

Gdański Uniwersytet Medyczny



**Odpowiedź immunologiczna u dzieci z cukrzycą typu 1
leczonych adoptywnie limfocytami T regulatorowymi
CD3(+)
CD4(+)
CD25(high)
CD127(-)**

mgr Marcelina Grabowska

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

GDAŃSK 2016

*Pracę dedykuję
mojemu mężowi Grzegorzowi
oraz moim synom Jankowi i Frankowi*

Pracę wykonano w Katedrze Immunologii, Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierownictwem:

– Prof. dr hab. med. Piotra Trzonkowskiego – Promotora pracy

Sponsor: Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Skłodowskiej-Curie 3a, 80-210 Gdańsk w ramach programu STRATEGMED1/233368/1/NCBR/2014 Narodowego Centrum Badań i Rozwoju



Ośrodek badawczy: Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku.

Skróty i akronimy używane w pracy:

ADA = (ang. American Diabetes Association) Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne

APC = (ang. antigen presenting cell) komórka prezentująca antygen

BMI = (ang. body mass index) wskaźnik masy ciała

DDI = Dobowa dawka insuliny

FSC = (ang. forward scatter) światło rozproszone na wprost, parametr stosowany w cytometrii przepływowej, opisuje wielkość badanych cząstek (komórek)

GAD = (ang. glutamic acid decarboxylase) dekarboksylaza kwasu glutaminowego

h = godzina

HbA1c = hemoglobina glikowana

HLA = (ang. human leukocyte antigens) antygeny ludzkich leukocytów, nazwa MHC stosowana u ludzi

IAA = (ang. insulin autoantibodies) przeciwciała przeciwinśulinowe IA-2 = (ang. insulinoma-associated protein 2) antygen 2 związany z insulinoma

IL = interleukina

MFI = (ang. mean/median fluorescence intensity) średnia intensywność fluorescencji/ /mediana intensywności fluorescencji (w tekście bliżej zdefiniowano, kiedy opisywano średnią, a kiedy medianę)

MHC = (ang. major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej

MMTT = (ang. mixed meal tolerance test) test tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego, z dużą częstotliwością pobierania próbek

MODY = (ang. maturity onset diabetes of youth) cukrzyca typu dorosłego u osób młodych

NOD = (ang. non-obese diabetic mice) myszy spontanicznie zapadające na cukrzycę pomimo braku otyłości; zwierzęcy model cukrzycy typu 1

PBS = (ang. phosphate-buffered saline) = zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

peptyd C = (ang. connecting peptide) peptyd łączący; część cząsteczki proinsuliny odcinana podczas uwalniania insuliny z trzustki, wraz z hormonem przedostaje się do krwiobiegu

SSC = (ang. side scatter) światło odbite pod kątem 90° i rozproszone bocznie, parametr stosowany w cytometrii przepływowej, opisuje gęstość i liczbę ziarnistości w analizowanych komórkach

T1DM = (ang. Type 1 diabetes) cukrzyca typu 1

Tcm = (ang. central memory T cell) limfocyt T pamięci centralny, immunofenotyp - CD4+CD27+CD45RO+/CD4+CCR7+CD45RA-

TCR = (ang. T-cell receptor) receptor limfocytów

Tem = (ang. effector memory T cell) limfocyt T pamięci efektorowy, immunofenotyp - CD4+CD27-CD45RO+/CD4+CCR7-CD45RA-

Th (ang. T helper cell) = limfocyty pomocnicze – T CD4+

Tn = (ang. naive T cell) limfocyt T naiwny, immunofenotyp - CD4+CD27+CD45RO-/CD4+CCR7+CD45RA+

TNF α = (ang. tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworów α

WHO = (ang. World Health Organization) Światowej Organizacja Zdrowia

Spis treści

I. Wstęp	15
I.1. Cukrzyca typu 1 – wprowadzenie	15
I.1.2. Etiologia i Patogeneza	20
I.1.2.1. Uwarunkowania genetyczne cukrzycy typu 1 – związek z HLA	22
I.1.3. Diagnostyka T1D	25
I.1.3.1. Peptyd-C – oznaczenie destrukcji komórek β	26
I.1.3.2. Autoprzeciwciała w diagnostyce cukrzycy typu 1	27
I.2. Zaburzenia mechanizmów immunologicznych w rozwoju cukrzycy typu 1	30
I.3. Limfocyty T regulatorowe (Tregs)	31
I.3.1. Rodzaje limfocytów T regulatorowych	33
I.3.1.1. Markery limfocytów T regulatorowych (Tregs)	34
I.3.1.1.1. Jądrowy Czynniki Transkrypcyjny P3 (FoxP3)	35
I.3.1.1.2. Podjednostka α receptora dla IL-2 (CD25)	36
I.3.1.1.3. Antygen CD127 – receptor dla IL-7	36
I.3.1.1.4. Antygen CD45RA	37
I.3.1.1.5. Częsteczką CD62L (L-selektyna)	38
I.3.2.1. Rola limfocytów Tregs w patogenezie cukrzycy	39
I.3.2. Limfocyty Tregs w terapii	40
II. Cele i założenia pracy	45
III. Materiały i Metody	47
III.1. Kryteria doboru badanych osób	47
III.2. Kryteria wyłączenia z grupy badanej	49
III.3. Protokół badawczy	50
III.3.1. Obserwacja	51
III.4. Materiały	52
III.4.1. Odczynniki	52
III.4.2. Przeciwciała monoklonalne używane w pracy	53
III.4.3. Odczynniki używane do oznaczenia cytokin	55
III.4.4. Odczynniki używane w pracy do oznaczenia autoprzeciwciał	55
III.4.4. Materiały jednorazowego użytku używane w pracy	55
III.5. Metody	57
III.5.1. Izolacja DNA metoda kolumnową – postępowanie	57
III.5.2. Typowanie HLA metodą PCR-SSP	58

III.5.2.1. Typowanie HLA-A, DRB1, DQB1 na poziomie niskiej rozdzielczości	58
III.5.3. Cytometria przepływowa	61
III.5.3.1. Izolacja PBMC.....	61
III.5.3.2. Barwienie PBMC.....	62
III.5.4. Uzyskiwanie surowicy.	65
III.5.4.1. Oznaczenie autoprzeciwciał	66
III.5.4.2. Oznaczenie cytokin za pomocą techniki Multiplex na aparacie Luminex.	71
III.6. Analiza statystyczna.....	72
IV. Wyniki.....	75
IV.1. Ocena funkcji komórek β	75
IV.2. Poziom Tregs <i>in vivo</i>	80
IV.3. Poziom Tregs podanych w preparacie limfocytów Tregs <i>in vivo</i>	82
IV.4. Subpopulacje Tregs <i>in vivo</i>	83
IV.5. Limfocyty Tregs i IL-2.....	87
IV.6. Markery immunologiczne w ocenie progresji choroby	88
IV.7. Antygeny HLA.....	92
IV.7. Autoprzeciwciała	98
V. Dyskusja.....	101
V.1. Efekt metaboliczny leczenia adoptywnego limfocytami Tregs.	102
V.2. Fenotyp i analiza limfocytów T regulatorowe <i>in vivo</i>	103
V.3. Stężenia cytokin podczas leczenia limfocytami Tregs	106
V.4. Antygeny zgodności tkankowej HLA.....	107
V.5. Autoprzeciwciała	108
V.6. Leczenie adoptywne limfocytami Tregs.	109
VI. Streszczenie	117
VII. Abstract	119
Spis rysunków	121
Spis tabel	123
Bibliografia.....	124
PODZIĘKOWANIA	135

I. Wstęp

I.1. Cukrzyca typu 1 – wprowadzenie.

Cukrzyca (ang. Diabetes mellitus, DM) należy do grupy chorób przewlekłych niezakaźnych. Jest to choroba metaboliczna, która charakteryzuje się przewlekłe zwiększonym stężeniem glukozy wynikającym z nieprawidłowego wydzielania i działania insuliny. Może prowadzić do licznych powikłań w tym do kwasicy, niewydolności nerek, chorób serca, udaru mózgu i ślepoty (Canivell i inni, 2014)

Na podstawie danych WHO określających występowanie cukrzycy w różnych środowiskach i różnych szerokościach geograficznych cukrzycę zalicza się do współczesnych globalnych chorób społecznych i cywilizacyjnych. Świadectwem wagi i powszechności tego problemu jest rezolucja Zgromadzenia Głównego Narodów Zjednoczonych przyjęta w grudniu 2006 r., która cukrzycę wliczyła do grupy chorób zagrażających ludzkości o zasięgu epidemii. (Chobot i inni, 2009)

Według klasyfikacji Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego wyróżniamy 4 postacie cukrzycy:

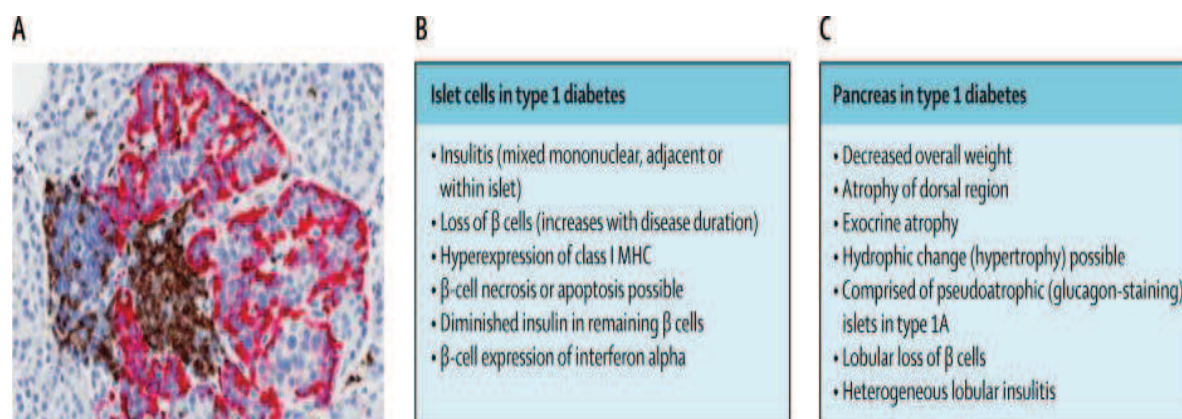
1. cukrzyca typu 1 (autoimmunologiczna, idiopatyczna),
2. cukrzyca typu 2 (defekt progresywnego wydzielania insuliny prowadzący do insulinooporności),
3. cukrzyca ciężarnych (ang. Gestational diabetes mellitus, GDM, która jest diagnozowana w drugim lub trzecim trymestrze ciąży) oraz
4. inne specyficzne typy cukrzycy, takie jak: genetyczne defekty czynności komórki β , genetyczne defekty działania insuliny, choroby zewnątrzwydzielniczej części trzustki, endokrynopatie, leki i substancje chemiczne, infekcje, rzadkie postacie cukrzycy wywołane procesem immunologicznym oraz inne uwarunkowane genetycznie zespoły związane z cukrzycą.

Do innych specyficznych typów cukrzycy wynikających z określonych mutacji dla konkretnych genów zaliczamy np. tzw. cukrzyce monogenową lub inaczej cukrzycę dorosłych u osób młodych (MODY, ang. maturity-onset diabetes of the young) ujawniająca się zazwyczaj do 25 r.ż.. Najpowszechniej występującymi mutacjami w tej postaci cukrzycy jest mutacja genów dla glukokinazy, czynnika jądrowego

hepatocytów (HNF) -1 α , dla czynnika promotora insuliny (IRF). (Polskie Towarzystwo Diabetologiczne, 2016)

Cukrzyca typu 1 (ang. DM1, T1D- ang. Type 1 diabetes), nazywana dawniej cukrzycą insulinozależną lub młodzieńczą) powstaje w wyniku procesu autoimmunologicznego, czyli niszczenia komórek beta (β) trzustki przez własny układ odpornościowy. W ciągu ostatnich 40 lat częstość występowania T1D całym światem wzrasta o 3-5% rocznie (Rewers i inni, 2009). Stanowi ona obecnie 5-10 % wszystkich zachorowań na cukrzycę (Maahs i inni, 2010) (Atkinson i inni, 2014).

Komórki beta (β) produkujące insulinę znajdują się w wyspach trzustkowych tzw. wyspach Langerhansa. Badania histologiczne trzustki pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 wykazały naciek wysp Langerhansa przez komórki jednojądrzaste, które później zostały zidentyfikowane jako limfocyty T i B, monocyty / makrofagi i komórki NK (rys. 1). Obecnie proces ten często określanym jest jako zapalenie wysp (*insulitis*). Pełnoobjawowy obraz choroby występuje po utracie 90-95% komórek β , natomiast rozpoznanie cukrzycy typu 1 ma zwykle miejsce, gdy w przybliżeniu dwie trzecie tych komórek jest zniszczone (Atkinson i inni, 2014) (Canivell i inni, 2014). W wyniku zniszczenia wysepek dochodzi do bezwzględnego braku insuliny lub jej produkcja nie wystarcza do utrzymania prawidłowego stężenia glukozy we krwi.



Rysunek 1. Patologiczne cechy trzustki w cukrzycy typu 1: Naciek wyspy trzustkowej u pacjenta z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1. Immunohistochemia pokazuje wewnątrz wysp obecność komórek CD3-dodatnich (brązowy) i komórek alfa produkujących glukagon (różowy). (Atkinson i inni, 2014)

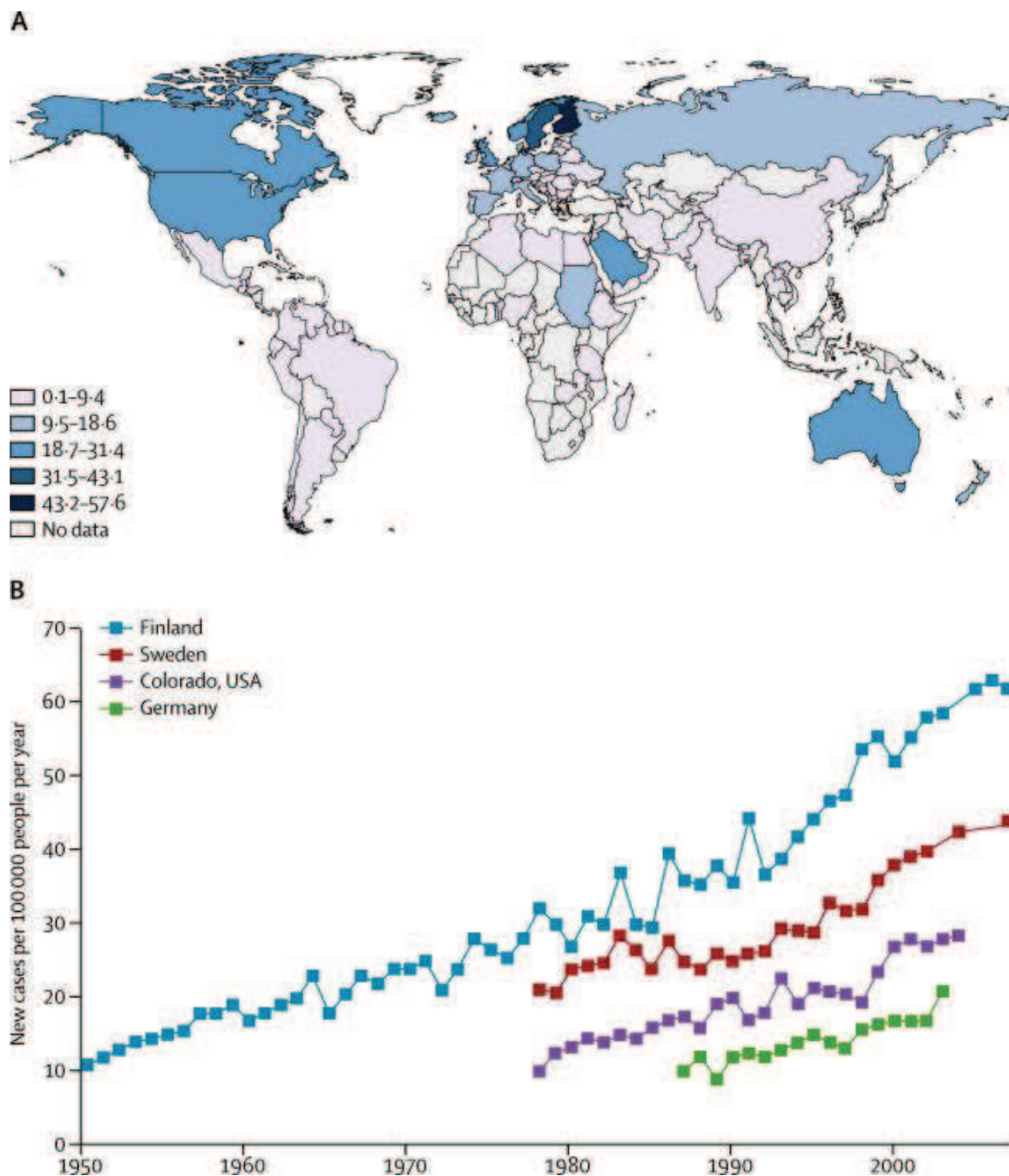
W zasadniczej większości T1D dotyczy dzieci. Początek choroby jest zazwyczaj nagły, a objawy narastają w ciągu kilku dni. Jediną formą leczenia T1D jest insulinoterapia. Niedobór insuliny u pacjentów z cukrzycą typu 1 wymaga ciągłego podawania tego hormonu do końca życia chorego.

Cukrzyca typu 1 może również rozwinąć się u dorosłych. Późno ujawniającą się cukrzyca typu I u dorosłych (ang. latent autoimmune diabetes in adults, LADA) jest wolno postępująca postacią cukrzycy autoimmunologicznej, która może początkowo nie wymagać podawania insuliny i może być błędnie zaklasyfikowana jako cukrzyca typu 2 (Laugesen, 2015). Ta postać cukrzycy ujawnia się zwykle u osób w wieku od 25–30 do 45–50 r.ż.

I.1.1. Epidemiologia

Co roku diagnozowanych jest ok 86 000 nowych przypadków cukrzycy typu 1 (T1D). Zapadalność wzrasta na całym świecie, a wiek rozpoznania choroby obniża się. Z raportu przygotowanego w 2015 przez Międzynarodową Federację ds. Cukrzycy, IDF (ang. International Diabetes Federation) wynika, że w grupie wiekowej 0-14 lat na świecie jest około 542 000 dzieci cierpiących na T1D z czego 25% to mieszkańcy Europy. W Polsce na 1000 dzieci (0-14 lat) przypada 6,4 dzieci chorych na T1D. Według najnowszych danych w Europie największa zapadalność występuje w Finlandii, która ma rocznie 62,3 nowych przypadków na 100.000 dzieci. Kraje europejskie, które mają największy udział w ogólnej liczbie osób cierpiących na T1D u dzieci są Wielka Brytania, Rosja i Niemcy. Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna prognozuje wzrost o 19% zachorowań na cukrzycę w Polsce do 2035 roku. Analizując dane NFZ na temat pacjentów leczonych insuliną w 2009 roku było ich 595 252, w 2010 – 613 700, a w 2011 – 627 971, co oznacza wzrost w ciągu dwóch lat o 5,5%. W tym samym okresie (2009-2011) wzrost kosztów leczenia insuliną wzrósł z 564 081 177zł do 658 063 920 zł czyli aż o 17%.

Duże badania potwierdziły dalszy wzrost zachorowalności na T1D w Europie od 1989 do 2008 roku o około 3% -4% rocznie (Patterson i inni, 2012).



Rysunek 2. Częstość występowania cukrzycy typu 1 u dzieci w wieku 0-14 lat, zależna od rejonu geograficznego i czasu. (A) szacowaną częstością występowania cukrzycy typu 1, wg. regionu, w 2011r. (B) trendy czasowe oparte na częstości występowania cukrzycy typu 1 u dzieci w wieku 0-14 lat na obszarach o wysokim lub pośrednim wskaźniku choroby (Atkinson i inni, 2014).

T1D może rozwinąć się w każdym wieku, ale rzadko odbywa się to w pierwszym roku życia, a w szczególności w pierwszych 6 miesiącach życia. Zaobserwowano, iż największa zapadalność w grupie dziewcząt przypada na okres 5-9 lat, a w grupie chłopców w przedziale wiekowym 10-14 lat (rys. 2) (Tuomilehto, 2013).

Zachorowalność w Polsce podwaja się co 10 lat (Jarosz-Chobot i inni, 2011). Wskaźnik zapadalności na cukrzycę typu 1 w populacji wieku rozwojowego do lat 14 w Polsce wykazuje różnice regionalne i waha się w ciągu ostatnich lat od 5,0/100 tys. w makroregionie lubelskim i 6,18/100 tys. w województwie rzeszowskim do 9,2/100 tys. w województwie pomorskim i regionie łódzkim, wykazując stały, systematyczny wzrost w kolejnych latach. T1D w populacji wieku rozwojowego ujawnia się najczęściej w okresie przedpokwitaniowym i w okresie pokwitania, częściej u dziewcząt, przy najniższej zachorowalności w miesiącach letnich i najwyższej na przełomie jesieni i zimy (Bodalski, 2003). Badania te mogłyby sugerować sezonową zmienność T1D lecz obecnie wiadomo iż częstsze jej diagnozowanie w okresie jesienno-zimowym, jest skutkiem częstszych badań lekarskich, które mają miejsce w tym właśnie czasie z powodu infekcji (Gandhi Forouhi i inni, 2014). Ponadto większość publikacji wskazuje, iż choroby o podłożu autoimmunologicznym znacznie częściej dotyczą kobiet, natomiast w przypadku cukrzycy typu 1 występuje nieznaczna przewaga chłopców i mężczyzn (Hansen i inni, 2015)

I.1.2. Etiologia i Patogeneza

Etiologia i patogeneza cukrzycy typu 1 (T1D) od lat jest przedmiotem intensywnych badań. Na początku lat 70 XX wieku zwrócono uwagę na uwarunkowania genetyczne i środowiskowe.

