LPS (Le⁺/Le⁻) a tato analýza je také mimo rámec naší studie, nicméně další studie by mohly být zaměřeny právě na identifikaci rizikového typu LPS. Antigeny, které jsme použili ve studii ke stimulaci PBMC, byly připraveny z 8 kmenů bakterie s nejpravděpodobnějšími rozdíly, získaných z oblasti Západních Čech.

Při autoimunitních poruchách štítné žlázy mohou interakce imunitního systému vést k vychýlení rovnováhy mezi Th1/Th2 na stranu Th1 imunitní odpovědi, která povede ke vzniku autoimunitní reakce s destrukcí tyreocytů a hypothyroidismu při Hashimotově tyreoiditidě, nebo opačně k Th2 mediované protilátkové odpovědi s produkcí stimulujících protilátek namířené proti receptoru TSH, která povede k hypertyroidismu při Gravesově nemoci (Klecha, A.J. et al. 2008). Tato imunitní reaktivita a cytokinový profil je značně individuální, ovlivněný genetickými, ale i dalšími faktory. Pozitivní vliv věku na cytokinovou produkci PBMC po stimulaci HP a LPS jsme pozorovali ve skupině THP. Ve skupině THN byla produkce určitých chemokinů (MCP-2, -3, MIG) a cytokinu IL-2 nižší v závislosti na vyšším věku. Vliv věku a stárnutí organismu je dobře zaznamenán v literatuře jako komplexní proces, který ovlivňuje vývoj imunitního systému a jeho funkce (Gruver, A.L. et al. 2007). Jelikož byly do studie zahrnuty pouze ženy, nebylo možné pozorovat vliv pohlaví na reaktivitu PBMC. Ve skutečnosti nebylo možné najít porovnatelnou reprezentativní skupinu mužů s AT, neboť je dobře známým faktem, že AT se vyskytuje častěji u žen než u mužů (Weetman, A.P. 2004). U pacientů s AT v obou skupinách (THN a THP) nebyla nalezena korelace koncentrace produkovaných cytokinů a chemokinů s hladinami protilátek proti TG a hladinami hormonů štítné žlázy. Nižší hladina protilátek proti TPO byla spojena s nízkou bazální koncentrací cytokinů IL-6, IL-10 a IL-15. Tento fakt nebylo možné vysvětlit trváním nemoci či léčbou, jelikož se pacienti ve studii v těchto aspektech zásadně nelišili. Nebylo také možno porovnat jednotlivé formy AT, protože atrofická forma byla málo zastoupená.

Jedinci s HP pozitivitou, a to jak ve skupině THP tak i CP, reagovali na HP i jeho LPS antigen masivní produkcí chemokinů. Ve skupině THP byla zaznamenána i vyšší produkce prozánětlivých cytokinů (zejména IL-6) po stimulaci těmito antigeny. HP negativní zdravé kontroly exprimovaly všeobecně nízkou bazální produkci cytokinů a chemokinů, ale po stimulaci specifickými antigeny reagovali zvýšenou produkcí Th1 cytokinu IFN- γ a současně regulačního cytokinu TGF- β . Naopak produkce regulačního cytokinu IL-10 a Th2 cytokinu IL-5 byla v této skupině spíše nižší. Podobnou nerovnováhu imunitních odpovědí pozorovali naši spoluautoři při studiu reaktivity PBMC u pacientů s T1D (Stechova, K. et al. 2007). V souvislosti s tímto pozorováním bude zřejmě důležité se v dalším výzkumu zaměřit na první fázi imunitní odpovědi u autoimunitních onemocnění, jako např. na zpracování antigenu a signální dráhy u dendritických buněk.

Výsledky naší studie poukazují na to, že adekvátní reakce imunitního systému na patogeny je nutná pro jeho vyloučení z organismu. Navíc dobře vyvážená aktivace imunoregulačních mechanismů je nevyhnutelná pro prevenci chronické infekce, ale je též nutná i k prevenci příliš agresivní reakce, která může vést k patologické autoreaktivitě.

2.5. Cytokinové spektrum mateřského mléka a eozinofilní kolitída kojence.

Cílem studie bylo analyzovat cytokinové spektrum mateřského mléka, které dostávali kojenci s alergickou kolitídou a porovnat je s mlékem, které dostávali zdravé kojené děti.

Metody

Vyšetřovanou skupinu tvořilo 20 kojenců s alergickou (eozinofilní) kolitídou (EK). Z těchto dětí byli 3 narozeni předčasně a 17 v řádném termínu, přitom 7 dětí bylo porozeno císařským řezem a 13 vaginálně. Stran alergické anamnézy (AA; alergická rinokonjunktivitida, astma, atopický ekzém) mělo 8 dětí negativní AA u prvostupňových příbuzných, 7 dětí pozitivní AA u 1 rodiče (5x matka, 2x otec), 1 dítě pozitivní AA u obou rodičů, 2 děti pozitivní AA u 1 rodiče a 1 sourozence a 2 děti pozitivní AA u obou rodičů a sourozence. Sourozenec 1 dítěte měl také v anamnéze EK. V době diagnostiky EK měli 4 děti současně atopickou dermatitidu. Kontrolní skupinu tvořilo 20 zdravých kojenců, kteří byli rozeni přirozenou cestou (vaginálně), v termínu, bez alergické zátěže u matky. U 6 dětí byla pozitivní AA u prvostupňových příbuzných (3x otec, 3x otec a sourozenec). Žádné dítě nemělo atopickou dermatitidu.

Mateřské mléko bylo získáno od matek kojenců s EK v době diagnostikování nemoci ve věku 2-27 týdnů (průměrný věk 16,8 týdnů) a od matek zdravých kojenců ve věku 12 týdnů. Sběr MM byl proveden za standardizovaných podmínek, mléko bylo skladováno při -20°C a před analýzou byla odstředěna tuková vrstva.

Pomocí komerčních ELISA kitů bylo provedeno kvantitativní stanovení následujících cytokinů v MM: IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IL-23, IFN- γ , TGF- β 1, EGF, eotaxin.

Výsledky

- Nebyly nalezeny významné statistické rozdíly v koncentracích cytokinů IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, EGF, eotaxin v mateřském mléku mezi skupinami.
- V mléku, které dostávali kojenci s EK, byla významně vyšší koncentrace Th1 cytokinu IFN- γ ($p < 0.001$) v porovnání se skupinou zdravých kojenců. Na druhou stranu, v mléku, které dostávali zdraví kojenci, byla statisticky významně vyšší koncentrace cytokinu IL-18 ($p = 0.001$) v porovnání se skupinou kojenců s EK.
- Koncentrace regulačního cytokinu TGF- β 1 byla nižší ($p = 0.072$) v mléku, které dostávali kojenci s EK.

- Regulační cytokin IL-10 nebyl detekovatelný ani v jednom vzorku mateřského mléka.

Diskuse.

Eozinofilní kolitída (EK) neboli alergická kolitída je považována za formu potravinové alergie s typickým výskytem v kojeneckém věku, v jejíž etiologii hraje nejzásadnější roli bílkovina kravského mléka. Přestože se v mechanismu vzniku EK uplatňuje non-IgE reakce, často je asociovaná s atopií (Lozinsky, A.C. and Morais, M.B. 2013). Mezi rizikové faktory vzniku EK patří nezralost imunitního systému, porušená permeabilita střeva a další faktory, které aktivují fokální imunitní systém jako genetická predispozice, v kombinaci se senzibilizujícími alergeny v potravě (Bone, J. et al. 2009). Také v našem souboru pacientů s EK jsme zaznamenali vyšší výskyt atopické dermatitidy a taktéž častější výskyt atopických onemocnění u prvostupňových příbuzných. Zajímavým pozorováním je relativně častý výskyt chirurgických porodů ve skupině kojenců s EK. Za normálních okolností dochází při přirozeném vaginálním porodu ke kolonizaci GIT novorozence mateřskými bakteriemi z oblasti porodních cest a GIT (Mandar, R. and Mikelsaar, M. 1996; Gronlund, M.M. et al. 1999), která podporuje vznik střevní bariéry, zrání imunologické ochrany střeva a pravděpodobně také pomáhá v navození orální tolerance (Dongarra, M.L. et al. 2013). V souladu s tímto faktem bylo prokázáno nižší zastoupení bifidobakterií a laktobacilů v střevní mikroflóře kojenců s EK v porovnání se zdravými kojenčí (Smehilova, M. et al. 2008).

Studie na zvířatech prokázaly, že u mláďat savců je střevo vystaveno cytokinům MM, které pomáhají regulovat imunitní odpovědi až do období, kdy je střevo dostatečně zralé a produkuje svoje vlastní imunoregulační cytokiny, jenž udržují normální homeostázu střeva (Penttila, I.A. et al. 2003). Nicméně role cytokinů nezůstává pouze při pasivní kompenzaci za nedostatečně fungující imunitní funkce novorozence, ale aktivně zasahuje do vývoje imunitního systému a právě určitý cytokinový vzorec mateřského mléka může ovlivňovat navození orální tolerance.

