

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Jindra Norková

T regulační lymfocyty pupečnickové krve a jejich vztah ke vzniku diabetu 1. typu
Cord blood T regulatory cells and their association with development of type 1 diabetes

Diplomová práce

Školitel: Doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 29.8.2011

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Doc.MUDr. Kateřině Štechové, PhD. za odborné vedení a cenné rady, které mi udělila. Za trpělivost a vstřícnost při konzultaci diplomové práce děkuji Mgr. Janě Včelákové a MUDr. Tereze Ulmannové. Děkuji také as. MUDr. Ivaně Špálové z Oddělení rizikového těhotenství za spolupráci při odběru pupečnickových krví. V neposlední řadě mé poděkování směřuje k rodině a přátelům, kteří mě neúnavně povzbuzovali.

Tato diplomová práce byla podpořena výzkumným záměrem MZOFNM2005.

Abstrakt

Diabetes mellitus 1. typu (T1D) je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k nevratné destrukci β buněk pankreatu. Jediná možná léčba je doživotní substituce inzulínem. Konkrétní impuls pro vznik autoimunitní inzulitidy není znám. Rozvoj se předpokládá u geneticky predisponovaného jedince působením faktorů zevního prostředí. Nezbytnou úlohu při vzniku diabetu 1. typu hraje přítomnost autoreaktivních T-lymfocytů. Naopak s protekcí organismu před autoimunitním onemocněním jsou spojovány T regulační lymfocyty.

Předkládaná diplomová práce pojednává o vztahu diabetu 1. typu a T regulačních lymfocytů definovaných jako CD4+CD25+CD127-. Snaží se najít rozdíl v počtu nebo funkci této populace izolované z pupečnickové krve dětí matek s diabetem 1. typu, s gestačním diabetem a zdravých matek. Během let 2009 - 2011 jsme otestovali 68 vybraných pupečnickových kreví. Zaměřili jsme se na detekci imunokompetentních buněk v pupečnickové krvi pomocí průtokové cytometrie a také na detekci rozdílů v produkci interferonu γ (IFN- γ) mononukleárními buňkami pupečnickové krve s přidáním vyizolovanými výše specifikovanými T regulačními buňkami v různých koncentracích. Populaci T regulačních lymfocytů (CD4+CD25+) jsme získali pomocí magnetické separace.

Prostřednictvím analýzy na průtokovém cytometru jsme našli signifikantní rozdíl u pupečnickových kreví dětí matek s T1D oproti pupečnickovým krevím dětí zdravých matek. Průměrná hladina T regulačních buněk z Th lymfocytů je u skupiny T1D signifikantně nižší ($p = 0,043$).

Dále jsme testovali produkci IFN- γ mononukleárními buňkami pupečnickové krve se změněnou koncentrací T regulačních buněk měřených pomocí metod ELISA a ELISpot. Výsledné hodnoty nevykazovala žádný signifikantní rozdíl.

Klíčová slova: Diabetes mellitus 1. typu - T regulační lymfocyty - pupečnicková krev

Abstract

Type 1 Diabetes (T1D) is organ-specific autoimmune disease which causes pancreatic beta cells to be irreversibly destroyed. The only possible treatment represents life-lasting insulin administration. The real trigger of destructive insulinitis isn't known. T1D is a multifactorial disease involving both external and internal factors in the disease pathogenesis. The presence of autoreactive T lymphocytes in pancreas is necessary for development of diabetes. T regulatory cells have protective function in the destructive insulinitis.

The aim of this diploma thesis was to study cord blood T regulatory cells and their connection to type 1 diabetes development. We tried to find the difference among T regulatory cells in mononuclear cord blood cells (CBMC) in different study groups. Samples were collected from mothers suffering from T1D, gestational diabetes. Healthy controls were tested as well. Sixty-eight samples of cord blood were included in the study among the years 2009 - 2011.

Samples were divided into 3 groups (CBMC from children born to T1D mothers, mothers with gestational diabetes and healthy mothers without T1D). CBMC were analysed by flow cytometry. T regulatory cells (defined as CD4+CD25+) were isolated by magnetic separation (MACS). The functional capacity of these cells was studied as well by analysing the effect of different T regulatory cells concentrations to IFN- γ production in CBMC (this cytokine is a typical representative of Th1 cytokines which are supposed to be prodiabetogenic).

Results from flow cytometry have shown significantly decreased level of T regulatory cells from Th lymphocytes in CBMC from children born to T1D mothers in comparison to samples obtained from babies born to mothers without T1D ($p = 0,043$).

Production of IFN-gamma was tested by ELISA and ELISpot. The different concentrations of T regulatory cells were analysed but no significant difference in IFN- γ was observed when different concentrations of these cells were added to CBMC.

Keywords: Type 1 diabetes - T regulatory cells - cord blood

Seznam použitých zkratek

ADA - Americká diabetická asociace (American Diabets Association)
Ag - antigen
APC - antigen prezentující buňka (antigen presenting cell)
APC - allophycocyanin
CBMC - mononukleární buňky pupečnickové krve (cord blood mononuclear cells)
CD - diferenciační znak (cluster of differentiation)
CTLA-4 - antigen 4 cytotoxických T-lymfocytů (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)
DC - dendritická buňka (dendritic cell)
DMSO - dimethylsulfoxid
EDTA - ethylen diamin tetraoctová kyselina
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot - enzyme-linked immunospot assay
FITC - fluorescein isothiocyanate
FoxP3 - transkripční represor (forkhead box P3)
GAD - dekarboxyláza kyseliny glutamové
GD - gestační diabetes
GITR - glukokortikoidy indukovaný receptor pro tumor nekrotizující faktor
HLA - lidské leukocytární antigeny
IA2 - ostrůvkový antigen
IFN- γ - interferon γ
IL - interleukin
MACS - magnetická separace (magnetic separation)
MHC - hlavní histokompatibilní komplex
N - počet naměřených hodnot
NK - negativní kontrola
PBMC - mononukleární buňky periferní krve
PBS - fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PE - phycoerythrin
PerCP - peridinin-chlorophyl A protein
PHA - fytohemaglutinin (phytohaemagglutinin)
PI - proinzulin
SD - směrodatná odchylka
SE - standardní chyba průměru
Sig. - signifikance
T1D - diabetes mellitus 1. typu

T2D - diabetes mellitus 2.typu

Tc - cytotoxický T-lymfocyt

TCR - receptor T-lymfocytů

TGF- β - transforming grow factor β

Th - pomocný T-lymfocyt

TNF- β - tumor necrosis factor β

Treg - T regulační lymfocyt

WHO - světová zdravotnická organizace (world health organization)

ZK - zdravá kontrola

Obsah

Úvod	10
1 Imunitní systém	12
1.1 Nespecifická imunita	13
1.2 Specifická imunita	13
1.2.1 T regulační buňky	14
1.3 Fyziologická imunitní reakce	16
1.4 Patologická imunitní reakce	16
1.5 Autoimunitní onemocnění	17
2 Diabetes mellitus	18
2.1 Klasifikace a diagnostika diabetu	18
2.1.1 Diabetes mellitus 1.typu	18
2.1.2 Gestační diabetes	20
2.2 Těhotenství a diabetes	20
2.3 Komplikace diabetu	21
2.3.1 Akutní komplikace diabetu	21
2.3.2 Chronické komplikace diabetu	21
2.4 Etiopatogeneze diabetu 1.typu	22
2.4.1 Genetické faktory	22
2.4.2 Zevní faktory	23
3 Imunopatologie diabetu mellitu 1.typu	25
3.1 Role podskupin Th buněk	25
3.2 Autoreaktivní T-lymfocyty	25
3.2.1 Vztah T1D a Treg	25
3.3 Prediktivní diagnostika T1D	26
4 Cíle práce a hypotézy	28
4.1 Cíle práce	28
4.2 Hypotézy práce	28
5 Metodika	29
5.1 Materiál	29
5.2 Roztoky a chemikálie	29
5.3 Přístroje a programy	30
5.4 Charakteristika souboru	30

5.5	Použité metody	31
5.5.1	Gradientová centrifugace a stimulace	31
5.5.2	Magnetická separace	31
5.5.3	Průtoková cytometrie	32
5.5.4	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	34
5.5.5	ELISpot (enzyme-linked immunospot assay)	35
5.6	Výsledky	36
5.6.1	Statistické vyhodnocení průtokové cytometrie	38
6	Diskuze	43
	Závěr	47
	Seznam použité literatury	49
	Přílohy	55
	Seznam obrázků	57
	Seznam tabulek	58

Úvod

Diabetes mellitus 1. typu je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k nevratné destrukci β buněk pankreatu (destruktivní inzulitidě). Snižující se počet β buněk nakonec nedokáže pokrýt potřebu inzulínu a tím dochází k hromadění glukózy v krvi (hyperglykémie), což vede až k metabolickému rozvratu.

Klinický rozvoj diabetu 1. typu začíná převážně v dětském věku, adolescenci nebo mladší dospělosti. Jediná možná léčba je doživotní substituce inzulínem. Ale ani podávání inzulínu a dobrá kompenzace zcela nezabrání rozvoji chronických komplikací, které časem výrazně zhoršují kvalitu života a zkracují jeho délku. Vzhledem k tomu, že léčba diabetických pacientů je finančně velmi náročná, mohou v budoucnu významně stoupat léčebné náklady, což z diabetu činí výrazný socioekonomický problém. Dalším problémem je zvyšující se incidence diabetu. Za minulých dvacet let se incidence této choroby v dětské populaci (0-14let) v České republice zvýšila z 6,8 / 100 000 / rok 1989 až na 18,5 / 100 000 / rok 2009. Nejstrmější nárůst incidence diabetu je v nejnižších věkových kategoriích [1, 2].

Diabetes 1. typu je považován za typického zástupce tzv. multifaktoriálního onemocnění. Jeho diagnóza je poměrně jasná a to většinou brzy po začátku onemocnění. Tyto skutečnosti vedou k celosvětově velkému zájmu o výzkum diabetu, který slibuje nejen rozšíření vědeckého poznání této choroby, ale i naději pro všechny pacienty a jejich příbuzné.

Dnes dokážeme diabetes predikovat pomocí stanovení hladiny autoprotilátek proti konkrétním strukturám, čímž můžeme přispět k včasnému nasazení inzulínu, který prodlouží tzv. „honeymoon periodu“ (postiniciální remisi) a zabráni manifestaci diabetu ketoacidotickým kómatem. Avšak ani protilátky nejsou dostatečně přesný prediktivní marker. Samotná pozitivita protilátek není schopna určit, zda se jedná o inzulitidu destruktivního či nedestruktivního charakteru. Vzhledem k nestejnému průběhu prediabetu u různých pacientů a různé reaktivitě imunitního systému nedokážeme přesně určit za jak dlouho a zda se u pacienta diabetes 1. typu manifestuje.

Konkrétní impuls pro vznik autoimunitní inzulitidy není znám. Rozvoj se předpokládá u geneticky predisponovaného jedince působením faktorů zevního prostředí. Nezbytnou úlohu při vzniku diabetu 1. typu hraje přítomnost autoreaktivních T-lymfocytů. Naopak s protekcí organismu před autoimunitním onemocněním jsou spojovány T regulační lymfocyty.

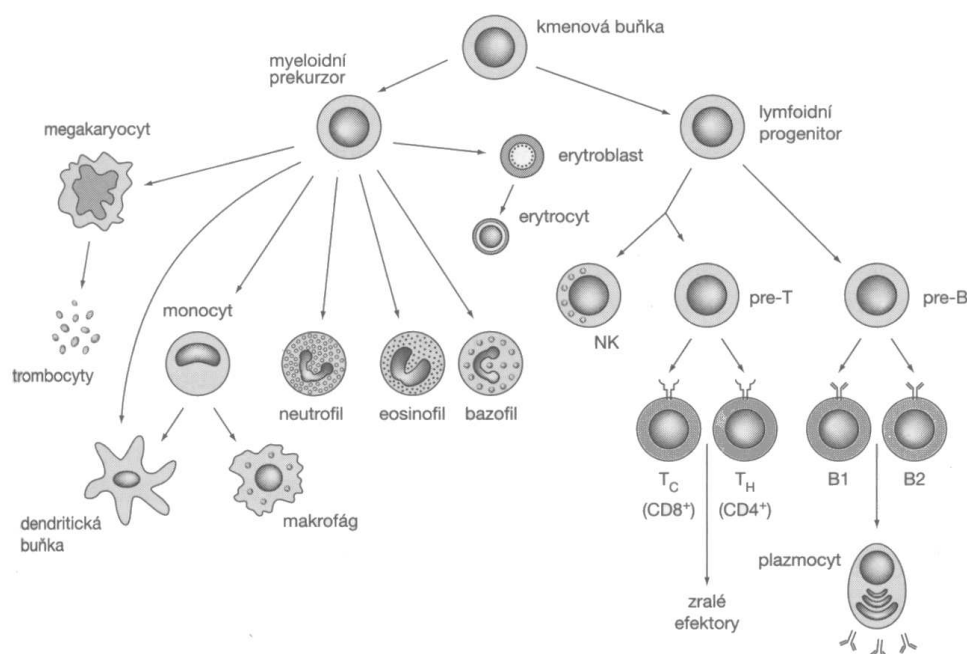
Předkládaná diplomová práce pojednává o vztahu diabetu 1. typu a T regulačních lymfocytů. Snaží se najít rozdíl v počtu nebo funkčnosti této populace izolované z pupečnickové krve matek s T1D, s gestačním diabetem a z pupečnickové krve zdravých matek. Imunitní systém novorozence byl vystaven jen malému množství exogenních faktorů v těle matky, které jsou relativně dobře charakterizovatelné (glykemický profil, onemocnění, způsob porodu). Děti matek s diabetem 1. typu mají nižší riziko (2-3 %) rozvoje T1D v bu-

doucnosti než děti diabetických otců (6-9 %) [3, 4]. Vystává zde otázka, proč je riziko pro vznik T1D u dítěte matky s diabetem nižší. Pravděpodobně jde o navození imunologické tolerance během intrauteriního vývoje.

1 Imunitní systém

Funkcí imunitního systému je udržovat homeostázu. Zajišťuje obranu těla před infekcí, ale i před vlastními změněnými buňkami. Důležitou vlastností imunitního systému je schopnost autotolerance. Pokud je reakce nedostatečná nebo neúměrná, jde o poruchu imunitního systému - alergii, imunodeficit, autoimunitu, nádorové onemocnění nebo jejich kombinaci.

Buňky imunitního systému společně s pojivovými buňkami a dalšími strukturami tvoří funkční celky: lymfatickou tkáň a lymfatické orgány. Centrální (primární) lymfatické orgány jsou kostní dřeň a thymus, kde imunokompetentní buňky vznikají, diferencují se a dozrávají. Všechny buňky pocházejí z kmenové buňky, která nese molekulární znak CD34 a dále se dělí na lymfoidní a myeloidní prekurzory (viz obr. 1).



Obrázek 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky CD34+ [5].

Mezi periferní (sekundární) lymfatické orgány řadíme slezinu, lymfatické uzliny a lymfatické tkáně sliznic = MALT, dýchacích cest = BALM, zažívacího traktu = GALT. V periferních orgánech probíhá imunitní reakce, dochází k rozpoznání a prezentaci antigenu. Z hlediska rozpoznání antigenu se imunitní systém dělí na nespecifický a specifický. Oba typy zahrnují jak část buněčnou tak část humorální, která je tvořena částmi krevního séra a sekretovanými molekulami. Všechny složky spolu úzce spolupracují, navzájem se ovlivňují a regulují prostřednictvím buněčného kontaktu nebo pomocí rozpuštěných mediátorů (např. cytokinů).

1.1 Nespecifická imunita

Jde o vývojově starší systém. Stěžejní je zde schopnost fagocytózy, která byla nalezena i u bakterií. Rozpoznání antigenu a reakce na jeho přítomnost probíhá velice rychle (v minutách) a vždy stejným způsobem (nespecifická imunita nemá imunologickou paměť). Buňky nespecifické části imunitního systému mají receptory pro molekuly, které vazbu s antigenem zprostředkují.

Mezi fagocytující buňky řadíme monocyty/makrofágy a polymorfonukleární leukocyty. Monocyty kolují v krevním oběhu a za určitých okolností se mohou diferencovat v tkáňové makrofágy. Na rozdíl od polymorfonukleárních leukocytů žijí makrofágy dlouho a fagocytózu mohou několikrát opakovat. Jejich hlavní úlohou je zpracovat a předložit antigen T-lymfocytům.

Humorální část nespecifické imunity zahrnuje proteiny akutní fáze a komplementový systém, což jsou plazmatické bílkoviny produkované především jaterními buňkami a částečně makrofágy. V séru se vyskytují v neaktivní formě. Po aktivaci se spouští kaskáda reakcí, jež je zakončena vznikem komplexu (membrane attack complex), který se naváže na membránu, vytvoří póry a dojde k rozpadu buňky. Další funkcí komplementu a jeho částí je opsonizace usnadňující fagocytózu, chemotaxe umožňující pohyb látek v závislosti na koncentračním gradientu, tvorba látek vyvolávajících degranulaci žírných buněk [5, 6, 7].