Za udziałem genów w rozwój T1D przemawia fakt, że w wieku 60 lat, 65% identycznych bliźniąt probantów T1D rozwinię T1D. Ponadto, dzieci urodzone w rodzinach w których wystąpił przypadek cukrzycy typu 1 występuje 5% ryzyko pojawienia się T1D do 20 r.ż., w porównaniu z 0,3% ryzykiem dla dzieci bez pozytywnego wywiadu rodzinnego (Bonifacio i inni, 2010).

Dotknięty chorobą T1D członek rodziny	Prawdopodobieństwo wystąpienia T1D
Pierwszy stopień pokrewieństwa (ogólnie)	5-6%
Matka	2%
Ojciec	7%
Bliźnięta monozygotyczne	30-50%
Bliźnięta dizygotyczne	6-10%

Tabela 1. Prawdopodobieństwo wystąpienia T1D wśród najbliższej rodziny chorego (Tuomilehto, 2013)) (Hansen i inni, 2015).

Jednak zdecydowana większość chorych na T1D nie posiada krewnego pierwszego stopnia obciążonego tą chorobą.

Istotnym czynnikiem predysponującym do wystąpienia T1D jest zjawisko mimikry molekularnej, czyli podobieństwa antygenów człowieka do wybranych białek wirusów, roślin i zwierząt.

U 15% pacjentów ze zdiagnozowaną T1D wykazano w limfocytach obecność genomu wirusa CMV oraz w surowicach występowanie autoprzeciwciał skierowanych przeciwko wysepkom trzustkowym. To mogło sugerować autoimmunizacyjny charakter choroby oraz związek infekcji wirusowej z tym schorzeniem (Roep i inni, 2002).

Badania Honeymana i wsp. wskazują na istnienie molekularnego podobieństwa między fragmentami fosfatazy tyrozynowej, a głównym immunogenem rotawirusa (RV), jakim

jest białko VP7. Uważa się, że podobieństwo między sekwencją aminokwasową antygeny gospodarza (IA-2) i białkiem wirusa (VP7) prowadzi do krzyżowej reaktywności komórek T, której skutkiem jest przerwanie tolerancji immunologicznej prowadzące do choroby autoimmunizacyjnej. Stwierdzono również, że wirusowe białko VP7 wykazuje 57% identyczności i 97% podobieństwa do dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD65) (Honeyman i inni, 2010).

Do powstawania autoprzeciwciała GAD65 dochodzi najprawdopodobniej na skutek prezentowania przez HLA-DR3 limfocytom T CD4+ fragmentu wirusowego białka UL57, wykazującego molekularne podobieństwo do GAD65. Badania z wykorzystaniem autoreaktywnych limfocytów T wykazały, że limfocyty T wiążą się z determinantą antygenową wirusowego białka w obrębie krótkiej sekwencji aminokwasowej (Hiemstra i inni, 2001).

Lenmark zwraca uwagę na zjawisko insulinooporności, które dotyczy nieco starszych pacjentów ze świeżo wykrytą cukrzycą typu 1, u których procesy autoimmunologicznej destrukcji komórek β przebiegają wolniej i u których pojawiają się procesy insulinooporności związane między innymi z burzą hormonalną okresu pokwitania, co może się wiązać również z podwyższonym stężeniem peptydu C (Lernmark, 2013).

Badania wykazały niejednoznaczną rolę zwiększenia masy ciała, BMI i insulinooporności, jako czynników predysponujących do rozwoju T1D. Zwiększona prędkość wzrostu była najlepszym wskaźnikiem progresji do T1D w dwóch badaniach (D'Angeli i inni, 2010), (Lamb i inni, 2009).

W związku z tym, iż T1D jest bardziej powszechna na północy, naukowcy zasugerowali, że poziom witaminy D może mieć wpływ na rozwój choroby. Zaobserwowano, że stężenie krążącej witaminy D u dzieci i młodzieży z T1D zmienia się sezonowo i jest znacznie mniejsze niż w grupie kontrolnej (Cooper i inni, 2011). Hipoteza ta nadal wymaga potwierdzenia.

Ponadto wśród czynników środowiskowych, które mogą wpływać na rozwój cukrzycy wymienia się również: zbyt krótki okres karmienia piersią, wczesne rozpoczęcie karmienia niemowląt mlekiem krowim lub jego mieszankami, dietę bogatą w gluten, wprowadzanie do diety produktów zbożowych, zwyczajnie żywieniowe, takie jak stosowanie sztucznych substancji słodzących, ekspozycję na związki toksyczne (N-nitrozopochodne), czynniki stresogenne, niedobór witaminy D3, jak również poprawę

higieny i opieki zdrowotnej. Do czynników środowiskowych o działaniu ochronnym zalicza się: karmienie piersią co najmniej przez pierwsze 6 miesięcy, szczepienia ochronne, wczesna suplementacja witaminy D3, dieta bogata w kwasy tłuszczowe wielonienasycone Ω 3,6, współistnienie chorób atopowych, wczesny kontakt z czynnikami infekcyjnymi (Barbeau i inni, 2007).

Podsumowując, istotną rolę w większej częstości występowania T1D odgrywają różnorodne czynniki środowiskowe, w tym zakażenia, dieta, ekspozycja na witaminę D3, zanieczyszczenia środowiska, zwiększona prędkość wzrostu, otyłość i oporność na insulinę. Jednak ostateczne czynniki przyczynowe nie są znane (Canivell i inni, 2014).

1.1.2.1. Uwarunkowania genetyczne cukrzycy typu 1 – związek z HLA

Rozwój T1D jest związany z nosicielstwem konkretnych genów. Podatność ta jest związana głównie z genotypami HLA DR i DQ oraz w mniejszym stopniu z wieloma innymi *loci*. Najnowsze badania genetyczne w tym badania mapowania genów rzucają nowe światło na temat możliwych początków T1D wskazując potencjalne choroby- istotne szlaki biologiczne (Todd, 2010). Tło genetyczne może również wpływać na reakcje na bodźce środowiskowe (Atkinson i inni, 2014).

Główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC) zlokalizowany jest na krótszym ramieniu chromosomu 6 (6p21.1-21.3) obejmuje fragment łańcucha DNA o długości ok. 4 mln. par zasad, który zawiera 200 genów. Obszar MHC dzieli się na 3 regiony: MHC klasy I, II oraz III. Geny głównego układu zgodności tkankowej kodują cząsteczki, nazwane u ludzi antygenami zgodności tkankowej (ang. human leukocyte antigen, HLA), które zlokalizowane są w regionie MHC klasy I i II. Geny HLA klasy I i II, są wysoce polimorficzne i składają się z wielu różnych form alelicznych (Pociot i inni, 2002) (Notkins, 2002).

W związku z istnieniem udokumentowanego związku między ekspresją niektórych antygenów/alleli HLA i częstości występowania chorób, głównie o charakterze autoimmunizacyjnym, geny głównego układu zgodności tkankowej mogą być używane jako markery genetyczne podatności na rozwój różnych chorób w tym T1D. Przyczyna tego zjawiska nie jest do końca znana, ale wiadome jest iż sama ekspresja cząsteczek HLA nie jest przyczyną choroby, a jedynie może być czynnikiem sprzyjającym jej

rozwojowi. W szeregu publikacji wykazano występowanie charakterystycznego wzoru haplotypów MHC wśród różnych grup etnicznych i w kohortach pacjentów z chorobami o podłożu autoimmunologicznym (Zembala i inni, 2001). Określając prawdopodobieństwo wystąpienia choroby skojarzonej z HLA należy zawsze wziąć pod uwagę czynniki pozagenetyczne, np. epigenetyczne.

Najczęstszym szerokim haplotypem charakterystycznym dla populacji europejskiej jest: A*01-C*07:01-B*08-DRB1*03-DQB1*02 zwany konserwatywnym haplotypem 8.1 (8.1AH). Stwierdzono, że 8.1AH jest związany ze zwiększoną częstością lub cięższym przebiegiem klinicznym chorób autoimmunizacyjnych i chorób zakaźnych. W grupie osób z pochodzenia europejskiego haplotyp ten jest związany z większą częstością zachorowania na T1D, zespół Sjögrena, nużliwość mięśniową, celiakię i toczeń układowy.

W przypadku cukrzycy typu 1 najsilniejszą asocjację pomiędzy ryzykiem jej wystąpienia, a obecnością konkretnych HLA obserwuje się w obrębie *loci* DRB1-DQA1-DQB1. Największym prawdopodobieństwem wystąpienia cukrzycy typu 1 określa się przez obecność specyficznego heterozygotycznego genotypu, składającego się z następujących alleli:

- HLA-DRB1*03:01,DQA1*05:01,DQB1*02 na jednym chromosomie oraz
- HLA-DRB1*04:01/02/05/08,DQA1*03:01,DQB1*03:02/04 lub DQB1*02 na drugim chromosomie.

Genotyp ten określa się mianem DR3/DR4 (Noble i inni, 2011).

Ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 1 jest znacznie większe w przypadku heterozygot utworzonych przez te dwa haplotypy niż dla któregośkolwiek z homozygot (DR3/DR3 lub DR4/DR4) (Noble i inni, 2011).

Ponad 90% pacjentów z cukrzycą typu 1 posiada DR3-DQ2 lub DR4-DQ8 (Erlich i inni, 2008).

Udowodniono, że obecność alleli DRB1*04:01 oraz DQB1*03:02 zwiększa ryzyko wystąpienia T1D aż 8,5 krotnie. Już w latach 80-tych ubiegłego wieku wskazywały że obecność antygeny DQ8 (DQB1*03:02) bądź DQ7 (DQB1*03:01) w obrębie haplotypu DR4 pozwala oszacować ryzyko wystąpienia choroby (Ronningen i inni, 1989).

Dodatkowo przydatnym w prognozowaniu T1D może być *locus* DPB1 HLA klasy II w szczególności allele DPB1*04:02, DPB1*03:01 i DPB1*02:02 (Noble i inni, 2011).

Obecnie znane są już również antygeny HLA wykazujące silne działanie ochronne przed rozwojem T1D, np. haplotyp:

- DR2, HLA-DRB1*15:01, DQA1*01:02, DQB1*06:02 (Valdes i inni, 2005)
- DRB1*04:03-DQB1*03:02;
- HLA-DRB1*11:04-DQA1*05:01-DQB1*03:01;
- DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03 oraz
- HLA-DRB1*14:01-DQA1*01:01- DQB1*05:03 (Noble i inni, 2011)

W badaniach przeprowadzonych w 2013 roku przez M. H. Black, J. M. Lawrence i wsp. wykazano, że obecność wielu konkretnych haplotypów DRB1, DQB1 charakterystycznych dla cukrzycy typu 1 zależy od rasy/ pochodzenia etnicznego z wyjątkiem haplotypu DRB1* 0301-DQB1* 0201. Ten ostatni pojawiał się równie często w każdej przebadanej grupie młodzieży ze świeżo wykrytą cukrzycą typ u 1 (Black i inni, 2013).

Związek HLA z cukrzycą typu 1 wykazano również w klasie I w *locus* HLA-A i HLA-B w szczególności obecność antygeny HLA-B39, który został uznany za ważny czynnik ryzyka. Natomiast antygen HLA-A*02 zwiększał ryzyko u osób posiadających haplotyp DR3/4-DQ8 (Rables i inni, 2002).

Najbardziej znaczącymi antygenami w *locus* HLA-B dla T1D są allele: B*57:01 (ochronny) i B*39:06 (predysponujący). Inne istotne dla T1D allele „predysponujące” to: A*24:02, A*02:01, B*18:01, oraz C*05:01 natomiast inne wymieniane w publikacjach allele ochronne to: A*11: 01, A*32: 01, A*66: 01, B*07:02, B*44,03, B*35:02, C*16:01, oraz C* 04:01 (Noble i inni, 2011).

Obecne propozycje badań przesiewowych w kierunku T1D opierają się na znajomości genotypu HLA-DR,DQ i innych *loci* HLA, z wywiadem rodzinnym oraz przesiewowymi badaniami na obecność autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych. Dzięki tym informacjom można zidentyfikować większość dzieci zagrożonych T1D przed wystąpieniem choroby. W ostatnich latach przeprowadzono w tym celu badania, w których próbowano ustalić liczbę polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP), za pomocą których można byłoby łatwo określić z większą dokładnością odpowiednie HLA-DR, DQ dla T1D, i w których można by wyróżnić haplotyp o najwyższym ryzyku wystąpienia T1D DR4

(DR4-DQ8), jak i niezwiązany z tą chorobą haplotyp DR4-DQB1*03:01 (Nguyen i inni, 2013). Takie badania pozwoliłyby na poprawę przewidywania rozwoju cukrzycy typu 1 z wybranych kohort zagrożonych dzieci (Winkler i inni, 2014).

I.1.3. Diagnostyka T1D

Przed 200 laty cukrzycę rozpoznawano na podstawie stężenia glukozy w moczu, a w latach późniejszych także na podstawie stężenia glukozy we krwi. Do końca lat 70 ubiegłego wieku nie było jednolitych kryteriów diagnostycznych ani klasyfikacji cukrzycy. Obecnie Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne ze Światową Organizacją Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) przedstawiło następujące kryteria rozpoznania cukrzycy: badanie poziomu hemoglobiny glikowanej HbA1c $\geq 6.5\%$ lub badanie glikemii na czczo (8 – 14 godzin bez spożywania posiłków), gdzie wartość glikemii przekracza ≥ 126 mg /dL (7,0 mmol/L) lub wykonanie testu doustnego obciążenia glukozą (ang. oral glucose tolerance test, OGTT), gdzie wartość glukozy w osoczu 2 godziny po spożyciu 75-g glukozy rozpuszczonej w wodzie przekracza ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol /L) lub kryterium badania glikemii przygodnej (próbka krwi pobrana w dowolnej porze dnia, niezależnie od spożytego posiłku) u pacjenta z klasycznymi objawami hiperglikemii gdzie oznaczone stężenie glukozy w osoczu ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/L) (Canivell i inni, 2014).

W najnowszych zaleceniach Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) dokonano zmian w celach glikemicznych dla osób z cukrzycą typu 1, uznając wartość HbA1c $\leq 6,5\%$ za wartość docelową, o ile nie wiąże się to ze zwiększeniem ryzyka niedocukrzeń czy pogorszeniem jakości życia pacjenta. W pozostałych przypadkach celem terapeutycznym powinno być osiągnięcie HbA1c $\leq 7,0\%$. Docelowa wartość glikemii na czczo i przed posiłkami w samokontroli uległa zmianie z 70–110 mg/dl na 80–110 mg/dl. W Stanach Zjednoczonych i niektórych krajach Europy w kryteriach diagnostycznych uwzględniono wartość HbA1c. Obecnie Polskie Towarzystwo Diabetologiczne nie zaleca stosowania oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c) do diagnostyki cukrzycy, ze względu na brak wystarczającej kontroli jakości metod laboratoryjnych w Polsce oraz nieustaloną wartość decyzyjną (odcięcia) HbA1c

w rozpoznaniu cukrzycy dla polskiej populacji (Polskie Towarzystwo Diabetologiczne, 2016).

Rozpoznanie cukrzycy typu 1 w wieku dziecięcym i młodzieńczym nie jest trudne jeśli spełnione jest jedno z powyżej wymienianych kryteriów oraz występują objawy kliniczne pod postacią: zwiększonego pragnienia, zwiększonej ilości oddawanego moczu, ubytku masy ciała, a w przypadku dłuższej trwającego stanu nierozpoznanej choroby również śpiączki ketonowej. Potwierdzeniem rozpoznania cukrzycy typu 1 są badania immunologiczne i biochemiczne (Myśliwiec, 2007).

Warto nadmienić, iż pojawiają się nowe predykcyjne markery biochemiczne w T1D, np.: profile lipidowe. Do takich markerów należą: fosfatydylocholina, która wykazuje niskie wartości przy urodzeniu i zmniejszone stężenia triglicerydów oraz fosfolipidów, a w kilka miesięcy przed serokonwersją autoprzeciwciał wzrasta poziom lizofosfatydylocholiny prozapalnej.

1.1.3.1. Peptyd-C – oznaczenie destrukcji komórek β .

W 1967 roku Steiner i wsp. wykazali istnienie jednołańcuchowego polipeptydu - proinsuliny, który w wyniku działania enzymów proteolitycznych rozszczepiany jest do dwułańcuchowej cząsteczki insuliny i jednołańcuchowego polipeptydu łączącego (ang. connecting peptide), tak zwanego peptyd C. Insulina i peptyd C magazynowane są w ziarnistościach komórek, a następnie wydzielane do krwioobiegu w stosunku equimolarnym. Oznaczenie stężenia peptydu C jest obecnie najlepszą metodą na poznanie rzeczywistej ilości insuliny produkowanej przez trzustkę. Metaboliczne zmiany w naturalnym przebiegu cukrzycy typu 1 są oznaczone spadkiem wczesnej odpowiedzi peptydu C przez co najmniej 2 lata przed wystąpieniem pełnoobjawowej T1D (Sosenko i inni, 2010).

W cukrzycy typu 1 na skutek procesów autoimmunizacyjnych i destrukcji komórek β obniżenie stężenia peptydu C stwierdza się zwykle już w chwili rozpoznania choroby. Z uwagi na różnice w dynamice tego procesu dalsze zmniejszanie się tego stężenia postępuje z różną szybkością (Palmer, 2009).

Omówienie piśmiennictwa na temat zastosowania pomiarów peptydu C przedstawili ostatnio Jones i Hattersley. Autorzy podkreślają przydatność tego badania do różnicowania między cukrzycą typu 1 a cukrzycą typu 2, a także między cukrzycą typu 1 a cukrzycą typu MODY (Jones i inni, 2013).

Do ujawnienia się cukrzycy typu 1 dochodzi przy destrukcji 80–90% komórek β , zasadą jest to, że w chwili rozpoznania cukrzycy typu 1 stężenie peptydu C jest obniżone, przy czym stopień tego obniżenia jest zróżnicowany. Wiele czynników wpływa na dynamikę obniżania się stężenia peptydu C w pierwszych dwóch latach po ujawnieniu się cukrzycy, wśród nich wymienia się wiek w chwili rozpoznania choroby, stopień kontroli glikemii, geny, a także BMI. (Otto-Buczowska, 2014)

Bodalski i wsp. wykazali, że u pacjentów z wyższymi stężeniami peptydu C w momencie rozpoznania cukrzycy remisja częściowa występowała znacznie częściej (61%) niż u chorych z niskim stężeniem peptydu C (37%) (Bodalski, 2003).

W innych publikacjach zwraca się uwagę na wyższe stężenie peptydu C u dziewcząt w pierwszym roku trwania choroby (Schiffrin i inni, 1992).

Palmer i wsp. zwracają uwagę, że dla dalszego przebiegu cukrzycy korzystne jest stężenie peptydu C w chwili rozpoznania choroby $> 0,6$ ng/ml. Autorzy ci podkreślają, że pacjenci z takim stężeniem peptydu C w chwili rozpoznania przez wiele następnych lat mają lepszą kontrolę metaboliczną i znamienne niższe wartości HbA1c oraz mniejszą skłonność do powikłań (Palmer, 2004).

Oznaczenie C-peptydu znalazło zastosowanie jako bezpośrednia ocena zniszczenia komórek β trzustki w procesie autoimmunologicznym. W przeciwieństwie do insuliny nie jest on degradowany w wątrobie. Dzięki czemu można dokładnie określić, ile insuliny zostało wyprodukowane przez trzustkę i uwolnione do krwi. Jako normę przyjmuje się stężenie na czczo 1,2–1,8 ng/ml (400–600 pmol/l lub 0,36–0,7 nmol/l). Po posiłku lub po obciążeniu glukozą poziom ten ulega podwyższeniu.

1.1.3.2 Autoprzeciwciała w diagnostyce cukrzycy typu 1.

Odpowiedź humoralna (limfocyty B) związana z wytwarzaniem autoprzeciwciał przeciwko antygenom komórek β odgrywa ważną rolę w procesie destrukcji wysp trzustkowych. Przeciwciała p/wyspowe (ICA) były opisane jako pierwsze, ale zostały zastąpione bardziej specyficznymi, w tym p/insulinowymi (IAA), p/dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GADA), p/fosfatazie tyrozynowej 2 (IA-2), a ostatnio, p/transporterom cynku Slc30A8 (ZnT8A) (Canivell i inni, 2014).

T1D jest określona przez obecność jednego lub więcej takich autoimmunologicznych markerów (Lebastchi i inni, 2012).