V naší práci jsme prokázali významně vyšší koncentraci Th1 cytokinu IFN- γ v MM, které dostávali kojenčí s EK oproti zdravým kojenčím. Přítomnost IFN- γ v MM byla popsána v jiných studiích a byla asociovaná s chirurgickým porodem (Bocci, V. et al. 1993). V nedávno provedené studii měli matky, u jejichž dětí se objevila atopická dermatitida do 12 měsíců života, významně nižší hladiny IFN- γ v MM (Linnamaa, P. et al. 2013). EK je představitelem alergických onemocnění, které bývají spojeny s Th2 buněčnou odpovědí,

navíc asi polovina matek ve skupině EK měla sama v anamnéze alergické obtíže, a tak bychom čekali spíše dominanci cytokinů Th2 spektra. Mohlo by se jednat o reakci na predominantní Th2 odpověď při manifestaci nebo exacerbaci alergie. V době odběru vzorků neměla žádná z matek akutní alergické obtíže, je tedy možné, že v době klinicky stabilní fáze nemoci se imunitní systém snaží vybalancovat tuto cytokinovou nerovnováhu a buněčnou odpověď směřovat do opačného typu Th1. Navíc zatímco v těhotenství je Th1 buněčná odpověď suprimovaná, po porodu je naopak zvýšené riziko relapsu autoimunitních nemocí predominantně řízených Th1 buněčnou odpovědí (např. roztroušené sklerózy). Mezi matkami s pozitivní a negativní alergickou anamnézou ovšem nebyl rozdíl v produkci IFN- γ v MM. Na druhou stranu v jiné naší práci jsme pozorovali signifikantně vyšší hladinu IFN- γ v MM alergických matek oproti skupině nealergických matek 3 měsíce po porodu ($p < 0.001$) (nepublikované data).

IL-18 byl nalezen ve významně vyšší koncentraci v MM, které dostávali zdraví kojenci oproti kojencům s EK. IL-18 je prozánětlivý cytokin, který je spolu s IL-12 součástí Th1 buněčné odpovědi a má významnou roli v indukci produkce IFN- γ z T-buněk a NK buněk (Dinarello, C.A. et al. 2013). IL-18 byl popsán v kolostru i zralém MM a ve významně vyšší koncentraci byl nalezen v kolostru matek po předčasném porodu nebo po porodních komplikacích. Podle autorů studie by IL-18 v kolostru mohl hrát roli v indukci Th1 systémové odpovědi a hostitelské obrany u novorozence (Takahata, Y. et al. 2001). IL-18 se významně uplatňuje při vzniku některých autoimunitních onemocnění, jako například zánětlivá střevní onemocnění. Ve střevě pacientů s Crohnovou chorobou byla nalezena upregulace IL-18, a to zejména v aktivní fázi nemoci, kdy byla jeho syntéza lokalizována v epiteliálních buňkách střeva, jakož i v makrofázích a dendritických buňkách laminy propria (Pizarro, T.T. et al. 1999). Na druhou stranu je ale IL-18 konstituční součástí střevního epitelu a podílí se na udržování střevní bariéry. V závislosti na místě aktivace může uvolnění IL-18 být součástí normálního ochranného mechanismu střevní bariéry nebo se může uplatnit jako klíčový mediátor poškození střeva. Při jeho aktivaci v epiteliálních buňkách střeva napomáhá IL-18 udržení střevní bariéry, a to indukcí proliferace a posilováním regenerace poškozeného epitelu. Naproti tomu při aktivaci IL-18 v lamina propria střeva za účasti IL-12 uplatňuje IL-18 svoje prozánětlivé účinky, které vedou k infiltraci střeva neutrofily, aktivaci efektorových T buněk a udržování zánětu ve střevě (Siegmond, B. 2010). Lze tedy uvažovat, že IL-18 v MM kompenzuje jeho nedostatečnou produkci a funkci ve střevě novorozence, kde se podílí na udržení střevní epiteliální bariéry.

Regulační cytokin TGF- β 1 byl vyšší v MM, které dostávali zdraví kojenci oproti kojencům s EK. Rozdíl sice nebyl signifikantně významný (možný vliv malé vzorky), ale tento nálezn je určitě zajímavý. Ve skupině zdravých kojenců byla také nalezena inverzní korelace hladiny TGF- β 1 a IL-4 v mléku. Zásadní význam regulačního cytokinu TGF- β na vývoj imunitního systému a další fyziologické děje ve vývoji jedince byl demonstrován na zvířecích modelech: myši narozené s disrupcí genu TGF- β 1 podlehly do 20 dnů od narození syndromu kachektizace, který byl provázen multifokální smíšenou zánětlivou buněčnou odpovědí a tkáňovou nekrózou, která vedla k orgánovému selhání a úmrtí (Shull, M.M. et al. 1992; Kulkarni, A.B. and Karlsson, S. 1993). Také myši s deficitem TGF- β 1 (s knockoutovaným genem pro TGF- β 1) přežívaly v prvních týdnech života po dobu když byly kojeni, což vedlo k závěru, že za jejich přežívání byl zodpovědný TGF- β 1 od matky, přenesený transplacentárně nebo mateřským mlékem (Letterio, J.J. et al. 1994). V posledních letech je TGF- β jedním z nejvíce zkoumaných cytokinů mateřského mléka. V lidském MM se nachází ve velkém množství a hromadí se důkazy, že právě tento cytokin je klíčovým imunoaktivním faktorem při vzniku a vývoji slizniční imunitní odpovědi kojeného dítěte a indukci orální tolerance (Oddy, W.H. and Rosales, F. 2010). Expres TGF- β 1 ve střevě novorozence je velice nízká, v podstatě nedetekovatelná až do 19 dne, kdy postupně začíná stoupat (Penttila, I.A. et al. 1998). Mateřské mléko je v tomto období, kdy jsou slizniční a systémové imunitní odpovědi nezralé, až do 3 měsíců po narození důležitým exogenním zdrojem TGF- β 1 (Rautava, S. and Walker, W.A. 2009). Přítomnost TGF- β , ale i dalších cytokinů v MM může významně ovlivňovat maturaci a funkci epitelálních, zánětlivých a strukturních složek vyvíjejícího se trávicího traktu novorozence. Výzkum na zvířecích modelech prokázal, že TGF- β prochází neporušený trávicím traktem, kde dochází k jeho endocytóze a může uplatňovat svoji funkci v organismu novorozence (Oddy, W.H. and McMahon, R.J. 2011). Perorální podávání TGF- β a přítomnost TGF- β v MM současně s potravinovým neboli vzdušným antigenem navozuje orální toleranci u potkanů predisponovaných k alergii, a to stimulací izotopového přesmyku IgA v B buňkách a udržováním epitelální bariéry střeva (Oddy, W.H. and McMahon, R.J. 2011). Sekreční IgA je klíčovým hráčem v slizniční obraně. TGF- β má klíčovou roli v izotopovém přesmyku do IgA v naivních B buňkách a další cytokiny jako IL-10 a IL-6 podporují jejich diferenciaci na IgA produkující plasmatické buňky (Brandtzaeg, P. 2009). Cytokinový vzorec mateřského mléka může tedy přispívat k vývoji nezralého gastrointestinálního traktu a podporovat orální toleranci stimulací produkce protilátek IgA a inhibicí IgE, IgG a buňkami zprostředkovaných reakcí. Tímto

mechanismem mohou vysoké hladiny TGF- β v MM taktéž působit preventivně před senzibilizací na potravinové alergen. Hladiny TGF- β v MM jsou však značně heterogenní a jsou ovlivněny mnoha faktory, jako např. atopií matky (Laiho, K. et al. 2003), suplementací probiotik (Bottcher, M.F. et al. 2008), ale i dalšími faktory, jako jsou váhový přírůstek v těhotenství (Collado, M.C. et al. 2012), psychosociální faktory (Kondo, N. et al. 2011), země původu matky a předchozí gravidita (Amoudruz, P. et al. 2009).

IL-10 jako jediný z testovaných cytokinů nebyl detekovatelný ani v jednom vzorku MM. Některé práce uvádějí přítomnost IL-10 v MM v prvních dnech po porodu s rychlým poklesem (Yilmaz, H.L. et al. 2007). Průměrný věk kojenců v době sběru vzorků v naší studii byl 16.8 týdnů (nejméně 2 týdny) ve skupině kolitid a 3 měsíce ve skupině zdravých dětí. Laboratorní chyba byla vyloučena opakovaným provedením testu. Tyto nízké hladiny IL-10 tedy mohou být způsobeny větším časovým odstupem od porodu. Zvířecí model myši s knock-outovaným genem pro IL-10 ukázal, že u těchto myši spontánně vzniká generalizovaná enterokolitida v době odstavení od mateřského mléka, které lze zabránit parenterálním podáváním IL-10 (Berg, D.J. et al. 1996). O významu tohoto regulačního cytokinu se širokým spektrem protizánětlivých účinků v lidském MM svědčí americká studie, ve které hladiny IL-10 v MM korelovaly se zralostí novorozenců, přičemž nejvyšší hladiny byly u matek, které porodily extrémně předčasně, a nedetekovatelné hladiny IL-10 v MM byly spojeny s rozvojem nekrotizující enterokolitidy (Fituch, C.C. et al. 2004).

Spontánní vaginální porod byl spojen s nižší hladinou IL-4 v MM, a tedy slabší Th2 odpovědí. V dostupné literatuře nejsou údaje o polarizaci imunitního systému matky v závislosti na způsobu porodu.

2.6. Analýza adiponektinu, AFABP, leptinu a adipofilinu v mateřském mléce v průběhu 12 měsíců laktace

Adiponektin, leptin, ghrelin a adipocytární protein vázající mastné kyseliny (AFABP) patří mezi regulační hormony příjmu potravy a glukózo-lipidového metabolismu.

Adiponektin je protein tvořený zejména v adipocytech tukové tkáně a má významnou úlohu v regulaci glukózového metabolismu, zvyšuje inzulinovou senzitivitu, zpomaluje progresi aterosklerotických změn a je považovaný za biomarker metabolického syndromu. Jeho sérové koncentrace jsou zvýšené u konstitučně štíhlých jedinců a nízké u obézních (Falcao-Pires, I. et al. 2012).

Adipocytární protein vázající mastné kyseliny (AFABP) je exprimován predominantně v tukové tkáni a makrofázích, reguluje intracelulární transport mastných kyselin do různých metabolických drah, hraje roli v glukózo-lipidovém metabolismu a podílí se na vzniku metabolického syndromu (Falcao-Pires, I. et al. 2012).