1.2 Specifická imunita

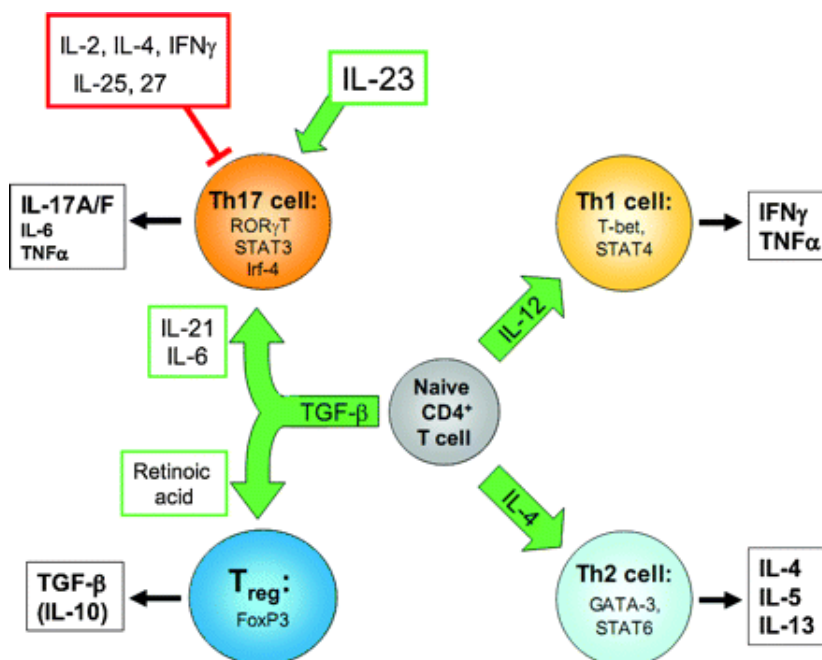
Tento typ imunity je vývojově mladší a dokonalejší než imunita nespecifická, ale složky specifické imunity reagují na přítomnost antigenu pomaleji (dny až týdny). Velkou výhodou je imunologická paměť zajišťovaná dlouhožijícími paměťovými buňkami, které při opakovaném setkání s antigenem reagují rychleji a vyvolávají účinnější imunologickou reakci. Poznáme je podle povrchového znaku CD45RO. Do systému specifické imunity řadíme lymfocyty a jejich produkty.

Skupina B lymfocytů zraje ve fetálních játrech, kostní dřeni a slezině. Typické povrchové znaky jsou molekuly CD19, CD20 a komplex BCR pro rozpoznání antigenu. Jakmile dojde k setkání s antigenem, začne se B lymfocyt dělit, až z něj vznikne klon plazmatických buněk produkujících imunoglobuliny proti antigenu, který reakci vyvolal. Imunoglobuliny tvoří humorální část specifické imunity [6, 7].

Skupina T-lymfocytů se vyvíjí v kostní dřeni, ale dozrává v thymu. Podle funkcí T-lymfocyty dělíme do dalších podskupin. Rozlišit je můžeme pomocí membránových znaků. Pro celou skupinu T-lymfocytů je charakteristický znak CD2 a CD3 sloužící jako adhezivní a signální molekula. Všem je společný ještě receptor pro antigen tzv. TCR, který váže antigen nabídnutý antigen prezentující buňkou ve spojení s molekulami HLA systému.

Subpopulace T-lymfocytů se společným znakem CD8 byla nazvaná cytotoxickou podle jejího toxického vlivu na cílové buňky. Ničí infikované nebo nádorové buňky. Rozpoznávají antigen ve spojení s molekulou HLA I. třídy. Ty jsou přítomny na povrchu všech jaderných buněk. K plné aktivaci Tc potřebují podporu cytokinů produkovaných pomocnou (Th) populací. Ač mají cytotoxické lymfocyty také regulační schopnost, na zvířecích modelech se ukázalo, že v patogenezi diabetu mají spíše podpůrnou roli při destrukci β buněk [3].

Podskupina T-lymfocytů se společným povrchovým znakem CD4 jsou pomocné T-lymfocyty (Th z anglického helper). Dokáží rozpoznat antigen spolu s molekulou HLA II. třídy. Jakmile antigen rozpoznají, diferencují se na další subtypy v závislosti na prostředí (viz obr. 2). Th lymfocyty hrají důležitou roli v autoimunitním procesu, proto se jim budu věnovat podrobněji v kapitole Imunopatologie diabetu mellitu 1.typu.



Obrázek 2: Diferenciace subpopulace CD4+ Th lymfocytů a její regulace prostřednictvím transkripčních faktorů a cytokinového prostředí [8].

1.2.1 T regulační buňky

Historie této buněčné populace začíná v 70.letech 20.století, kdy Gershon a Kondo poprvé pozorovali, že T buňky podporují imunitní odpověď, ale také jsou schopny ji tlumit [9, 10]. V roce 1972 vyšel od stejných autorů nový článek s názvem Supresorové T buňky [11]. Od této chvíle začalo intenzivní studium, ale netrvalo dlouho. Ke konci 80.let došlo ke zpochybnění významu supresorových buněk především kvůli absenci jednotného

markeru supresorových buněk [12]. Až Sakaguchi a kolegové v 90. letech identifikovali ve své práci spolehlivý charakteristický znak CD25, což je označení α řetězce receptoru pro IL-2. Prokázali jejich důležitou úlohu při porušení autotolerance a rozvoji autoimunitního onemocnění. Následně se název buněčné populace změnil v T regulační lymfocyty [13, 14]. Dalším převratným objevem byl specifický gen FoxP3, což je hlavní regulátor vývoje a funkce regulačních buněk. Odstraněním subpopulace CD4+CD25+ dochází k rozvoji těžkých autoimunit [14, 15, 16, 17]. Transkripční faktor FoxP3 stimuluje expresi CD25 a dalších povrchových molekul asociovaných s Treg: CTLA-4 (cytotoxic T cell-associated antigen-4) a GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor). Naopak produkci cytokinů IL-2, IL-4 a INF- γ snižuje [16, 25]. U lidí představují CD4+CD25+ Treg 1-4 % periferních CD4+ T buněk [18, 19, 20, 21, 23]. Existují dvě základní populace regulačních buněk: přirozené (nTreg) a indukované (iTreg).

Přirozeně se vyskytující Treg

Populace nTreg (naturally occurring) vzniká v thymu a je přirozenou součástí imunitního systému. Na svém povrchu nTreg nesou „autoreaktivní“ TCR (vysokoafinitní receptor pro komplexy MHC glykoproteinů s vlastními peptidy prezentovanými buňkami thymu), ale na rozdíl od jiných autoreaktivních klonů vlastní tkáň ne napadají. Imunosupresivní vlastnosti není nutno nijak indukovat. Mají za úkol zabezpečovat periferní toleranci a bránit vzniku autoimunitních onemocnění. Mechanismy působení na okolní buňky zahrnují produkci tlumivých cytokinů (IL-10, TGF- β) a přímý kontakt [5].

Diferenciace přirozeně se vyskytujících Treg je závislá na transkripčním faktoru FoxP3, na transmembránovém proteinu LAT (linker for activation of T cells), na síle kostimulačního signálu a na cytokinovém prostředí [24, 25]. Do místa svého působení, tedy periferní tkáň, putují jako funkční zralé buňky. Jejich počet v periférii je relativně stálý a nezávislý na přítomnosti antigenu.

Indukované Treg

Indukované regulační T-lymfocyty vznikají po setkání s antigenem v periferních tkáňích z naivních CD4+CD25- T-lymfocytů působením mnoha faktorů. Přítomnost cytokinu TGF- β indukuje expresi genu FoxP3, který následně změní fenotyp buňky. Zheng a kolegové poukázali na fakt, že samotná přítomnost TGF- β nestačí, protože u CTLA-4 deficientních myši (-/-) ke vzniku indukovaných Treg nedošlo [26]. Důležitou roli CTLA-4 podporuje i Takeshi a kolegové [27].

1.3 Fyziologická imunitní reakce

Průběh imunitní reakce se liší v závislosti na tom, zda se už tělo s antigenem setkalo či nikoliv. V případě sekundární odpovědi je imunitní reakce rychlejší a účinnější. Od počátku je reakce regulována, aby nedošlo k neúměrnému poškození.

Imunitní reakce začíná pohlcením antigenu buňkou prezentující antigen. Dojde ke zpracování a vystavení částí antigenu (Ag) na povrchu buňky pomocí molekul HLA II.třídy. Tím se aktivuje příslušný T a následně i B lymfocyt. Buď dojde k produkci protilátek a vývoj lymfocytů směřuje k vývojové větvi Th2 nebo se aktivují makrofágy a cytotoxické lymfocyty, čímž se rozvíjí subtyp Th1 [5, 6, 7].

1.4 Patologická imunitní reakce

Někdy je imunitní reakce nadměrná nebo neúčinná a vyvolá poškození organismu. V tomto případě mluvíme o imunopatologické reakci. Příčinou je povaha antigenu nebo naopak porucha imunitního systému. Podle převládajícího efektorového mechanismu patologické projevy dělíme na humorální a buněčně zprostředkované. Klasická klasifikace zavedená Coombsem a Gelem dělí imunopatologie do čtyř základních typů, které však dnes nepostihují všechny známé mechanismy.

Typ reakce	Imunitní mechanismus	Fyziologická reakce	Patologická reakce	Příklad onemocnění
I	Vazba IgE na žírné buňky a jejich aktivace antigenem (alergenem)	Vypuzení střevních parazitů	alergický zánět, anafylaktický šok	Alergická rýma, kopřivka, alergické astma, anafylaktický šok
II a)	Vazba protilátek a aktivace komplementu	Oponizace, popř. lýza mikroorganismu	Osponizace a destrukce vlastních buněk	Autoimunitní hemolytická anémie, trombocytopenie, neutropenie
II b)	Vazba protilátek	Neutralizace toxinů, blokování adheze virů	Neutralizace sérových proteinů, blokování nebo stimulace buněčných receptorů	Hemofilie s Ab proti faktoru VIII, myasthenia gravis, thyreotoxikóza

Typ reakce	Imunitní mechanismus	Fyziologická reakce	Patologická reakce	Příklad onemocnění
III	Tvorba imunokomplexů	Eliminace antigenů, stimulace akutního zánětu	Usazování imunokomplexů ve tkáních	Některé vaskulitidy, glomerulonefritidy, sérová nemoc
IV a)	Aktivace Th1 a makrofágů	Obrana proti intracelulárním bakteriím	Destrukce vlastních tkání neúměrná infekci, autoimunitní choroby	Rozpadová TBC, sarkoidóza, roztroušená skleróza
IV b)	Aktivace cytotoxických lymfocytů CD8+	Destrukce buněk infikovaných viry	Destrukce vlastních neinfikovaných buněk nebo buněk infikovaných relativně neškodnými viry	Kontaktní dermatitida, autoimunitní hepatitidy

Tabulka 1: Paralela imunopatologické a fyziologické reakce u jednotlivých typů reakcí [7].

1.5 Autoimunitní onemocnění

Autoimunitní reakce je fyziologická, pokud rozpoznává a odstraňuje buňky poškozené, staré či jinak pozměněné. Jakmile reakce vede k poškození tkání, mluvíme o autoimunitním onemocněním.

Symptomy jsou různorodé, odvíjí se od postiženého orgánu, mechanismu poškození, věku pacienta nebo od přidružených chorob. Hlavním rysem je zánět, proto se v současné době můžeme setkat s označením IMID (immune mediated inflammatory disease). Podmínkou vzniku autoimunitního onemocnění je prolomení autotolerance působením vnějších či vnitřních faktorů a změna fyziologické autoimunitní reakce v patologickou. Tolerance imunitního systému k vlastním tkáním je řízena na dvou úrovních, centrální a periferní.

Autoimunitní choroby dělíme na systémové a orgánově specifické. Na rozhraní leží orgánově lokalizované autoimunity, kdy je postižen jeden orgán, ale u nemocného najdeme řadu systémových příznaků. U systémového autoimunitního onemocnění jsou prokazatelné nespecifické autoprotilátky, které nejsou zaměřené proti konkrétnímu orgánu. Při orgánově specifickém autoimunitním onemocnění dochází k autoreaktivitě vůči antigenům exprimovaným na určitém typu orgánu nebo tkáni.

Diabetes mellitus patří mezi orgánově specifické autoimunity, kde jsou cílem autoprotilátek pouze antigeny slinivky břišní. Nejčastěji jsou detekovány protilátky proti antigenům β buněk pankreatu, konkrétně proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (GAD65), tyrosinofosfatáze (IA2) či inzulinu [7, 28].

2 Diabetes mellitus

Definice WHO popisuje diabetes jako stav charakterizovaný chronickým zvýšením glykémie (zvýšenou hladinou krevního cukru), který může být doprovázen klinickými syndromy: žízeň, polyurie, snížená chuť k jídlu a pokles hmotnosti, bolesti břicha, objevit se mohou poruchy vědomí či poruchy vidění. Dále WHO uvádí, že diabetem trpí na světě více než 220 milionů lidí a roku 2004 zemřelo následkem zvýšené glykémie přibližně 3,4 milionů lidí [29].

2.1 Klasifikace a diagnostika diabetu

Rozdělení diabetu se s přibývajícími znalostmi mění. Jednoznačně určená je kategorie diabetu, ale vedle ní můžeme ještě rozlišit další poruchy glukózové homeostázy. Dnes se používají diagnostická kritéria, která stanovila ADA a byla potvrzena WHO, jak je uvedeno v tabulce 2, 3. Uznávané hodnoty se ještě stále mění a náhled jednotlivých organizací není zcela jednotný.

I. Diabetes mellitus 1.typu (absolutní nedostatek inzulínu)
- autoimunitní: protilátky proti ostrůvkovým antigenům jsou pozitivní - idiopatický: protilátky proti ostrůvkovým antigenům jsou negativní
II. Diabetes mellitus 2.typu (relativní nedostatek inzulínu)
III. Ostatní specifické formy diabetu
- genetické defekty postihující vlastní působení inzulínu (receptory, iontové kanály, signalizační dráhy, tvorba a uvolnění inzulínu) - primární choroby exokrinní části pankreatu (nádory, fibrotizace) - endokrinopatie (nádory, paraneoplázie) - lékově podmíněný diabetes - infekčně podmíněný diabetes - vzácné formy imunologicky podmíněného diabetu (např. Ab proti inzulínovému receptoru) - genetické syndromy (Downův, Turnerův, Wolframův aj.)
IV. Gestační diabetes (relativní nedostatek inzulínu)

Tabulka 2: Klasifikace diabetu podle ADA [30].

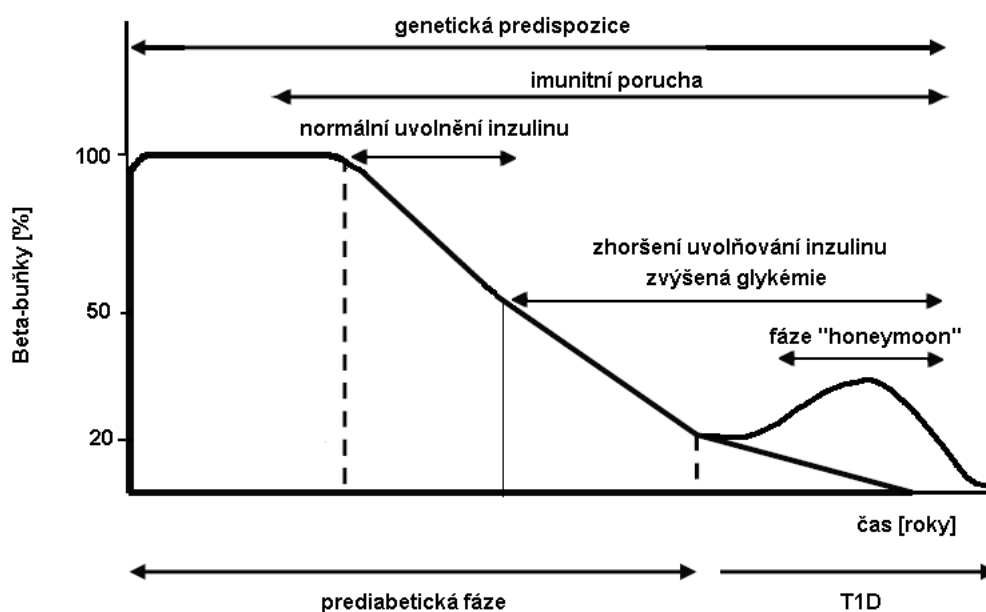
2.1.1 Diabetes mellitus 1.typu

Nedostatek inzulínu je způsoben zničením β buněk pankreatu, což je výsledek autoimunitního děje zprostředkovaného T-lymfocyty. Porušenou tvorbu inzulínu zatím nedokážeme obnovit, proto je jedinou léčbou celoživotní užívání inzulínu. Z tohoto důvodu se T1D někdy označuje jako inzulín-dependentní [28, 29, 31, 32].