Przeciwciała przeciwiinsulinowe IAA pojawiają się jako pierwsze, są oznaczane w celu przewidywania wystąpienia cukrzycy typu 1, zwłaszcza u dzieci w wieku poniżej pięciu lat.

U młodszych osób, ryzyko zbliża się nawet do 90% w ciągu 7 lat (Orbana i wsp. 2009). Następnie pojawiają się przeciwciała ICA, GAD, IA-2 oraz ZnT8A (Wenzlau i inni, 2007).

Przeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) wykrywa się u 70–90% osób przed wystąpieniem cukrzycy typu 1 i w początkowym okresie choroby, przy czym przeważają przeciwciała anty-GAD65. Przeciwciała anty-GAD utrzymują się dłużej niż pozostałe typy przeciwciał wykrywane u chorych na cukrzycę typu 1, a ponadto przypisuje się im znaczenie w rozwoju nefropatii cukrzycowej (Hansen i inni, 2015).

Przeciwciała przeciw wyspom trzustki (ICA) zostały opisane w 1974 r. jako pierwsze przez Bottazzo i wsp. (Bottazzo i inni, 1974). Należą do klasy IgG, a ich miano zmniejsza się po ujawnieniu się choroby. Stwierdza się je u 60–80% badanych chorych z niedawno wykrytą cukrzycą, a po roku ich miano maleje i są wykrywalne u 15–20% chorych.

	Antygen	Czułość	Specyficzność	Obecność na początku T1D	Adnotacja
ICA	Wyspy trzustkowe	70%	99%	70-90%	Pojedynczo dodatni podobna predykcyjność; w połączeniu ≥ 3 zwiększają ryzyko wystąpienia T1D do około 90%; niezależne od wieku. Odrotna korelacja z wiekiem; Spadki szybko po rozwinięciu T1D
GADA	dekarboksylaza kwasu glutaminowego	65-75%	99%	70-80%	
IA-2	fosfataza tyrozynowa 2	50-90%	99%	50-70%	
IAA	Insulina/proinsulina	74%	99%	ok 90%	
ZnT8	Terminalna domena C transporteru cynku 8	65-75%	99%	60-80%	

Tabela 2. Charakterystyka istotnych autoprzeciwciał w cukrzycy typu 1. (Lebastchi i inni, 2012), (Hansen i inni, 2015)

Obecność **IA-2** wskazuje na najwyższe ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 1. (Ziegler, 2010).

Przeciwciała przeciwko IA2 wykrywane są u 60-70% chorych na cukrzycę typu 1, przy czym pierwsze objawy choroby mogą pojawić się w ciągu 5 lat od momentu pojawienia się przeciwciał. (Christie i inni, 1997).

Przeciwciała IA-2, w przypadku cukrzycy typu 1 związane są z obecnością receptorów HLA-DR4, które prezentują autoantygeny limfocytom T CD4+, co prowadzi to do powstania odpowiedzi autoreaktywnych limfocytów B. (McLaughlin i inni, 2014).

W zależności od wieku zachorowania, autoprzeciwciała **ZnT8** występują u 60-80% pacjentów z nowo wykrytą cukrzycą typu 1. (Wenzlau i inni, 2007). Ostatnio cząsteczkę ZnT8 zidentyfikowano również jako ważny autoantygen prezentowany limfocytom cytotoksycznym CD8+, które biorą czynny udział w procesie destrukcji komórek β w cukrzycy typu 1. (Wenzlau i inni, 2009). Ponadto w ostatnim czasie prowadzone są badania nad białkiem ZnT8 wykorzystywanym w celu zahamowania progresji choroby. Białko to związane z HLA-A*0201 może ograniczyć reakcje cytotoksyczne limfocytów CD8+. (Li i inni, 2013).

Białka insuliny i ZnT8 występują przede wszystkim w komórkach wysp trzustkowych, natomiast GAD65 i IA-2 są zlokalizowane w wielu tkankach. (Lebastchi i inni, 2012).

Dodatni wynik w kierunku pojedynczego zdefiniowanego autoprzeciwciała (ang. single defined autoantibody, d-aab) może wynikać z obecności limfocytów B pamięci, które mogą znajdować się w węzłach chłonnych lub szpiku kostnym po krótkim przemijającym incydencie „trzustkowym” nie powodującym pełnoobjawowej cukrzycy. (LaGasse i inni, 2002). Uzyskane wyniki przez zespół LaGasse i wsp. potwierdzają wysokie ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 1 wśród osób z dodatnim wynikiem co najmniej dwóch przeciwciał dla trzech głównych autoantygenów cukrzycy (GAD, IA2 / ICA512 i insuliny) oraz pokazują, że strategia ta może być z powodzeniem wykorzystywana w przewidywaniu wystąpienia cukrzycy typu 1 u dzieci w wieku szkolnym. Z kolei inne badania u dorosłych wskazują, że ww. przeciwciała są przydatne, ale niewystarczające do przewidywania T1D. (Bottazzo, 2005), (Lampasona, 2010).

Z przeprowadzonych badań w 2006 roku przez Seyfert-Margolis i wsp. oraz w 2009 r. przez Herolda i wsp. wykazano, iż przedstawione autooprzeciwciała mogą skutecznie odróżnić pacjentów z T1D od osób zdrowych. Sześćdziesiąt jeden procent pacjentów z cukrzycą typu 1 wykazywało obecność dwóch lub więcej przeciwciał w porównaniu do 0% w grupie kontrolnej.

Niektóre autooprzeciwciała okazały się dobrym wskaźnikiem mogącym przewidzieć wystąpienie cukrzycy typu 1. Obecność trzech lub większej liczby ww. autooprzeciwciał zwiększa ryzyko wystąpienia cukrzycy o 50% w ciągu 5 lat (Krischer i wsp. 2003). U osób młodszych ryzyko to wzrasta nawet do 90% w ciągu 7 lat (Orban i wsp. 2009).

I.2. Zaburzenia mechanizmów immunologicznych w rozwoju cukrzycy typu 1.

Według modelu „sygnału zagrożenia” Polly Matzinger inicjacja swoistej odpowiedzi immunologicznej zależy od rozpoznania nie tylko obcej natury antygeny, ale także warunków, w jakich dany antygen jest prezentowany komórkom immunokompetentnym. Jeśli dane warunki zostaną odebrane przez organizm jako patologiczne, sprzyjać będą powstaniu odpowiedzi immunologicznej bez względu na to, czy antygen jest własny, czy obcy. Komórki prezentujące antygen (APC, antigen presenting cells) muszą więc otrzymać dodatkowy „sygnał zagrożenia”, aby rozpocząć odpowiedź immunologiczną. W sytuacji autoagresji takim sygnałem może być nieswoisty proces zapalny towarzyszący uwalnianiu autoantygenów w wyniku zniszczenia tkanek. (Matzinger, 1994)

Teoria Matzinger wpisuje się w model patogenezы cukrzycy typu 1, stworzony przez Nerupa i wsp. Zakłada on, że po uszkodzeniu wysp trzustkowych przez czynniki inicjujące autoantygeny są prezentowane przez komórki APC limfocytom T pomocniczym CD4+ (Th, T helper), co prowadzi do ich aktywacji. Aktywne limfocyty Th za pośrednictwem produkowanych przez siebie limfokin indukują apoptozę/nekrozę komórek beta trzustki, powodując nacieki wysp trzustkowych komórkami mononuklearnymi (*insulitis*) (Nerup i inni, 1994)

Podkreśla się rolę defektu mechanizmów regulacyjnych, w tym nieprawidłowej selekcji autoantygenów w grasicy w powstawaniu autoagresji.

Przełomowe okazały się prace Sakaguchiego i wsp., którzy w 1995 r. odkryli iż komórkami odpowiedzialnymi za hamowanie rozwoju autoimmunizacji u myszy są

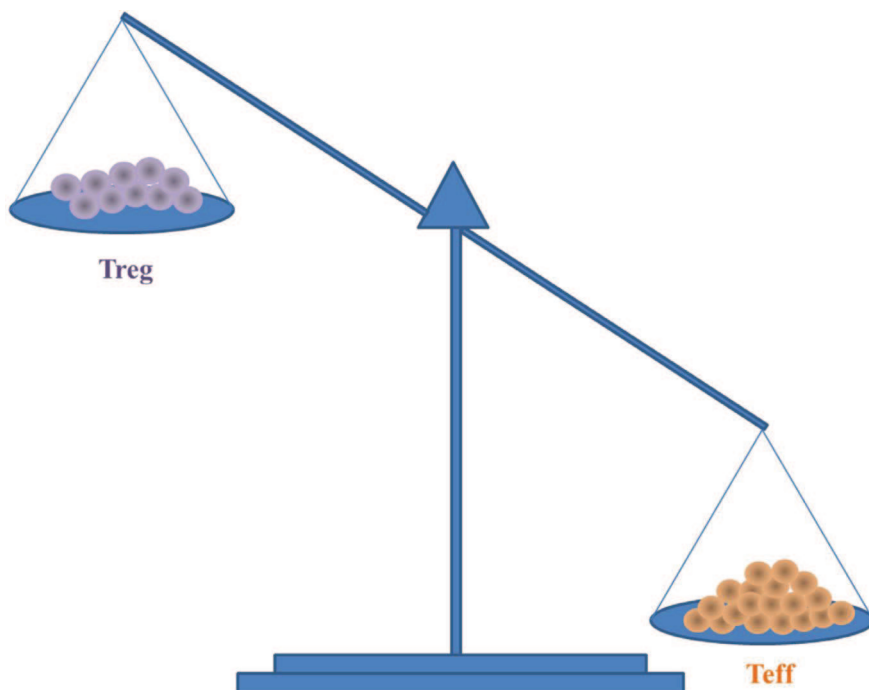
limfocyty T pomocnicze, które na swojej powierzchni mają receptor łańcucha α IL-2 (CD25⁺). (Sakaguchi i inni, 1995)

Przypuszcza się, że wystąpienie cukrzycy może mieć związek z redukcją liczby limfocytów Tregs oraz osłabieniem ich aktywności supresyjnej oraz pojawienia się opornych na regulację patogennych limfocytów T. Nieprawidłowe działanie m.in. limfocytów regulatorowych może mieć kluczowe znaczenie w inicjowaniu zaburzonych procesów immunologicznych, w wyniku których dochodzi do załamania się autotolerancji i postępującego zniszczenia komórek β wysp trzustkowych. (Gregori i inni, 2003) (Piccirillo i inni, 2004) (Li i inni, 2012)

I.3. Limfocyty T regulatorowe (Tregs)

Po raz pierwszy istnienie regulatorowych limfocytów T stwierdzono w 1969r. w Archi Center Research Institute w Nagoi, w Japonii, w którym przeprowadzono doświadczenie, polegające na usunięciu mysimiu żeńskiemu noworodkowi grasicy. Taka operacja przyczyniła się do rozwinięcia się zespołów autoimmunologicznych w wyniku ataku własnych komórek odpornościowych na własne tkanki myszy. Co więcej, okazało się, że po wstrzyknięciu zwierzętom limfocytów T choroba ulegała regresji. Naukowcy stwierdzili, że w puli limfocytów T znajdują się niescharakteryzowane bliżej komórki pomagające w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej. Limfocyty Te nazwano supresorowymi limfocytami T. W 1995r. Sakaguchi z Uniwersytetu w Kioto, jako pierwszy wykazał marker charakteryzujący Limfocyty Tregs, białko CD25 (receptor dla interleukiny 2) oraz udowodnił, że Tregs należą do subpopulacji TCD4⁺.

Jednym z istotnych mechanizmów regulacji odpowiedzi układu immunologicznego są limfocyty T-regulatorowe (Tregs), które sprawują nadzór nad pozostałymi elementami układu immunologicznego. Limfocyty Te hamują proliferację limfocytów efektorowych, jak i wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych. Niedobór ich liczby lub upośledzenie ich funkcji może prowadzić do pojawienia się odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko własnym antygenom natomiast ich nadmierna liczba bądź czynność może prowadzić do zaburzenia odporności i innych konsekwencji immunosupresji.



Rysunek 3. Zwiększona ekspansja i aktywność limfocytów Teff o ograniczonej liczbie Tregs i funkcji w chorobach autoimmunologicznych, takich jak T1D. Źródło: (Pham i inni, 2016)

U ludzi ich obecność stwierdzono m.in.: w krwi obwodowej, grasicy, śledzionie, migdałkach i krwi pępowinowej. Zróżnicowana fenotypowo populacja limfocytów Tregs bierze udział m.in. w odpowiedzi przeciwnowotworowej, przeciwinfekcyjnej, poszczepiennej, wytwarzaniu tolerancji na antygeny pokarmowe, bakterie saprofityczne i transplantacyjne, w hamowaniu limfocytów autoreaktywnych. Mechanizm działania komórek regulatorowych opiera się o uwalnianie cytokin o działaniu supresorowym. (IL-10, TGF- β) bądź zachodzi na drodze bezpośredniego oddziaływania z komórką docelową poprzez prezentację receptorów supresyjnych. Tregs wywierają swoje działanie regulacyjne na limfocyty T, komórki NK i komórki NKT, na limfocyty B i komórki prezentujące antygen (APC) (Tan i inni, 2014).

W ostatnich latach Limfocyty Tregs przedstawia się jako kluczowy element homeostazy immunologicznej. W kilku badaniach oceniano rolę deficytu ilości lub funkcji limfocytów Tregs w rozwoju i utrzymywaniu chorób autoimmunologicznych. Takie defekty są wynikiem uszkodzenia samych limfocytów Tregs lub skutkiem częściowej oporności na aktywowane komórki efektorowe (Miyara i inni, 2011). Na przykład, Lawson i wsp. stwierdzili, że Tregs CD4⁺CD25⁺ uległy zmniejszeniu we krwi obwodowej u pacjentów z wczesnym reumatoidalnym zapaleniem stawów (Lawson i inni, 2006), a bardziej współczesne badania również potwierdziły te wyniki (Jae-Ryong i inni,

2012) (Li i inni, 2014). Co więcej, zaburzenia limfocytów Tregs stwierdzono niedawno u pacjentów z u pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym (SLE) (Nocentini i inni, 2014).

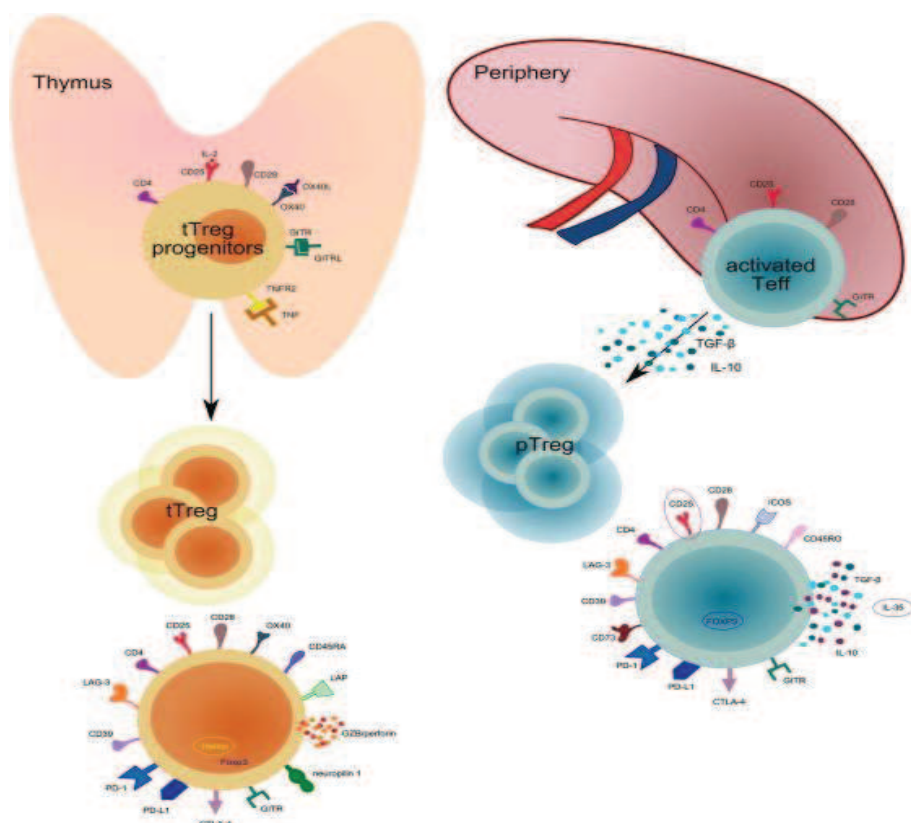
Konsekwencje braku limfocytów Tregs widać najlepiej na przykładzie zespołu chorobowego IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked), w którym występuje mutacja w genie *foxp3*, kluczowym dla aktywności nTregs. Charakterystycznymi objawami IPEX w wieku noworodkowym są atopowe zapalenie skóry, wodnista biegunka i T1D (Bennett i inni, 2001) (Marek-Trzonkowska i inni, 2013).

Znaczenie Tregs w regulacji odpowiedzi immunologicznej jest również omawiane na przykładzie badań dotyczących ludzkich nowotworów. Liczba limfocytów Tregs jest podwyższona w różnych typach guzów, takich jak rak piersi, rak płuc, czerniaka złośliwego (Nishikawa i inni, 2010). Obecność dużej proporcji komórek CD4 + Tregs w limfocytach naciekających nowotwór, przy zmniejszonej proporcji komórek T CD8 + w stosunku do Tregs, jest związana ze złym rokowaniem dla takich nowotworów jak: rak piersi, jajnika i żołądka (Sato i inni, 2005).

I.3.1. Rodzaje limfocytów T regulatorowych

Limfocyty Tregs CD4 + można przedstawić jako dwie odrębne subpopulacje: Tregs powstające w grasicy (tTregs, nTregs – natural Tregs), które rozwijają się jako odrębna linia i charakteryzują się stabilnym fenotypem i funkcją, oraz Tregs indukowane na obwodzie (pTregs, iTregs -indukowane), które wydają się być przekształcone z konwencjonalnych komórek CD4 + efektorowych T w odpowiedzi na sygnały mikrośrodowiska. Są to limfocyty pomocnicze produkujące cytokiny: IL-10 (limfocyty Tr1) i TGF- β (limfocyty Th3) (Geiger i inni, 2012).

Badania Taamsa i wsp. wykazały, iż Limfocyty Tregs mogą powstawać w rezultacie transformacji wysoce zróżnicowanych limfocytów T pamięci, podczas prezentacji limfocytom antygeny przez nieprofesjonalne komórki APCs. Doświadczenia przeprowadzone w warunkach in vitro na limfocytach mysich i ludzkich potwierdzają możliwość powstawania limfocytów Tregs CD4+ CD25+ z limfocytów T CD4+ CD25–. Takie zjawisko zostało odnotowane w hodowli komórek w obecności TGF- β oraz TGF- β i IL-2 (Zheng i inni, 2004).



Rysunek 4. Rozwój i charakterystyka limfocytów Tregs (Tregs) pochodzących z grasicy (tTregs) i obwołu Tregs (pTregs). Przedstawiono główne markery obecne w subpopulacjach limfocytów Tregs (Petrillo i inni, 2015).

Wysoki poziom ekspresji CD25 i FOXP3, niezdolność do wytwarzania interleukiny 2 (IL-2) oraz do proliferacji *in vitro* są cechami definiującymi komórkę nTregs. Podstawowy sposób ich działania immunosupresyjnego jest zależny od ich bezpośrednich kontaktów z komórkami efektorowymi (Tan i inni, 2014).

1.3.1.1. Markery limfocytów T regulatorowych (Tregs)

U człowieka fenotypowe właściwości limfocytów Tregs są o wiele bardziej zróżnicowane. Również wytypowanie populacji limfocytów Tregs spośród limfocytów izolowanych od pacjentów sprawia o wiele więcej trudności (Trzonkowski i inni, 2004). Za najbardziej swoiste markery komórek T regulatorowych $CD4^+CD25^+$ uważa się wewnątrzkomórkowy czynnik transkrypcyjny FoxP3 (ang. forkhead fox P3) (represor transkrypcji IL-2) będący głównym regulatorem ich rozwoju i funkcji, cząsteczkę LAG-

3 (CD223) będącą homologiem CD4 negatywnie regulującym ekspansję limfocytów T i ich homeostazę oraz brak receptora dla IL-7 (IL-7R) – CD127 (Liu i inni, 2006).

I.3.1.1.1. Jądrowy Czynn timeranskrypcyjny P3 (FoxP3)

W procesie dojrzewania populacji limfocytów Tregs CD4⁺ CD25⁺ podkreśla się rolę takich receptorów i cytokin jak: CCR8, CD28, CD40, B7.1, B7.2, IL-2 i TGF- β , które są niezbędne do prawidłowego ukształtowania i funkcjonowania tych komórek. Oprócz zmian morfologicznych zachodzących na powierzchni komórki, Limfocyty Tregs „nabywają” swoisty dla komórek jądro timeranskrypcyjny P3 (Foxp3), który po raz pierwszy został zidentyfikowany właśnie w tych komórkach. Wcześniej za wiarygodny marker nTregs uważano podjednostkę α receptora dla IL-2 (CD25), jednak CD25 jest również markerem aktywacji innych limfocytów, dlatego tylko na podstawie jego wysokiej ekspresji (CD25^{high}) można charakteryzować populację nTregs (Campbell i inni, 2007). Badania Hori i wsp. wykazały, iż transfer za pomocą sondy retrowirusowej mRNA białka Foxp3 naiwnym komórkom T powoduje przejście ich w stan anergii i nabycie cech fenotypowych oraz czynnościowych limfocytów Tregs, ze zdolnością do hamowania innych komórek układu immunologicznego włącznie. Limfocyty z pozytywnie wprowadzoną sondą mRNA białka Foxp3 przeciwdziałały rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych (Hori i inni, 2003).