Leptin je produktem genu obezity, přítomný zejména v tukové tkáni. Má strukturu podobnou cytokinům a jeho základní funkcí je regulace tělesné hmotnosti a chuti k jídlu. Jeho sérové hladiny významně korelují s množstvím tukové tkáně v organismu (Friedman, J.M. and Halaas, J.L. 1998)

Adipofilin (adipose differentiation-related protein, ADRP, perilipin-2) patří do skupiny PAT proteinů (perilipin, adipofilin, a TIP47), které jsou klíčovými regulátory akumulace lipidů v eukaryotických buňkách. Tuky jsou hlavním energetickým zdrojem MM, jsou produkovány exocytózou ve formě tukových kapének obalených plasmatickou membránou v epiteliálních buňkách prsní žlázy. ADRP je v mléku hlavním proteinem membrány tukových kapének (Heid, H.W. et al. 1996) a v prsní žláze hraje v době diferenciaci a laktace klíčovou roli při tvorbě a maturaci tukových kapének a jejich sekrece do mateřského mléka (Heid, H.W. et al. 1998; Russell, T.D. et al. 2007; Chong, B.M. et al. 2011).

Cíl

Cílem naší studie bylo stanovit koncentraci a popsat dynamiku hladin adiponektinu, leptinu, AFABP a adipofilinu a v mateřském mléku v průběhu laktace, popsat jejich vzájemné vztahy a jejich vztah k nutričním parametrům kojenců i kojících matek.

Metody

Mateřské mléko (celkem 327 vzorků) bylo získáno od 72 kojících matek v stanovených časových intervalech: do 4 dnů po porodu (D0, kolostrum), 1 měsíc (M1), 3 měsíce (M3), 6 měsíců (M6) a 12 měsíců (M12) po porodu. Odběr MM byl proveden standardizovaným způsobem v ranních hodinách po kojení dítěte, vzorky byly uskladněné při -20°C a před analýzou byla odstředěna tuková vrstva.

Kvantitativní stanovení adiponektinu, leptinu a AFABP bylo provedeno pomocí komerčně dostupných ELISA kitů. Byla vyvinuta vysoce senzitivní ELISA metoda pro stanovení adipofilinu v MM, pomocí které byly stanoveny hladiny adipofilinu v netučné složce mléka. Anamnesticky a prospektivním sledováním byla získána antropometrická data matek a kojenců (30 chlapců, 42 dívek). Studie se účastnili pouze fyziologičtí novorozenci porození přirozeným způsobem po nekomplikované graviditě.

Výsledky

- Všechny 4 hormony byly nalezeny v kolostru.
- Adiponektin byl detekovatelný ve všech vzorkách MM až do 12. měsíce laktace. Leptin a AFABP mají větší variabilitu koncentrace a v mnohých vzorkách zralého MM byla jejich koncentrace pod detekčním limitem. Nicméně, křivka detekovatelných hladin všech 3 proteinů v průběhu laktace měla tvar písmene U, tedy s klesajícím trendem do M3 a následným vzestupem do M6 a M12. Koncentrace adiponektinu v MM byla několikrát vyšší než koncentrace leptinu, nicméně jejich hladiny pozitivně korelovaly v průběhu celých 12 měsíců laktace.
- Adipofilin byl nalezen ve všech vzorkách MM od prvních dnů až do 12. měsíce po porodu, jeho hladiny do 1. měsíce po porodu stoupaly, ve 3. měsíci poklesly a pak následně opět stoupaly až do 12. měsíce. Hladiny adipofilinu v M3 korelovaly s hladinami v M6 a M12, z čeho jsme usoudili, že u některých matek byly hladiny adipofilinu všeobecně vyšší a u jednotlivých matek byl silně zachován určitý trend hladin od M1 až do 12. měsíce.
- Nebyla nalezena korelace mezi adiponektinem, leptinem a AFABP a tělesnou hmotností kojenců a jejich BMI po celou dobu laktace, vyjma AFABP v M1. Hraniční pozitivní korelace byla nalezena mezi hladinou adiponektinu v M6 s váhovým přírůstkem kojenců v prvním roce života.

- Kromě negativní korelace hladiny adipofilinu v M6 s porodní hmotností a porodní délkou dětí nebyla nalezena žádná korelace adipofilinu s váhou, či výškou dětí, ani BMI matek na začátku těhotenství. Taktéž nebyla nalezena korelace hladin adipofilinu s váhovým přírůstkem kojenců v prvním roce života. Hladiny adipofilinu nekorelovaly se žádným regulačním hormonem příjmu potravy (adiponektin, leptin, AFABP).

Diskuse

Teorie programování je založená na hypotéze, že faktory, které ovlivňují organismus v klíčovém vývojovém období (prenatálně a časně postnatálně), mohou mít trvalé důsledky na vyvíjející se organismus a určovat riziko civilizačních onemocnění v dospělosti (Langley-Evans, S.C. 2014). Předpokládá se, že toto riziko může být sníženo cílenou specifickou výživou v těhotenství a v časném postnatálním období. Kojení je všeobecně spojováno se snížením rizika různých civilizačních onemocnění, nicméně mechanismus této ochrany zatím nebyl objasněn. V této souvislosti se zkoumají regulační hormony příjmu potravy a glukózo-lipidového metabolismu (adiponektin, leptin, ghrelin, AFABP a další), které jsou přítomny v MM, mají vliv na nutriční stav jedince a pravděpodobně hrají roli při vzniku metabolického syndromu v dospělosti.

Hladiny a jejich korelace. Naše studie regulačních hormonů v MM jako první prokázala dynamické intraindividuální změny hladin adiponektinu, leptinu, a AFABP v lidském MM v průběhu 12 měsíců laktace. Hladiny těchto hormonů do 3. měsíce klesaly a následně stoupaly do 6. a 12. měsíce. Podle dostupných studií hladina adiponektinu korelovala s hladinou leptinu v MM v prvních měsících po porodu, což se také potvrdilo v naší studii, kde jsme viděli pokračování této korelace po celých 12 měsících. Nicméně, hladina adiponektinu v MM byla několikrát vyšší než hladina leptinu a ostatních regulačních hormonů v MM, toto pozorování je také v souladu s nálezy v jiných studiích (Martin, L.J. et al. 2006; Weyermann, M. et al. 2006).

Podobně hladiny adipofilinu, který byl přítomen v MM v průběhu celých 12 měsíců laktace, měli stoupající trend do 1. měsíce, klesající ve 3. měsíci a následovaný opětovným vzestupem do 12. měsíce. Hladiny adipofilinu v M3 korelovaly s hladinami v M6 a M12, což vedlo k poznatku, že u některých matek byly hladiny adipofilinu všeobecně vyšší než u jiných a byly tedy intraindividuálně zachovány. Kvantifikaci proteinů mléčných tukových kapének provedli Reinhardt a Lippolis pomocí „shotgun“ proteomiky, přičemž pozorovali paralelní

upregulaci proteinů spojených s transportem, syntézou a sekrecí lipidů (adipofilin, butyrofilin a xantin dehydrogenáza) v době přechodu kolostra do zralého mléka (Reinhardt, T.A. and Lippolis, J.D. 2008), a podle nich dochází v transportu mléčného tuku k časné vývojové změně, přestože kolostrum obsahuje více tuku. Vzestup hladin adipofilinu v MM od 6. do 12. měsíce má podobný trend jako i vzestup dalších regulačních hormonů (adiponektinu, leptinu a AFABP) a může být způsoben zavedením příkrmů do stravy a delšími intervaly mezi kojením v tomto věku.

Vztah k nutričním parametrům. Kojení je považováno za významný faktor snižující riziko obezity, ale mechanismus této ochrany zatím nebyl nijak prokázán. Adiponektin, leptin a AFABP by se pravděpodobně mohly podílet na nutričním programování kojenců, a to v průběhu celých 12 měsíců kojení.

Podle dostupné literatury je adiponektin již v průběhu fetálního vývoje inverzně spojený s inzulinem, leptinem a tělesnou hmotností. Spolu s leptinem byl adiponektin nalezen v pupečnickové krvi a placentě a jejich hladiny v plasmě byly spojeny s porodní hmotností, obezitou a BMI při narození. Hladina leptinu v MM koreluje s jeho hladinou v séru jak u matek, tak i kojených dětí (Ucar, B. et al. 2000; Uysal, F.K. et al. 2002) a s BMI matky (Bronsky, J. et al. 2006). Savino et al. prokázali, že hladiny leptinu v séru, ale ne v mléku, korelují s hmotností kojenců a BMI (Savino, F. et al. 2010). Podle Savina hladina adiponektinu v séru dítěte souvisí s jeho hladinou v mateřském mléku i v séru matky. V jiné studii (Weyermann, M. et al. 2006) zase nebyla nalezena souvislost mezi hladinou adiponektinu v MM a porodní hmotností, kromě skupiny novorozenců s porodní hmotností pod 3000 g, u kterých byla hladina adiponektinu signifikantně zvýšená. Vzhledem k tomu, že v naší studii byly zahrnuty pouze kojenci s normální porodní hmotností, nemohli jsme toto tvrzení potvrdit.

V naší studii nebyla nalezena souvislost mezi studovanými hormony (adiponektinem, leptinem či AFABP) a hmotností kojených dětí, kromě AFABP v M1. Nicméně, hraniční pozitivní korelace byla nalezena mezi váhovým přírůstkem kojených dětí v průběhu prvního roku života a hladinou adiponektinu v MM v M6. Zdá se tedy, že adiponektin by mohl být prediktivním faktorem pro váhový přírůstek kojenců, ale na potvrzení této hypotézy je potřeba další studie s delší dobou sledování (alespoň 2 roky).