Diagnostická kritéria diabetu	
1) glykémie 11,1 mmol/l - kdykoliv během dne bez ohledu na lačnění	NEBO
2) lačná glykémie 7,0 mmol/l - tzn. po 8 hodinách lačnění	NEBO
3) glykémie ve 120. minutě oGTT 11,1 mmol/l - při standardním testu	

Tabulka 3: Diagnóza diabetu 1.typu [30].

Celý proces rozvoje diabetu probíhá v několika fázích (viz obr. 3). Věk manifestace je určen rychlostí destrukce β buněk. První fáze je zcela asymptomatická. Dále nastává snížení počtu β buněk, ale produkovaný inzulin stačí udržet glykémii v normálních mezích. Jakmile počet β buněk klesne na 10-20 % normálního stavu, sekrece inzulinu už je nedostatečná, glykémie stoupá a objevují se první symptomy diabetu. Zpočátku je ještě přítomná reziduální sekrece inzulinu prokazatelná vyšetřením C-peptidu (spojující bílkovina, která se odštěpí z proinzulinu za vzniku inzulinu). Na začátku terapie může mít inzulin i pro-
tektivní účinek na zbylou populaci β buněk. Může se stát, že potřeba exogenního inzulinu přechodně klesne na minimum. V tomto případě hovoříme o remisi diabetu, tzv. honeymoon periodě. Nakonec ale začne potřeba inzulinu stoupat a nelze zabránit destrukci zbývajících β buněk [3, 33].



Obrázek 3: Vývoj poruchy β buněk pankreatu [33].

Incidence diabetu stále narůstá. Mezi lety 1990-1997 byla v České republice u dětí

ve věku 0-14 let 10,1/100 000, v roce 2001 to bylo už 11,4/100 000. Alarmující na těchto statistikách je především meziroční nárůst 4,3 % u všech dětí a dokonce 6,9 % u dětí do 4 let [1, 2]. Nejčerstvější údaj je incidence T1D 18,5 / 100 000 / rok 2009. Pozitivní je, že během posledních 5 let podle výzkumné skupiny O.Cinka incidence v ČR stagnuje, přičemž v nejmladší věkové kategorii 0-4 roky dokonce klesá [34].

Tisková zpráva z roku 2008 vydaná ke světovému dni diabetu udává, že výskyt diabetu 1.typu u dětí a dospívajících každým rokem vzroste o 3 % a u dětí v předškolním věku dokonce o 5 %. Každoročně onemocní přibližně 70 000 dětí ve věku do 15 let (tedy téměř 200 dětí denně). Podle odhadů WHO dnes na celém světě žije kolem 440 000 dětí s diabetem 1.typu [29].

Některé studie uvádějí, že v zemích s vyšší životní úrovní je výskyt diabetu 1.typu častější. Např. v Pákistánu je incidence pouze 0,7/100 000 obyvatel, zatímco ve Finsku byl výskyt nově vzniklých onemocnění 50/100 000/rok 2007 [35, 36]. Rozdíly v incidenci jsou pravděpodobně způsobeny genetickými rozdíly a rozdíly v expozici vnějším vlivům.

2.1.2 Gestační diabetes

Gestační diabetes mellitus (GD) je abnormální glukózová tolerance, která se poprvé u ženy objeví až během těhotenství, nejčastěji mezi 24. a 28. týdnem. Objevuje se přibližně u 3-8 % všech těhotných žen. Gestační diabetes je způsoben hormonálními změnami v těhotenství a zvýšenou inzulinovou rezistencí. Ženy s gestačním diabetem nemusí mít žádné příznaky, proto je během těhotenství každá žena na diabetes vyšetřena. Léčba probíhá dietou, jen v některých případech je nutné doplnit podáváním inzulinu.

2.2 Těhotenství a diabetes

Bezproblémový průběh těhotenství závisí na schopnosti tolerance těla matky k plodu, tedy na změně imunitní odpovědi. Součástí zárodečných buněk jsou totiž otcovské aloantigeny, které by se mohly stát terčem pro cytotoxickou Th1 buněčnou odpověď matky. Proto je imunitní rovnováha během těhotenství lehce vychýlena na stranu Th2 buněčné odpovědi [37, 38]. Kumru a kolektiv ve své práci udává zvýšený počet CD8+ lymfocytů, NK buněk a vyšší hladiny IL-10 a TFG- β oproti hladinám buněk a cytokinů u zdravých netěhotných žen [39].

Zajímavé je, že už v roce 1984 Warram a kolektiv došel ke zjištění, že u dětí diabetických matek je riziko vzniku diabetu téměř třikrát nižší než u dětí diabetických otců [4].

2.3 Komplikace diabetu

2.3.1 Akutní komplikace diabetu

Glukoregulační mechanismy mají za úkol udržovat koncentraci glukózy v rozpětí 3,3 - 5,6 mmol/l. Snížená hladina glukózy je nebezpečná především pro mozkovou tkáň, která je na glukóze závislá. Nejčastější závažné stavy, se kterými se u pacienta s diabetem 1. typu setkáme, jsou hypoglykémie a ketoacidóza s pojená s hyperglykemií..

Hypoglykémie

U všech pacientů léčených inzulinem se někdy hypoglykémie vyskytne. Jde o stav, kdy koncentrace glukózy klesne pod hraniční hodnotu 3,3 mmol/l. Pacienti udávají zvýšený pocit únavy, bolest hlavy, rozostřené vidění, křeče. To je první skupina příznaků způsobená poruchou oxidačního metabolismu. Druhá skupina příznaků vzniká působením adrenalinu: třes, pocení, tachykardie, hlad, nervozita.

Diabetická ketoacidóza

Nedostatek inzulinu může vést k hyperglykémii a vyústit až v ketoacidotické kóma. Jde o stav dekompenzovaného diabetu, kdy dochází k metabolickému rozvratu a poruchám vědomí pacienta. Při nedostatku inzulinu se uvolňují mastné kyseliny z tukové tkáně do krevního oběhu a jsou transportovány do jater, kde dojde k jejich oxidaci. Finální produkt oxidace není zpracován a dochází k hromadění ketoláték. Neléčená hyperglykémie spojená s ketoacidózou je smrtelná a před objevem inzulinu všichni pacienti s diabetem 1. typu umírali dříve či později v metabolickém rozvratu.

2.3.2 Chronické komplikace diabetu

Následkem dlouhodobé expozice tkání hyperglykémii dochází k postižení buněk i mezibuněčné hmoty, což zhoršuje funkci tkání i orgánů a vede až k jejich selhání. Rozvoj komplikací mohou urychlit genetická dispozice nebo hypertenze, která je u diabetiků častá. Ohroženo je celé krevní řečiště. Pokud jde o postižení kapilár a přilehlých úseků cévního řečiště označujeme tento jev souhrnně diabetická mikroangiopatie, kam řadíme diabetickou retinopatii, nefropatii a neuropatii. Změny větších cév mají charakter aterosklerózy, kterou označujeme jako diabetická makroangiopatie.

Diabetická retinopatie

Diabetická retinopatie je významnou příčinou slepoty. Postupně dochází k poškození drobných cév v sítnici. Po 15 letech života s diabetem přibližně 2 % lidí oslepnou a u 10 % se

rozvine těžké zrakové postižení. Populační studie udávají prevalenci diabetické retinopatie u T1D 15-79 %. Epidemiologické šetření provedené Českou diabetickou společností v ČR v roce 2002 ukázalo prevalenci retinopatie asi 44 % u T1D a 17 % u T2D [3].

Diabetická nefropatie

Diabetickou nefropatií trpí asi 4-8 % nemocných navštěvujících diabetologické ordinace. V současné době je hlavní příčinou terminálního selhání ledvin ve většině zemí západní Evropy [3].

Diabetická neuropatie

Postižení nervového systému patří k nejčastějším komplikacím diabetu. Je nezánnělivé, heterogenní a postihuje různé části nervového systému. Příznaky jsou mravenčení, bolest, znečitlivění nebo slabost v nohou a rukou. U T1D je udávaná prevalence 13-54 %. V ČR byla zjištěna prevalence periferní neuropatie dokonce 57 % [3].

Diabetická makroangiopatie

Postižení koronárních arterií podmiňuje rozvoj ischemické choroby srdeční, změny na cerebrálních tepnách zvyšují riziko cévní mozkové příhody a poruchy tepen na dolní končetině vedou k rozvoji ischemické choroby dolních končetin. V ČR byla celková prevalence ischemické choroby srdeční v roce 2002 u T1D 28 %, u mozkových cévních příhod je odhadována na 8,7 %. Prevalence amputací dolní končetiny se odhaduje na 2,1 % [3].

2.4 Etiopatogeneze diabetu 1.typu

Konkrétní spouštěcí mechanismus není u diabetu znám. Jedná o tzv. multifaktoriální polygenní onemocnění. Je prokázáno určité genetické pozadí u predisponovaného jedince, kdy pomocí HLA II.třídy můžeme vytipovat jedince s vyšším rizikem pro vznik T1D. Dnes víme, že za vznik autoimunitní reakce proti β buňkám pankreatu jsou genetické faktory zodpovědné asi jen z 50 % a zbývající procenta tvoří faktory vnějšího prostředí.

2.4.1 Genetické faktory

Existenci určitých predispozic k T1D dokazují především vědecké práce zabývající se jednovaječnými dvojčaty, z nichž jedno diabetem trpí. Uvádějí přibližně 40 % pravděpodobnost výskytu diabetu u druhého sourozence z jednovaječných dvojčat, zatímco pro sourozence z dizygotních dvojčat je pravděpodobnost kolem 5 % [40, 41, 42]. Konkrétně

Redondo a kolektiv ve své práci dokazuje zvýšené riziko rozvoje diabetu zjištěnými autoprotilátkami, které byly detekovány u 22 z 53 jednovaječných dvojčat oproti 6 ze 30 dvojevaječných sourozenců [43].

Nejsilněji asociovanou oblastí s imunitním systémem je oblast hlavního histokompatibilního komplexu HLA II.třídy na krátkém raménku šestého chromozomu (6p21). Geny na uvedeném chromozomu zahrnují až 60 % genetické vnímavosti pro onemocnění [34, 44]. Jsou zde kódovány proteiny se zcela zásadní funkcí pro zpracování a následnou prezentaci antigenu. Pravděpodobnou poruchou je neschopnost rizikových molekul prezentovat autoantigeny v průběhu vyžívání T-lymfocytů v thymu, což vede ke vzniku větší populace autoreaktivních klonů. Druhým možným mechanismem je prezentace antigenu β buněk autoreaktivním T-lymfocytům na periférii [3].

S diabetem 1.typu jsou spojovány především lokusy HLA-DQA1, HLA-DQB1 a HLA-DR. Dnešní obecně platný názor je, že riziko T1D je primárně určováno genotypem HLA-DQB1, -DQA1 s přispěním subtypů DRB1*04 [34]. V rámci genotypizace byly objeveny i tzv. protektivní alely, jejichž nositel má výrazně snížené riziko onemocnění [35, 34]. Např. Cinek a kolektiv uvádí ve své práci nejvyšší genetické riziko u kombinace haplotypů DQA1*03-DQB1*0201/DQB1*0302, při současném chybění protektivního haplotypu DRB1*0403 [45]. Lambert a kolegové uvádějí jako nejrizikovější genotyp v Anglii následující kombinaci: DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201/DRB1*0401-DQA1*0301-DQB1*0302 [46]. Haplotypy určující riziko diabetu 1.typu nebo naopak haplotypy protektivní se liší napříč populacemi a kontinenty. Změny mohou dokonce vznikat i časem [34, 36].

2.4.2 Zevní faktory

Samotná genetická predispozice neznamená nutně rozvoj autoimunitního onemocnění. Diabetes 1.typu se rozvine jen u méně než 10 % vnímavých jedinců [40]. Vliv vnějších faktorů shrnuje „hygienická hypotéza“. Tato hypotéza říká, že rozvoj diabetu souvisí s vyšší životní úrovní a tím i s vyšším hygienickým standardem, čímž se sníží možnost antigenní stimulace v raném dětství. Hlavní vnější faktory asociované s rizikem vzniku autoimunitní inzulitidy vedoucí k diabetu 1.typu jsou infekce, nutriční faktory, průběh perinatálního období a raného dětství [34, 47].

Mezi prokazatelné infekční vlivy patří viry, které dokážou měnit antigenní struktury buněk. Odkrývají tzv. kryptogenní antigeny a vyvolávají autoimunitní reakci proti buňkám těla vlastním. Nejčastější je u prediabetických a diabetických jedinců nález viru coxsackie subtypu B [48, 49, 50].

Jedním z nutričních faktorů je výživa kojence kravským mlékem nebo kojením. Ochranný vliv kojení ve své práci prokázal Cinek a kolegové [36]. Další studie se snažili spojit vyšší incidenci v severských zemích se sníženým množstvím vitamínu D, který k syn-

téze potřebuje sluneční záření. Jenže více než 95 % rodičů v severských zemích svým dětem vitamin D dodává v tabletách [40, 51, 52].

Většina studií se shoduje na tom, že vyšší věk matky přináší i vyšší riziko rozvoje T1D. Dalšími snadno zjistitelnými a hodnotitelnými parametry jsou porodní délka a hmotnost nebo způsob porodu. V porovnávání rizika plynoucího z uvedených faktorů se výsledky studií liší. Většinou jde jen o mírně změněné riziko [34, 47].

3 Imunopatologie diabetu mellitu 1. typu

K rozvoji autoimunitního zánětu dochází v případě, že v periférii jsou autoreaktivní T-lymfocyty rozeznávající antigeny β buněk pankreatu a není zastavena jejich klonální expanze. Periferní imunologická tolerance je zajišťována klonální delecí (autoreaktivní klony hynou apoptózou), klonální anergií (funkční útlum autoreaktivních klonů) [53], klonální ignorancí (lymfocyty nejsou schopny rozpoznat autoantigen) [54] a aktivní supresí (autoreaktivní klony jsou potlačeny pomocí jiných imunokompetentních buněk a jejich produktů).

3.1 Role podskupin Th buněk

O charakteru inzulitidy probíhající proti β buňkám pankreatu rozhoduje převaha subpopulace Th1 nebo Th2. Inzulitida je destruktivní či nedestruktivní. Na zvířecích modelech se ukázalo, že destruktivní inzulitidu vyvolává převaha Th1 subpopulace a cytokiny IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- β . K destrukci β buněk dochází přímo indukci apoptózy a nepřímo stimulací buněčné imunity. Naopak při nedestruktivní inzulitidě převažují Th2 a Th3 lymfocyty a cytokiny IL-4, IL-10 a TGF- β , které uplatňují regulační mechanismy [3].

3.2 Autoreaktivní T-lymfocyty

Na rozvoji autoimunity se podílejí autoreaktivní T-lymfocyty, které unikly negativní selekci v thymu a prolomily mechanismy periferní tolerance [20, 21, 22, 56]. Rozeznávají prezentovaný pankreatický autoantigen prostřednictvím HLA molekuly. Jde především o subtyp CD4+ (Th), který po aktivaci začne produkovat Th1 spektrum cytokinů, tzn. především IFN- γ a IL-2. Cytokinové spektrum podporuje buněčnou imunitní odpověď - do Langerhansových ostrůvků se kromě Th1 lymfocytů infiltrují i NKT buňky a CD8+ T-lymfocyty, které destruuji β buňky na úrovni buněčného kontaktu. Do místa zánětu jsou přitahovány i makrofágy a sekundárně se spouští tvorba protilátek proti β buňkám [31, 33, 57, 58].

3.2.1 Vztah T1D a Treg

Diabetes 1. typu vzniká jako důsledek narušené tolerance k antigenům pankreatických ostrůvků. V periférii se nacházejí autoreaktivní klony T-lymfocytů, které rozpoznávají antigeny β buněk. Dojde tak k vyvolání patologické imunitní reakci a k produkci cytokinů typických pro Th1 buňky (především IFN- γ), které iniciují autoimunitní proces. Pro další rozvoj onemocnění je nutná přítomnost autoreaktivních CD8+ cytotoxických T-lymfocytů [59, 60].

Předpoklad defektní regulace imunitní odpovědi CD4+CD25+ T regulačními buňkami u pacientů s T1D se plně nepotvrzuje. Snížené schopnosti suprese a regulace sekrece prozánětlivého cytokinu IFN- γ T regulačními buňkami oproti kontrolám prokázali Lindley

s kolegy a skupina Z.Vrábelové [59, 61]. Vědecká skupina Amy Putnamové signifikantní rozdíly mezi supresivními schopnostmi CD4+CD25+ T regulačních buněk nepozorovala [62]. Výsledky studií nehovoří shodně. Rozdíly mohou být dány použitím odlišných stimulačních podmínek a také například vlivem rozdílného věku a rozdílnou délkou trvání diabetu u sledovaných osob.