Foxp3 hamuje ekspresję genów cytokin na skutek oddziaływań z jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych NFAT. Wzbudzenie ekspresji Foxp3 w komórkach CD4⁺CD25⁻ nadaje im w pełni funkcjonalny fenotyp regulatorowy. To odkrycie dało nowy obraz biologii limfocytów T regulatorowych i przyczyniło się do rozwoju terapii w leczeniu schorzeń na podłożu immunologicznym. Z kolei funkcja FoxP3 jako czynn timeranskrypcyjnego jest zależna od stopnia jego metylacji.

U myszy z mutacją w genie *foxp3*, tzw. myszy *sf* (*scurfy*), komórki CD4⁺CD25⁺ powstają, ale nie wykazują właściwości regulatorowych. Jedną z cech charakterystycznych dla limfocytów T izolowanych od myszy *sf* jest ich spontaniczna proliferacja i produkcja cytokin w warunkach *in vitro*. Limfocyty T CD4⁺ od myszy *sf* są nadreaktywne, a czynn timeranskrypcyjne NFAT i AP-1 są u nich stale aktywne. Poza tym limfocyty T od tych myszy w warunkach *in vitro* były odporne na stymulację poprzez TCR, słabo proliferowały i wydzielały niewielkie ilości IL-2. Skutki wynikające z mutacji bądź też delecji genu *foxp3* są podobne do tych, które powstają po

usunięciu populacji limfocytów T regulatorowych, a więc są związane z rozwojem chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. Myszy *sf* umierają w wyniku zaburzeń limfoproliferacyjnych, a ich śmierci zapobiec może jedynie transfer limfocytów Tregs od myszy typu dzikiego (Khattari i inni, 2003) (Lin i inni, 2007).

Metylacja DNA w określonym obszarze w obrębie miejsca Foxp3, nazywanym Treg-specyficznym regionem demetylowanym (TSDR), powoduje wyłączenie transkrypcji, a tym samym funkcji regulatorowej limfocytów Tregs. W warunkach fizjologii region ten jest hipometylowany w naturalnych limfocytach Tregs, natomiast silnie zmetylowany w indukowanych limfocytach Tregs i populacjach efektorowych (Battaglia i inni, 2011) (McMurchy i inni, 2011).

Z badań wynika, że do prawidłowej funkcji limfocytów Tregs konieczna jest nie tylko obecność czynnika transkrypcyjnego Foxp3, ale także odpowiedni poziom jego ekspresji, którego obniżenie może wskazywać na zaburzenia immunoregulacyjne u pacjentów z chorobami o podłożu zapalnym i autoimmunizacyjnym, takimi jak cukrzyca, celiakia, choroba Leśniowskiego-Crohna czy stwardnienie rozsiane (Ryba, i inni, 2010).

W przeciągu ostatnich lat zidentyfikowano nowy czynnik transkrypcyjny Helios charakterystyczny dla limfocytów Tregs (Thornton i inni, 2010).

I.3.1.1.2. Podjednostka α receptora dla IL-2 (CD25).

Ekspresja CD25 jest wyraźnie widoczna zarówno na ludzkich jak i mysich konwencjonalnych, aktywowanych limfocytach T CD4 i tylko komórki z najwyższą ekspresją tego białka (CD25 bright) zostały uznawane jako Tregs. Limfocyty T CD4⁺CD25⁺ (Tregs) stanowią od 5 do 10% wszystkich obwodowych komórek CD4⁺ i charakteryzują się stałą i wysoką ekspresją podjednostek α receptora IL2 (CD25), co odróżnia je od aktywowanych limfocytów T CD4⁺.

I.3.1.1.3. Antygen CD127 – receptor dla IL-7

Inną ważną fenotypową cechą limfocytów Tregs u człowieka jest brak ekspresji receptora dla IL-7 (CD127). Wykazano, że ekspresja FOXP3 jest odwrotnie proporcjonalnie skorelowana z ekspresją tego antygenu. Jednoczesne wykazanie wysokiej ekspresji CD25 i niskiej ekspresji CD127 pozwoliło na wyznaczenie populacji

komórek, w której około 98% limfocytów wykazuje obecność antygeny FOXP3. Ten fakt umożliwił sortowanie dla celów terapeutycznych stosunkowo czystej populacji limfocytów Tregs (Trzonkowski i inni, 2004). Wykazano, iż powierzchniowa ekspresja cząsteczki CD127 pozostaje w odwrotnej korelacji z ekspresją Foxp3 na limfocytach Tregs (Vrabelova i inni, 2008).

I.3.1.1.4. Antygen CD45RA

Liczba naiwnych limfocytów Tregs CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ obecnych we krwi i w węzłach chłonnych zmniejsza się wraz z wiekiem, prawdopodobnie wraz z involucją grasicy jako podstawowym źródłem dziewiczych limfocytów Tregs.

Zaproponowana przez Cvetanovich i Hafler i udoskonalona przez Sakaguchi i współpracowników charakterystyka fenotypowa naturalnych Tregs u człowieka wskazuje dwie zasadnicze populacje regulatorowych limfocytów T CD4⁺: nTregs: dziewicze (naiwne) i spoczynkowe Limfocyty Tregs z ekspresją CD25⁺⁺⁺CD45RA⁺FOXP3^{low} i Limfocyty Tregs efektorowe i aktywowane z ekspresją CD25⁺⁺⁺CD45RA⁻FOXP3^{high}. Limfocyty Te cechuje też ekspresja antygeny CD45RO co mogłoby wskazywać ich pamięciowy charakter jednakże są to przede wszystkim komórki efektorowe. Limfocyty z niską ekspresją FOXP3 i brakiem antygeny CD45RA należą do limfocytów nie-Tregs (ang. non-Tregs) wykazujących zdolność wydzielania IL-2, IFN- γ i IL-17. Wśród efektorowych limfocytów Tregs wyróżnia się ponadto subpopulacje o zmiennej ekspresji antygenów ICOS i HLA-DR, które charakteryzuje odmienna aktywność proliferacyjna, zdolność do syntezy cytokin a także sposób wywoływania supresji w komórkach docelowych. Ponadto Limfocyty Tregs cechuje obecność antygenów GITR, wspomnianego powyżej kostymulującego antygeny CTLA-4 a także antygeny CD39, będącego ektonukleotydażą obecną na efektorowych komórkach pamięci TREM (ang. T regulatory effector/memory cells) (Cvetanovich i inni, 2011) (Sakaguchi i inni, 2010).

I.3.1.1.5. Cząsteczka CD62L (L-selektyna)

Doświadczenia na myszach NOD wykazały, iż przed rozwojem cukrzycy mogą chronić tylko limfocyty T regulatorowe z ekspresją cząsteczki CD62L (L-selektyny), TregsCD62L- natomiast są nieskuteczne (Szanya i inni, 2002). CD62L jest głównym receptorem zasiedlania limfocytów T do węzłów chłonnych. Cząsteczka ta odpowiada za przytwierdzenie i toczenie limfocytów do żyłek z wysokim śródbłonkiem (HEV) obecnych w węzłach chłonnych. Przeprowadzone badania wskazują, że subpopulacja Tregs CD62L+ jest znacznie lepsza w zapobieganiu zarówno autoimmunizacji, jak i GvHD (przeszczep przeciw gospodarzowi) niż jej odpowiednik bez ekspresji CD62L (Ermann i inni, 2005).

Limfocytom Tregs przypisuje się rolę ochronną przed rozwojem autoimmunizacji, co opisano m.in. w mysim modelu cukrzycy typu 1. W badaniach na tym modelu jednoznacznie wykazano, że regulacja przez komórki o naiwnym fenotypie (ekspresja CD62L) jest w tym przypadku najbardziej znacząca. Jednak w badaniach *in vitro* nie wykazano wyższej aktywności supresyjnej subpopulacji Tregs CD62L^{high} w porównaniu z subpopulacją CD62L^{low}. Różnice w zdolności regulatorowej tych dwóch subpopulacji odzwierciedlają raczej ich właściwości migracyjne niż aktywność supresorową, gdyż ekspresja CD62L nie wpływała na funkcję supresorową Tregs. Ponadto Limfocyty Tregs wyizolowane bezpośrednio z wysp trzustkowych myszy NOD miały fenotyp CD62L^{low}, a to sugeruje, że część komórek regulatorowych może w warunkach *in vivo* różnicować się w komórki efektorowe/pamięci. Ich migracja do trzustki nie jest zależna od receptora CD62L (You i inni, 2004) (Lepault i inni, 2000).

Odmienną aktywność supresyjną subpopulacji Tregs CD62L+ wykazały badania Fu i wsp., w których pokazano, że subpopulacja limfocytów Tregs CD62L+, w porównaniu do subpopulacji CD62L-, w warunkach *in vitro* charakteryzuje się lepszą aktywnością proliferacyjną i zachowuje funkcje supresorowe przez co najmniej 30 dni hodowli. Potwierdzili to też inni badacze. Tregs o fenotypie CD62L+ charakteryzują się najlepszymi zdolnościami immunosupresyjnymi i tylko one są w stanie zatrzymać rozwój choroby u myszy NOD (*non-obese-diabetic mice*) (Fu i inni, 2004).

Warto zwrócić uwagę na fakt, iż naturalnie występujące limfocyty T regulatorowe są zdolne do utrzymania ekspresji CD62L, w przeciwieństwie do konwencjonalnych limfocytów T, które obniżają ekspresję tej cząsteczki po aktywacji. Różnice w aktywności tych dwóch subpopulacji limfocytów Tregs nadają znaczenia

mechanizmowi migracji tych komórek do obwodowych narządów limfatycznych w celu hamowania rozwoju procesu zapalnego (Kim, 2006).

1.3.2.1. Rola limfocytów Tregs w patogenezie cukrzycy.

W badaniach eksperymentalnych Wu i wsp. obserwowali niedobór limfocytów Tregs w grasicy i śledzionie myszy chorych na cukrzycę. Dodatkowo badacze potwierdzili także współzależność między Tregs, a podawaniem TNF- α . Wiadome jest, iż iniekcje TNF- α wywołują cukrzycę, zaś przeciwciała przeciwko TNF- α zapobiegają ujawnieniu się choroby. Kuracja za pomocą TNF- α w doświadczeniu Wu i wsp. zmniejszała liczbę Tregs w grasicy i śledzionie myszy z cukrzycą NOD (*non-obese-diabetic mice*), natomiast podawanie antyTNF- α wywoływało wzrost ich liczby. Jest zatem prawdopodobne, że antyTNF- α działa w cukrzycy poprzez wpływ na limfocyty T regulatorowe (Ryba, i inni, 2010) (Wu i inni, 2002). Jednak niektóre prace kwestionują istnienie zaburzeń liczby limfocytów Tregs w cukrzycy typu 1. Na przykład w jednym z badań przeprowadzonych na dużej grupie pacjentów z cukrzycą typu 1, nie wykazano różnic w odsetkach komórek CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ między grupą badaną, a kontrolną. Autorzy tego opracowania obserwowali brak zmian w odsetkach komórek T regulatorowych w czasie trwania choroby, np. po kilku miesiącach od zachorowania. Wyjaśnienia wymaga ocena funkcjonalna komórek T regulatorowych w tej jednostce chorobowej (Brusko i inni, 2007).

Należy pamiętać, że to nie liczba, a funkcja limfocytów Tregs, może ulegać zaburzeniu w czasie zachorowania na cukrzycę. Dotyczy to w szczególności ich możliwości supresyjnych, ale także produkcji cytokin w tym zwiększenia produkcji IFN- γ i upośledzenia wytwarzania IL-10. Dodatkowo limfocyty Te charakteryzowały się wzrostem ekspresji antygenów CD69 oraz CTLA-4. Supresyjna funkcja limfocytów Tregs w cukrzycy jest najprawdopodobniej zależna od TGF- β (Ryba i inni, 2006).

Zaburzenia liczby i dysfunkcja limfocytów Tregs może wywoływać nadreaktywność komórek efektorowych TCD4⁺, co prowadzi do wytwarzania cytokin prozapalnych i uszkodzeń komórek β w wyspach Langerhansa.

Limfocyty Tregs pośredniczą w zapobieganiu autoimmunizacji na kilka sposobów.

Pierwszy z nich dotyczy zapobiegania aktywacji komórek autoreaktywnych limfocytów T i różnicowania w węzłach chłonnych. Limfocyty Tregs usytuowane wokół komórek

dendrytycznych w węzłach chłonnych mogą zapobiegać wczesnym etapom aktywacji limfocytów T efektorowych. Tregs zatrzymują migrację komórek T efektorowych (Teff) do węzłów chłonnych trzustki, gdzie występują komórki dendrytyczne (DC) prezentujące antygen, co zapobiega powstawaniu autoreaktywnych limfocytów T. Tregs mogą wpływać na interakcje między Teff i komórkami prezentującymi antygen (APC), ponieważ mogą tworzyć trwałe połączenia z DC, zapobiegając kontaktom między Teff i APC prezentującymi antygeny trzustkowe (Tan i inni, 2014). Bezpośredni kontakt komórka-komórka pomiędzy Tregs i komórką dendrytyczną (DCS) hamuje dojrzewanie DC. W konsekwencji DC wykazują niskie poziomy molekół kostymulujących (CD80 i CD86) wymaganych do aktywacji komórek T naiwnych (Marek-Trzonkowska i inni, 2013).

Drugim sposobem tłumienia aktywacji komórek przez Tregs obejmuje aktywację, proliferację i następnie taksję limfocytów Tregs do dotkniętej zapaleniem tkanki, by lokalnie hamować funkcje limfocytów efektorowych. Tregs przez kontakt z limfocytami efektorowymi Teff mogą je niszczyć z udziałem cytotoksycznych ziarnistości zawierających perforynę i granzymy.

Limfocyty Tregs mogą również regulować autoimmunologiczne zapalenie wysp trzustki poprzez kontrolę innych rodzajów komórek układu immunologicznego. Przeniesienie Tregs do trzustki z *insulitis* spowodowało zmniejszenie liczby makrofagów w trzustce i hamowanie wytwarzania szkodliwych cytokin. Ponadto naturalne komórki cytotoksyczne (NK), mogą być celami Tregs (Tan i inni, 2014).

Prowadzone są liczne badania kliniczne mające na celu przywrócenie tolerancji immunologicznej przez indukcję Tregs lub bezpośrednią infuzję limfocytów Tregs, za pomocą których będzie można zahamować autoreaktywność i leczyć zaburzenia autoimmunologiczne (Wallberg i inni, 2013).

I.3.2. Limfocyty Tregs w terapii

Limfocyty T regulatorowe zostały użyte jako lek po raz pierwszy na świecie w roku 2007 w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym w Klinice Hematologii i Transplantologii w leczeniu choroby przeszczep przeciw gospodarzowi, a obecnie także w leczeniu cukrzycy typu 1 w Klinice Pediatrii Diabetologii i Endokrynologii oraz w leczeniu stwardnienia rozsianego w Klinice Neurologii Dorosłych w ramach programu STRATEGMED NCBiR. Próby klinicznego stosowania tych komórek trwają

obecnie w kilkunastu ośrodkach europejskich i w USA (Trzonkowski i inni, 2009) (Marek-Trzonkowska i inni, 2012) (Marek-Trzonkowska i inni, 2014) (Bluestone i inni, 2015).

Limfocyty Tregs odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu tolerancji immunologicznej na przeszczep (Trzonkowski i inni, 2009). Dzięki swoim właściwościom immunosupresyjnym, które utrzymują *ex vivo* mogą być stosowane w terapii komórkowej i atrakcyjnej nowej strategii zwalczania przewlekłego odrzucenia, co pozwoliłoby na wyeliminowanie konieczności stosowania immunosupresji farmakologicznej. Limfocyty Tregs mogą fizjologicznie hamować limfocyty T efektorowe mając przy tym niższe ryzyko wystąpienia efektów ubocznych niż klasyczne leki immunosupresyjne. Ponadto, Limfocyty Tregs są zdolne do indukowania długoterminowej tolerancji immunologicznej (Wang i inni, 2013) (Golab i inni, 2013).

Na przykładzie T1D pojawiły się liczne badania kliniczne mające na celu przywrócenie tolerancji immunologicznej poprzez indukcję limfocytów Tregs lub bezpośrednią infuzję limfocytów Tregs, np.: terapia anty-CD3, terapia antygenowa z użyciem peptydów dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD), transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych (HSCT), autologiczna transfuzja krwi pępowinowej. Niektóre z tych metod leczenia okazały się skuteczne, jak wykazano przez zwiększone poziomy C-peptydu i zmniejszenie dziennej dawki zapotrzebowania na insulinę, natomiast inne nie spełniły ich pierwotnych założeń (Tan i inni, 2014).

Dobrym przykładem są terapie z użyciem antygenów specyficznych dla insuliny lub innych peptydów podawanych donosowo lub doustnie, które powinny indukować tolerancję wysepek trzustkowych. W większości przed- i klinicznych badaniach, w których ta strategia okazała sukcesem, tolerancja była zależna od Tregs (Staeva-Vieira i inni, 2007). Stąd istnieją sugestie, że terapia komórkowa z limfocytami Tregs powinna być skuteczna, aby zatrzymać T1D (Brusko i inni, 2008).

Szereg badań klinicznych wykazało, że iniekcja Tregs w transplantacjach haploidentycznych krwiotwórczych komórek macierzystych może zapewnić trwałą tolerancję immunologiczną. Ponadto liczne badania wykazały, że FoxP3 + Tregs i alospecyficzne typu 1 limfocyty regulatorowe (TR1) zapobiegają graft-versus-host disease (GvHD) bez hamowania rekonstytucji immunologicznej (Trzonkowski i inni, 2009) (Di Ianni i inni, 2011) (Trzonkowski i inni, 2015)

Trwają badania nad próbą leczenia pacjentów z nowo powstałą T1D z uzyskanych *ex vivo* autologicznych poliklonalnych Tregs (CD4+CD25+CD127-/niska). Wstępne wyniki są zachęcające, pozwalające uwierzyć że przeprogramowanie Tregs lub wlew autologicznych lub alogenicznych limfocytów Tregs może zmienić naturalny przebieg choroby autoimmunologicznej. Potrzebne są wysiłki mających na celu opracowanie leków zdolnych przeprogramować Tregs i ustalić, które subpopulacje limfocytów Tregs najlepiej nadają się do wykorzystania w terapii komórkowej (Miyara i inni, 2014) (Himmel i inni, 2012).

Obecnie trwają zaawansowane próby wykorzystania komórek supresorowych w leczeniu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu, zapalenia śluzówki żołądka, zapalenia tarczycy, jajników, SLE i chorób zapalnych jelit, a także wcześniej wykrytej cukrzycy typu I u dzieci (Kohm i inni, 2002) (Frey i inni, 2005) (DiPaolo i inni, 2005) (Marek-Trzonkowska i inni, 2013).

Opracowywane są również strategie terapeutyczne mające na celu zmniejszenie liczebności i osłabienie funkcji supresorowej limfocytów Tregs. Tego typu rozwiązanie może być stosowane w leczeniu przewlekłych infekcji wirusowych i bakteryjnych, jak również w terapii przeciwnowotworowej. Zaaprobowane klinicznie są dwa przeciwciała hamujące Limfocyty Tregs (anty-CTLA4 o nazwie ipilimumab oraz antyPD1 o nazwie nivolumab). Doświadczalnie w tym celu próbuje się hamować ekspresję białka Foxp3, jego wiązanie z DNA, neutralizuje się cytokiny niezbędne do prawidłowego funkcjonowania limfocytów Tregs oraz blokuje cząsteczki CD25 i GITR (Shimizu i inni, 2002) (Callahan i inni, 2010).

II. Cele i założenia pracy

1. Celem niniejszej pracy jest ocena odpowiedzi immunologicznej na terapię komórkową cukrzycy typu 1 w oparciu o namnożone sztucznie limfocyty regulatorowe CD4⁺CD25⁺CD127.
 - Analiza fenotypu limfocytów T regulatorowych CD3/CD4/CD25/CD127/CD45RA/CD62L/FoxP3
 - Analiza markerów metabolicznych
 - Analiza cytokin
2. Identyfikacja czynników mających wpływ na skuteczność terapii komórkami Tregs.
3. Oszacowanie związku antygenów zgodności tkankowej HLA z przebiegiem terapii Tregs.
 - Typowanie HLA metodą PCR-SSP na poziomie niskiej rozdzielczości.



III. Materiały i Metody

III.1. Kryteria doboru badanych osób.

Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsinkach i zostało zatwierdzone przez Komitet Etyki Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, Polska (NKEBN / 8/2010 z późniejszymi zmianami).

Zbadano dwadzieścioro dwoje dzieci rasy kaukaskiej pochodzących z Polski ze świeżo rozpoznaną T1D.