Hladina adipofilinu v MM nekorelovala s nutričními parametry matek, ani hmotnostním přírůstkem kojenců v prvním roce života. Jediným signifikantním nálezem byla negativní korelace hladina adipofilinu v M6 s porodní váhou i délkou dítěte, avšak vzhledem

k ojedinělému nálezu je klinický význam tohoto nálezu sporný a vyžaduje delší dobu sledování dětí. Zajímavým zjištěním bylo, že hladina adipofilinu ani v jednom časovém bodě v průběhu 12 měsíců laktace nekorelovala s hladinou ostatních regulačních hormonů (adiponektin, AFABP, leptin). Zdá se tedy, že hladina adipofilinu v MM nesouvisela s nutričním stavem kojených dětí ani jejich matek.

Bylo prokázáno, že exprese a produkce adipofilinu je indukovaná mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem, a to obzvláště v období hladovění, kdy dochází k lipolýze a stoupá jejich koncentrace v séru (Dalen, K.T. et al. 2006). V naší práci jsme neměli k dispozici informaci o stravovacích návycích u matek, které by bylo možno korelovat s hladinou adipofilinu v MM.

Otázkou zůstává, jakou funkci plní regulační hormony mateřského mléka ve vývoji kojence. Hladina adiponektinu je 2-3x vyšší u novorozenců než u dospělých. Je známo, že hladina adiponektinu i leptinu v MM souvisí s hladinou leptinu v plasmě matek a obezitou (Houseknecht, K.L. et al. 1997; Uysal, F.K. et al. 2002) a hladinou leptinu u kojenců (Savino, F. et al. 2008; Savino, F. et al. 2010). Podle Savina byly hladiny leptinu vyšší v séru kojenců, kteří byli plně kojeni v porovnání s kojenci krmenými mléčnou formulí. O možnosti uplatnění leptinu z MM v organismu kojence svědčí nález jeho receptorů v epiteliálních buňkách žaludku a střeva u zvířat i lidí (Barrenetxe, J. et al. 2002; Aparicio, T. et al. 2005). Navíc studie na zvířatech prokázaly, že leptin z MM prochází do žaludku i séra mládřat (Aparicio, T. et al. 2005). Leptin v MM může tedy fungovat jako signál sytosti u kojeného dítěte a regulovat krátkodobý příjem potravy, ale může mít také i dlouhodobý efekt na energetickou bilanci a tělesnou hmotnost (Stocker, C.J. and Cawthorne, M.A. 2008; Palou, A. and Pico, C. 2009).

Receptor pro adiponektin byl také nalezen ve střevě lidí (Bronsky, J. et al. 2012). U myši bylo prokázáno vstřebávání adiponektinu z lumen střeva do oběhu. Studie u kojených dětí ukázaly významnou souvislost hladin adiponektinu v séru kojenců s jeho hladinou v MM, které přijímali, což vede k předpokladu, že v lidském střevě taky dochází k jeho transportu přes sliznici střeva. Biologický význam adiponektinu v MM je zjevný na inverzní korelaci hladin adiponektinu v MM a adipozitou kojenců, což by mohlo vysvětlovat snížení rizika obezity u kojených dětí (Newburg, D.S. et al. 2010). Vzhledem k tomu, že adiponektin se nachází v MM až do 12 měsíce, MM může představovat významný přídatný zdroj adiponektinu kromě tukové tkáně dítěte. Vyšší hladiny adiponektinu v MM byly asociovány s nadváhou ve 2 letech u dětí, které byly kojené nejméně 6 měsíců. Vzhledem k tomu, že doba

sledování v naší studii byla 12 měsíců, toto pozorování nemohlo být potvrzeno. Podle Savina byly vyšší hladiny adiponektinu v MM asociovány s významně nižší tělesnou hmotností s štíhlejší proporcionalitou těla v průběhu 6 měsíců u kojených dětí (Savino, F. et al. 2012). Navíc přítomnost adiponektinu v MM v biologicky aktivní formě pravděpodobně umožňuje jeho regulační schopnosti ve váhovém prospívání kojenců a také umožňuje jeho působení jako protizánětlivého faktoru zejména na střevní sliznici. Adiponektin v MM tedy může být faktorem, který snižuje riziko obezity a zánětlivých poruch v době kojení. Adiponektin v MM může být typickým příkladem blízkého metabolického propojení mezi matkou a dítětem.

Adipofilin byl nalezen jako součást membrány mléčných tukových kapének v lidském, kravském a kozím mléku i mléku potkana, přičemž více studií se zabývalo jeho významem v MM. Studie na zvířatech odhalily, že adipofilin je zvláště lokalizován v sekrečních epiteliálních buňkách prsní žlázy v době její diferenciaci a laktace a jeho zvýšená exprese je spojena s akumulací tukových kapének v cytoplasmě těchto buněk (Russell, T.D. et al. 2007). Adipofilin navíc interaguje s fosfolipidy na apikální části buněčné membrány a zapojuje se do sekrece tukových kapének z cytoplasmy (Chong, B.M. et al. 2011). Nicméně, podle dostupné literatury i našich výsledků se zdá, že adipofilin nemá vztah k nutričním parametrům matek či kojených dětí. V nedávné práci skandinávských autorů byly v MM objevené exosomy s imuoregulačními vlastnostmi. Proteomická analýza těchto vezikul prokázala mezi jinými i přítomnost adipofilinu (Admyre, C. et al. 2007).

3. Shrnutí a závěr

Cytokinový profil mononukleárních buněk periferní krve odráží imunologické děje, které se uplatňují v patogenezi konkrétního onemocnění. Ve své práci jsem se zabývala několika imunopatologickými stavy (diabetes mellitus 1. typu, autoimunitní tyreoiditida, alergická kolitida), u kterých je popisována cytokinová dysbalance. Snažila jsem se najít charakteristické rysy cytokinového profilu každého konkrétního onemocnění a poukázat na to, co je spojuje resp. rozděluje.

První chorobou byl diabetes mellitus 1. typu, kdy jsme studovali jednak pacienty s touto chorobou, dále pak jejich prvostupňové příbuzné. Zvláštní skupinu prvostupňových příbuzných pak představovali novorozenci, jejichž jeden z rodičů je pro tuto chorobu léčen. U osob v prediabetické fázi tj. v době, kdy je ještě zachována glukózová homeostáza, dominovala spontánní i poststimulační produkce Th1 asociovaných cytokinů, zatímco v době stanovení diagnózy T1D jejich produkce poklesla a byla potlačena alespoň po dobu 2 let od stanovení diagnózy. Imunologický profil u nově diagnostikovaných pacientů se vyznačoval dominantní produkcí Th3/Tr1 asociovaných cytokinů, ale současně i značnou produkcí prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Pouze buňky získané v prediabetické fázi od pacientů s vysoce rizikovým profilem byly schopné indukovat Th2 imunitní odpověď, a to zvýšenou produkcí IL-5 po stimulaci mitogenem. Patologická převaha reaktivity ve směru Th1 se tedy bezesporu na vzniku T1D podílí, ale není již přítomná v době klinické manifestace choroby. V tomto období je patrná naopak zvýšená aktivace regulačních mechanismů, která je neefektivní, protože celý proces destrukce beta buněk již příliš pokročil. V době klinické manifestace choroby je pak dále přítomné jasné perzistentní prozánětlivé ladění organismu.

Při studiu imunologické reaktivity v novorozeneckém období byla pozorována Th1 predominance poststimulační odpovědi u dětí diabetických otců a dále pak u dětí ideálně kompenzovaných matek diabetiček. Je tedy otázka, zda se nějak na imunologické reaktivitě u novorozenců diabetiček podílí vliv hyperglykémie. Provedené *in vitro* experimenty svědčí pro možný supresní vliv hyperglykémie. Ta samozřejmě za *in vivo* podmínek má velmi negativní důsledky (vznik diabetické embrya resp. fetopatie). Nicméně je možné, že pomocí jistého imunosupresního působení hyperglykémie by bylo možné vysvětlit nižší výskyt T1D u potomků diabetiček ve srovnání například s potomky T1D otců. Je potřeba ovšem uvážit i možnost vlivu vyšší aktivity beta buněk dětí těchto matek a tudíž jejich „lepší