Kromě vzorků periferní krve od pacientů s T1D se často využívají zvířecí modely, tzv. NOD myši (non-obese diabetes mouse). V pankreatu myši se brzy objeví infiltráty leukocytů, ale až za 10-30 týdnů dojde k rozvoji destruktivní inzulitidy a ke vzniku diabetu. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že supresorové schopnosti regulačních buněk klesají s progresí autoimunity proti β buňkám pankreatu [63].

3.3 Prediktivní diagnostika T1D

Vyšetření obecné populace se zatím v klinické praxi neprovádí, protože stanovení autoprotilátek nemá dostatečnou prediktivní hodnotu a je finančně náročné. Rizikového pacienta na první pohled nepoznáme, takže se do naší laboratoře dostávají pouze vzorky příbuzných pacientů, u kterých se diabetes rozvinul. Laboratoř autoimunitních onemocnění se podílí na programu Predikce diabetu, který si dal za úkol odhalit včas rozvoj diabetu a zabránit tak tomu, aby bylo dítě při záchytu T1D v těžkém klinickém stavu. Při včasném záchytu se lékaři snáze daří navodit a udržet remisi, kdy stačí nižší dávka inzulinu. Do budoucna si program dal za úkol vytipovat jedince ohrožené diabetem a pomocí imunosuprese oddálit manifestaci [64]. Ale jak víme, každý imunitní systém reaguje jinak rychle a citlivě a zatím se žádná imunointervenční studie neukázala jako vhodná pro klinické použití.

Protilátka	Prevalence [%]	
	Děti	Dospělí
GADA	70-80	70-80
IA2-Ab	60-70	30-50
IAA	50-70	20-30
ICA	80-90	70-80
GADA nebo IA2-Ab nebo IAA	95-100	70-80

Tabulka 4: Výskyt autoprotilátek při manifestaci T1D [30].

V rámci programu Predikce diabetu je určeno genetické riziko a přítomnost protilátek. Biochemické vyšetření zahrnuje stanovení sekundárních autoprotilátek (nepodílejí se na destrukci β buněk) proti inzulinu (IAA), dekarboxyláze kyseliny glutamové (GAD65) a tyrosinofosfatáze (IA-2) [55, 65]. Wenzlau a kolektiv ještě na seznam autoprotilátek s prediktivním charakterem přidávají autoprotilátky proti zinkovému transportéru (ZnTA), které jsou pozitivní u 60-80 % čerstvě manifestovaných pacientů s T1D [66].

Dalšími, méně často vyšetřovanými protilátkami, jsou protilátky proti ostrůvkovým antigenům pankreatu (ICA). Stanovují se nepřímou imunofluorescencí na kryosekcích lidské slinivky, takže výsledky jsou velmi ovlivněné subjektivním názorem hodnotitele a těžko se standardizují [30].

4 Cíle práce a hypotézy

4.1 Cíle práce

- Zmapovat zastoupení populace T regulačních buněk, které jsou definovány jako CD4+CD25+CD127-, v pupečnickové krvi dětí zdravých matek, matek s gestačním diabetem a matek s diabetem 1. typu.
- Prokázat rozdílné schopnosti T regulačních buněk pupečnickové krve tlumit produkci IFN- γ u zdravých a diabetických matek.
- Studium možností navození imunologické tolerance pro zlepšení budoucích možností imunointervence.

4.2 Hypotézy práce

- Populace T regulačních buněk je zvýšená v pupečnickové krvi dětí matek s diabetem 1. typu.
- T regulační buňky v pupečnickové krvi dětí matek s T1D diabetem jsou schopné tlumit produkci IFN- γ intenzivněji.

5 Metodika

5.1 Materiál

- pupečnicková krev odebraná do 2-3 zkumavek s heparinem lithným (zelená zkumavka Vacuette, objem 9ml)

5.2 Roztoky a chemikálie

- Izolace CBMC:
 - Earle's Balanced Salts solution (EBSS) (Sigma, USA)
 - Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma, USA)
 - Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare, USA)
 - RPMI (Invitrogen, Gibco, USA)
- Směs antibiotik: L-glutamin ($10\mu\text{l/ml}$ 200mM), penicilin-streptomycin ($1\mu\text{l/ml}$ PNC a $1\mu\text{g/l}$ streptomycin) (Sigma, USA)
- Směs diabetogenních autoantigenů (viz tab.4) (ProImunne, Oxford, UK)
- protilátky na průtokovou cytometrii (ředění podle pokynů výrobce):
 - Human CD3 FITC (Miltenyi Biotec, Německo)
 - Conjugated CD4 Alexa Fluor 700 (EXBIO Praha a.s., ČR)
 - Human CD25 PE (Miltenyi Biotec, Německo)
 - Human CD45 PerCp (Miltenyi Biotec, Německo)
 - Mouse monoclonal CD45RA FITC (EXBIO Praha a.s., ČR)
 - Mouse monoclonal CD45RO APC (EXBIO Praha a.s., ČR)
 - Monoclonal CD71 PE (IMMUNOTECH a.s., ČR)
 - Human CD127 APC (Miltenyi Biotec, Německo)
- Human IFN- γ Instant ELISA (Bender MedSystems, Rakousko)
- Human IFN- γ ELISpot PLUS kit (Mabtech AB, Nacka Strand, Švédsko)

5.3 Pístroje a programy

- centrifuga - Hettich Universal 32R (GMI, USA)
- mikroskop - Olympus CX31 (Olympus, ČR)
- automatické pipety - DISCOVERY comfort (PZ HTL S.A, Polsko)
- průtokový cytometr - LSR II (BD Bioscience, USA)
- magnetický separátor - VarioMACS (Miltenyi Biotec, Německo)
- BD FACSDiva Software 6.0 (BD Bioscience, USA)
- Summit v 4.3. (Dako, Dánsko)
- SPSS 14.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)

5.4 Charakteristika souboru

V této práci byly použity vzorky pupečnickové krve z porodního oddělení 2.LF UK a FN v Motole. Během let 2009 až 2011 bylo shromážděno 68 vzorků. Konkrétně bylo odebráno 12 pupečnickových krvinek od dětí matek s diabetem 1.typu, 42 pupečnickových krvinek od dětí zdravých matek a 14 od dětí matek s gestačním diabetem. Pupečnickové krve byly zařazovány postupně, bez výběru. Zařazovány nebyly vzorky matek, které porodily před 38. týdnem nebo pokud matka trpěla další poruchou imunitního systému. Každá rodička dostala písemné informace o studii a podepsala informovaný souhlas schválený místně příslušnou Etickou komisí.

Ze všech vzorků byly vyizolovány mononukleární buňky a ty byly následně proměřeny na průtokovém cytometru. ELISA byla použita u 6 vzorků a ELISpot u 7 vzorků. Dále byla u 47 vzorků proměřena přítomnost CD71+ buněk (nezralých prekurzorů erytrocytů a aktivovaných lymfocytů) a zaznamenána naivita/zralost lymfocytů.

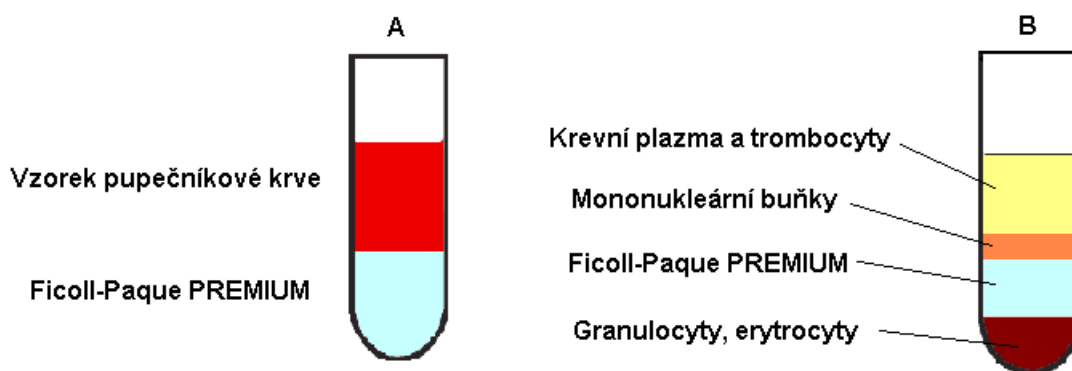
		Zdravé děti	Děti matek s GD	Děti matek s T1D
Počet pupečnickových krvinek (N)		42	14	12
Věk matek (průměr ± sd)		31,24 ± 3,19	34,5 ± 1,79	29,14 ± 1,84
Porod	Vaginální	33	11	8
	Císařský řez	9	3	4

Tabulka 5: Parametry vzorků zahrnutých do studie.

5.5 Použité metody

5.5.1 Gradientová centrifugace a stimulace

Tato metoda slouží k izolaci krevních částic z plné krve. K oddělení buněk využívá rozdílnou hustotu jednotlivých elementů. Krev se odebírá do zkumavky potažené heparinem. Navrství se na Ficoll a následně se celá zkumavka zcentrifuguje 30 minut při 400g. Na povrchu Ficollu se objeví prstenec mononukleárních buněk s nižší hustotou, zatímco granulocyty a erytrocyty se propadají přes vrstvu Ficollu na dno zkumavky (viz obr. 4). Trombocyty tvoří viditelnou vrstvu, ale zůstávají v séru, čímž mohou kontaminovat vrchní vrstvu mononukleárních buněk. Pro jejich odstranění se používá promytí a následná centrifugace [6, 67].



Obrázek 4: Schéma rozdělení pupečnickové krve před (A) a po centrifugaci (B) [67].

Ve všech experimentech jsme používali mononukleární buňky pupečnickové krve (CBMC). Problém při dalším zpracování dělaly jaderné prekurzory erytrocytů, které kontaminovaly mononukleární buňky pupečnickové krve a mohly zkreslit výsledky dalších měření.

K čerstvě izolovaným CBMC v kultivačním médiu s inaktivovaným fetálním bovinním sérem (FBS) jsme přidali antibiotika (ATB) a případně směs diabetogenních antigenů. Konkrétní složení aminokyselinových sekvencí je uvedeno v tabulce 6. U pozitivních kontrol jsme místo diabetogenních antigenů Ag přidávali fytohemaglutinin (PHA) a negativní kontroly tvořily jen CBMC s ATB v kultivačním médiu.

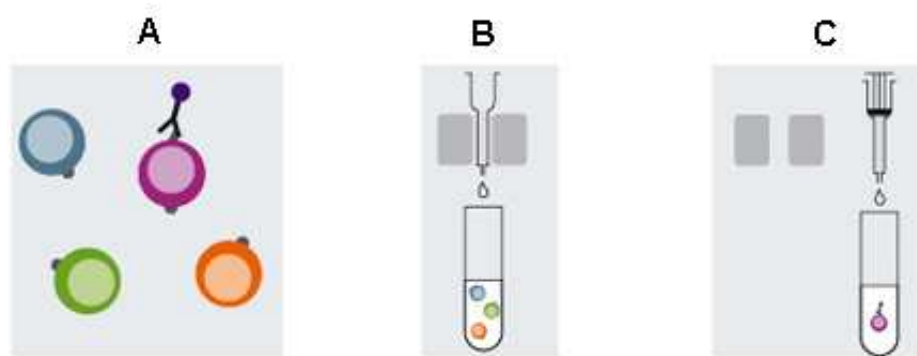
5.5.2 Magnetická separace

Metoda magnetické separace (MACS) k izolaci buněk využívá silné magnetické pole a protilátky s navázanými magnetickými částicemi, které mají průměr pouze 50nm. Výrobce mezi výhody řadí jednoduché zacházení, vysokou čistotu separované populace, možnost kombinace s dalšími metodami a také široké využití - ve vědecké i v klinické laboratoři [68].

AutoAg	Pořadí a.k.	Aminokyselinová sekvence	Mol. hm.
GAD 1	247-279	NMYAMMIARFKMFPEVKEKGMALPRLIAFTSEE-OH	3823,7
GAD 2	509-528	IPPSLRTLEDNEERM SRLSK-OH	2371,7
GAD 3	524-543	SRLSKVAPVIKARMMEYGTT-OH	2238,7
IA-2	853-872	SFYLK(Nleu)VQTQETRTLTLQFHF	2489
PI	9-23	SHLVEALYLVCGERG	1645

Tabulka 6: Diabetogenní autoantigeny použité ke stimulaci CBMC.

K izolaci T regulačních lymfocytů jsme používali VarioMACS Separator od firmy Miltenyi Biotec. Postup práce je shodný s originálním návodem k soupravě. Před samotnou separací se buňky spočítají v Bürkerově komůrce, aby byl přidán správný poměr protilátek/magnetických částic (Biotin Antibody Cocktail, Anti-Biotin Microbeads, CD25 MicroBeads). Následně se resuspendují v předepsaném pufru. Důležité je směs stále udržovat v chladu, aby nedošlo k agregaci magnetických částic. Z tohoto důvodu probíhala centrifugace při 4 °C a inkubace v lednici.

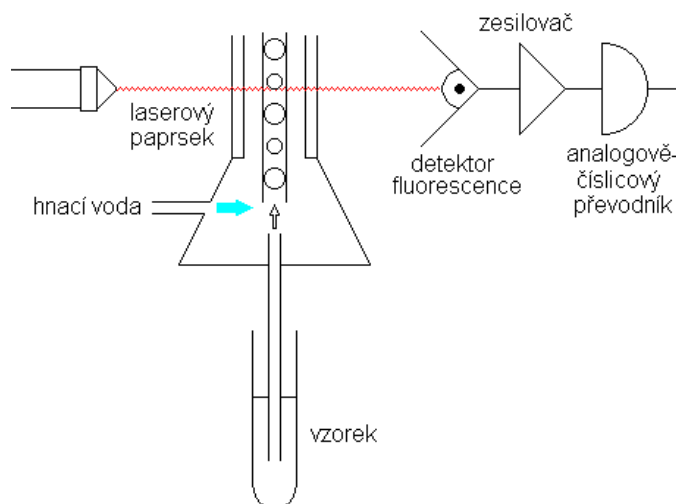


Obrázek 5: Schématické znázornění postupu. Naznačení populace za použití koktejlu protilátek s navázanými magnetickými částicemi (A). Získání CD4+ bohaté směsi negativní selekcí za použití LD kolony (B). Naznačení směsi protilátkou CD25. Získání populace CD4+CD25+ pozitivní selekcí za použití MS kolony. Vychytné buňky se uvolní proplachem po vyjmutí kolony z magnetického pole (C) [68].

5.5.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FACS) je technologie, která umožňuje simultánní měření několika charakteristik na úrovni jedné buňky v suspenzi. Funguje na principu hydrodynamické fokusace, což znamená, že buněčná suspenze tvoří v cytometru tenký proud a buňky prochází jedna po druhé přes laserový paprsek. Každá částice v suspenzi odráží a rozptyluje laserové světlo s různou intenzitou. Pokud je buňka naznačená pomocí monoklonální

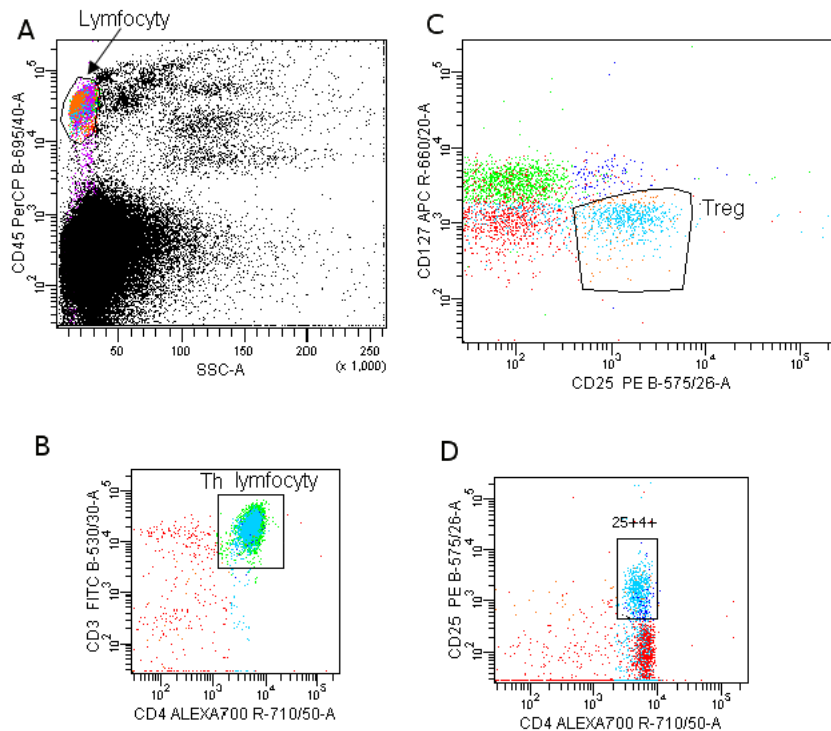
protilátky s navázaným fluorochromem, dojde k excitaci fluorescenčního záření. Základními dvěma měřenými parametry jsou forward scatter (FSC), který měří rozptyl světla v malém úhlu a side scatter (SSC), který měří rozptyl světla v úhlu 90° . FSC je přímo úměrný velikosti buněk a SSC je ovlivněn hlavně granularitou buněk, takže se buňky rozdělí na populaci lymfocytů, monocytů a granulocytů, navíc se oddělí drť a mrtvé buňky [6].