Charakterystykę kliniczną grupy przedstawiono poniżej w tabeli nr 3.

Charakterystyka kliniczna grup badanych		
	Grupa leczona (n=12)	Grupa nieleczona (n=10)
Wiek (lata) [mediana; min-max]	12.2; 8-16	11.5; 7-16
BMI [mediana; min-max]	17.1; 12.5-23.5	16.7; 14.2-20.8
Zdiagnozowana polidypsja (liczba pacjentów)	5	8
Zdiagnozowana poliuria (liczba pacjentów)	5	3
Utrata wagi w czasie diagnozy (liczba pacjentów)	4	3
pH w czasie diagnozy (krew włośniczkowa) [mediana; min-max]	7.40; 7.36-7.42	7.39; 7.35-7.53
pO ₂ w czasie diagnozy krew włośniczkowa - mmHg) [mediana; min-max]	69.3; 24.1-88.0	69.5; 56.0-86.6
pCO ₂ w czasie diagnozy (krew włośniczkowa - mmHg) [mediana; min-max]	39.6; 28.0-46.9	38.0; 24.0-40.7
HCO ₃ w czasie diagnozy (krew włośniczkowa - mmHg) [mediana; min-max]	24.15; 18.8-27.4	23.6; 21.3-25.2
Równowaga kwasowo-zasadowa w czasie diagnozy (BE - mEq/l) [median; min-max]	0.05; -7.8-3.2	-0.5; -3.8-0.9
SatO ₂ w czasie diagnozy (krew włośniczkowa - %) [median; min-max]	94.1; 90.2-97.3	95.4; 92.4-97.2
Przeciwciało anti-GAD65 (liczba pacjentów)	9	9
ICA (liczba pacjentów)	7	5
IAA (liczba pacjentów)	7	4

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna grup badanych.

Ogólny stan zdrowia i stan metaboliczny badanych osób był kontrolowany przez 24 miesiące od daty włączenia do badania.

Dobrano grupę kontrolną, 10 pacjentów nieleczonych, dopasowanych pod względem wieku, płci i czasu trwania choroby.

Materiał badawczy stanowiła krew obwodowa i surowica grupy badanej i kontrolnej.

Grupą badaną byli pacjenci poddani adoptywnemu leczeniu limfocytami T regulatorowymi CD3(+)CD4(+)CD25(high)CD127(-) w wieku od 5 do 18 r.ż., płci męskiej i żeńskiej, ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 (pacjenci w okresie do 2 miesięcy od rozpoznania cukrzycy typu 1). W badaniach laboratoryjnych wykazujący dodatnie miano autoprzeciwciał (ICA, IAA, GAD) – wysokie miano jednego z przeciwciał (≥ 4 -krotność normy, nie dotyczy ICA) lub niskie miano dwóch lub trzech przeciwciał (2-4-krotność normy) oraz poziom peptydu C na czczo w osoczu większy niż 0.4ng /ml. Ponadto wymagane było zaangażowanie pacjenta i jego rodziców zdefiniowane jako samodzielne monitorowanie poziomu glukozy nie mniej niż trzy razy dziennie, oraz codzienne odnotowywanie podawania zastrzyków insuliny lub pompy insulinowej. Ponadto stabilny stan psychiczny chorych i ich opiekunów. Chory musiał posiadać dostęp żylny gwarantujący donacje krwi.

Cukrzycę typu 1A diagnozowano w oparciu o zalecenia Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (Diabetologia Praktyczna, 2009) przeprowadzając pomiar stężenia glukozy na czczo i w dowolnej porze doby oraz w drugiej godzinie doustnego testu tolerancji glukozy, a także oznaczając poziom peptydu C i autoprzeciwciał: anty-GAD, ICA i IAA.

W związku z niepełnoletnością grupy badanej wszyscy chorzy za pośrednictwem swoich opiekunów prawnych musieli wyrazić pisemną zgodę na udział w projekcie.

Grupę kontrolną stanowili pacjenci spełniający również wyżej wymienione kryteria, u których nie można było przeprowadzić donacji krwi do terapii limfocytami T regulatorowymi z powodu braku dobrego dostępu żylnego.

W odniesieniu do typowania antygenów HLA badania wykonano na większej grupie pacjentów, którzy zostali włączeni na podstawie powyższych kryteriów także już po zakończeniu badań fenotypu limfocytów Tregs. Do badań HLA wykorzystano materiał grupy kontrolnej nieleczonej, która liczyła 31 pacjentów z T1D oraz w grupach leczonych 1 lub 2 dawkami Tregs, liczącej 25 osób.

III.2. Kryteria wyłączenia z grupy badanej.

1. Omowa uczestnictwa w badaniu lub brak podpisanego formularza świadomej zgody.
2. Inna niż cukrzyca typu 1 forma cukrzycy.
3. Wiek poniżej 5 lat lub powyżej 18 lat.
4. Niedobór IgA lub inny zdiagnozowany niedobór odporności.
5. BMI < 25 lub > 75 percentyla dla określonego wieku.
6. Przebyta lub aktywna forma zakażenia wirusem HBV, HCV, HIV, prątkiem gruźlicy, krętkiem kiły, Dla zdiagnozowania wystarczą laboratoryjne wykładniki zakażenia bez konieczności klinicznych objawów.
7. Przebyte lub aktywne zakażenia wirusem EBV w wywiadzie.
8. Przebyte lub aktywne układowe zakażenie grzybicze.
9. Przebyta lub aktywna choroba nowotworowa.
10. Niedokrwistość, limfopenia, neutropenia lub małopłytkowość definiowana jako liczba krwinek poniżej dolnej granicy normy dla wieku stwierdzona w ciągu ostatnich 6 tygodni przed włączeniem do badania.
11. Podwyższona aktywność zakrzepowa/przebyty epizod zakrzepicy w wywiadzie.
12. Jakakolwiek choroba wymagająca przyjmowania leków innych niż insulina dłużej niż 3 miesiące.
13. Przyjmowanie leków przeciwcukrzycowych innych niż insulina w ciągu ostatnich 4 tygodni przed włączeniem do badania.
14. Retinopatia
15. Nadciśnienie tętnicze
16. Stwierdzona obecnie lub w wywiadzie makroalbuminuria
17. Dziewczeta powyżej 15 roku życia – pozytywny test ciąży lub brak stosowania uznanej medycznej formy antykoncepcji podczas badania i do 4 miesięcy po jego zakończeniu, jeśli dotyczy.
18. Chłopcy powyżej 15 roku życia – wyrażony zamiar posiadania potomstwa lub posiadania potomstwa w trakcie trwania badania i do 4 miesięcy po jego zakończeniu, jeśli dotyczy.
19. Nadmierny lęk pacjenta lub jego rodziców lub opiekunów odniesieniu do procedur badawczych.

20. Każdy problem medyczny, który w opinii badacza może wpłynąć negatywnie na zdrowie pacjenta, jeśli zostanie włączony do badania.
21. Rodzice lub opiekunowie oraz dzieci powyżej 15 roku życia ze stwierdzonym uzależnieniem od alkoholu lub substancji psychoaktywnych.

III.3. Protokół badawczy

Przygotowanie i podanie preparatu limfocytów Tregs.

Zespół pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Piotra Trzonkowskiego kierownika Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego opracował terapie komórkową opartą o namnażanie limfocytów regulatorowych *ex vivo*. Zespół medyczny pobierał krew obwodową w ilości adekwatnej do wieku, masy ciała i stanu zdrowia zakwalifikowanego do badania pacjenta. Uzyskana jednostka krwi z była rutynowo rozdzielana do osocza, kożuszka leukocyтарnego oraz koncentratu krwinek czerwonych. Kożuszek leukocyтарny i osocze służyły badaniu, natomiast koncentrat krwinek czerwonych był zabezpieczony dla potrzeb pacjenta. W przypadku wskazań pacjent mógł otrzymać zwrotnie uzyskany w ten sposób koncentrat własnych krwinek czerwonych. Następnie z tak uzyskanego materiału izolowano komórki regulatorowe przy pomocy FACS sortera (Influx, BDBioscience, USA) zaadoptowanego do warunków dobrej praktyki wytwarzania (*ang.* Good Manufacturing Practice, GMP) uzyskując czystość preparatu komórkowego powyżej 97% ($\approx 98\%$). Uzyskane komórki hodowano następnie z kulkami pokrytymi przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 (Ab), w środowisku wysokiego stężenia interleukiny-2 i autologicznej surowicy. Warunki te pozwalają w ciągu 10 dni hodowli z ilości około 0.5mln komórek uzyskać do 2mld komórek (od 100 do 1000x) bez zmiany ich właściwości biologicznych. Produkt końcowy posiadał ekspresję FoxP3 powyżej 90% [mediana (min.-max) = 91% (90-97)] (Marek i inni, 2011). W przypadku udanego procesu namnażania komórki były sprawdzane pod względem bezpieczeństwa przetoczenia pacjentowi (czystość mikrobiologiczna, właściwości hamowania układu odpornościowego) i podawane jako uzupełnienie standardowego leczenia.

Podawane dawki Tregs były następujące: 10×10^6 Tregs/kg m.c. w pojedynczej infuzji (3 pacjentów), 20×10^6 Tregs/kg m.c. w pojedynczej infuzji (3 pacjentów), oraz

o całkowitej wartości 30×10^6 Tregs/kg m.c. dwa wlewy (6 pacjentów) z drugą dawką w 6 lub 9 miesiącu po pierwszym podaniu.

Dwóch chorych nie ukończyło badania (decyzja rodziców lub nie stosowanie się do zaleceń lekarza w zakresie kontroli glikemii).

III.3.1. Obserwacja

Kontrola pacjentów w postaci oceny limfocytów T regulatorowych odbywała się: w dniu rekrutacji, na etapie pobrania autologicznych limfocytów Tregs, w dniu infuzji Tregs, a następnie w drugim tygodniu po infuzji i co dwa miesiące w pierwszym pół roku, a następnie co 3 miesiące w okresie trwania badania (2 lata). Ponadto oceniano odpowiedź immunologiczną (cytokiny, autoprzeciwciała) i metaboliczną (na czczo HbA1c, C-peptyd i glukozy) (tabela 4).

	R	P	I	+14d	+2m	+4m	+6m	+9m	+12m	+18m	+24m
Badania kliniczne	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dawkowanie Insuliny	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HbA1c (%)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C-peptyd	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Jakość Życia	x		x		x		x		x	x	x
Fenotyp limf.	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Autoprzeciwciała	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Cytokiny	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabela 4. Grafik wizyt kontrolnych, R-rekrutacja, P- pobranie, I- infuzja

Ocena pacjentów z grupy kontrolnej odbywała się o po rekrutacji oraz w ciągu rutynowych wizyt.

Na każdym etapie pobierano od każdego uczestnika 15ml krwi żyłnej obwodowej, gdzie: 8 ml pobierano do próbówki z heparyną do analiz komórkowych (cytometria przepływowa), 5ml do próbówki bez koagulantu do oznaczeń z surowicy i 2 ml z antykoagulantem EDTA do izolacji DNA (tabela 5).

Badanie laboratoryjne	Materiał diagnostyczny	Antykoagulant	Ilość	Warunki transportu
Oceny fenotypu limfocytów Tregs	leukocyty z krwi pełnej	Heparyna	8 ml	badanie wykonane w ciągu 4 godzin od momentu pobrania
Typowanie HLA	Izolacja DNA	EDTA	2 ml	Temp. pokojowa
Autoprzeciwciała	surowica	Brak	5 ml	
Cytokiny	surowica	Brak	5 ml	

Tabela 5. Materiał badany wykorzystywany w obserwacji pacjentów.

III.4. Materiały

III.4.1. Odczynniki

Ø Odczynniki do izolacji DNA używane w pracy.

Zestaw AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit	
minikolumny do izolacji DNA	
Bufor AP1	Liza
Bufor AP2	Odbiałczanie
Bufor W1A	Oczyszczanie
Bufor W2A	Oczyszczanie
Bufor TE	Tris-EDTA, przechowywanie DNA
Probówki jałowe	1,5 ml

Tabela 6. Odczynniki do izolacji DNA używane w pracy

Ø Odczynniki do typowania HLA używane w pracy.

Typowanie HLA metodą SSP na poziomie niskiej rozdzielczości		
HLA-DRB SSP	Biotest (BioRad)	Na poziomie niskiej rozdzielczości
HLA-DQB SSP	Biotest (BioRad)	Na poziomie niskiej rozdzielczości
HLA-A SSP	Biotest (BioRad)	Na poziomie niskiej rozdzielczości
Polimeraza Taq DNA	EUR _x	5 u/μl
Agarosa	Prona	0,5 kg
Bufor TBE	Tris, kwas borowy, wersenian dwusodowy Na ₂ EDTA	10x stężony
Barwnik DNA	Midori Green	1 ml

Tabela 7. Odczynniki do typowania HLA używane w pracy.

Przygotowanie żelu agarozowego 2%.	
Agaroza	2 g
Bufor TBE (0,5xstężonego)	100 ml
Barwnik Midori Green DNA Stain	1-2 μ l

Tabela 8. Przygotowanie żelu do elektroforezy.

Ø Pożywka hodowlana do bankowania komórek używana w pracy.

Bankowanie komórek	
RPMI 1640 (Gibco, WB)	95%
FBS	Płodowa surowica bydlęca
Roztwór DMSO	100%

Tabela 9. Pożywka hodowlana do bankowania komórek używana w pracy.

Ø Roztwory i bufor używane w pracy

PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} *	
0.147 M NaCl (POCH, Warszawa)	0.859g
4.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (POCH, Warszawa)	0.11g
2.3 mM Na_2HPO_4 (POCH, Warszawa)	0.028g
0.1 M EDTA(dwusodowy) (POCH, Warszawa)	0.37g
H_2O destylowana (Elga, Purelab Prima, WB)	aa 100ml

Tabela 10. Roztwory i bufor używane w pracy.

III.4.2. Przeciwciała monoklonalne używane w pracy

Do analizy ekspresji białek zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych przy użyciu cytometru przepływowego (BD FACS Canto II BD Biosciences, USA oraz BD Fortessa BD Biosciences, USA) użyto przeciwciał monoklonalnych (mAb) (Tab.11) sprzężonych z fluorochromami (Tab.12) oraz odpowiednich kontroli izotypowych do ustalenia prawidłowego odcięcia sygnału pozytywnego fluorescencji fluorochromu.

Specyficzność	Izotyp	Nazwa klonu (pochodzenie)	Fluorochrom
BD Pharmingen/Biosciences, USA - barwienie powierzchniowe			
anty-CD4	IgG1	RPA-T4	PerCP
anty-CD25	IgG1 _k	M-A251 (mysie)	PE
anty-CD3	IgG1 _k	UCHT1 (mysie)	Pacific Blue
anty-CD127	IgG1 _k	HIL-7R-M21 (mysie)	FITC
anty-CD45RA	IgG2b	L48 (mysie)	PE-Cy7
Invitrogen, USA- barwienie powierzchniowe			
Anty-CD62L	IgG1	3B5	APC-Cy7
eBiosciences, USA - barwienie wewnątrzkomórkowe			
FoxP3	IgG1 _k	236A/E7 (mysie)	APC

Tabela 11. Przeciwciała monoklonalne sprzężone z fluorochromami używane w pracy

Nazwa fluorochromu	Długość fali wzbudzenia(nm)	Długość fali emisji (nm)	Kolor emitowanego światła	Laser wzbudzający
PerCP	490	675	czerwony	niebieski (488 nm)
APC	650	660	czerwony	czerwony (633 nm)
PE	546	575	żółty	niebieski (488 nm)
PE-Cy7	490	785	podczerwony	niebieski (488 nm)
FITC	495	520	zielony	niebieski (488 nm)
APC-Cy7	650	767	podczerwony	czerwony (633 nm)

Tabela 12. Charakterystyka fluorochromów, którymi były znakowane przeciwciała monoklonalne używane w pracy

Roztwór do permeabilizacji komórek w czasie barwienia FoxP3 używany w pacy.	
Permeabilization Buffer	10xsteżony, eBioscience
Fixation/Permeabilization concentrant	eBioscience
Fixation/Permeabilization diluent	eBioscience

Tabela 13. Odczynniki do permeabilizacji komórek

III.4.3. Odczynniki używane do oznaczenia cytokin

W pracy do oznaczenia cytokin wykorzystano odczynniki Luminex® Performance Assay Human High Sensitivity Cytokine Base Kit (eBioscience, USA)

III.4.4. Odczynniki używane w pracy do oznaczenia autoprzeciwciał

Ø Immunofluorescencja pośrednia:

Autoprzeciwciało	Substrat tkankowy	Producent	Barwnik
ICA	„Trzustka (Małpa)”	EUROIMMUN	izotiocyjanian fluoresceiny (FITC)

Tabela 14. Odczynniki użyte do oznaczenia autoprzeciwciał ICA.

Ø Testy Immunoenzymatyczne

Przeciwciała przeciw	Klasa Ig	Supstrat	Nr katalogowy	Zawartość zestawu testowego
Dekarboksylaza kwasu glutaminowego (GAD)	IgG	Oplaszczona antygenem płyta mikrotitracyjna	EUROIMM UN EA 1022-9601 G – zestaw testu	Oplaszczony antygenem studzienki reakcyjne, Kalibratory, Kontrole, GAD (znakowana biotyną), bufor do GAD, Koniugat enzymatyczny, bufor do koniugatu i płukania, roztwór chromogenu (substrat), roztwór przerywający reakcje
Insulinowe (IAA)	IgG	Oplaszczona antygenem płyta mikrotitracyjna	EUROIMM UN 3806 – zestaw testu	Oplaszczony antygenem studzienki reakcyjne, Kalibratory, Kontrole, GAD (znakowana biotyną), bufor do GAD, Koniugat enzymatyczny, bufor do koniugatu i płukania, roztwór chromogenu (substrat), roztwór przerywający reakcje

Tabela 15. Odczynniki wykorzystane w badaniach AD i IAA.

III.4.4. Materiały jednorazowego użytku używane w pracy

Wszystkie materiały jednorazowego użytku zastosowane w pracy (np. próbówki) zostały wyprodukowane przez firmę Falcon Becton Dickinson, USA.

III.5. Metody

Uzyskiwanie subpopulacji leukocytów krwi obwodowej, surowic oraz izolacja DNA.

III.5.1. Izolacja DNA metoda kolumnową – postępowanie.

Zasada metody opiera się na zdolności wiązania DNA do ziół krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaloneptowych. Krew jest lizowana w buforze zawierającym sole chaloneptowe i detergenty niejonowe, w obecności proteiny K. W tych warunkach dochodzi do lizy komórek (uwolnienie DNA) i degradacji białek. Następnie mieszanina nanoszona jest na mikrokolumnę ze ziołem krzemionkowym zapewniającym dodatni ładunek. DNA przechodząc przez zioło osiada na nim, podczas gdy zanieczyszczenia przechodzą nie wiążąc się z kolumną. Po wypłukaniu zanieczyszczeń DNA wypłukiwane jest z kolumny roztworem o niskiej sile jonowej (woda lub bufor TRIS).

Do izolacji DNA potrzebnego do wykonania typowania HLA w loci: HLA-A, HLA-DRB1, HLA-DQB1 użyto zestawu AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (tab. 5). Z pobranej krwi pełnej na antykoagulant EDTA (wcześniej dobrze wymieszanej na mieszadle hematologicznym przez 20 min.) pobrano 250µl krwi i dodano do sterylnej próbki Eppendorf, następnie dodano 500 µl buforu AP1. Uzyskaną mieszaninę worteksowano 10 sekund po czym dodano 100 µl kolejnego buforu AP2, powtarzając worteksowanie przez 10 sek. Następnie materiał wirowano przez 10min/12000rcf. Uzyskany supernatant przeniesiono na kolumnę umieszczoną w 2 ml próbce i wirowano 1min/12000rcf. Następnie zlewano filtrat, ponownie umieszczono kolumnę w tej samej próbce dodawano 700 µl buforu W1A, i inkubowano przez 2 minuty. Po inkubacji wirowano 1 min/12000 rcf . Filtrat usuwano dodawano 800µl buforu W2, a następnie wirowano 1 minutę. Aby uzyskać lepszą czystość DNA czynność tą powtarzano. Ostatnim etapem było umieszczenie kolumny w 1,5 ml próbce, dodanie 80-200 µl buforu TE, zostawienie na 1 minutę w celu elucji, a następnie zwirowanie przez 1min./12000rcf . Wyizolowane DNA było następnie sprawdzone pod względem uzyskanej czystości i ilości. Wykonywano pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 260nm /280nm. DNA spełniające wymogi: czystość: OD 260 /280 [1,7-1,9].

Archiwizowano wyizolowane DNA w temp. -20°C , do momentu wykonania badania typowania HLA.

III.5.2. Typowanie HLA metodą PCR-SSP

Reakcja PCR SSP (ang. polymerase chain reaction with sequence specific primers) opiera się o zasadę swoistej amplifikacji z wykorzystaniem specjalnie dobranych starterów (primerów) specyficznych jedynie dla danego allelu /grupy alleli. W każdej z próbek reakcyjnych znajduje również para starterów swoistych dla kontroli pozytywnej. Po zakończonej reakcji PCR SSP, zamplifikowane fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie. Wynik reakcji uwidoczniiony jest w świetle UV dzięki obecności barwników interkalujących nić DNA.