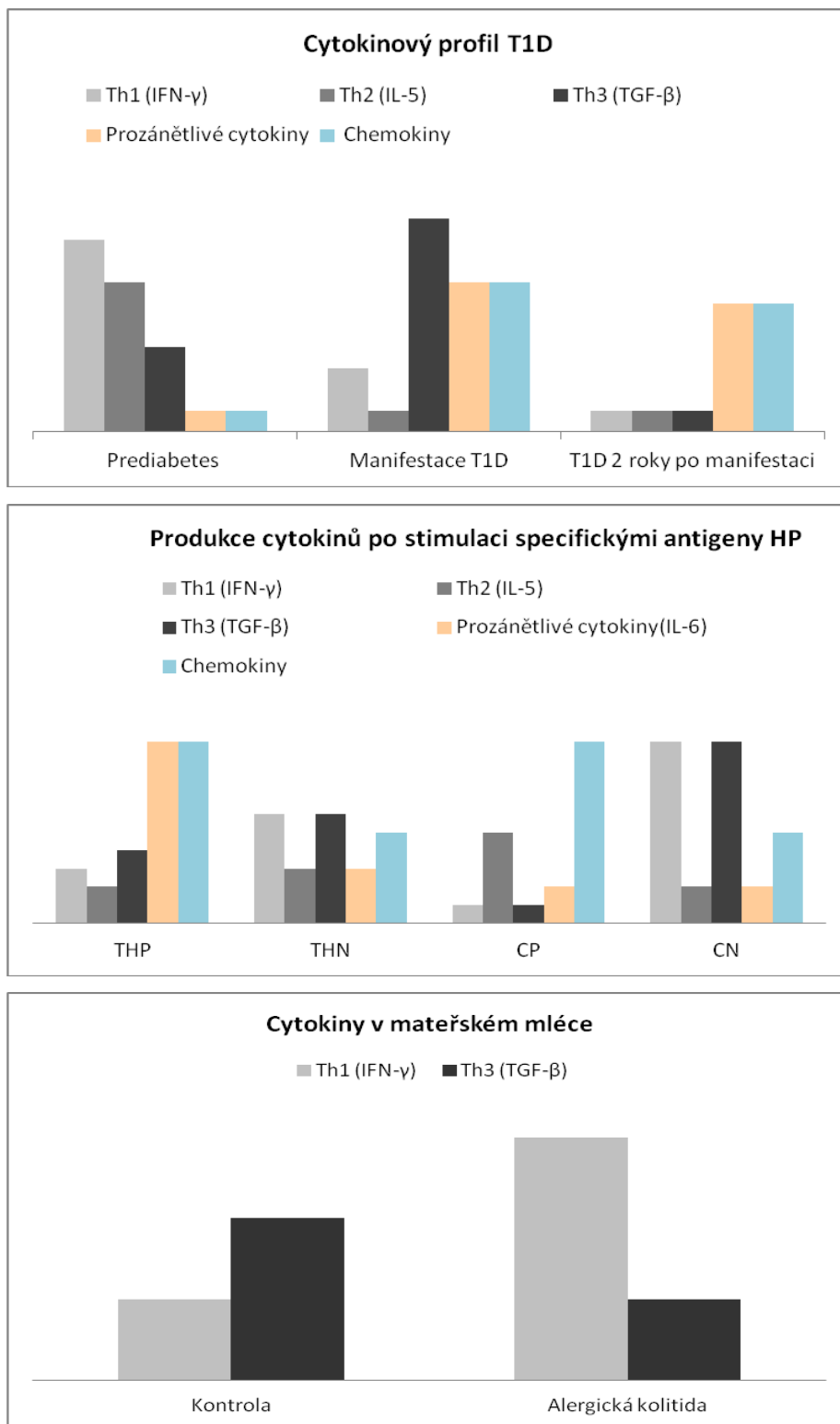
imunologickou viditelnost“ pro fetální imunitní systém, který by tímto způsobem mohl být schopen navodit lepší specifickou imunologickou toleranci. To je předmětem dalšího extenzivního výzkumu, který již nebyl plánován jako součást této práce.

Dalším studovaným imunopatologickým stavem byla autoimunitní tyreoiditida. Adekvátní reakce imunitního systému na patogeny je nevyhnutelná pro jejich vyloučení z organismu. Antigeny infekčního patogenu mohou ale vést k autoreaktivitě právě aktivací neadekvátní imunologické odpovědi. Právě to bylo demonstrováno na pozorované produkci zánětlivých cytokinů u pacientů s AT v reakci na specifické antigeny HP. Zvýšená prozánětlivá reaktivita u těchto pacientů je v souladu s výše popsanou vyšší prozánětlivou aktivitou u pacientů s recentní manifestací T1D a může tedy představovat prvek společný pro různá autoimunitní onemocnění, která se navíc často vyskytují společně. Je ovšem otázkou, jaký je mechanismus vedoucí k tomuto apriori prozánětlivému ladění organismu. Odpověď se může nacházet v nastavení imunologické reaktivity prenatálně a časně postnatálně. V této souvislosti jsem se proto zabývala i otázkou cytokinů v mateřském mléce.

Cytokiny v mateřském mléku jsou důležitými biologicky aktivními faktory, které nahrazují roli chybějících imunitních mechanismů novorozence a současně působící ve vyvíjejícím se imunitním systému kojeného dítěte. Významně vyšší hladina Th1 cytokinu IFN- γ spolu s nižší hladinou regulačního cytokinu TGF- β byla nalezena v mateřském mléku, které dostávali kojenci s alergickou kolitidou a je tedy možné, že na patogenezi této choroby se může podílet snaha nezralého imunitního systému o nastolení imunologické rovnováhy. Spojení mezi cytokinovým spektrem mateřského mléka a imunologickou reaktivitou dítěte je ale evidentní. Nicméně přesný biologický podklad pro dlouhodobý ochranný efekt kojení před vznikem imunologicky podmíněných a civilizačních onemocnění není v současnosti zcela objasněn, přestože užitek kojení pro zdraví kojence je nepochybný.

Zabývala jsem se i kandidátními cytokiny podílejícími se na nutričním programování kojenců (adiponektin, leptin a AFABP), které jsou také označovány jako regulační hormony příjmu potravy a glukózo-lipidového metabolismu. Přítomnost těchto cytokinů v mateřském mléku byla prokázána po celé období 12 měsíců laktace. Zdá se, že v tomto ohledu je nejvýznamnější adiponektin, jelikož hraniční pozitivní korelace byla nalezena mezi jeho hladinou v mateřském mléku 6 měsíců po porodu a váhovým přírůstkem kojenců v průběhu prvního roku života. U adipofilinu, který je hlavní součástí membrány tukových kapének v mléku, jsme korelaci s výživovými parametry matek ani kojenců nenalezli. Je samozřejmě otázka, jaký bude další vývoj nutrice sledovaných dětí. To je ale již také mimo výzkum

spojený s touto prací. Jedná se ale o velmi perspektivní oblast výzkumu vzhledem k tomu, jak je například obezita (nadváha) spojena s vyšší prozánětlivou aktivitou, aktivací endotelu a dalšími jevy, které se podílejí na vzniku metabolického syndromu se všemi jeho konsekvencemi.



Obrázek 9. Schematické zobrazení cytokinového profilu u diabetu 1. typu, autoimunitní tyreoiditidy a mateřského mléka matek dětí s alergickou kolitidou.

Legenda: T1D – diabetes 1. typu, HP – Helicobacter pylori, THP – pacienti s autoimunitní tyreoiditidou HP pozitivní, THN - pacienti s autoimunitní tyreoiditidou HP negativní, CP - kontrolní skupina HP pozitivní, CN - kontrolní skupina HP negativní

4. Seznam použité literatury

- Admyre, C., et al. (2007). "Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk." *J Immunol* 179(3): 1969-1978.
- Akdis, M., et al. (2011). "Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases." *J Allergy Clin Immunol* 127(3): 701-721 e701-770.
- Akdis, M., et al. (2012). "TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection." *J Allergy Clin Immunol* 129(6): 1438-1449; quiz1450-1431.
- Amoudruz, P., et al. (2009). "Maternal country of birth and previous pregnancies are associated with breast milk characteristics." *Pediatr Allergy Immunol* 20(1): 19-29.
- Andersen, L.P. (2007). "Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans." *Helicobacter* 12 Suppl 2: 12-15.
- Aparicio, T., et al. (2005). "Leptin and Ob-Rb receptor isoform in the human digestive tract during fetal development." *J Clin Endocrinol Metab* 90(11): 6177-6184.
- Appelberg, R. (2007). "Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing." *Trends Microbiol* 15(2): 87-92.
- Avanzini, M.A., et al. (2005). "IFN-gamma low production capacity in type 1 diabetes mellitus patients at onset of disease." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113(6): 313-317.
- Averbeck, M., et al. (2007). "Immunologic principles of allergic disease." *J Dtsch Dermatol Ges* 5(11): 1015-1028.
- Ballard, O. and Morrow, A.L. (2013). "Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors." *Pediatric Clinics of North America* 60(1): 49-74.
- Barclay, A.R., et al. (2009). "Systematic Review: The Role of Breastfeeding in the Development of Pediatric Inflammatory Bowel Disease." *The Journal of Pediatrics* 155(3): 421-426.
- Barrenetxe, J., et al. (2002). "Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes." *Gut* 50(6): 797-802.
- Bartůňková, J. (2002). Ontogeneze imunitního systému. In *Imunodeficiency*. Praha, Grada Publishing: 46-52.
- Berg, D.J., et al. (1996). "Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses." *J Clin Invest* 98(4): 1010-1020.
- Bergman, M.P., et al. (2004). "*Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN." *J Exp Med* 200(8): 979-990.
- Bettelli, E., et al. (2007). "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." *Curr Opin Immunol* 19(6): 652-657.
- Blander, J.M. (2008). "Phagocytosis and antigen presentation: a partnership initiated by Toll-like receptors." *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3: iii44-49.
- Bocci, V., et al. (1993). "Presence of interferon-gamma and interleukin-6 in colostrum of normal women." *Lymphokine Cytokine Res* 12(1): 21-24.
- Bodmer, J.L., et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." *Trends Biochem Sci* 27(1): 19-26.
- Bohmova, K., et al. (2007). "Cord blood cytokine profile detection in neonates with T1D parents -- monitoring of cellular auto-reactivity using protein microarray." *Scand J Immunol* 66(5): 563-571.
- Bone, J., et al. (2009). "Allergic proctocolitis, food-induced enterocolitis: immune mechanisms, diagnosis and treatment." *Allergol Immunopathol (Madr)* 37(1): 36-42.