Obrázek 6: Schéma průtokového cytometru [69].

Získané mononukleární buňky pupečnickové krve se nejprve promyly v 1,5ml fosfátového pufru (PBS) a zcentrifugují (400 g, 5 minut). Následně byly buňky značeny protilátkami (viz Roztoky a chemikálie) a 15 minut inkubovány ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci byl vzorek zcentrifugován (400 g, 5 minut) a supernatant byl odstraněn. Ke vzorkům se přidalo $100 \mu\text{l}$ PBS a byly proměřeny v laboratoři CLIP na FACS LSR II programem Diva software. Další analýza byla provedena pomocí programu Summit v.4.3 prostřednictvím dvojrozměrných bodových grafů (dot plot). Jako první se ohraničil lymfoidní gate podle silné exprese molekuly CD45. Dále se pokračovalo v analýze buněk pouze z lymfoidního gate (obr. 7).

Kromě měření zastoupení buněčné populace T regulačních lymfocytů jsme zjišťovali poměr naivních a paměťových lymfocytů pomocí znaků CD45RA/CD45RO. Množství erytroblastů jsme měřili pomocí znaku CD71. Povrchový znak CD71 je transferinový receptor, který je exprimovaný na aktivovaných a proliferujících buňkách [5].

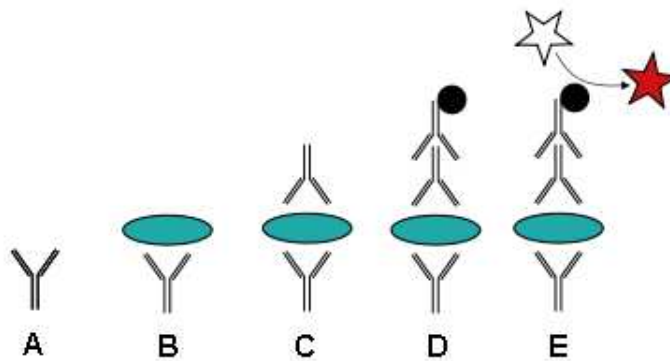


Obrázek 7: Ukázka strategie gatování při primární analýze dat na FACS LSR II. Nejprve se vyhledá populace lymfocytů (A) pomocí znaku CD45+ a z tohoto gatů se provádí další analýza Th lymfocytů CD3+CD4+ (B) a T regulačních lymfocytů CD4+CD25+CD127- (C a D)

5.5.4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Podstatou metody je reakce antigen-protilátka. Využívá se ke kvantitativnímu stanovení antigenu (přímá ELISA) nebo ke stanovení protilátek (nepřímá ELISA). Na dně jamky (většinou 96 jamkové destičky) je navázaná primární protilátka. Aplikuje se diagnostikovaný vzorek, nechá se inkubovat a nakonec se promyje. Nenavázaný konjugát (antigen) se odmyje, zatímco navázaný je inkubován s enzymovým substrátem. Na ELISA-readeru je odečtena vzniklá barevná reakce z mikrotitrační destičky při různých vlnových délkách (9). Pro zrychlení a usnadnění metody jsme pro měření použili tzv. Instant ELISu, kde jsou na dně jamek v prvních dvou sloupcích již připravené standardy, ke kterým se vztahují výsledky měření.

Měřeným cytokinem v našem případě byl prozánětlivý interferon γ (IFN- γ), což je hlavní produkt Th1 populace. Právě produkci IFN- γ by měly T regulační buňky snižovat [18]. Práh citlivosti námi použitého komerčního kitu je pro IFN- γ 0,66 pg/ml. Otestovali jsme 6 vzorků (2 pupečnickové krve dětí matek s T1D a 4 pupečnickové krve dětí zdravých matek). Buňky jsme nastimulovali a přidávali různou koncentraci T regulačních



Obrázek 8: Schématické znázornění postupu. Navázaná protilátka na dně jamky (A). Přidání vzorku a navázání antigenu (B). Přidání specifické protilátky (C) a sekundární enzymaticky značené protilátky (D). Přidání substrátu, který po reakci s enzymem změnil barvu (E) [70].

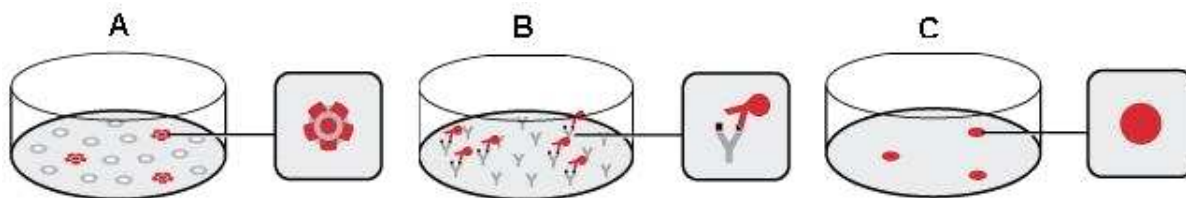
buněk izolovaných magnetickou separací, abychom prokázali rozdílnou schopnost T regulačních buněk tlumit produkci $\text{IFN-}\gamma$. Díky průtokové cytometrii jsme znali zastoupení T regulačních buněk v konkrétním vzorku a díky magnetické separaci jsme tuto populaci vyizolovali. Stimulované i nestimulované CBMC jsme rozdělili do 4 zásobních mikrozkušavek. V první zůstali CBMC beze změny, do druhé jsme přidali 100 % T regulačních buněk, do třetí 200 % a do čtvrté dokonce 400 % původního množství T regulačních buněk. Kultivace buněčných suspenzí trvala 72 hodin v termostatu (37°C , 5% atmosféra CO_2), poté byl zvlášť odebrán supernatant a buňky. Pokud nebyly vzorky okamžitě použity, zamrazili jsme supernatant při -20°C . Buňky byly po přidání DMSO zamrazeny při -80°C . Aby nevznikaly poškozující ledové krystaly, použili jsme zmrazovací kontejner obsahující isopropanol, který zajišťuje pozvolný pokles teploty ($1^\circ\text{C}/\text{min}$).

5.5.5 ELISpot (enzyme-linked immunospot assay)

ELISpot je metoda, při které dochází k vazbě cytokinu produkovaného určitou buňkou na protilátku navázanou na destičce. Dno desky tvoří speciální membrána s navázanou primární specifickou protilátkou proti hledanému cytokinu (interleukinu). Po několikahodinové inkubaci (délka inkubace je závislá na typu cytokinu) se buňky zlyžují, odmyjí a přidá se sekundární značená protilátka proti testovanému cytokinu. Přidáním barevného substrátu dojde ke zvýraznění míst, kde lymfocyt produkoval detekovaný cytokin. Vzniknou barevné body (spoty). V našem případě byl v komerčním kitu tetramethylbenzidin (TMB) substrát, který při oxidaci zmodrá. Vyhodnocení lze provést manuálně pomocí inverzního mikroskopu nebo automaticky využitím ELISpot readeru.

Pro zjištění produkce $\text{IFN-}\gamma$ jsme použili kit, kde jako pozitivní kontrola slouží mAb

CD3-2. Pracovní koncentrace buněk byla 100 tisíc CBMC na jamku. Buňky jsme stimulovali směsí diabetogenních antigenů (viz tab. 6). Dále jsme připravili negativní kontrolu (NK) z nestimulovaných buněk a absolutní negativní kontrolu (pouze médium). Do každého vzorku byla přidána antibiotika (ATB). Vzniklé spoty jsme odečítali pod inverzním mikroskopem.

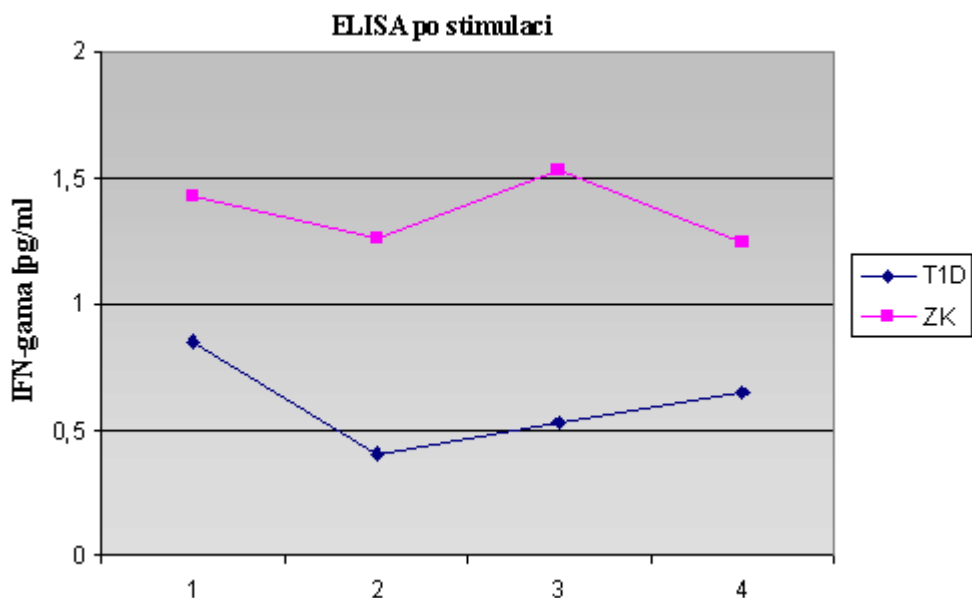


Obrázek 9: Schématické znázornění postupu. Inkubace buněk a antigenu (A). Buňky během kultivace začnou produkovat cytokiny, které se naváží na protilátku navázanou na dně desky. Přidání enzymaticky značené protilátky proti hledanému cytokinu (B). Přidání substrátu a vývoj spotů (C). Mezi jednotlivými kroky dochází k promytí [71].

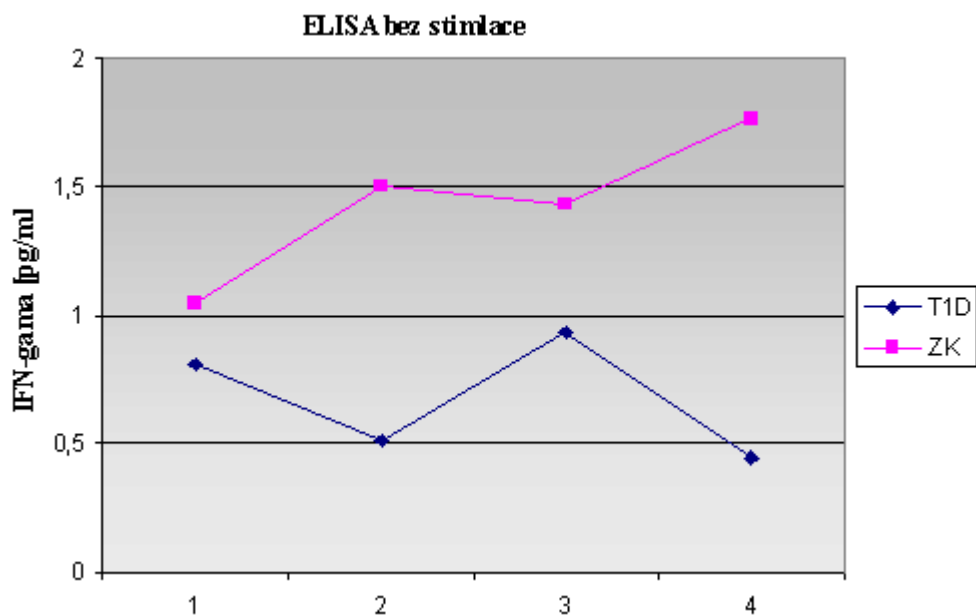
5.6 Výsledky

Procentuální zastoupení jednotlivých buněčných populací naměřených na průtokovém cytometru jsme zaznamenali do tabulek, ke kterým jsme doplnili základní popisné statistiky (viz tab. 7). Grafickým znázorněním je boxplot (obr. 14-16), který poskytuje základní informace o rozložení proměnné a názorně zachycuje medián, kvartily i extrémy v datech. V grafech jsou znázorněny tři skupiny (statistické výběry): 1 - T1D - pupečnicková krev dítěte matky s diabetem 1. typu; 2 - ZK - pupečnicková krev dítěte zdravé matky; 3 - GD - pupečnicková krev dítěte matky s gestačním diabetem. Všechny uvedené statistické tabulky byly vypracovány v programu SPSS. Opět ke skupinám 1, 2, 3 platí stejná legenda jako v případě grafů.

Pomocí ELISy jsme otestovali 2 pupečnickové krve dětí matek s T1D a 4 pupečnickové krve dětí zdravých matek. Výsledky ELISA měření nevykazovaly žádný jednotný trend a neodpovídaly našemu očekávání. Hodnoty produkce IFN- γ vycházely velmi nízko, průměrná koncentrace ze všech měření je 1,18 pg/ml, přičemž detekční limit máni použitého komerčního kitu byl 0,66 pg/ml. Vzhledem k takto nízkým hladinám IFN- γ , často i pod detekčními limity, jsme měření neopakovali na větším souboru. Z obrázků 10 a 11 je patrné, že produkce IFN- γ nemá shodný průběh mezi stimulovanými buňkami a nestimulovanými buňkami (negativní kontrola) ani mezi vzorky CBMC dětí matek s T1D a zdravými kontrolami. Někdy se po přidání 100 % T regulačních buněk produkce IFN- γ snížila, ale po přidání 200 % Treg se produkce IFN- γ opět zvýšila a při přidání 400 % Treg se u stimulované skupiny T1D zase snížila. Překvapivé bylo, že hodnoty produkce IFN- γ naměřené u skupiny T1D jsou nižší, než u zdravých kontrol i v případě bazální produkce.



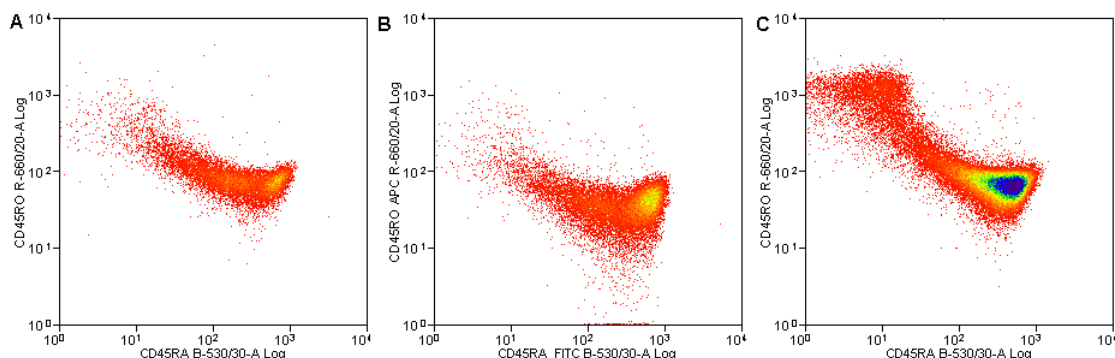
Obrázek 10: Záznam změněné produkce IFN- γ po stimulaci diabetogenními antigeny a přidání odlišného množství T regulačních buněk. Nejprve byly proměřeny CBMC s normálním počtem Treg (1), poté CBMC + 100 % Treg (2), následně CBMC + 200 % Treg (3) a nakonec CBMC + 400 % Treg (4).



Obrázek 11: Záznam změněné produkce IFN- γ u negativních kontrol po přidání odlišného množství T regulačních buněk. Nejprve byly proměřeny CBMC s normálním počtem Treg (1), poté CBMC + 100 % Treg (2), následně CBMC + 200 % Treg (3) a nakonec CBMC + 400 % Treg (4).

Prostřednictvím ELISpotu jsme otestovali produkci IFN- γ u 7 vzorků. V počtu spotů a tedy ve schopnosti tlumit produkci IFN- γ jsme nezaznamenali žádný signifikantní rozdíl. ELISpot z pupečnickové krve se zcela liší od ELISpotu periferní krve, který jsme pro kontrolu také provedli.

Signifikantní rozdíl nevyšel ani při porovnání buněčné populace CD45+CD45RA a CD45+CD45RO. Výsledky se špatně kvantifikují, protože populace naivních a paměťových buněk v sebe postupně přecházejí a prolínají se (mouhou být i double pozitivní). Rozdíl je vidět při porovnání pupečnickové krve a periferní krve (viz obr. 12).



Obrázek 12: Zastoupení naivních buněk CD45+CD45RA+ a paměťových buněk CD45+CD45RO+ v pupečnickové krvi dítěte od matky s diabetem 1. typu (A), zdravé matky (B) a v periferní krvi (C).