III.5.2.1. Typowanie HLA-A, DRB1, DQB1 na poziomie niskiej rozdzielczości

Do typowania HLA użyto wcześniej wyizolowanego DNA oraz wykorzystano odpowiedni zestaw HLA SSP kit firmy Biotest (tab. 7). Metoda ta wymagała stężenia DNA o wartości $100 \pm 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ oraz czystości DNA OD: $A_{260}/A_{280\text{nm}} > 1.6$

W zależności od użytego testu sporządzono mieszaninę reakcyjną PCR (master mix) (według tabeli 16) w jałowych, autoklawowanych próbkach typu Eppendorf. Wyizolowane DNA dodawano do mieszaniny PCR dopiero po aplikacji $10 \mu\text{l}$ do próbki kontroli kontaminacji.

Proporcje mieszaniny reakcyjnej PCR w zależności od testu typowania HLA

Liczba reakcji PCR	8 (DQB1)	24 (HLA-A, DRB1)
Koktajl PCR	44 μl	120 μl
Polimeraza Taq	0,7 μl	1,8 μl
dH ₂ O	55 μl	150 μl
DNA	11 μl	30 μl

Tabela 16. Sposób sporządzenia mieszaniny reakcyjnej.

Objętość mieszaniny reakcyjnej PCR, jaką dozowano do pojedynczej próbki to 10 μl . Tak przygotowany blok próbek PCR umieszczano w termocyklerze. Poniżej

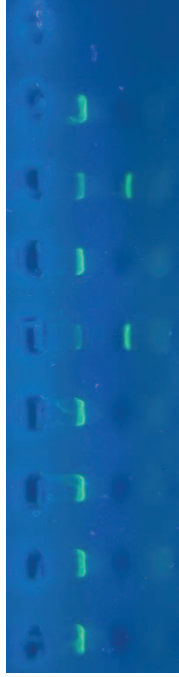
przedstawiono program amplifikacji, który był wymagany dla testów BioTest (BioRad) (tabela nr 17).

1 cykl	94°C	2 min	denaturacja
10 cykli	94°C	10 sek.	denaturacja
	65°C	60 sek.	annealing
20 cykli	94°C	10 sek.	denaturacja
	61°C	50 sek.	annealing
	72°C	30 sek.	wydłużanie

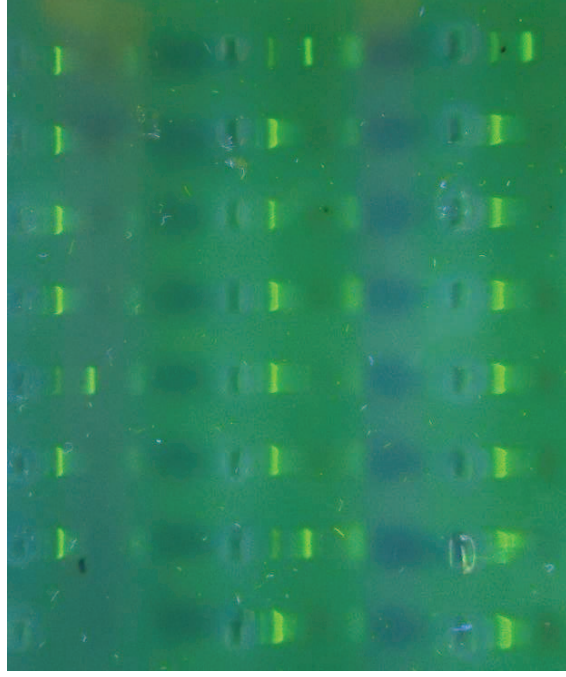
Tabela 17. Program amplifikacji PCR-SSP dla testów BioTest (BioRad).

Po skończonej amplifikacji produkty przeniesiono na żel agarozowy 2%, a następnie przeprowadzono elektroforezę w następujących warunkach: napięcie 240 V (8 V /cm odległość między elektrodami) 10 min.

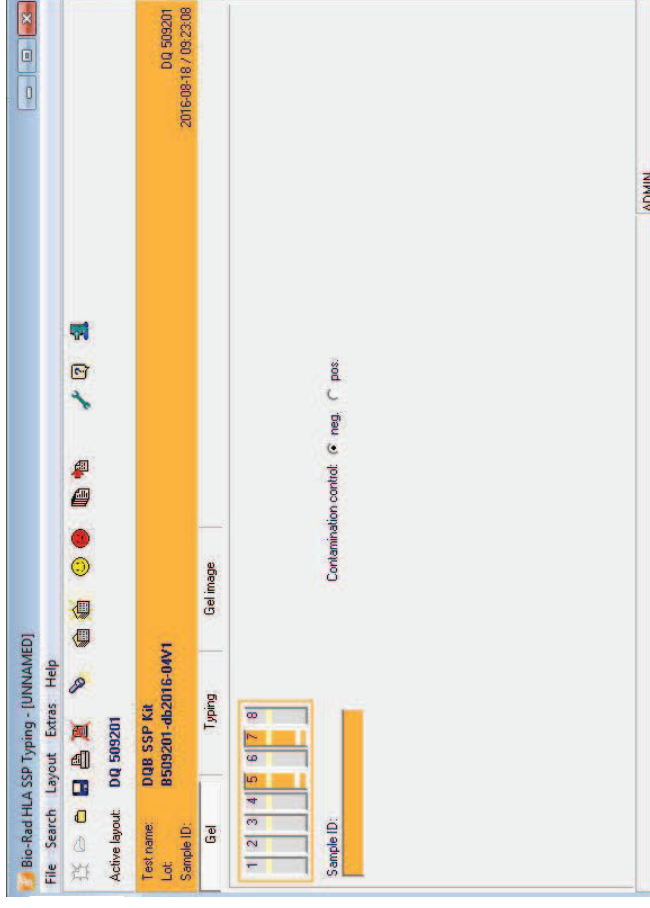
Po elektroforezie żel przeniesiono na transiluminator i w świetle UV odczytywano wynik nanosząc miejsca swoistej amplifikacji na raport próbki odpowiedni dla używanego zestawu (zgodny z nr ref.). Odczyt wyniku odbywał się za pomocą dostarczonych z testem tabel interpretacyjnych oraz przy pomocy odpowiedniego programu firmy BioTest (Rys. 5).



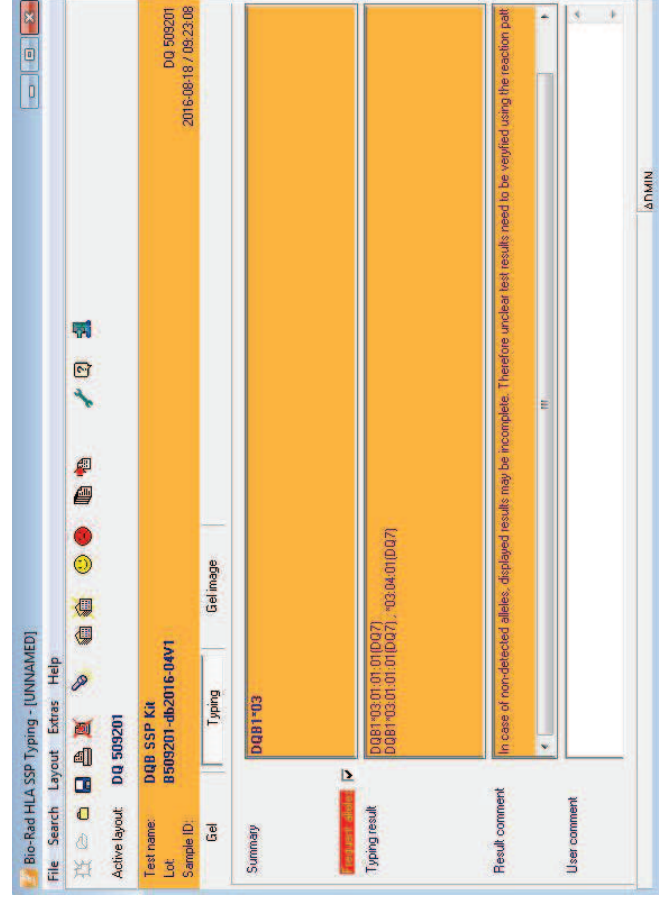
1a



1b



2



3

- Rysunek 5. Przebieg analizy typowania HLA, PCR-SSP firmy BioRad.
- 1a. Zdjęcie żelu HLA-DQB1, oraz widoczne dodatnie reakcje amplifikacji.
 - 1b. Zdjęcie żelu HLA-DRB1 oraz widoczne dodatnie reakcje amplifikacji.
 2. Raportowanie dodatnich reakcji w programie BioRad.
 3. Uzyskany wynik HLA-DQB1 w badanej próbce.

III.5.3. Cytometria przepływowa

Wszystkie oznaczenia cytometryczne prezentowane w niniejszej pracy zostały wykonane w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii w Katedrze Immunologii GUMed przy użyciu cytometru przepływowego BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA), który jest wyposażony w trzy lasery: niebieski (488nm), czerwony (633nm) i fioletowy (405nm), dające możliwość oznaczania jednocześnie 8 parametrów w jednej próbce oraz BD LSRFortessa (BD Biosciences, USA) wyposażonego w cztery lasery: niebieski (488nm), czerwony (640nm), fioletowy (405nm), jak i żółto-zielony (561nm), Urządzenie jest zdolne do wykrywania do 18 kolorów jednocześnie z określonych rodzajów filtrów optycznych,

Ustalanie regionów do analizy w cytometrze przepływowym wykonywano w sposób standardowy w oparciu o właściwości rozpraszania światła przez badane komórki określane jako parametr FSC/SSC (FSC- Forward scatter - światło rozproszone na wprost, parametr opisujący wielkość komórki; SSC- Side scatter - światło odbite i rozproszone bocznie, parametr opisujący gęstość i liczbę ziarnistości) oraz fluorescencję antygenów, z którymi sprzężone były użyte mAb, a także kombinacje wszystkich tych parametrów. Sposób ustalania bramek podano przy opisie analizy ekspresji konkretnych antygenów.

Wszystkie wyniki uzyskane podczas analizy leukocytów krwi obwodowej zostały przedstawione jako wartości odsetkowe, co jest zgodne ze standardowymi protokołami (Taylor JM, 1989) (Kunkl A, 1997).

W celu wykluczenia wzajemnego nakładania się widm fluorescencji używanych fluorochromów przed rozpoczęciem badań dla każdego eksperymentu przeprowadzano kompensację w oparciu o analizę autofluorescencji komórek niebarwionych lub barwionych kontrolami izotypowymi i znakowanych jednym mAb sprzężonym z danym fluorochromem.

III.5.3.1. Izolacja PBMC

Izolację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells; PBMC) wykonuje się z krwi pełnej pobranej na heparynę (w wyjątkowych sytuacjach EDTA) w ciągu 4 godzin od momentu pobrania, Krew pełną rozcieńcza się w stosunku 1:1 roztworem PBSu. Rozcieńczoną krew ostrożnie nakłada

się na warstwę 3-6 ml ficollu. W trakcie wirowania w temperaturze 15-17°C przy 2700 RPM przez 20 minut, bez funkcji hamowania w wyniku gradientu gęstości krew rozdziela się na frakcje. Następnie zbiera się kożuszek leukocytarny i przepłukuje PBS-em wirując przez 7 minut przy 1700 RPM. Czynność tą powtarzano dwukrotnie w celu uzyskania lepszej czystości komórek. Po zlaniu supernatantu, komórki zawieszają się w 2 ml PBSu.

Ostatnim krokiem izolacji PBMC było policzenie ile komórek jednojądrzastych otrzymano. W tym celu wykonano barwienie PBMC z płynem Türka w stosunku 1:9. Następnie zliczono komórki pod mikroskopem świetlnym w komorze Fuchsa-Rosenthala. Określenie ilości komórek w próbce jest niezbędne do wykonania barwienia, podczas którego potrzebne jest 100 tysięcy komórek w próbce badanej.

W mikroskopie świetlnym trzykrotnie liczone komórki znajdujące się na powierzchni 8 dużych kwadratów siatki komory, a otrzymaną średnią wartość podstawiano do wzoru:

$$A = n/8 \times 80\,000 \times 10$$

A= liczba PBMC w 1ml

n= liczba (średnia) PBMC w 8 dużych kwadratach siatki komory Fuchsa-Rosenthala

80 000 – przelicznik uwzględniający objętość komory w której liczone komórki

10 - oznacza rozcieńczenie próbki komórek płynem Türka w stosunku 1:9 (10 µl zawiesiny + 90 µl płynu Türka)

PBMC, które nie wykorzystano do barwienia fenotypu limfocytów T regulatorowych zostały zarchiwizowane w ciekłym azocie.

III.5.3.2. Barwienie PBMC

Do barwienia, czyli wyznakowania komórek fluorochromami sprzężonymi z przeciwciałami należy przygotować 3 próbki cytometryczne, w których powinno znajdować się ok. 100 tys. komórek jednojądrzastych zawieszonych w 200µl PBSu. Następnie dodawano odpowiednie w danym barwieniu mAb sprzężone z fluorochromami (po 5µl mAb/10⁴ komórek) i inkubowano odpowiednio przez 30 min. w ciemności, w temp. pokojowej (20+/-2°C) (tabela nr 18).

Probówka/ Przeciwciało	nr 1 CD3/CD4	nr 2 Fenotyp Tregs	nr 3 Komórki niebarwione
CD3	+	+	
CD4	+	+	
CD25	(-) lub kontrola izotypowa	+	
CD127	(-) lub kontrola izotypowa	+	
CD62L	(-) lub kontrola izotypowa	+	
CD45RA	(-) lub kontrola izotypowa	+	

Tabela 18. Schemat dodawania przeciwciał I rzutu w trakcie barwienia PBMC

Po inkubacji dodawano 2 ml PBS, po czym całość wirowano 1700 obr/min. Po wirowaniu nadsącz zlewano.

W celu wyznakowania antygeny wewnątrzkomórkowego FoxP3 kolejnym etapem barwienia była permeabilizacja. Komórki poddawane były procedurze utrwalenia i permeabilizacji przy wykorzystaniu buforów zawartych w zestawie. Do komórek dodawano 1 ml FoxP3 Fixation/Permabilization (1 część koncentratu 500 µl + 3 części diluentu 1500 µl). Całość mieszano i inkubowano w 4°C 60 minut (w lodówce). Następnie wirowano komórki przez 7 min 1700 obr/min., supernatant zlewano i dodawano 2 ml Permeabilization Buffer (rozcieńczony 1:10 wodą destylowaną). Czynność powtarzano 2-krotnie. Po zlaniu nadsącza dodawano 100µl rozcieńzonego uprzednio buforu Permeabilization, a następnie dodawano 5µl przeciwciała FoxP3 do próbki nr 2 (Fenotyp). Inkubacja w ciemności w temp. pokojowej trwała 30 min. Po inkubacji dodawano 2 ml i wirowano 1700obr./min w czasie 7 min.

Po barwieniu komórki płukano wcześniej rozcieńczonym buforem Permeabilization, wirowano przez 5 min. (1500 obr./min.), zlewano nadsącz i zawieszano w 500 µl PBS. Tak przygotowane próbki poddawano analizie cytometrycznej. Zwykle w cytometrze zbierano 10 000 komórek z analizowanego regionu. Ponadto, fluorescencję każdej barwionej próbki porównywano z fluorescencją komórek niebarwionych. Za sygnał dodatni uznawano fluorescencję silniejszą od fluorescencji komórek niebarwionych.

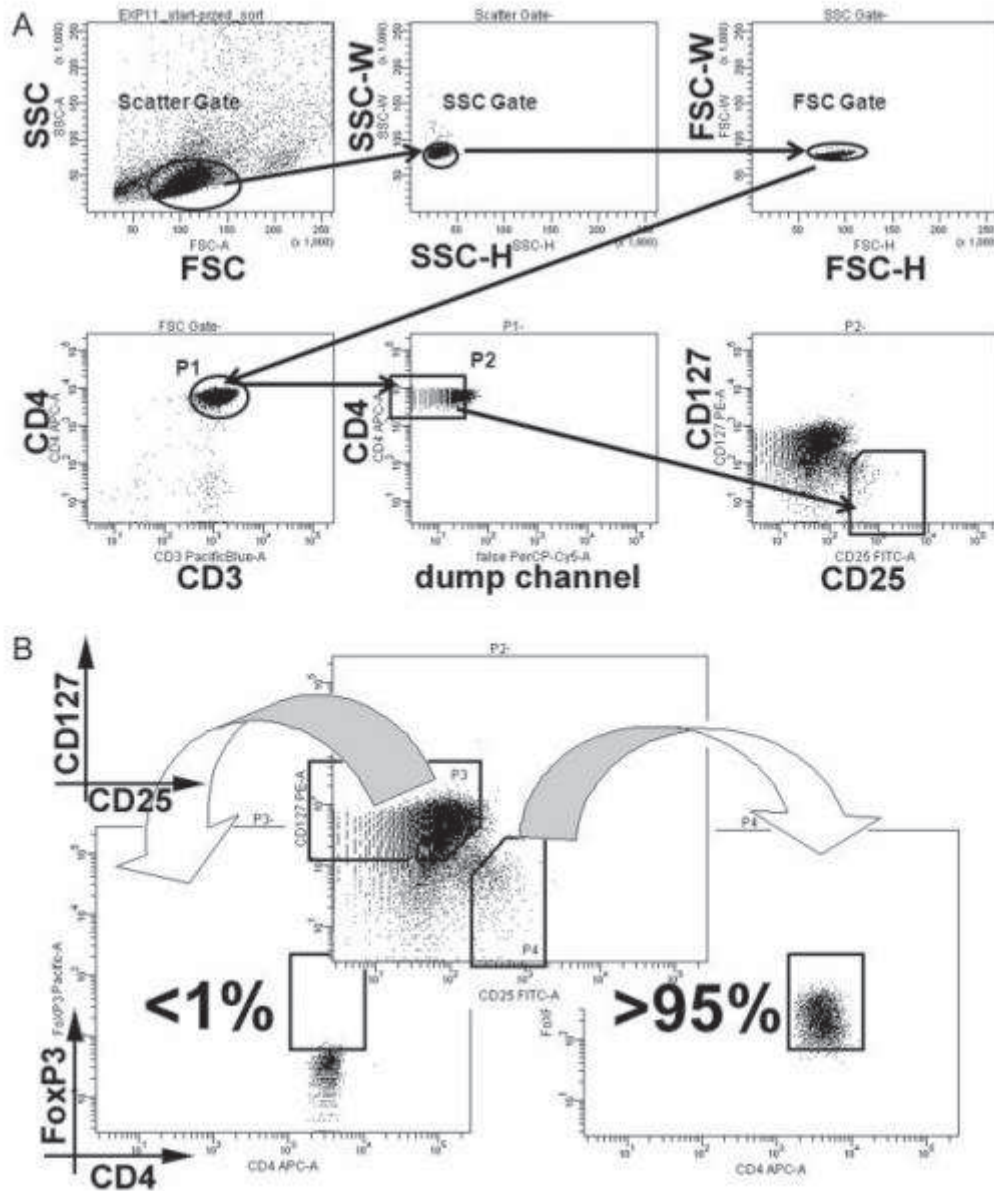
Immunofenotypizację PBMC przeprowadzono w panelu 7 kolorów: CD3/CD4/CD25/CD127/CD45RA/CD62L/ FoxP3.

Przeanalizowano dwa fenotypy Tregs:

- Limfocyty T CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺
- Limfocyty T CD3⁺ CD4⁺ CD25^{high} CD127⁻.

Bramkę CD25^{high} CD127⁻ z ostatniej populacji zastosowano również do oceny zawartości limfocytów T FoxP3⁺ w celu oceny nałożenia się tych dwóch fenotypów Tregs. Ostatecznie limfocyty T CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ zostały podzielone na komórki :

- CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺CD62L⁺CD45RA⁺ T naiwne (Tn) Tregs,
- CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺CD62L⁺CD45RA⁻ T pamięci centralnej (TCM) Tregs,
- CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺CD62L⁻CD45RA⁻ T pamięci efektorowe (TEM) Tregs.



Rysunek 6. Przykładowa analiza cytometryczna limfocytów Tregs. Źródło: (Trzonkowski i inni, 2009)

III.5.4. Uzyskiwanie surowicy.

Krew pobraną do sterylnych probówek bez antykoagulantu (6ml) wirowano przez 15 min. (2500obr./min.) w celu oddzielenia elementów komórkowych. Następnie zbierano surowicę, którą zamrażano i przechowywano do momentu przeprowadzanie oznaczeń cytokin w temp. -80°C.

Surowicę do badań autoprzeciwciał przekazywano do Pracowni Autoprzeciwciał, Laboratorium Immunologii Klinicznej i Transplantologii UCK w Gdańsku.

III.5.4.1. Oznaczenie autoprzeciwciał

Przedstawione w pracy autoprzeciwciała (ICA, GAD, IAA, IA2 oraz ZnT8) zostały oznaczone za pomocą dwóch metod: immunofluorescencji pośredniej (IFE) oraz testów immunoenzymatycznych. Materiałem badanym była surowica.