- Bottcher, M.F., et al. (2008). "Low breast milk TGF-beta2 is induced by *Lactobacillus reuteri* supplementation and associates with reduced risk of sensitization during infancy." *Pediatr Allergy Immunol* 19(6): 497-504.
- Brandtzaeg, P. (2003). "Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant." *Vaccine* 21(24): 3382-3388.
- Brandtzaeg, P. (2009). "Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions." *Scand J Immunol* 70(6): 505-515.
- Brandtzaeg, P. (2010). "The mucosal immune system and its integration with the mammary glands." *J Pediatr* 156(2 Suppl): S8-15.
- Bresson, D., et al. (2006). "Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs." *J Clin Invest* 116(5): 1371-1381.
- Bronsky, J., et al. (2006). "Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk." *Clin Chem* 52(9): 1763-1770.
- Bronsky, J., et al. (2012). "Immunoexpression of type-1 adiponectin receptor in the human intestine." *Cesk Patol* 48(3): 165-166.
- Candelli, M., et al. (2003). "Helicobacter pylori, gastrointestinal symptoms, and metabolic control in young type 1 diabetes mellitus patients." *Pediatrics* 111(4 Pt 1): 800-803.
- Cantani, A. (2008). *Diagnosis of Pediatric Allergy. In Pediatric Allergy, Asthma and Immunology. U. Heilmann. Germany, Springer: 421-467.*
- Cardozo, A.K., et al. (2003). "IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice." *Diabetologia* 46(2): 255-266.
- Cinek, O. (2010). *Molekulární epidemiologie dětského diabetu 1. typu. 2. Lékařská fakulta Praha, Univerzita Karlova.*
- Cinek, O., et al. (2012). "The incidence of type 1 diabetes in young Czech children stopped rising." *Pediatric Diabetes* 13(7): 559-563.
- Coffman, R.L. (2006). "Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective." *Nat Immunol* 7(6): 539-541.
- Collado, M.C., et al. (2012). "Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk." *Pediatr Res* 72(1): 77-85.
- Comerford, I., et al. (2014). "Advances in understanding the pathogenesis of autoimmune disorders: focus on chemokines and lymphocyte trafficking." *Br J Haematol* 164(3): 329-341.
- Commins, S.P., et al. (2010). "Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines." *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2): S53-72.
- Cottrell, E.C. and Ozanne, S.E. (2008). "Early life programming of obesity and metabolic disease." *Physiol Behav* 94(1): 17-28.
- Cox, M.A., et al. (2013). "Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love." *Virology* 435(1): 157-169.
- Čapková, Š., et al. (2005). *Atopický ekzém. Praha, Galén.*
- D'Alessandro, A., et al. (2010). "Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview." *J Proteome Res* 9(7): 3339-3373.
- D'Elios, M.M., et al. (1997). "Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer." *Eur J Immunol* 27(7): 1751-1755.
- d'Hennezel, E., et al. (2009). "FOXP3 forkhead domain mutation and regulatory T cells in the IPEX syndrome." *N Engl J Med* 361(17): 1710-1713.

- Dalen, K.T., et al. (2006). "PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver." *J Lipid Res* 47(5): 931-943.
- Davies, T.F. (2013). Pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis (chronic autoimmune thyroiditis). In UpToDate. D. S. Basow. Waltham, MA, UpToDate.
- deShazo, R.D. and Kemp, S.F. (2013). Allergic rhinitis: Clinical manifestations, epidemiology, and diagnosis. In UpToDate. D. S. Basow. Waltham, MA, UpToDate.
- Dinarello, C.A. (2007). "Historical insights into cytokines." *Eur J Immunol* 37 Suppl 1: S34-45.
- Dinarello, C.A., et al. (2013). "Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein." *Front Immunol* 4: 289.
- Dongarra, M.L., et al. (2013). "Mucosal immunology and probiotics." *Current Allergy and Asthma Reports* 13(1): 19-26.
- Dons, E.M., et al. (2012). "Induced regulatory T cells: mechanisms of conversion and suppressive potential." *Human Immunology* 73(4): 328-334.
- Duhen, T., et al. (2009). "Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells." *Nat Immunol* 10(8): 857-863.
- Egan, B.J., et al. (2007). "Helicobacter pylori gastritis, the unifying concept for gastric diseases." *Helicobacter* 12 Suppl 2: 39-44.
- Eichenfield, L.F., et al. (2012). "Atopic dermatitis: epidemiology and pathogenesis update." *Semin Cutan Med Surg* 31(3 Suppl): S3-5.
- El-Behi, M., et al. (2011). "The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF." *Nat Immunol* 12(6): 568-575.
- Esposito, K., et al. (2002). "Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress." *Circulation* 106(16): 2067-2072.
- Eyerich, S., et al. (2009). "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling." *J Clin Invest* 119(12): 3573-3585.
- Falcao-Pires, I., et al. (2012). "Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines." *Drug Discov Today* 17(15-16): 880-889.
- Fernández, L., et al. (2013). "The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease." *Pharmacological Research* 69(1): 1-10.
- Fituch, C.C., et al. (2004). "Concentrations of IL-10 in preterm human milk and in milk from mothers of infants with necrotizing enterocolitis." *Acta Paediatr* 93(11): 1496-1500.
- Fleischer, D.M. (2013). The impact of breastfeeding on the development of allergic disease. Waltham, MA, UpToDate.
- Fox, L., et al. (2010). "Natural killer T cells: innate lymphocytes positioned as a bridge between acute and chronic inflammation?" *Microbes and Infection* 12(14-15): 1125-1133.
- Frederiksen, B., et al. (2013). "Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The diabetes autoimmunity study in the young (daisy)." *JAMA Pediatrics* 167(9): 808-815.
- Friedman, J.M. and Halaas, J.L. (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* 395(6704): 763-770.
- Gaffen, S.L. (2009). "Structure and signalling in the IL-17 receptor family." *Nat Rev Immunol* 9(8): 556-567.
- Gaffen, S.L. (2011). "Recent advances in the IL-17 cytokine family." *Curr Opin Immunol* 23(5): 613-619.
- Gasbarrini, A., et al. (1998). "Helicobacter pylori infection in patients affected by insulin-dependent diabetes mellitus." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10(6): 469-472.

- Geijtenbeek, T.B., et al. (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." *Cell* 100(5): 587-597.
- Ghoreschi, K., et al. (2011). "T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease." *Trends Immunol* 32(9): 395-401.
- Ghoreschi, K., et al. (2010). "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." *Nature* 467(7318): 967-971.
- Goldman, A.S. (2000). "Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective." *J Nutr* 130(2S Suppl): 426S-431S.
- Gronlund, M.M., et al. (1999). "Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28(1): 19-25.
- Gruver, A.L., et al. (2007). "Immunosenescence of ageing." *J Pathol* 211(2): 144-156.
- Guariso, G., et al. (2004). "Organ-specific autoantibodies in children with *Helicobacter pylori* infection." *Helicobacter* 9(6): 622-628.
- Hales, C.N. and Barker, D.J.P. (2001). "The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes." *British Medical Bulletin* 60(1): 5-20.
- Halminen, M., et al. (2001). "Cytokine expression in unstimulated PBMC of children with type 1 diabetes and subjects positive for diabetes-associated autoantibodies." *Scand J Immunol* 53(5): 510-513.
- Hamza, T., et al. (2010). "Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications." *Int J Mol Sci* 11(3): 789-806.
- Harjutsalo, V., et al. (2006). "Differential transmission of type 1 diabetes from diabetic fathers and mothers to their offspring." *Diabetes* 55(5): 1517-1524.
- Harrington, L.E., et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* 6(11): 1123-1132.
- Hedman, M., et al. (2006). "Nicotinamide reduces high secretion of IFN-gamma in high-risk relatives even though it does not prevent type 1 diabetes." *J Interferon Cytokine Res* 26(4): 207-213.
- Heid, H.W., et al. (1998). "Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases." *Cell Tissue Res* 294(2): 309-321.
- Heid, H.W., et al. (1996). "Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane." *Biochem J* 320 (Pt 3): 1025-1030.
- Hemdan, N.Y.A., et al. (2012). "Key molecules in the differentiation and commitment program of T helper 17 (Th17) cells up-to-date." *Immunology Letters* 148(2): 97-109.
- Hinck, A.P. (2012). "Structural studies of the TGF-betas and their receptors - insights into evolution of the TGF-beta superfamily." *FEBS Lett* 586(14): 1860-1870.
- Holgate, S.T. (2012). "Innate and adaptive immune responses in asthma." *Nat Med* 18(5): 673-683.
- Holm, B.C., et al. (2006). "Evidence for immunological priming and increased frequency of CD4+ CD25+ cord blood T cells in children born to mothers with type 1 diabetes." *Clin Exp Immunol* 146(3): 493-502.
- Horta, B.L. and Victora, C.G. (2013). Long-term effects of breastfeeding: a systematic review. Geneva, WHO Press.
- Hořejší, V. and Bartůňková, J. (2009). Alergie. In *Základy imunologie*. Praha, Triton.
- Houseknecht, K.L., et al. (1997). "Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity." *Biochem Biophys Res Commun* 240(3): 742-747.

- Chatila, T.A. (2009). "Regulatory T cells: key players in tolerance and autoimmunity." *Endocrinol Metab Clin North Am* 38(2): 265-272, vii.
- Chen, M.C., et al. (2001). "Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells." *Diabetologia* 44(3): 325-332.
- Chirido, F.G., et al. (1998). "Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers." *Scand J Gastroenterol* 33(11): 1186-1192.
- Chirico, G. and Gasparoni, A. (2009). Immunologic components of human milk.
- Chong, B.M., et al. (2011). "The adipophilin C terminus is a self-folding membrane-binding domain that is important for milk lipid secretion." *J Biol Chem* 286(26): 23254-23265.
- Jabeen, R. and Kaplan, M.H. (2012). "The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells." *Current Opinion in Immunology* 24(3): 303-307.
- Johansson, S.G., et al. (2004). "Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003." *J Allergy Clin Immunol* 113(5): 832-836.
- Kalabay, L., et al. (2002). "Helicobacter pylori infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60." *Helicobacter* 7(4): 250-256.
- Karlsson Faresjö, M., et al. (2006). "Diminished IFN- γ response to diabetes-associated autoantigens in children at diagnosis and during follow up of type 1 diabetes." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 22(6): 462-470.
- Karlsson Faresjö, M.G.E. and Ludvigsson, J. (2005). "Diminished Th1-Like Response to Autoantigens in Children with a High Risk of Developing Type 1 Diabetes." *Scandinavian Journal of Immunology* 61(2): 173-179.
- Karlsson, M.G., et al. (2000). "Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type I diabetic patients." *Diabetologia* 43(6): 742-749.
- Kašák, V. (2011). "Léčba astmatu – pohled do budoucnosti." *Alergie Supplementum*(2): 19-28.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* 11(5): 373-384.
- Keymeulen, B., et al. (2005). "Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes." *N Engl J Med* 352(25): 2598-2608.
- Klecha, A.J., et al. (2008). "Immune-endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases." *Neuroimmunomodulation* 15(1): 68-75.
- Klein, D., et al. (2008). "CD40 activation in human pancreatic islets and ductal cells." *Diabetologia* 51(10): 1853-1861.
- Kleinman, R.E. and Walker, W.A. (1979). "The enteromammary immune system: an important new concept in breast milk host defense." *Dig Dis Sci* 24(11): 876-882.
- Kondo, N., et al. (2011). "Maternal psychosocial factors determining the concentrations of transforming growth factor-beta in breast milk." *Pediatr Allergy Immunol* 22(8): 853-861.
- Kramer, M.S. (2011). "Breastfeeding and allergy: the evidence." *Ann Nutr Metab* 59 Suppl 1: 20-26.
- Krishnamurthy, B., et al. (2008). "Autoimmunity to both proinsulin and IGRP is required for diabetes in nonobese diabetic 8.3 TCR transgenic mice." *J Immunol* 180(7): 4458-4464.
- Kukreja, A., et al. (2002). "Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes." *J Clin Invest* 109(1): 131-140.