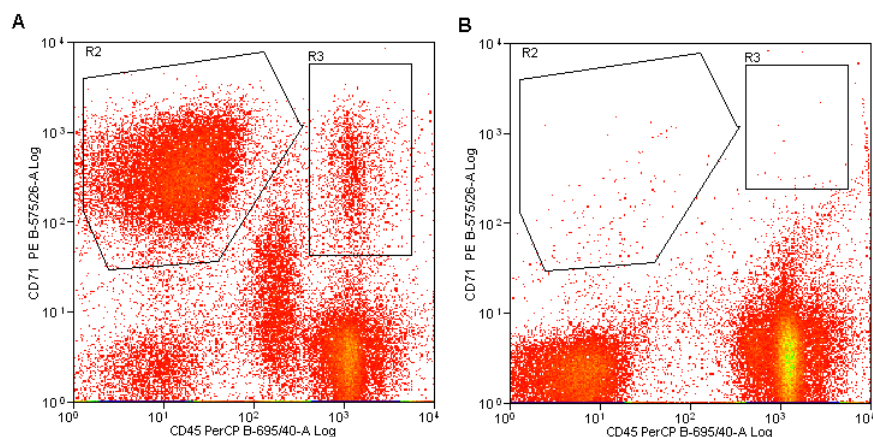
Při měření znaku CD71+ jsme potvrdili přítomnost jaderných prekurzorů erytrocytů v pupečnickové krvi, které se v periferní krvi nevyskytují (viz obr 13). V množství vyplavených buněk nesoucích znak CD71 jsme nenašli signifikantní rozdíl v případě porovnání způsobu porodu ani v případě porovnání CBMC dětí matek s T1D a zdravými kontrolami.

5.6.1 Statistické vyhodnocení průtokové cytometrie

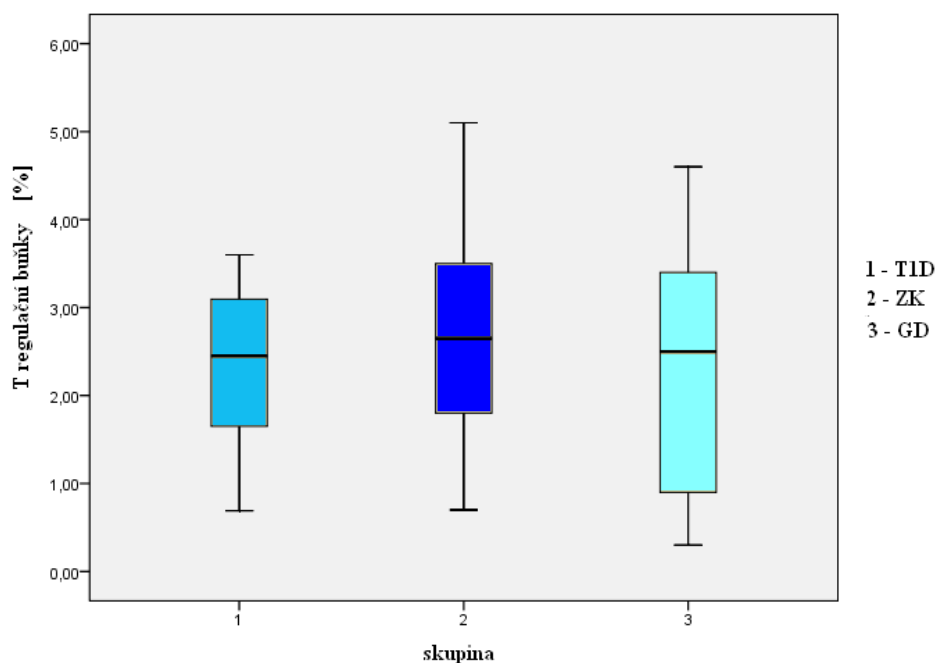
Výsledky byly zpracovány za požití softwarového programu SPSS. Pro všechny testy byla zvolena hladina významnosti $p = 0,05$. K ověření, že zvolené výběry odpovídají normálnímu rozdělení, jsme použili Kolmogorov-Smirnovův test. U všech buněčných populací ve všech 3 skupinách vyšla signifikance $p > 0,05$, což vede k závěru, že nezamítáme nulovou hypotézu o normálním rozložení předložených výběrů (viz tab. 8). Grafickým znázorněním normálního rozdělení jsou histogramy (obr. 17-19).

Pomocí Levenova testu jsme ověřili shodu rozptylu ve skupině. Signifikance opět převyšovala hraniční hodnotu $p > 0,05$, i když ne s takovou převahou jako při testování normality rozdělení. Nulovou hypotézu o shodě rozptylu ve výběru nezamítáme (viz tab. 9).

Pro testování rozdílu středních hodnot všech tří skupin výběrů jsme použili metodu

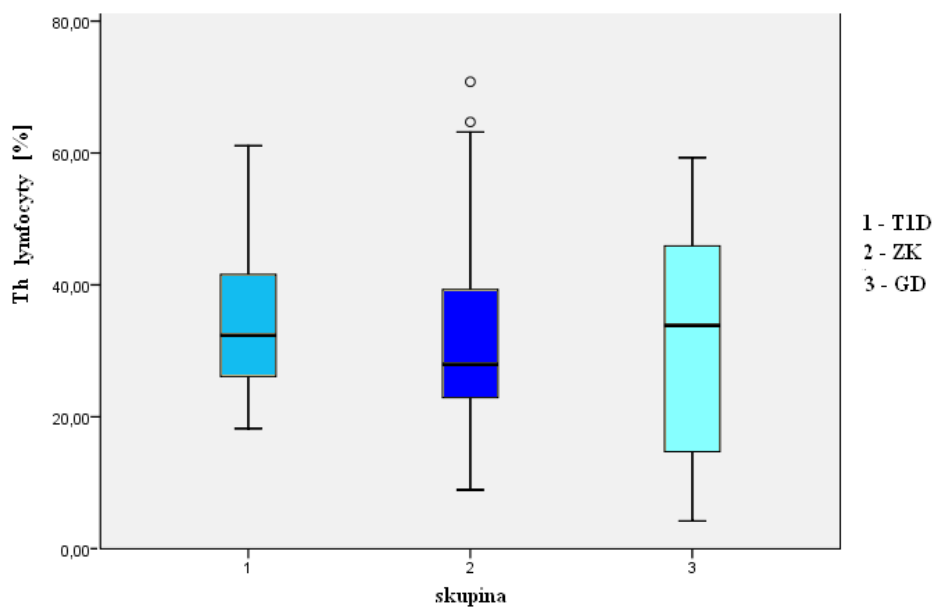


Obrázek 13: Zastoupení erytroblastů (CD45-CD71+) a aktivovaných T-lymfocytů (CD45+CD71+) v pupečnickové krvi (A) a periferní krvi (B).

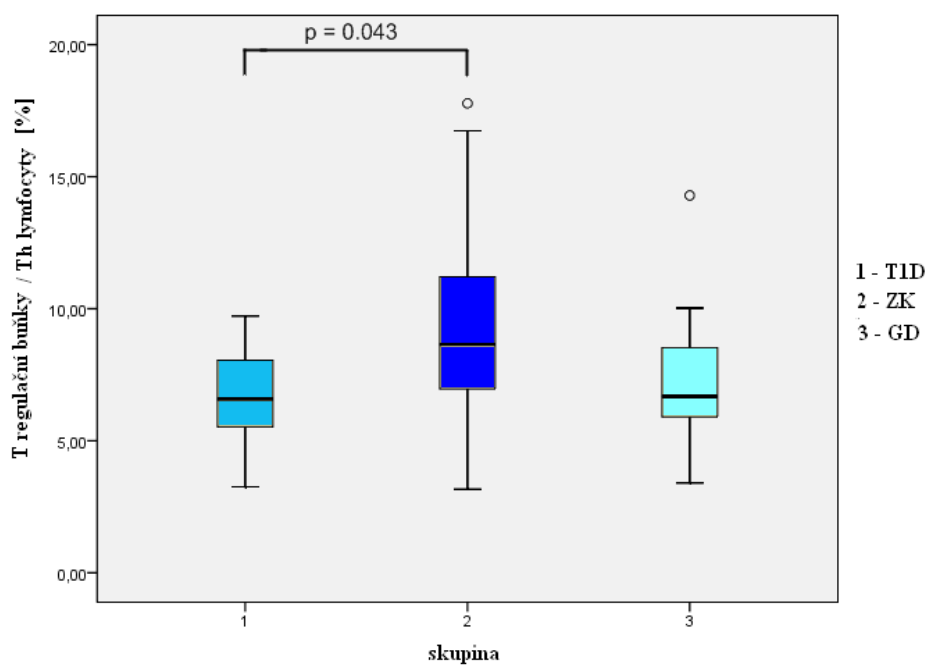


Obrázek 14: Boxplot ukazuje procentuální zastoupení populace T regulačních buněk (CD4+CD25+CD127-) z celkového počtu lymfocytů (CD45+) v jednotlivých skupinách.

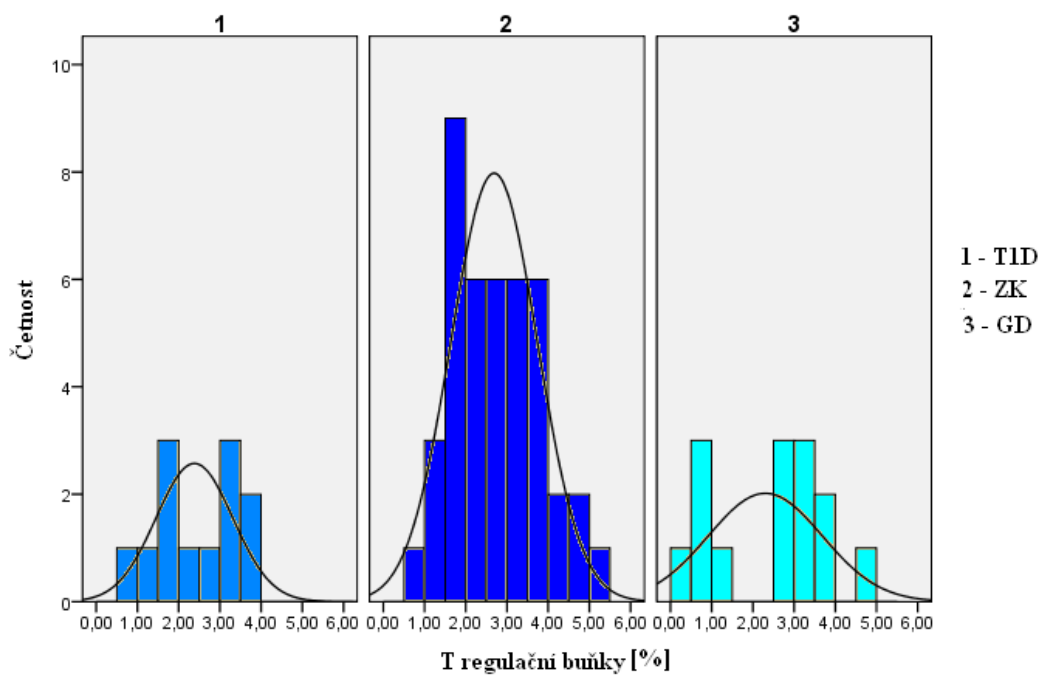
ANOVA (analýza rozptylu), protože pokud bychom opakovaně použili Studentův t-test pro dva nezávislé výběry, mohli bychom se dopustit chyby falešně pozitivního výsledku. Jak je uvedeno v tabulce 10 nulovou hypotézu o shodě středních hodnot nezamítáme v případě množství Th lymfocytů a T regulačních buněk, protože signifikance je $p > 0,05$. Nemůžeme tedy říct, že by se výběry mezi sebou lišily. Ale u poměru T regulačních buněk v rámci populace Th lymfocytů nám vychází signifikance $p = 0,020$, takže na 95 % hladině



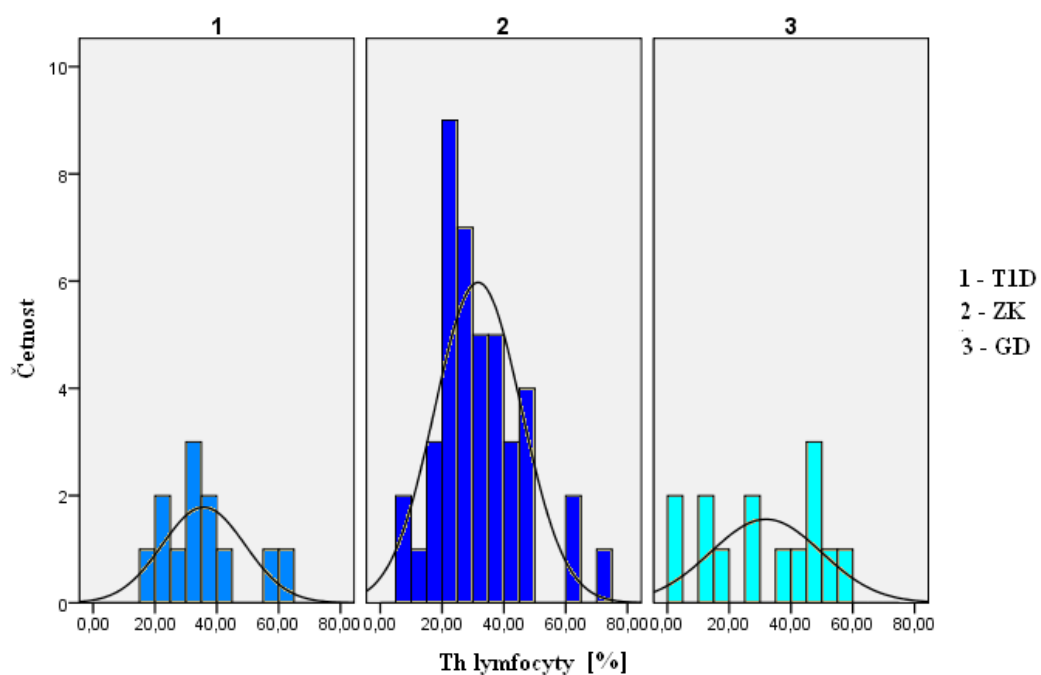
Obrázek 15: Procentuální zastoupení populace Th lymfocytů (CD3+CD4+) z celkového počtu lymfocytů (CD45+) v jednotlivých skupinách.



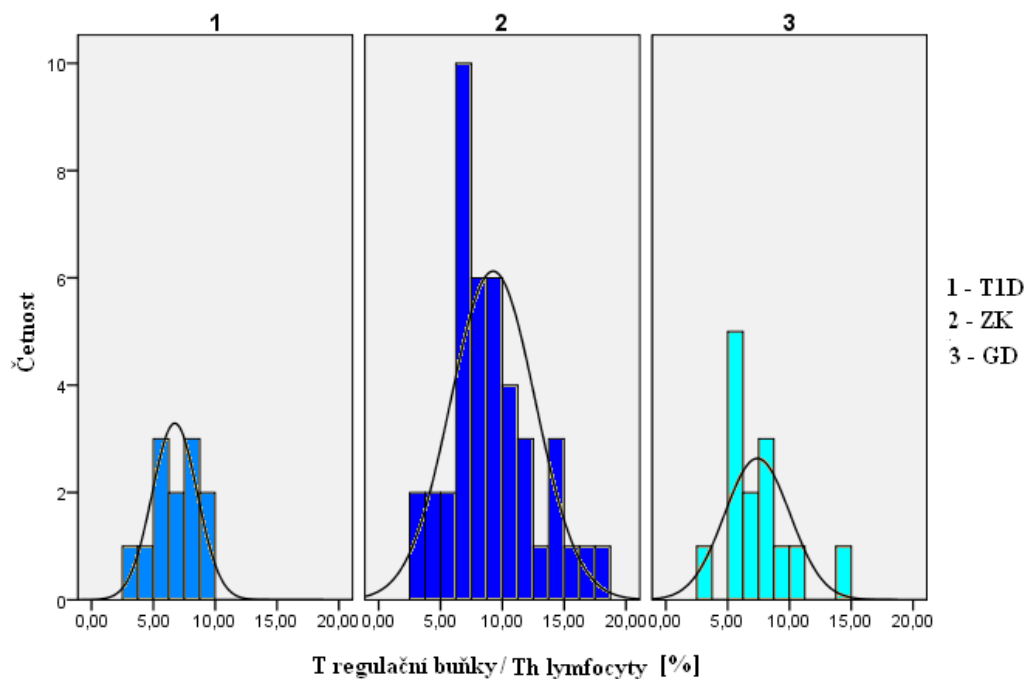
Obrázek 16: Procentuální zastoupení populace T regulačních buněk (CD4+CD25+CD127-) z Th lymfocytů (CD3+CD4+) v jednotlivých skupinách.



Obrázek 17: Normální rozdělení hodnot T regulačních buněk (CD4+CD25+CD127-) z celkového počtu lymfocytů (CD45+) v jednotlivých výběrech.