Przeciwciała przeciwwypowe (ICA) oznaczono metodą immunofluorescencji pośredniej w Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej UCK w Gdańsku (Kierownik: dr Grażyna Moszkowska). Jest metodą immunomorfologiczną, pozwalającą określić miejsce wiązania antygeny z przeciwciałem *in situ* w badanej tkance lub w komórkach. Do testu wykorzystywano skrawki tkankowe małpiej trzustki (odczynniki Pancreas (Monkey), Euroimmun). Jest to test ilościowo-jakościowy. Zastosowano barwnik izotiocyanian fluoresceiny (FITC), który po wzbudzeniu emituje kolor zielony

Sposób postępowania:

Przeciwciała ICA wykrywane są w surowicy metodą immunofluorescencji pośredniej przy użyciu komercyjnych preparatów (biochip-ów) (Trzustka (Małpa) przytwierdzonych do szkiełka podstawowego. Postępowanie

1. Na pole zawierające biochip naniesiono 30µl surowicy badanej, rozcieńczonej w buforze PBS-Tween (rozcieńczenie podstawowe 1:10).
2. Inkubacja 18h. w temp. pokojowej w komorze wilgotnej (jeśli przeciwciała w badanej surowicy są obecne, wiążą się z antygenami substratu i tworzy się swoisty kompleks antygen-przeciwciała)
3. Płukanie nadmiaru surowicy buforem PBS-Tween, a następnie szkiełka umieszczono na 5 min. w kąpeli PBS-Tween.
4. Szkiełka wyjąć i odsączyć.
5. Dodano po 25 µl znakowanej fluoresceiną anty-ludzkiej surowicy.
6. Inkubacja 30 min. w temp. pokojowej (znakowane fluoresceiną przeciwciała wiąże się z utworzonymi w czasie pierwszej inkubacji kompleksami antygen-przeciwciała).
7. Powtórka etapu 3 i 4
8. Na każde pole reakcyjne na szkiełku dodano 10 µl glicerolu i nałożono szkiełko nakrywkowe.

9. Odczyt wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym

Formułowanie wyników:

Badanie jakościowe umożliwia stwierdzenie obecności przeciwciał skierowanych przeciw antygenom przewodów ślinowych.

Wynik dodatni, określony jest poprzez:

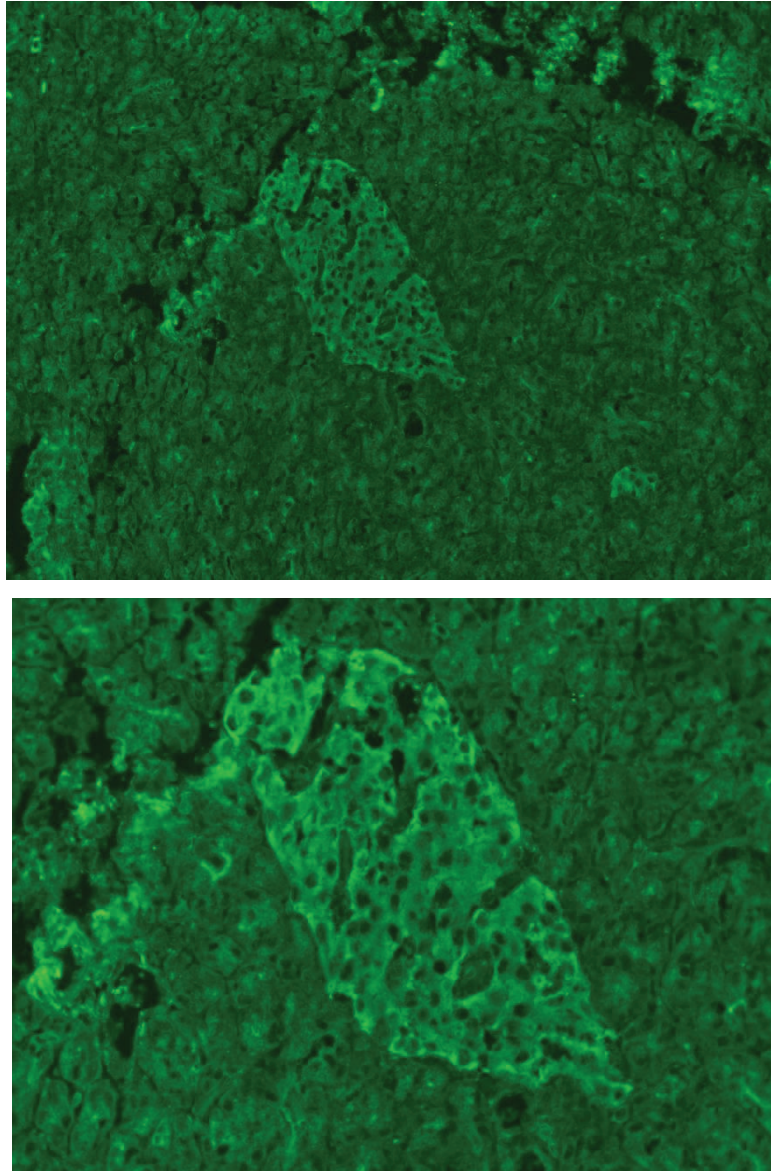
- podanie miana (1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280; 1:2560 lub >1:2560)

Wynik wydawany jest jako ujemny w przypadku stwierdzenia braku swoistej dla ocenianych autoprzeciwciał reakcji dla miana podstawowego (1:10).

Przykładowy obraz obecnych przeciwciał ICA widzianych w mikroskopie fluorescencyjnym przedstawiono na rysunku nr 7.

Interferencje i źródła błędów

Nie wykazano interferencji w przypadku surowic hemolitycznych, lipemicznych oraz z hiperbilirubinemią.



Rysunek 7. Reakcje dodatnie wysp trzustkowych w badaniu ICA metodą IFE (substrat tkankowy - trzustka mały) u pacjenta ze świeżo wykrytą T1D. Źródło: dr Julia Kulczycka, zasoby własne.

Przeciwciała antyGAD oznaczono metodą ELISA (Diaplets Anti-GAD plus, Euroimmun) w Pracowni Autoprzeciwciał w Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej (kierownik: dr Grażyna Moszkowska), zgodnie z instrukcją producenta, bez modyfikacji. Jest to analiza ilościowa pozwalająca na wykrycie w surowicy ludzkich przeciwciał IgG przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego.

Jeśli próbki pacjentów są pozytywne przeciwciała wiążą się z GAD. Związane przeciwciała mogą reagować dwuwartościowo tworząc mostek pomiędzy GAD unieruchomionym w studzience reakcyjnej, a GAD znakowanym biotyną, który jest

dodawany w drugim etapie inkubacji. Związane biotyną przeciwciała wykrywa się podczas trzeciego etapu inkubacji z awidyną znakowaną enzymem (koniugat enzymatyczny), który następnie katalizuje reakcję barwną. Intensywność koloru jest proporcjonalna do stężenia przeciwciał przeciw GAD.

Sposób postępowania:

1. Odpipetowano do studzienek reakcyjnych po 25 μ l kalibratorów, pozytywnej i negatywnej surowicy kontrolnej oraz próbki pacjentów (nierozcieńczona surowica). Inkubacja przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (+18°C do +25°C) na wytrząsarce do mikroplatek o prędkości 500 obrotów/min.
2. Płukanie: po opróżnieniu studzienek reakcyjnych trzykrotne płukanie, używając po 450 μ l rozcieńczonego buforu płuczącego.
3. Inkubacja: po odpipetowaniu do każdej studzienki reakcyjnej po 100 μ l roztworu GAD (znakowanego biotyną) inkubowano przez 1h w temperaturze pokojowej (+18°C do 25°C) na wytrząsarce do mikroplatek o prędkości 500 obrotów/min.
4. Płukanie – powtórzono pkt. 2
5. Inkubacja koniugatu: do każdej studzienki reakcyjnej dodano po 100 μ l roztworu koniugatu enzymatycznego (znakowana peroksydazą awidyna). Płytkę inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej (+18°C do 25°C) na wytrząsarce do mikroplatek o prędkości 500 obrotów/min.
6. Płukanie – pkt. 2
7. Inkubacja substratu: do każdej studzienki reakcyjnej dodano po 100 μ l roztworu substratu/chromogenu. Inkubacja 20 minut w temperaturze pokojowej (+18°C do 25°C).
8. Przerwanie reakcji: dodano po 100 μ l roztworu przerywającego reakcję.
9. Pomiar: Fotometryczna ocena intensywności barwy, przy długości fali 450nm i 405 za pomocą czytnika.
10. Ocena ilościowa testu: krzywą kalibracyjną, z której można odczytać stężenie przeciwciał anty-GAD w próbkach pacjentów, otrzymujemy przez odwzorowanie wartości ekstynkcji dla kalibratorów 3-6 (450 nm) lub kalibratorów 1-6 (405 nm) (linearnie, oś y) wobec odpowiednich stężeń (logarytmicznie, oś x).

Formułowanie wyników:

Górna granica normy (cut-off) rekomendowana przez EUROIMMUN wynosi 10 jednostek

międzynarodowych na mililitr (IU/ml). EUROIMMUN rekomenduje następującą interpretację wyników: <10 IU/ml: negatywny, >10 IU/ml: pozytywny

Przeciwciała IAA - oznaczono metodą ELISA (anti-IAA, Euroimmun) w Pracowni Autoprzeciwciał w Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej UCK w Gdańsku (kierownik: dr Grażyna Moszkowska), zgodnie z instrukcją producenta, bez modyfikacji. Jest to analiza ilościowa pozwalająca na wykrycie w surowicy ludzkich przeciwciał IgG przeciw insulinowym.

Surowica pacjentów do oznaczenia IAA została rozcieńczona 101 razy (5 µl surowicy + 500 µl roztworu do rozcieńczania (G))

Sposób postępowania:

1. Dodano do studzienek reakcyjnych po 100 µl kalibratorów, pozytywnej i negatywnej surowicy kontrolnej oraz próbki pacjentów (rozcieńczona surowica). Inkubacja przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (+18°C do +25°C) na wytrząsarce do mikropłytek o prędkości 500 obrotów/min
2. Płukanie: po opróżnieniu studzienek reakcyjnych trzykrotne płukanie, używając po 300µl rozcieńzonego buforu płuczącego.
3. Inkubacja: po odpipetowaniu do każdej studzienki reakcyjnej po 100 µl roztworu IgG – HRP (D) (znakowanego biotyną) inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej (+18°C do 25°C) na wytrząsarce do mikropłytek o prędkości 500 obrotów/min.
4. Płukanie – powtórzono pkt. 2
5. Inkubacja koniugatu: do każdej studzienki reakcyjnej dodano po 100 µl roztworu koniugatu enzymatycznego (znakowana peroksydazą awidyna). Płytkę inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej (+18°C do 25°C) na wytrząsarce do mikropłytek o prędkości 500 obrotów/min.
6. Płukanie – pkt. 2
7. Inkubacja substratu: do każdej studzienki reakcyjnej dodano po 100µl roztworu substratu/chromogenu. Inkubacja 15 minut w temperaturze pokojowej (+18°C do 25°C).
8. Przerwanie reakcji: dodano po 100µl roztworu przerywającego reakcję.

9. Pomiar: Fotometryczna ocena intensywności barwy, przy długości fali 450nm i 690nm za pomocą czytnika.
10. Ocena ilościowa testu: krzywą kalibracyjną, z której można odczytać stężenie przeciwciał anti-IAA w próbkach pacjentów.

Formułowanie wyników:

Górna granica normy (cut-off) rekomendowana przez EUROIMMUN wynosi 2,4 jednostek

międzynarodowych na mililitr (IU/ml). EUROIMMUN rekomenduje następującą interpretację wyników: <2,4 IU/ml: negatywny, >2,4 IU/ml: pozytywny

Wyniki **Autoprzeciwciał IA-2 oraz ZnT8** zostały przedstawione przez zespół Kliniki Pediatrii Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Przeciwciała zostały oznaczone metodą ELISA, zgodnie z instrukcją producenta, bez modyfikacji. Były to niezależne analizy ilościowe, pozwalające na wykrycie w surowicy ludzkiej przeciwciał IgG przeciw fosfatazie tyrozyny białkowej (IA-2) oraz przeciwko terminalnej domenie C transportera cynku 8. Analiza składała się z 4 inkubacji: 1) z rozcieńczonymi badanymi surowicami, kalibratorami oraz pozytywną i negatywną kontrolą, 2) z antygenem IA-2, ZnT8 3) z konjugatem, 4) z substratem, a następnie z pomiaru fotometrycznego przy długości fali 450 nm i 405 nm odczytano wyniki.

III.5.4.2. Oznaczenie cytokin za pomocą techniki Multiplex na aparacie Luminex.

Oznaczenie stężenia TNF α , IL1, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, VEGF i IFN γ przeprowadzono z wykorzystaniem techniki Multiplex na aparacie Luminex™100. Zestawy do oznaczeń dostarczyła firma Biocom.

Luminex® Performance Assay umożliwiają jednoczesny pomiar do 22 markerów w jednym cyklu testu (panelu). Technologia Luminex® opiera się na wykorzystaniu mikrokulek polisterynowych lub magnetycznych. Mikrokulki te (ang. beads) są wewnętrznie wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym, który stanowi widmowy adres danej kulki. Na ich powierzchni są immobilizowane przeciwciała, specyficzne dla oznaczanych markerów, które są wychwytywane w materiale badanym. Analizator Luminex® wykorzystuje technikę cytometrii przepływowej do identyfikacji

mikrokulek. Przy pomocy jednej wiązki lasera identyfikuje się ich kolor, a tym samym rodzaj badanego antygeny. Druga wiązka lasera wzbudza barwnik fluorescencyjny przyłączony do przeciwciała II-rzędowego. Taka technika pozwala na ocenę wielu biomarkerów (cytokin) w jednym badanym dołku płytki 69-dołkowej.

Oznaczenie przeprowadzono według instrukcji producenta R&D Systems, „Human high Sensitivity Cytokine Base Kit A”.

III.6. Analiza statystyczna

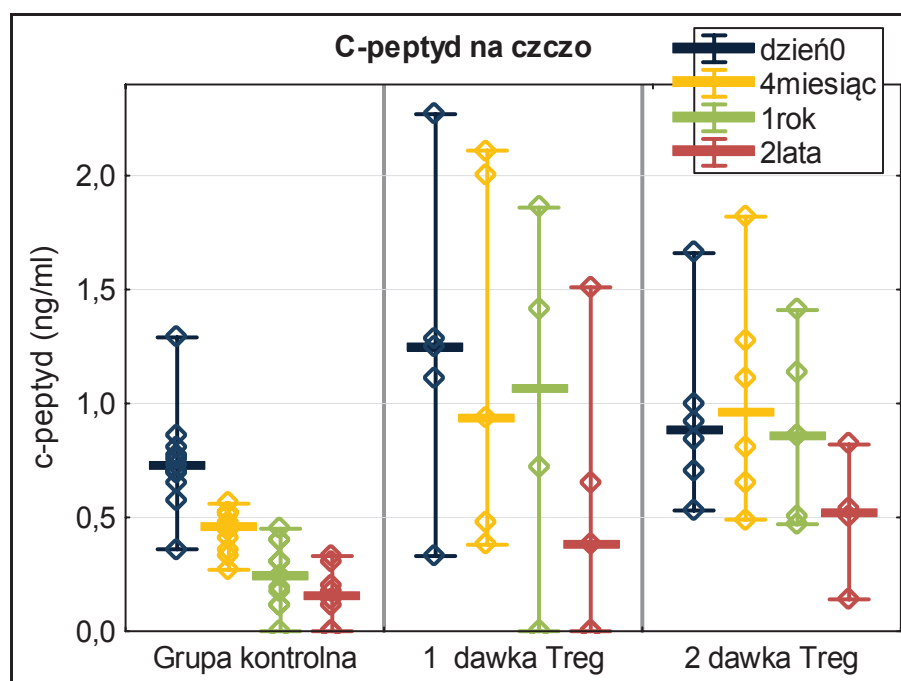
Do statystycznego opracowania wyników wykorzystano program STATISTICA 10.0 (Statsoft, Polska). Rozkład uzyskanych danych różnił się od rozkładu normalnego, z tego względu do ich analizy wykorzystano testy nieparametryczne: ANOVA rang Kruskala-Wallisa, test U Manna-Whitneya i test Wilcoxon. Różnice traktowano jako istotne statystycznie w przypadku, kiedy uzyskany w teście poziom istotności p wynosił < 0.05 .

IV. Wyniki

IV.1. Ocena funkcji komórek β .

Funkcja komórek β była najlepiej zachowana u pacjentów leczonych dwoma dawkami Tregs, nieco gorsze wyniki przedstawiały się u osób leczonych jedną dawką, natomiast najgorsze wyniki były w grupie kontrolnej, nieleczonej.

Efekt ten przedstawiono za pomocą pomiaru stężenia C-peptydu na czczo, który był znacznie wyższy u pacjentów leczonych jedną lub dwoma dawkami Tregs w porównaniu do nieleczonej grupy kontrolnej w ciągu całego badania.

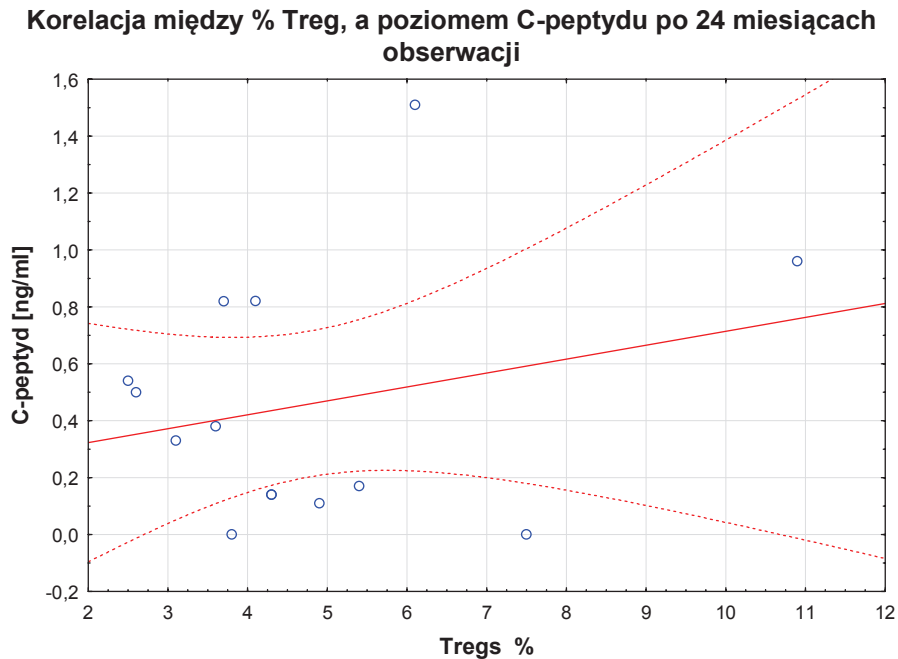


Rysunek 8. Stężenie C-peptydu na czczo w grupie kontrolnej i w grupach leczonych 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA – porównanie dla 3 grup w czasie: 0: $Chi2 = 3,43$; $p = 0,180$, 4 miesięcy: $Chi2 = 8,57$; $p = 0,014$, 1 rok: $Chi2 = 10,15$; $p = 0,006$ 2 lata: $Chi2 = 3,46$; $p = 0,177$

Różnica ta stała się nieistotna w okresie 2 lat po zakończeniu badania w grupie z pojedynczą dawką Tregs oraz grupą kontrolną, nieleczonej (Test U-Manna-Whitneya $Z = 0,63$; $p = 0,43$). W porównaniu z grupą nieleczonej, a grupą z dwiema dawkami Tregs różnica ta była statystycznie znamiennej (test U Manna-Whitneya $z = 2,04$, $p = 0,04$).

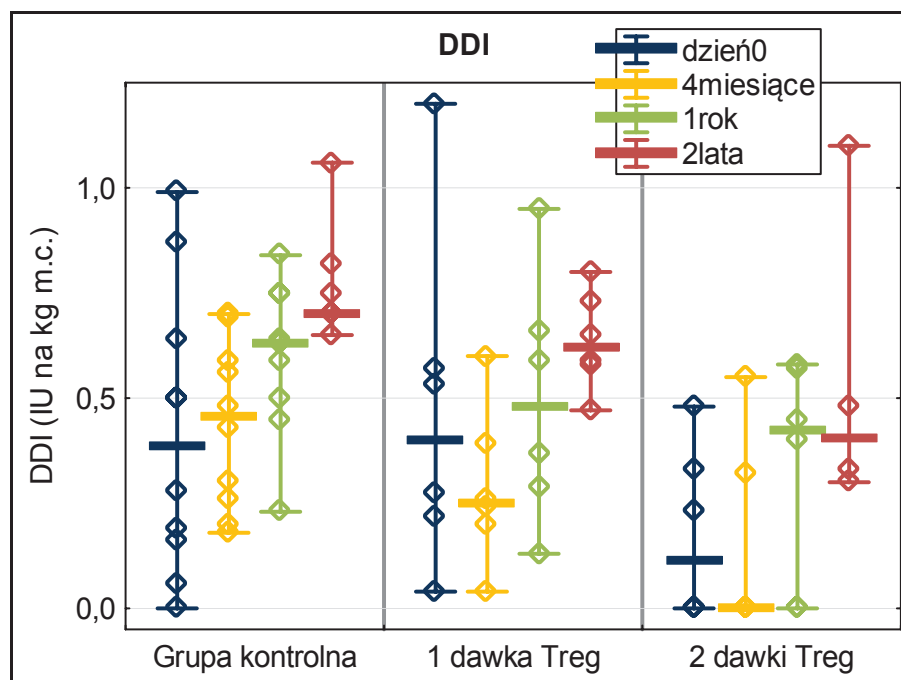
Dodatkowo, jeśli dane leczonych i nieleczonych pacjentów analizowano razem po 4 miesiącu i po roku od rozpoczęcia obserwacji, zaobserwowano, że poziom C-peptydu

był skorelowany z procentem Tregs we krwi obwodowej (Marek-Trzonkowska i inni, 2014). Ta sytuacja zmieniła się po 2 latach obserwacji, gdzie korelacja ta już nie wystąpiła - przeanalizowano dane leczonych i nieleczonych pacjentów razem po 24 miesiącach od rozpoczęcia obserwacji (Wsp. R Spearmana; po 24 miesiącach: $R = -0.072$, $p = 0.05$).