- Kulkarni, A.B. and Karlsson, S. (1993). "Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease." *Am J Pathol* 143(1): 3-9.
- Kumagai, Y. and Akira, S. (2010). "Identification and functions of pattern-recognition receptors." *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(5): 985-992.
- Kumar, V. and Sharma, A. (2010). "Neutrophils: Cinderella of innate immune system." *International Immunopharmacology* 10(11): 1325-1334.
- La Cava, A. (2008). "Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity." *Autoimmun Rev* 8(1): 83-87.
- Laiho, K., et al. (2003). "Breast milk fatty acids, eicosanoids, and cytokines in mothers with and without allergic disease." *Pediatr Res* 53(4): 642-647.
- Langley-Evans, S.C. (2014). "Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review." *J Hum Nutr Diet*.
- Larizza, D., et al. (2006). "Helicobacter pylori infection and autoimmune thyroid disease in young patients: the disadvantage of carrying the human leukocyte antigen-DRB1*0301 allele." *J Clin Endocrinol Metab* 91(1): 176-179.
- Larsen, C.M., et al. (2007). "Interleukin-1–Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus." *New England Journal of Medicine* 356(15): 1517-1526.
- Laurent, C., et al. (2010). "A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers." *Haematologica* 95(3): 356-358.
- Lawrence, R.M. and Pane, C.A. (2007). "Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases." *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 37(1): 7-36.
- Le Roux, D. and Niedergang, F. (2012). "New insights into antigen encounter by B cells." *Immunobiology* 217(12): 1285-1291.
- Lee, S. and Margolin, K. (2011). "Cytokines in cancer immunotherapy." *Cancers* 3: 3856-3893.
- Letterio, J.J., et al. (1994). "Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice." *Science* 264(5167): 1936-1938.
- Levitsky, L.L. and Misra, M. (2013). Epidemiology, presentation, and diagnosis of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. In UpToDate. Waltham, MA, UpToDate.
- Levy, O. (2007). "Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates." *Nat Rev Immunol* 7(5): 379-390.
- Lindley, S., et al. (2005). "Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes." *Diabetes* 54(1): 92-99.
- Linnamaa, P., et al. (2013). "Black currant seed oil supplementation of mothers enhances IFN-gamma and suppresses IL-4 production in breast milk." *Pediatr Allergy Immunol* 24(6): 562-566.
- Litonjua, A.A. and Weiss, S., T. (2013). Risk factors for asthma. In UpToDate. D. S. Basow. Waltham, MA, UpToDate.
- Liu, B. and Newburg, D.S. (2013). "Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens." *Breastfeed Med* 8(4): 354-362.
- Liu, M. (2013). Pathogenesis of asthma. In UpToDate. D. S. Basow. Waltham, MA, UpToDate.
- Lloyd, C.M. and Hessel, E.M. (2010). "Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells." *Nat Rev Immunol* 10(12): 838-848.
- Locksley, R.M., et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104(4): 487-501.

- Lohmann, T., et al. (2002). "Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes." *Diabetes* 51(8): 2474-2480.
- Lozinsky, A.C. and Morais, M.B. (2013). "Eosinophilic colitis in infants." *J Pediatr (Rio J)*.
- Luckheeram, R.V., et al. (2012). "CD4+T Cells: Differentiation and Functions." *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 12.
- Ludvigsson, J., et al. (2008). "GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes." *N Engl J Med* 359(18): 1909-1920.
- Maecker, H.T. (2008). *Measuring Human Cytokines*. In *Handbook of Human Immunology*. M. R. G. O'Gorman and A. D. Donnenberg. USA, CRC Press: 517 - 533.
- Maloney, J. and Nowak-Wegrzyn, A. (2007). "Educational clinical case series for pediatric allergy and immunology: allergic proctocolitis, food protein-induced enterocolitis syndrome and allergic eosinophilic gastroenteritis with protein-losing gastroenteropathy as manifestations of non-IgE-mediated cow's milk allergy." *Pediatr Allergy Immunol* 18(4): 360-367.
- Mandar, R. and Mikelsaar, M. (1996). "Transmission of mother's microflora to the newborn at birth." *Biol Neonate* 69(1): 30-35.
- Manfras, B.J., et al. (2004). "T-cell receptor repertoire and function in umbilical cord blood lymphocytes from newborns of type 1 diabetic mothers." *Acta Diabetol* 41(4): 167-171.
- Mantovani, A., et al. (2007). "Regulatory pathways in inflammation." *Autoimmun Rev* 7(1): 8-11.
- Martin, L.J., et al. (2006). "Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors." *Am J Clin Nutr* 83(5): 1106-1111.
- Masoli, M., et al. (2004). "The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report." *Allergy* 59(5): 469-478.
- Mattapallil, J.J., et al. (2000). "A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques." *Gastroenterology* 118(2): 307-315.
- Mayer, A., et al. (1999). "The relationship between peripheral T cell reactivity to insulin, clinical remissions and cytokine production in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab* 84(7): 2419-2424.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
- Moudgil, K.D. and Choubey, D. (2011). "Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment." *J Interferon Cytokine Res* 31(10): 695-703.
- Nakayamada, S., et al. (2012). "Helper T cell diversity and plasticity." *Current Opinion in Immunology* 24(3): 297-302.
- Nathan, C. (2006). "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." *Nat Rev Immunol* 6(3): 173-182.
- Nelson, R.L. (1986). "Diabetes and pregnancy: control can make a difference." *Mayo Clin Proc* 61(10): 825-829.
- Newburg, D.S. and Walker, W.A. (2007). "Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk." *Pediatr Res* 61(1): 2-8.
- Newburg, D.S., et al. (2010). "Characteristics and potential functions of human milk adiponectin." *J Pediatr* 156(2 Suppl): S41-46.
- Newcomb, J.D., et al. (2007). "Umbilical cord blood research: current and future perspectives." *Cell Transplant* 16(2): 151-158.

- Oddy, W.H. and McMahon, R.J. (2011). "Milk-derived or recombinant transforming growth factor-beta has effects on immunological outcomes: a review of evidence from animal experimental studies." *Clin Exp Allergy* 41(6): 783-793.
- Oddy, W.H. and Rosales, F. (2010). "A systematic review of the importance of milk TGF-beta on immunological outcomes in the infant and young child." *Pediatr Allergy Immunol* 21(1 Pt 1): 47-59.
- Orgiazzi, J. (2012). "Thyroid autoimmunity." *Presse Med* 41(12 P 2): e611-625.
- Orr, M.T. and Lanier, L.L. (2010). "Natural Killer Cell Education and Tolerance." *Cell* 142(6): 847-856.
- Palmer, D.J. and Makrides, M. (2006). "Diet of lactating women and allergic reactions in their infants." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9(3): 284-288.
- Palou, A. and Pico, C. (2009). "Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life." *Appetite* 52(1): 249-252.
- Paul, W.E. and Zhu, J. (2010). "How are TH2-type immune responses initiated and amplified?" *Nat Rev Immunol* 10(4): 225-235.
- Penttila, I.A., et al. (2003). "Maternal milk regulation of cell infiltration and interleukin 18 in the intestine of suckling rat pups." *Gut* 52(11): 1579-1586.
- Penttila, I.A., et al. (1998). "Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum." *Pediatr Res* 44(4): 524-531.
- Peters, A., et al. (2011). "The many faces of Th17 cells." *Curr Opin Immunol* 23(6): 702-706.
- Pietropaolo, M. (2013). "Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus." UpToDate.
- Pillai, S., et al. (2011). "B cells and autoimmunity." *Current Opinion in Immunology* 23(6): 721-731.
- Pizarro, T.T., et al. (1999). "IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells." *J Immunol* 162(11): 6829-6835.
- Procko, E. and Gaudet, R. (2009). "Antigen processing and presentation: TAPping into ABC transporters." *Curr Opin Immunol* 21(1): 84-91.
- Quinn, A., et al. (2001). "Regulatory and effector CD4 T cells in nonobese diabetic mice recognize overlapping determinants on glutamic acid decarboxylase and use distinct V beta genes." *J Immunol* 166(5): 2982-2991.
- Rautava, S. and Walker, W.A. (2009). "Academy of Breastfeeding Medicine founder's lecture 2008: breastfeeding--an extrauterine link between mother and child." *Breastfeed Med* 4(1): 3-10.
- Raz, I., et al. (2001). "Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial." *Lancet* 358(9295): 1749-1753.
- Reddy, S., et al. (2006). "Immunolocalization of monocyte chemoattractant protein-1 in islets of NOD mice during cyclophosphamide administration." *Ann N Y Acad Sci* 1079: 103-108.
- Reinhardt, T.A. and Lippolis, J.D. (2008). "Developmental changes in the milk fat globule membrane proteome during the transition from colostrum to milk." *J Dairy Sci* 91(6): 2307-2318.
- Rescigno, M. (2010). "Functional specialization of antigen presenting cells in the gastrointestinal tract." *Current Opinion in Immunology* 22(1): 131-136.
- Rizzi, M., et al. (2006). "Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity." *Autoimmun Rev* 5(2): 145-147.
- Roan, F., et al. (2012). "The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond." *Journal of Leukocyte Biology* 91(6): 877-886.