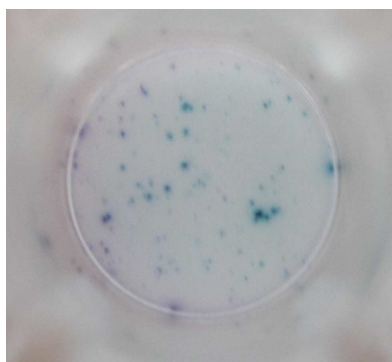


Obrázek 18: Normální rozdělení hodnot populace Th lymfocytů (CD3+CD4+) z celkového počtu lymfocytů (CD45+) v jednotlivých skupinách.



Obrázek 19: Normální rozdělení hodnot podílu T regulačních buněk (CD4+CD25+CD127-) z Th lymfocytů (CD3+CD4+).

spolehlivosti zamítáme hypotézu H_0 a potvrzujeme alternativní hypotézu, že se liší množství T regulačních buněk v rámci populace Th lymfocytů minimálně ve dvou výběrech. Pro zjištění, které dvě skupiny se liší, jsme použili Post Hoc testy. Aplikace SPSS pro testování použila Bonferroniho metodu. Průměrné zastoupení T regulačních buněk v rámci populace Th lymfocytů je 6,73 % u pupečnickové krve matek s T1D oproti 9,25 % v pupečnickové krvi zdravých matek, což podle Post Hoc testu činí signifikanci $p = 0,043$ (viz tab. 11).



Obrázek 20: Ukázka výsledku z ELISpotu - jde o produkci IFN- γ pupečnickovou krví po stimulaci diaetogenními antigeny.

6 Diskuze

Nerovnováha mezi aktivací a supresí imunitního systému může být způsobena odchylkou v počtu nebo funkci T regulačních lymfocytů. Tento rozdíl může nesprávně vychýlit imunitní mechanismy Th1 vs. Th2 a následně může dojít k aktivaci destrukce β buněk pankreatu [72, 73, 74, 75, 76]. Proto se náš zájem ubíral především k populaci T regulačních lymfocytů. Při jejich identifikaci jsme dali přednost povrchovému markeru CD127 před intracelulárním transkripčním faktorem FOXP3. Mezi oběma znaky je prokázána inverzní korelace [77, 78].

Experimenty v této diplomové práci byly zaměřeny na pupečnickové krve, protože se jedná o mimořádně zajímavý materiál. Imunitní systém novorozence se doposud setkal jen s malým množstvím exogenních vlivů prostřednictvím těla matky. Prostředí, ve kterém se vyvíjely děti matek s T1D a zdravých matek, se zásadně neodlišovalo s výjimkou výkyvů glykémie během těhotenství a autoimunitně laděného prostředí mateřského organismu. Cílem bylo zjištění rozdílů v zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací a zavedení metod k odhalení rozdílné schopnosti T regulačních buněk tlumit produkované cytokiny.

Domníváme se, že průběh těhotenství a případné navození imunologické tolerance zapříčiňuje rozdíl v riziku vzniku diabetu u diabetických matek a diabetických otců. Matky s diabetem 1. typu mají pro své dítě riziko vzniku T1D 2-3 %, ale otcové dokonce 6-9 % [3, 79]. K myšlence, že se jedná o vliv prostředí (ve smyslu efektu vývoje v autoimunitně laděném prostředí a následného navození specifické imunologické tolerance) nás vedlo i zjištění, že snížené riziko vzniku diabetu pro děti matek s T1D platí pouze, pokud matka onemocněla diabetem ještě před otěhotněním. Pokud onemocněla diabetem až po těhotenství, riziko, že onemocní potomek, se podobá riziku onemocnění pro dítě otce s T1D [79, 80]. Roli v této disproporci může sehrávat i mateřská glykémie. Vliv změněné glykémie na produkci cytokinů byl již dříve studován v laboratoři, kde jsem realizovala svoji diplomovou práci. Byla zde provedena studie *in vitro* na CBMC izolovaných z pupečnickové krve, které byly stimulovány diabetogenními antigeny. Byl prokázán signifikantní rozdíl při porovnání sekrece IL-2, IFN- γ , TNF- β CBMC po stimulaci. Hladina byla zvýšená u skupiny matek s výbornou kompenzací diabetu oproti zdravým kontrolám. Skupina matek s horší kompenzací diabetu měla obecně snížené hladiny sledovaných cytokinů, ale u výše uvedených cytokinů nebyl potvrzen signifikantní rozdíl. Dalším pokusem byla kultivace CBMC v médiu s různou koncentrací glukózy. Při snížené koncentraci glukózy v médiu nebyl prokázán mezi skupinami signifikantní rozdíl. U vzorků, které byly kultivovány v médiu se zvýšenou koncentrací glukózy po dobu 72 hodin, byla zjištěna nižší produkce IFN- γ . Proto nepovažujeme možnost ovlivnění imunitního systému změněnými glykémiami matky v průběhu těhotenství za vyloučenou. Imunitní systém se vyvíjí po dlouhou dobu, takže může být na změnu glykémie citlivý i v jiné fázi, než těsně před porodem, což simulovala

předložená studie *in vitro*.

Rozdíl v zastoupení T regulačních buněk mezi pupečnickovými krvemi dětí matek s T1D a zdravými kontrolami, může být způsoben tím, že matky diabetičky rodí většinou plánovaně na spodní hranici zralosti dítěte (38. týden), zatímco zdravé matky rodí ve většině případů kolem 40. týdnu. Důvodem je to, že po 38. týdnu těhotenství u dětí matek s diabetem významně stoupá riziko náhlého úmrtí a z tohoto důvodu jsou tato riziková těhotenství plánovaně a řízeně ukončována poněkud dříve než odpovídá fyziologické délce gestace. Do studie jsme zahrnuli i vzorky CBMC dětí matek s T1D, které rodily v 36. - 38. týdnu těhotenství. Dítě je v 38. týdnu plně zralé a prodlužování těhotenství by znamenalo prodlužování rizika komplikací pro matku i dítě. Dřívější porod u matek bez T1D bývá většinou způsoben jinými zdravotními komplikacemi a pupečnicková krev tedy nemůže být zařazena mezi zdravé kontroly. Proto v naší studii mají matky s T1D resp. jejich děti poněkud nižší gestační věk a to samozřejmě může ovlivnit množství T regulačních buněk v pupečnickové krvi. Toto téma nebylo zatím podrobně zkoumáno. Zmínku jsme našli ve studii Íránského výzkumného centra transfuzní stanice v Teheránu, která prokázala vyšší hladiny T regulačních buněk v pupečnickové krvi dětí rozených před očekávaným termínem porodu [81], ale neprokázala rozdíl v zastoupení naivních (CD4+CD45RA) a paměťových buněk (CD4+CD45RO) v pupečnickových krvích dětí narozených před termínem a v termínu, což odpovídá našim výsledkům, které také nevykazují rozdíl ve zralosti buněk mezi zkoumanými skupinami.

Další rozdíl mezi skupinami je v počtu císařských řezů - u T1D je zastoupení 33 %, u ZK a GD je zastoupení nižší a to 21,5 %. Císařský řez je u zdravých matek indikován např. z důvodu předešlého císařského řezu, kefalopelvického nepoměru nebo problematické polohy dítěte, což jsou indikace nemající primárně vliv na imunitní systém. Samotný císařský řez může ovšem významně ovlivnit další vývoj imunitního systému dítěte, neboť dítě nepřijde do kontaktu s bakteriemi v porodních cestách matky a bývá proto po porodu kolonizováno jiným typem bakterií, než dítě porozené vaginálně. Toto se však týká spíše pozdějšího vývoje imunitního systému dítěte. Dalším významným činitelem ovlivňujícím imunitní systém během porodu by mohl být významný stres, které dítě prožívá během vaginálního porodu ve srovnání se zanedbatelně kratším stresovým impulzem, který provází císařský řez (pokud není indikován akutně např. z důvodu hypoxie plodu). Proto jsme provedli porovnání zastoupení T regulačních buněk u jednotlivých typů porodů, kde jsme však v našem souboru nenalezli rozdíl.

Ze studie jsme vyloučili pupečnickové krve od matek s další závažnou poruchou imunitního systému a těžce dekompenzovaných diabetiček nebo gestačních diabetiček s vysokými glykémiami. Hyperglykémie matky způsobí výrazně zvýšený přestup glukózy přes placentu a nutí plod ke zvýšení metabolické aktivity a ke zpracování přijaté glukózy, což dále

výrazně zvyšuje nároky na potřebu kyslíku. Plod trpí hypoxií a snaží se jí kompenzovat vyplavením erytroblastů, které se nedají oddělit hustotní gradientovou centrifugací a ztěžují hodnotitelnost vzorku a to jak při počítání buněk v Burkerově komůrce - tak při odečítání výsledků z FACS. Domníváme se, že imunitní systém plodu se v takto závažném stavu může chovat odlišně. Na průtokovém cytometru jsme analyzovali i vzorek CBMC dítěte výrazně dekompenzované matky s T2D, kdy bylo dítě vystaveno extrémnímu metabolickému stresu a byl zde jasný efekt na jeho imunitní systém. Pozorovali jsme výraznou supresi, která se projevila velmi nízkým počtem lymfocytů při analýze vzorku na průtokovém cytometru.

Dále je potřeba diskutovat početní zastoupení vzorků v nejvíce zajímavé skupině tj. ve skupině matek s T1D. Diabetických matek je ve studii méně také proto, že porody diabetických matek bývají často ještě před 36.týdnem, kdy je dítě ještě příliš nezralé a i jeho imunitní systém by mohl reagovat odlišně. Tato těhotenství jsou obecně riziková a provázená problémy, což často znesnadňuje odběr krve pro jiné než primárně medicínské účely. I vlastní porody diabetických matek bývají komplikované, takže porodní sál někdy odsunul náběr CBMC pro vědecké účely např. z důvodu nutnosti resuscitace novorozence. O spolupráci jsme proto požádali i Ústav péče pro matku a dítě v Podolí, ale ani takto se nám nepodařilo počet těchto vyšetření významně navýšit. Tyto obtíže se sháněním takto vzácných vzorků mají i jiné vědecké skupiny, protože například i ve studii B.C.Holma jsou CBMC matek s T1D zastoupeny jen 13 vzorky a naše práce je tedy srovnatelná s nejvíce uznávanou zahraniční prací v této oblasti co se týká počtu realizovaných testů.

Naše měření nepřineslo signifikantní rozdíl mezi zastoupením buněčných populací T regulačních buněk a Th lymfocytů ve skupinách, zatímco švédská skupina B.C.Holma, prokázala zvýšené množství T regulačních buněk v pupečnickové krvi dětí diabetických matek oproti pupečnickové krvi dětí zdravých matek (průměr 12,0 % u T1D oproti 8,9 % u ZK, $p = 0.0102$) [82]. Naše výsledky vykazovaly signifikantní rozdíl v případě podílu T regulačních buněk z Th lymfocytů, kde je průměrné zastoupení 6,73 % u pupečnickové krve matek s T1D oproti 9,25 % v pupečnickové krvi zdravých matek ($p = 0,043$). Toto je zajímavý výsledek i vzhledem k tomu, že na základě literárních údajů bychom očekávali opačný výsledek. Možné příčiny byly diskutovány výše. Co se týče T regulačních lymfocytů je průměrná hodnota lehce zvýšená u zdravých kontrol (viz tab. 7). Pro statistické vyhodnocení jsme nevybrali Mann-Whitney test tak jako švédská skupina, protože naše naměřené hodnoty vykazovaly normální rozložení.

Dalším důležitým hledaným údajem byla hladina produkce IFN- γ . Zjištěná průměrná hladina koncentrace IFN- γ v plazmě pupečnickové krve se ve studii švédské výzkumné skupiny B.C.Holma pohybovala kolem 15 pg/ml. Statisticky významný rozdíl u produkce IFN- γ v pupečnickové krvi dětí matek s T1D a zdravých matek nepotvrdili. Průměrná hladina byla u T1D vyšší.

Vyšší bazální produkci IFN- γ ve své práci prokázala Z.Vrábelová. Pracovala ovšem s buňkami PBMC, produkci IFN- γ měřila proteinovou arrayí po 72hod kultivaci *in vitro*. U příbuzných diabetiků s rizikovými alelami byla produkce IFN- γ mononukleárními buňkami po stimulaci vyšší než u zdravých kontrol ($p = 0,02$) [61]. K.Böhmová a kolektiv prokázala nižší bazální produkci vyšetřovaných cytokinů (včetně IFN- γ) u novorozenců s jedním T1D rodičem. Signifikantní byl rozdíl jen u některých cytokinů. Opět pro měření cytokinové produkce používala proteinovou microarray (79).

Naše výsledky vykazují opačný trend. Po stimulaci diabetogenními autoantigeny měly pupečnickové krve dětí matek s T1D nižší hladinu IFN- γ než pupečnickové krve zdravých kontrol. Vzhledem k nedostatečné citlivosti ELISy v takto nízkých hodnotách, jsme nemohli provést měření touto metodou na větším souboru.

ELISpot z pupečnickové krve se zcela liší od ELISpotu periferní krve, který jsme pro kontrolu také provedli, abychom vyloučili, že jedná o metodickou chybu. Na ELISpotu z pupečnickové krve se zobrazuje mnoho drobných a nevýrazných bodů. Dá se uvažovat o možnosti, že nezralé buňky, kterých je v pupečnickové krvi velice mnoho, se během kultivace mohly částečně diferenciovat a slabě produkovat IFN- γ .

Vzhledem k tomu, že jsme našli práce, které pracovali s CBMC a s ELISpotem, domníváme se, že je možné zvýšit průkaznost dat použitím počítačové úpravy dat.

Závěr

V naší práci jsme se zabývali populací imunoregulačních buněk CD4+CD25+ ve vztahu ke vzniku diabetu 1. typu. Zjišťovali jsme, zda jsou přítomné početní nebo funkční odchylky těchto buněk u novorozence matky léčené pro autoimunitně podmíněný diabetes tj. diabetes 1. typu. Dítě matky s T1D má vyšší riziko než dítě zdravé matky, že touto chorobou v budoucnu rovněž onemocní. Jeho riziko je ale podstatně nižší než u dítěte, jehož matka je sice zdravá, ale otec je léčen pro tuto chorobu. Jedním z možných vysvětlení je, že během těhotenství dochází k nastolení jisté imunologické tolerance u dítěte, které se vyvíjí v mateřském „autoimunitně laděném prostředí“. Ve vztahu k poznání vzniku diabetu 1. typu se jedná tedy o velmi potřebné a dosud málo probádané téma. Během let 2009 - 2011 jsme otestovali 68 pupečnickových krví (12 CBMC od dětí matek s T1D, 42 CBMC od dětí zdravých matek a 14 CBMC od dětí matek s GD), jež splňovaly stanovená kritéria. Kontrolní vzorky byly získány od matek, které rodily v 38.- 42. týdnu těhotenství. Skupina dětí matek s T1D byla porozena průměrně o něco dříve než kontrolní skupina a to v rozmezí 36.-39. týdne gestace.

Zaměřili jsme se na detekci imunoregulačních buněčných populací v pupečnickové krvi pomocí průtokové cytometrie a také na detekci rozdílů v produkci IFN-gama buňkami pupečnickové krve po přidání různé koncentrace T regulačních buněk CD4+CD25+. Populaci T regulačních buněk jsme získali pomocí magnetické separace a poté jsme ji použili v dalších in vitro testech.

Prostřednictvím analýzy na průtokovém cytometru jsme našli rozdíl v počtu T regulačních buněk v rámci populace Th lymfocytů. Produkce IFN-gama testovaná ELISou a ELISpotem nevykazovala žádný signifikantní rozdíl. Pro definitivní závěry týkající se role imunoregulačních lymfocytů v případném nastolení imunologické rovnováhy u dětí matek s T1D jsou ovšem nezbytné další studie na rozsáhlejších souborech pupečnickových krví.

V průběhu testů jsme řešili různé technické problémy způsobené tím, že se jednalo o do značné míry novátorské experimenty a použité metody byly primárně určené pro práci s periferní krví. Vlastnosti pupečnickové krve se v některých parametrech výrazně liší od periferní krve a tak se použití některých metod komplikuje. Největší komplikací byla přítomnost erytroblastů, které nebylo možné odstranit z frakce mononukleárních buněk. Také magnetická separace měla nízkou výtěžnost CD4+CD25+ buněk a pozorovali jsme i odlišné chování mononukleárních buněk pupečnickové krve při aplikaci metody ELISPOT ve srovnání s periferními mononukleárními buňkami.

Lze tedy konstatovat, že jsme pozorovali odchylky na úrovni počtu imunoregulačních buněk definovaných jako CD4+CD25+, další výzkum je ovšem nezbytný, ale i velmi potřebný a právě pro jeho realizaci jsou cenné i metodické poznatky, která přinesla tato práce. Do budoucna je totiž velmi potřebné zjistit, jak efektivně navodit imunologickou toleranci

proti antigenům beta buněk pankreatu a zlepšit tak vyhlídky na imunologickou prevenci závažné choroby, kterou bezesporu diabetes 1.typu je.

Seznam použité literatury

- [1] Cinek, O., Lánská, V., Koloušková, S. et al. Type 1 diabetes mellitus in Czech children diagnosed in 1990-1997: a significant increase in incidence and male predominance in the age group 0-4 years. *Diabetic Medicine*, 17: 64-69.
- [2] Cinek, O., Šumník, Z., Vavřínek J. Continuing increase in incidence of childhood-onset type 1 diabetes in the Czech Republic 1990-2001. *Eur J Pediatr*. 2003 Jun;162(6):428-9.
- [3] Škrha, J. et al. *Diabetologie*. Praha : Galén, 2009.
- [4] Warram, J.H., Krolewski, A.S., Kahn, C.R. Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N Engl J Med*. 1984 Jul 19;311(3):149-52.
- [5] Hořejší, V. *Základy imunologie*, 4. vyd. . Praha : Triton, 2009. 316 s.
- [6] Bartůňková, J. a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, 2005. 176 s.
- [7] Bartůňková, J., Vernerová, E. *Imunologie a alergologie*. Praha : Triton, 2002. 83 s.
- [8] Oxford Journals
<http://ndt.oxfordjournals.org>
- [9] Gershon, R.K., Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Imunology* 18: 723-737, 1970
- [10] Gershon, R.K., Kondo, K. Infectious immunological tolerance: *Immunology*. 1971 December; 21(6): 903-914.
- [11] Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R. Suppressor T cells. *J Immunology*. 1972 March ;108(3):586-90
- [12] Möller, G. Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol*. 1988 March ;27(3):247-50
- [13] Sakaguchi, S., Sakaguchi, N. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-6
- [14] Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild et al., Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet*. 2001. 27: 68-73
- [15] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299:1057-61

- [16] Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-6
- [17] Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M. et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005;22:329-41
- [18] Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167: 1245-1253, 2001
- [19] Stephens, L. A., Mottet, C., Mason, D. Human CD25+CD4+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 31: 1247, 2001
- [20] Yi, H., Zhen, Y., Jiang, L., et al. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol* 2006;3:189-95.
- [21] Walker, M.R., Kasprowicz, D.J., Gersuk, V.H., et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 2003;112:1437-43.
- [22] Bach, J.F. Autoimmune diseases as the loss of active "self-control". *Ann N Y Acad Sci* 2003;998:161-77.
- [23] Bluestone, J.A., Tang, Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005;17:638-42.
- [24] Koonpaew, S., Shen, S., Flowers, L. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med* 203: 119-129, 2006
- [25] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-352, 2005
- [26] Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W. TGF- β requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+regulatory cells, *J Immunol*, 176, 3321-3329, 2006
- [27] Takeshi, T., Tomoyuki, T., Sayuri, Y. Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25+CD4+ Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-310, July 17, 2000
- [28] Stárka, L., Zamrazil, V. et al. *Základy klinické endokrinologie, 2. rozš. Vyd.* Praha : Maxdorf, c2005. 378 s.
- [29] WHO - Diabetes
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>
- [30] Seissler, J., Scherbaum, W.A. Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(2):133-7. Review.
- [31] Pelikánová, T., Bartoš, V. et al. *Praktická diabetologie, 4. vydání.* Maxdorf, 2010. 743 s.

- [32] Lébl, J., Průhová, Š., Šumník, Z. et al. Abeceda diabetu: příručka pro děti a mladé dospělé, kteří chtějí o diabetu vědět víc. 3., přeprac. a rozš. vyd. Praha : Maxdorf, c2008. 184 s.
- [33] Eisenbarth, G.S. Type 1 Diabetes: Cellular, Molecular & Clinical Immunology <http://www.barbaradaviscenter.org>
- [34] Cinek, O. Molekulární epidemiologie dětského diabetu 1.typu, 2010. <http://www.lmg.cz/cteni/cteni15.pdf>
- [35] Behrman, R.E., Kliegman, R.M., Jenson, H.B. Nelson textbook of pediatrics. Elsevier Science, 2004.
- [36] Cinek, O. Deskriptivní, analytická a genetická epidemiologie dětského diabetu 1. typu <http://www.lmg.cz/cteni/cteni7.pdf>
- [37] Faas, M.M., Bouman, A., Van Nieuwenhoven, A.L.V. Species differences in the effect of pregnancy on lymphocyte cytokine production between human and rat. Journal of leukocyte Biology. 2005;78:946-953.
- [38] Piccinni, M.P., Scaletti, C., Maggi, E. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. J Neuroimmunol. 2000 Sep 1: Review.
- [39] Kumru, S., Boztosun, A., Godekmerdan, A. Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations and serum cytokine concentrations in healthy women. J Reprod Med. 2005 Apr;50(4):246-50.
- [40] Mikael, K., Riitta, V., Suvi, M.V., et al. Environmental Triggers and Determinants of Type 1 Diabetes. Diabetes. December 2005 54:S125-S136
- [41] Kyvik, K.O., Green, A., Beck-Nielsen, H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. Bmj 1995 Oct 7;311(7010):913-7.
- [42] Kaprio, J., et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. Diabetologia, 1992. 35(11): p. 1060-7
- [43] Redondo, M.J., Rewers, M., Yu, L., Garg, S., et al. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. BMJ 318 :698 -702,1999
- [44] Risch, N. Genetics of IDDM: evidence for complex inheritance with HLA. Genet Epidemiol, 1989. 6(1): p. 143-8.
- [45] Cinek, O., Koloušková, S., Pechová, M., et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in children of first-degree relatives of diabetic patients]. Cas Lek Cesk. 2001 Aug;140(16):492-6.
- [46] Lambert, A.P., Gillespie, K.M., Thomson, G., et al. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Aug;89(8):4037-43.

- [47] D'Angeli, M.A., Merzon, E., Valbuena, L.F., et al. Environmental factors associated with childhood-onset type 1 diabetes mellitus: an exploration of the hygiene and over-load hypotheses. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2010 Aug;164(8):732-8.
- [48] Oikarinen, S., Martiskainen, M., Tauriainen, S. et al. Enterovirus RNA in blood is linked to the development of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2011 Jan;60(1):276-9.
- [49] Dotta, F., Censini, S., van Halteren, A.G. et al. Coxsackie B4 virus infection of β cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 20;104(12):5115-20.
- [50] Juhela, S., Hyöty, H., Roivainen, M., et al. T-cell responses to enterovirus antigens in children with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2000 Aug;49(8):1308-13.
- [51] Borch-Johnsen, K., Mandrup-Poulsen, T., Zachau-Christiansen, B. Relation between breastfeeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1984; 2: 1083-1086.
- [52] Virtanen, S., Knip, M. Nutritional risk predictors of β cell autoimmunity and type 1 diabetes at young age. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 1053-1067.
- [53] Schwartz, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990 Jun 15;248:1349-1356
- [54] Miller, J.F., Heath, W.R. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol Rev.* 1993 Jun;133:131-50
- [55] Achenbach, P., Warncke, K., Reiter, J., et al. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics *Diabetes.* 2004 Feb;53(2):384-92.
- [56] Banham, A.H., Powrie, F.M., Suri-Payer, E. FOXP3+ regulatory T cells: current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 2006;36:2832-6.
- [57] Krejsek, J., Kopecký, O. *Klinická imunologie.* Hradec Králové: Nucleus, 2004.
- [58] In't Veld, P., Lievens, D., De Grijse, J. et al. Screening for insulinitis in adult autoantibody-positive organ donors. *Diabetes* 56 :2400 -2404,2007
- [59] Lindley, S., Dayan, C.M., Bishop, A. et al. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92-99, 2005
- [60] Thomas, D., Zaccane, P., Cooke, A. The role of regulatory T cell defects in type 1 diabetes and the potential of these cells for therapy. *Rev Diab Stud* 2: 9-18, 2005
- [61] Vrabelová, Z., Hroteková, Z., Hladíková, Z., et al. CD 127- and FoxP3+ Expression on CD25+CD4+ T Regulatory Cells upon Specific Diabetogenic Stimulation in High-risk Relatives of Type 1 Diabetes Mellitus Patients. *Scandinavian Journal of Immunology,* 2008;67: 404-410.
- [62] Putnam, A.L., Vendrame, F., Dotta, F., Gottlieb, P.A. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 24: 55-62, 2005

- [63] Danese, S., Rutella, S. The Janus face of CD4+CD25+ regulatory T cells in cancer and autoimmunity. *Curr Med Chem* 14: 649-666, 2007
- [64] Program Predikce Diabetu
<http://www.predia.cz>
- [65] Bingley, P.J., Bonifacio, E., Williams, A.J., et al. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes*. 1997 Nov;46(11):1701-10.
- [66] Wenzlau, J.M., Juhl, K., Yu, L. et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 23;104(43):17040-5.
- [67] GE Healthcare Life science
http://www.gelifesciences.com/apatrix/upp00919.nsf/Content/LD_323942189-N216
- [68] Miltenyi Biotec: products & services for biomedical research
<http://www.miltenyibiotec.com>
- [69] Laboratoř AIDS a infekční imunologie
<http://inf3.lf1.cuni.cz/~hrozs/flowcyt1.htm>
- [70] Wikipedia ELISA
<http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>
- [71] MABTECH AS 2011
<http://mabtech.com>
- [72] Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62
- [73] Tsutsumi, Y., Jie, X., Ihara, K., et al. Phenotypic and genetic analyses of T-cell-mediated immunoregulation in patients with Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2006;23:1145-50.
- [74] Michálek, J., Vrábelová, Z., Hroteková, Z., et al. Immune regulatory T cells in siblings of children suffering from type 1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol* 2006;64:531-5.
- [75] Sedláková, N., Praksová, P., Pejchlová, M., et al. Immunoregulatory T cell defects in children with type 1 diabetes. *Cs Pediatr* 2005;60:183-7
- [76] Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109:131-40.
- [77] Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
- [78] Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203:1693-700.

- [79] Harjutsalo, V., Lammi, N., Karvonen, M., et al. Age at onset of type 1 diabetes in parents and recurrence risk in offspring. *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):210-4
- [80] Štechová, K., Špálová, I., Durilová, M. Influence of maternal hyperglycaemia on cord blood mononuclear cells in response to diabetes-associated autoantigens. *Scand J Immunol*. 2009 Aug;70(2):149-58.
- [81] Kheirandish, M., Ebtekar, M., Pourfathollah, A.A., et al. Do preterm cord blood CD4+/CD8+, CD45RA+/RO+ cells demonstrate distinct functional properties compared with their term cord blood counterparts? *Blood* 2007; 4(3):189-197
- [82] Holm, B. C., Svensson, J., Akesson, C., et al. Evidence for immunological priming and increased frequency of CD4+ CD25+ cord blood T cells in children born to mothers with type 1 diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*, 146: 493-502
- [83] Böhmová, K., Hladíková, Z., Černý, M., et al. Cord Blood Cytokine Profile Detection in Neonates with T1D Parents - Monitoring of Cellular Auto-reactivity Using Protein Microarray. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66: 563-571.

Přílohy

		N	Průměr	SD	SE	Minimum	Maximum
Treg	1	12	2,3817	0,93011	0,26850	0,69	3,60
	2	42	2,6871	1,05019	0,16205	0,70	5,10
	3	14	2,3000	1,38453	0,37003	0,30	4,60
	Celkem	68	2,5535	1,10399	0,13388	0,30	5,10
Tlymf	1	12	35,7383	13,43024	3,87698	18,20	61,10
	2	42	31,6512	14,02197	2,16364	8,90	70,80
	3	14	31,9000	17,92579	4,79087	4,20	59,30
	Celkem	68	32,4237	14,65189	1,77680	4,20	70,80
Treg/Tlymf	1	12	6,7283	1,81860	0,52498	3,25	9,72
	2	42	9,2460	3,41955	0,52765	3,16	17,78
	3	14	7,4014	2,64858	0,70786	3,40	14,29
	Celkem	68	8,4219	3,19635	0,38761	3,16	17,78

Tabulka 7: Popisná statistika zastoupení buněčných populací ve sledovaných statistických výběrech. N - počet měření, SD - směrodatná odchylka, SE - standardní chyba měření, Tlymf - T-lymfocyty.

	1 - diabetes 1.typu		2 - zdravá kontrola		3 - gestační diabetes	
	KS Z	Sig.	KS Z	Sig.	KS Z	Sig.
Tregs	0,567	0,905	0,653	0,788	0,749	0,628
Tlymf	0,579	0,891	0,807	0,533	0,490	0,970
Tregs/Tlymf	0,349	1,000	0,663	0,772	0,548	0,925

Tabulka 8: Kolmogorov-Smirnovův test shody rozložení proměnné (buněčné populace) a normálního rozdělení.

	Levenova Statistika	df1	df2	Sig.
Treg	1,911	2	65	0,156
Tlymf	1,503	2	65	0,230
Treg/Tlymf	2,289	2	65	0,109

Tabulka 9: Levenův test pro ověřování shody rozptylu. Df - stupně volnosti, Sig. - signifikace potvrzující/zamítající nulovou hypotézu.

		Míra variability	df	Průměrné čtverce	F	Sig.
Treg	Mezi skupinami	2,004	2	1,002	0,818	0,446
	Uvnitř skupin	79,655	65	1,225		
	Celkem	81,659	67			
Tlymf	Mezi skupinami	160,746	2	80,373	0,367	0,694
	Uvnitř skupin	14222,669	65	218,810		
	Celkem	14383,414	67			
Treg/Tlymf	Mezi skupinami	77,518	2	38,759	4,150	0,020
	Uvnitř skupin	607,000	65	9,338		
	Celkem	684,517	67			

Tabulka 10: Testování shody středních hodnot pomocí metody ANOVA. Tabulka je vytvořená v programu SPSS. Df - stupně volnosti, Sig. - signifikace potvrzující/zamítající nulovou hypotézu.

Proměnná	(I) skupina	(J) skupina (I-J)	Mean Difference	SE	Sig.
Treg	1	2	-0.30548	0.36235	1.000
		3	0.08167	0.43549	1.000
	2	1	0.30548	0.36235	1.000
		3	0.38714	0.34163	0.784
	3	1	-0.08167	0.43549	1.000
		2	-0.38714	0.34163	0.784
Tlymf	1	2	4.08714	4.84190	1.000
		3	3.83833	5.81924	1.000
	2	1	-4.08714	4.84190	1.000
		3	-0.24881	4.56498	1.000
	3	1	-3.83833	5.81924	1.000
		2	0.24881	4.56498	1.000
Treg/Tlymf	1	2	-2.51762	1.00027	0.043
		3	-0.67310	1.20218	1.000
	2	1	2.51762	1.00027	0.043
		3	1.84452	0.94307	0.164
	3	1	0.67310	1.202218	1.000
		2	-1.84452	0.94307	0.164

Tabulka 11: Test pro podrobnější porovnání průměrů prostřednictvím Bonferroniho metody. Signifikantní hodnota je zvýrazněna. SE - standardní chyba měření, Sig. - signifikace potvrzující/zamítající nulovou hypotézu.

Seznam obrázků

1	Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky CD34+ [5].	12
2	Diferenciace subpopulace CD4+ Th lymfocytů.	14
3	Vývoj poruchy β buněk pankreatu [33].	19
4	Schéma rozdělení pupečnickové krve před (A) a po centrifugaci (B) [67].	31
5	Princip metody MACS	32
6	Schéma průtokového cytometru [69].	33
7	Ukázka strategie gatování při primární analýze dat na FACS LSR II.	34
8	Princip metody ELISA.	35
9	Princip metody ELISpot.	36
10	Produkce IFN- γ po stimulaci diabetogenními antigeny.	37
11	Produkce IFN- γ u negativních kontrol.	37
12	Zastoupení naivních a paměťových buněk.	38
13	Zastoupení erytroblastů a aktivovaných T-lymfocytů	39
14	Boxplot - procentuální zastoupení T regulačních buněk.	39
15	Boxplot - procentuální zastoupení Th lymfocytů.	40
16	Boxplot - procentuální zastoupení T regulačních buněk z Th lymfocytů.	40
17	Normální rozdělení hodnot T regulačních buněk	41
18	Normální rozdělení hodnot populace Th lymfocytů	41
19	Normální rozdělení hodnot T regulačních buněk z Th lymfocytů.	42
20	Ukázka výsledku ELISpotu.	42

Seznam tabulek

1	Paralela imunopatologické a fyziologické reakce u jednotlivých typů reakcí.	17
2	Klasifikace diabetu podle ADA [30].	18
3	Diagnóza diabetu 1. typu [30].	19
4	Výskyt autoantilátok při manifestaci T1D [30].	26
5	Parametry vzorků zahrnutých do studie.	30
6	Diabetogenní autoantigeny použité ke stimulaci CBMC.	32
7	Popisná statistika zastoupení buněčných populací	55
8	Kolmogorov-Smirnovův test shody	55
9	Levenův test pro ověřování shody rozptylu.	55
10	Testování shody středních hodnot pomocí metody ANOVA.	56
11	Test pro porovnání průměrů prostřednictvím Bonferroniho metody.	56