- Roitt, I.M. and Delves, P.J. (2001). *Roitt's essential immunology*, Blackwell Publishing.
- Rubtsov, Y.P. and Rudensky, A.Y. (2007). "TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity." *Nat Rev Immunol* 7(6): 443-453.
- Ruemmele, F., et al. (2009). "Clinical Evidence for Immunomodulatory Effects of Probiotic Bacteria." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 48(2): 126-141
110.1097/MPG.1090b1013e31817d31880ca.
- Russell, T.D., et al. (2007). "Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism." *J Lipid Res* 48(7): 1463-1475.
- Saranac, L., et al. (2011). "Why is the thyroid so prone to autoimmune disease?" *Horm Res Paediatr* 75(3): 157-165.
- Savino, F., et al. (2008). "Looking for a relation between serum leptin concentration and body composition parameters in healthy term infants in the first 6 months of life." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46(3): 348-351.
- Savino, F., et al. (2010). "Evaluation of leptin in breast milk, lactating mothers and their infants." *Eur J Clin Nutr* 64(9): 972-977.
- Savino, F., et al. (2012). "Adiponectin in breast milk: relation to serum adiponectin concentration in lactating mothers and their infants." *Acta Paediatr* 101(10): 1058-1062.
- Segni, M., et al. (2004). "Early manifestations of gastric autoimmunity in patients with juvenile autoimmune thyroid diseases." *J Clin Endocrinol Metab* 89(10): 4944-4948.
- Shah, A. (2012). "The Pathologic and Clinical Intersection of Atopic and Autoimmune Disease." *Current Allergy and Asthma Reports* 12(6): 520-529.
- Sharma, A.A., et al. (2012). "The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area." *Clin Immunol* 145(1): 61-68.
- Sheu, S.M., et al. (2007). "Anti-Lewis X antibody promotes *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells." *Infect Immun* 75(6): 2661-2667.
- Shlomchik, M.J. (2009). "Activating systemic autoimmunity: B's, T's, and tolls." *Curr Opin Immunol* 21(6): 626-633.
- Shuai, K. and Liu, B. (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." *Nat Rev Immunol* 3(11): 900-911.
- Shull, M.M., et al. (1992). "Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease." *Nature* 359(6397): 693-699.
- Schanler, R.J. (2013). *Infant benefits of breastfeeding*. In *UpToDate*. D. S. Basow. Waltham, MA, UpToDate.
- Schmitt, E., et al. (2014). "Th9 cells, new players in adaptive immunity." *Trends Immunol* 35(2): 61-68.
- Schwartz, R. and Teramo, K.A. (2000). "Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn." *Seminars in perinatology* 24(2): 120-135.
- Siegmund, B. (2010). "Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe?" *Immunity* 32(3): 300-302.
- Smehilova, M., et al. (2008). "Comparison of intestinal microflora in healthy infants and infants with allergic colitis." *Folia Microbiol (Praha)* 53(3): 255-258.
- Soulimane-Mokhtari, N.A., et al. (2005). "Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring." *Clin Sci (Lond)* 109(3): 287-295.
- Stechova, K., et al. (2007). "High T-helper-1 cytokines but low T-helper-3 cytokines, inflammatory cytokines and chemokines in children with high risk of developing type 1 diabetes." *Diabetes Metab Res Rev* 23(6): 462-471.

- Steinman, L. (2007). "A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage." *Nat Med* 13(2): 139-145.
- Stocker, C.J. and Cawthorne, M.A. (2008). "The influence of leptin on early life programming of obesity." *Trends Biotechnol* 26(10): 545-551.
- Stritesky, G.L. and Kaplan, M.H. (2011). "Changing the STATus quo in T helper cells." *Transcription* 2(4): 179-182.
- Stuart, L.M. and Ezekowitz, R.A. (2005). "Phagocytosis: elegant complexity." *Immunity* 22(5): 539-550.
- Sykora, J., et al. (2004). "Helicobacter heilmannii gastroduodenal disease and clinical aspects in children with dyspeptic symptoms." *Acta Paediatr* 93(5): 707-709.
- Sykora, J., et al. (2009). "Epidemiology of Helicobacter pylori infection in asymptomatic children: a prospective population-based study from the Czech Republic. Application of a monoclonal-based antigen-in-stool enzyme immunoassay." *Helicobacter* 14(4): 286-297.
- Szajewska, H., et al. (2012). "Systematic review: early infant feeding and the prevention of coeliac disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 36(7): 607-618.
- Takahata, Y., et al. (2001). "Interleukin-18 in human milk." *Pediatr Res* 50(2): 268-272.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010). "Pattern Recognition Receptors and Inflammation." *Cell* 140(6): 805-820.
- Tellier, J. and Nutt, S.L. (2013). "The unique features of follicular T cell subsets." *Cell Mol Life Sci* 70(24): 4771-4784.
- Tian, J., et al. (1996). "Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes." *J Exp Med* 183(4): 1561-1567.
- Tiittanen, M., et al. (2006). "Dietary insulin as an immunogen and tolerogen." *Pediatr Allergy Immunol* 17(7): 538-543.
- Turina, M., et al. (2005). "Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects." *Crit Care Med* 33(7): 1624-1633.
- Turvey, S.E. and Broide, D.H. (2010). "Innate immunity." *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(2): S24-S32.
- Ucar, B., et al. (2000). "Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels." *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(2): 149-156.
- Umetsu, D.T. and DeKruyff, R.H. (2010). "Natural killer T cells are important in the pathogenesis of asthma: The many pathways to asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(5): 975-979.
- Uysal, F.K., et al. (2002). "Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity." *Clin Nutr* 21(2): 157-160.
- Vaitaitis, G.M. and Wagner, D.H., Jr. (2008). "High distribution of CD40 and TRAF2 in Th40 T cell rafts leads to preferential survival of this auto-aggressive population in autoimmunity." *PLoS One* 3(4): e2076.
- Van Belle, T.L., et al. (2011). "Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies." *Physiological Reviews* 91(1): 79-118.
- van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T.B. (2003). "DC-SIGN: escape mechanism for pathogens." *Nat Rev Immunol* 3(9): 697-709.
- Veerdonk, F.V.D. and Netea, M. (2013). "New insights in the immunobiology of IL 1 family members." *Frontiers in Immunology* 4.

- Veldhoen, M., et al. (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." *Nat Immunol* 9(12): 1341-1346.
- Verhasselt, V. (2010). "Neonatal tolerance under breastfeeding influence." *Curr Opin Immunol* 22(5): 623-630.
- Voormolen, D.N., et al. (2013). "The Efficacy and Effectiveness of Continuous Glucose Monitoring During Pregnancy: A Systematic Review." *Obstetrical & Gynecological Survey* 68(11): 753-763
- Warram, J.H., et al. (1991). "Risk of IDDM in children of diabetic mothers decreases with increasing maternal age at pregnancy." *Diabetes* 40(12): 1679-1684.
- Weetman, A. (2003). "Autoimmune thyroid disease: propagation and progression." *European Journal of Endocrinology* 148(1): 1-9.
- Weetman, A.P. (2004). "Autoimmune thyroid disease." *Autoimmunity* 37(4): 337-340.
- Weetman, A.P. (2004). "Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease." *Clin Endocrinol (Oxf)* 61(4): 405-413.
- West, E.E., et al. (2012). "TSLP: a key regulator of asthma pathogenesis." *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*(0).
- Weston, W.L. and Howe, W. (2013). Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of atopic dermatitis (eczema). In *UpToDate*. D. S. Basow. Waltham, MA, UpToDate.
- Weyermann, M., et al. (2006). "Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk." *Clin Chem* 52(11): 2095-2102.
- Wilke, C.M., et al. (2011). "Deciphering the role of Th17 cells in human disease." *Trends in immunology* 32(12): 603-611.
- Witebsky, E., et al. (1957). "Chronic thyroiditis and autoimmunization." *J Am Med Assoc* 164(13): 1439-1447.
- Witherden, D.A. and Havran, W.L. (2011). "Molecular aspects of epithelial gammadelta T cell regulation." *Trends Immunol* 32(6): 265-271.
- Witte, E., et al. (2010). "Interleukin-22: A cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection." *Cytokine & growth factor reviews* 21(5): 365-379.
- Xing, J., et al. (2011). "Th9: a new player in asthma pathogenesis?" *J Asthma* 48(2): 115-125.
- Ygberg, S. and Nilsson, A. (2012). "The developing immune system - from foetus to toddler." *Acta Paediatr* 101(2): 120-127.
- Yilmaz, H.L., et al. (2007). "Interleukin-10 and -12 in human milk at 3 stages of lactation: a longitudinal study." *Adv Ther* 24(3): 603-610.
- Zdanov, A. (2010). "Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family." *Cytokine Growth Factor Rev* 21(5): 325-330.
- Zhang, N. and Bevan, Michael J. (2011). "CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System." *Immunity* 35(2): 161-168.
- Zhu, J. and Paul, W.E. (2010). "Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors." *Immunological Reviews* 238(1): 247-262.