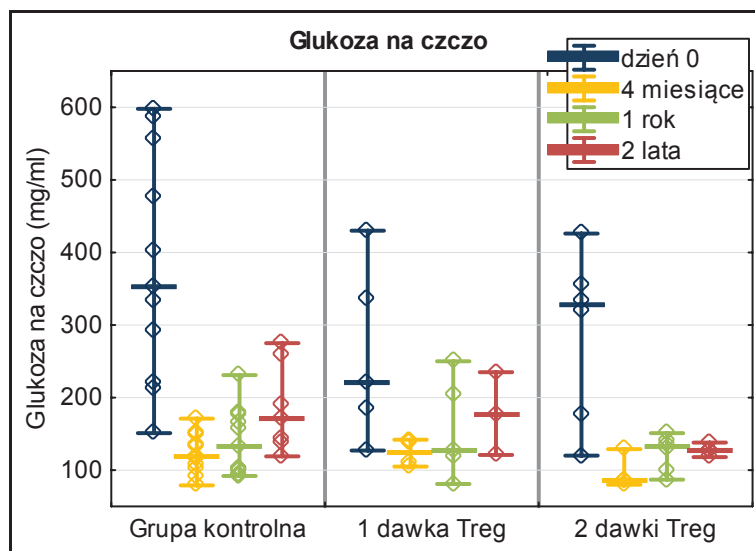
Rysunek 9. Korelacja między Limfocytami Tregs [%], poziomem C-peptydu.

Różnicę zaobserwowano również gdy przeanalizowano dobową dawkę podawania insuliny. Obie grupy leczone Tregs wymagały niższych dawek insuliny w czasie trwania całego badania. W grupie leczonej dwoma dawkami Tregs dwóch pacjentów było całkowicie niezależnych od podawania insulina na ponad rok czasu po podaniu limfocytów Tregs. Ponadto wszyscy oprócz jednego pacjenta wymagali mniej niż 0,5 UI dawki insuliny na kg masy ciała.

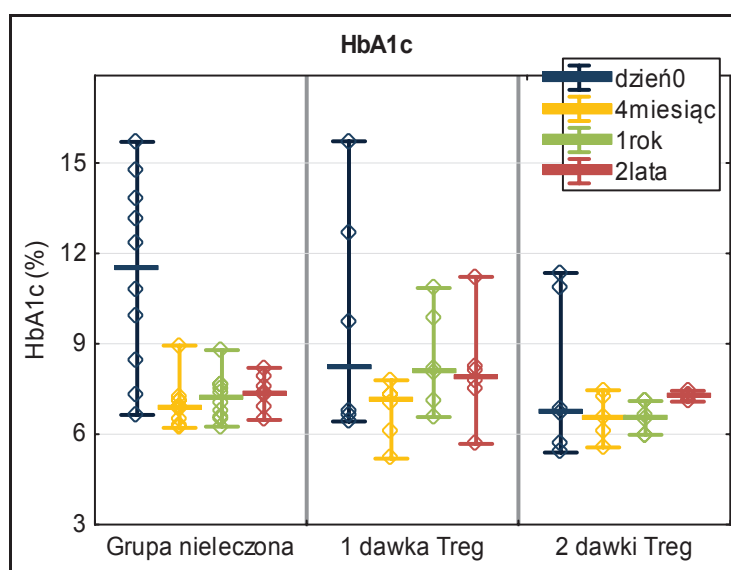


Rysunek 10. Dobowa dawka insuliny (DDI) w grupie kontrolnej i grupach leczonych 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA – porównanie 3 grup w czasie: 0: $\text{Chi}^2 = 5,21$; $p = 0,074$, 4 miesiące: $\text{Chi}^2 = 8,351$; $p = 0,015$, 1 roku: $\text{Chi}^2 = 7,86$; $p = 0,020$, 2 lat: $\text{Chi}^2 = 5,88$; $p = 0,052$.

Istotne jest, że podawane dawki insuliny dostosowywano w sposób standardowy do markerów kontroli metabolicznej, takich jak: Hb1C i stężenie glukozy na czczo. Stąd, szczególnie ważne jest, że w grupie leczonej wymagane było podawanie niższych dawek egzogennej insuliny, a parametry te były przez cały okres badania lepsze od grupy kontrolnej, zwłaszcza na dwa lata od włączenia terapii.



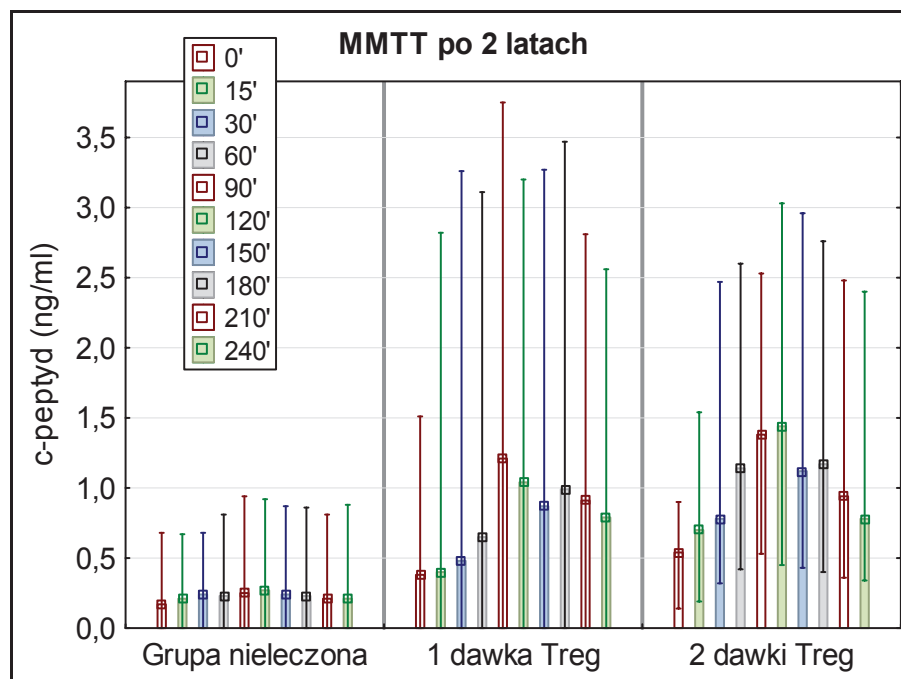
Rysunek 11. Poziom glukozy na czczo obserwowany w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA dla glukozy na czczo – porównanie trzech grup w czasie: 0 $\text{Chi}^2 = 2,27$; $p = 0,322$, 4 miesiące $\text{Chi}^2 = 6,95$; $p = 0,031$, 1 rok $\text{Chi}^2 = 0,89$; $p = 0,639$, 2 lata: $\text{Chi}^2 = 6,79$; $p = 0,034$



Rysunek 12. Poziom HbA1c czczo obserwowany w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA dla HbA1c – porównanie trzech grup w czasie: 0 $\text{Chi}^2 = 8,06$; $p = 0,018$, 4 miesiące $\text{Chi}^2 = 0,78$; $p = 0,676$, 1 roku: $\text{Chi}^2 = 7,13$; $p = 0,028$ i 2 lat: $\text{Chi}^2 = 3,233$; $p = 0,197$

Zaobserwowano lepsze funkcjonowanie wysp trzustkowych, potwierdzone testem tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego, z dużą częstotliwością pobierania próbek (MMTT ang. mixed meal tolerance test) po 2 latach od włączenia terapii Tregs. Obie grupy leczone charakteryzowały się lepszym stymulowanym poziomem C-peptydu niż grupa nieleczona. Różnica między grupą leczoną 2 dawkami,

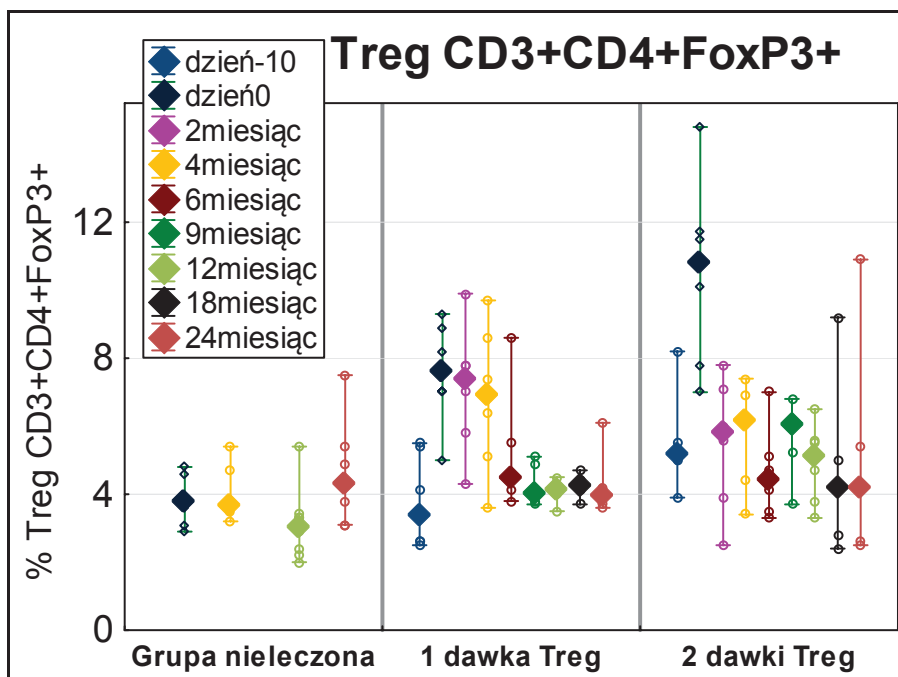
a grupą tych nie poddanych leczeniu była istotna. Natomiast podobne wyniki testu MMTT zaobserwowano pomiędzy pacjentami leczonymi jedną dawką, a grupą nieleczoną - tu różnica była nieistotna.



Rysunek 13. Test tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego, z dużą częstotliwością pobierania próbek przeprowadzony w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA dla MMTT – porównanie trzech grup w czasie: 0': $\text{Chi}^2 = 3,93$; $p = 0,139$, 15': $\text{Chi}^2 = 3,88$; $p = 0,143$, 30': $\text{Chi}^2 = 5,40$; $p = 0,067$, 60': $\text{Chi}^2 = 5,92$; $p = 0,051$, 90': $\text{Chi}^2 = 4,90$; $p = 0,085$, 120': $\text{Chi}^2 = 4,90$; $p = 0,085$, 150': $\text{Chi}^2 = 5,27$; $p = 0,071$, 180': $\text{Chi}^2 = 4,90$; $p = 0,085$, 210': $\text{Chi}^2 = 5,32$; $p = 0,069$, 240': $\text{Chi}^2 = 4,27$; $p = 0,118$.

IV.2. Poziom Tregs in vivo.

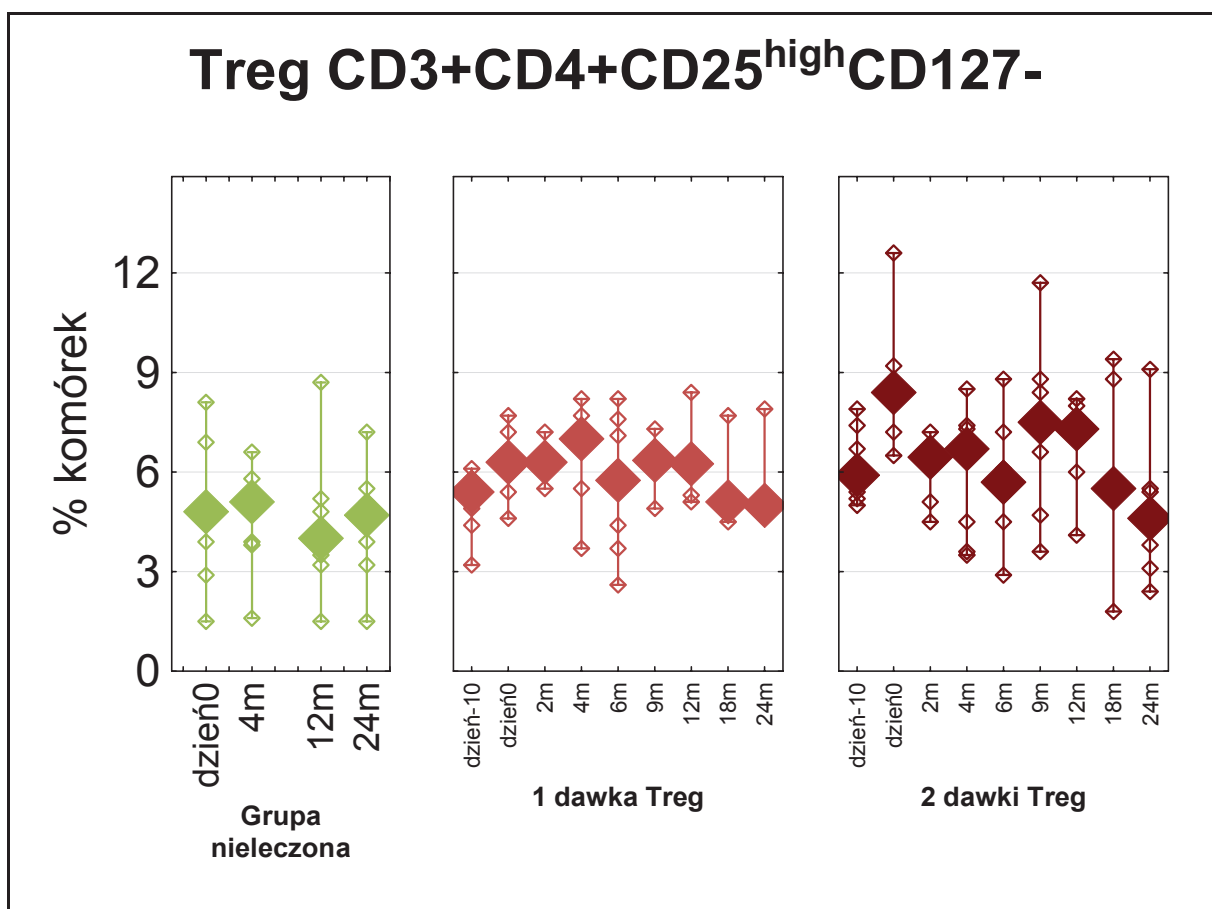
Poziom Tregs wzrastał za każdym razem po indukcji limfocytów Tregs. Niemniej jednak ich podwyższony poziom nie był trwały i spadał do wartości wyjściowych w ciągu 2 lat od rozpoczęcia badania. Dodatkowo zaobserwowano wzrost poziomu Tregs po drugim podaniu, jednak nie był tak wysoki, jak po pierwszym podaniu.



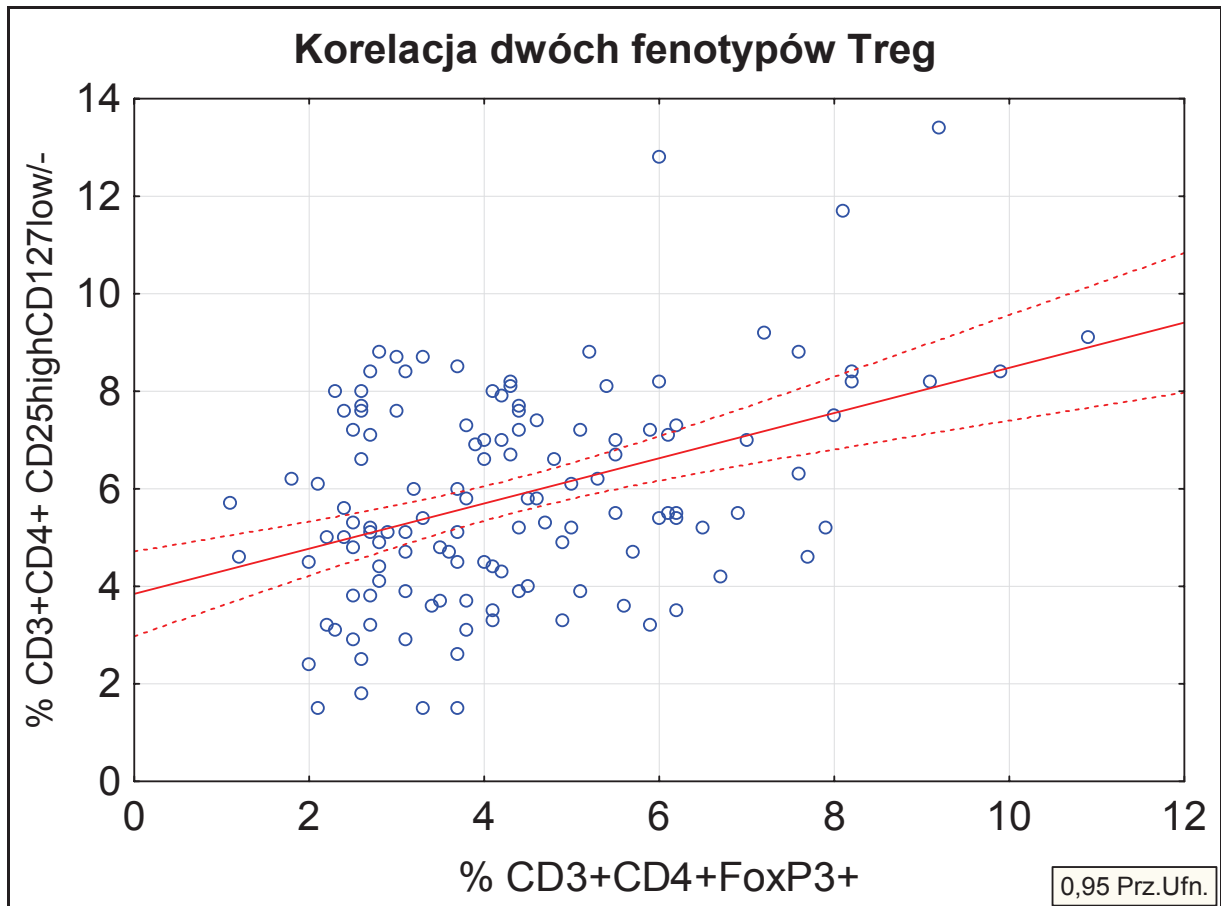
Rysunek 14. Poziom limfocytów Tregs $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA dla porównania poziomu limfocytów Tregs $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ w trzech badanych grupach w czasie: 0 $Chi^2 = 12,83$; $p = 0,002$, 4 miesiące: $Chi^2 = 5,98$; $p = 0,050$, 1 roku: $Chi^2 = 9,98$; $p = 0,006$ oraz 2 lat: $Chi^2 = 0,379$; $p = 0,827$

Wykazano istotną korelację między odsetkiem dwóch fenotypów limfocytów Tregs: $CD3^+CD4^+Foxp3^+$, a fenotypem $Foxp3^+CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^-$ (test Spearmana $r = 0,33$ $p < 0,05$). Niemniej jednak, analiza zawartości bramki $CD25^{high}CD127^-$ wykazała, że w czasie rozwoju cukrzycy zmniejszał się odsetek komórek $FOXP3^+$ w bramce $CD25^{high}CD127^-$ niezależnie od liczby podawanych dawek Tregs (test Wilcoxon'a: dzień 0 vs 24miesiąc grupa nieleczona Tregs $Z = 2,053$, $p = 0,04$; pojedyncza dawka $Z = 2,086$, $p = 0,03$; podwójna dawka $Z = 1,35$, $p = 0,17$). Ten efekt był przejściowy i odwracalny u pacjentów po podaniu drugiej dawki Tregs, ale nie był trwały i poziom komórek $FOXP3^+$ zmniejszał się w czasie również w tej grupie. Tym niemniej procent komórek $FOXP3^+$ w bramce $CD25^{high}CD127^-$ był znacznie większy

w grupie leczonej dwoma dawkami Tregs u wszystkich trzech grup badanych w 24miesiącu (test Wallis ANOVA Kruskal Chi2 = 6,66, p = 0,009).



Rysunek 15. Poziom limfocytów Tregs CD3+CD4+CD25^{high}CD127⁻ w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs.



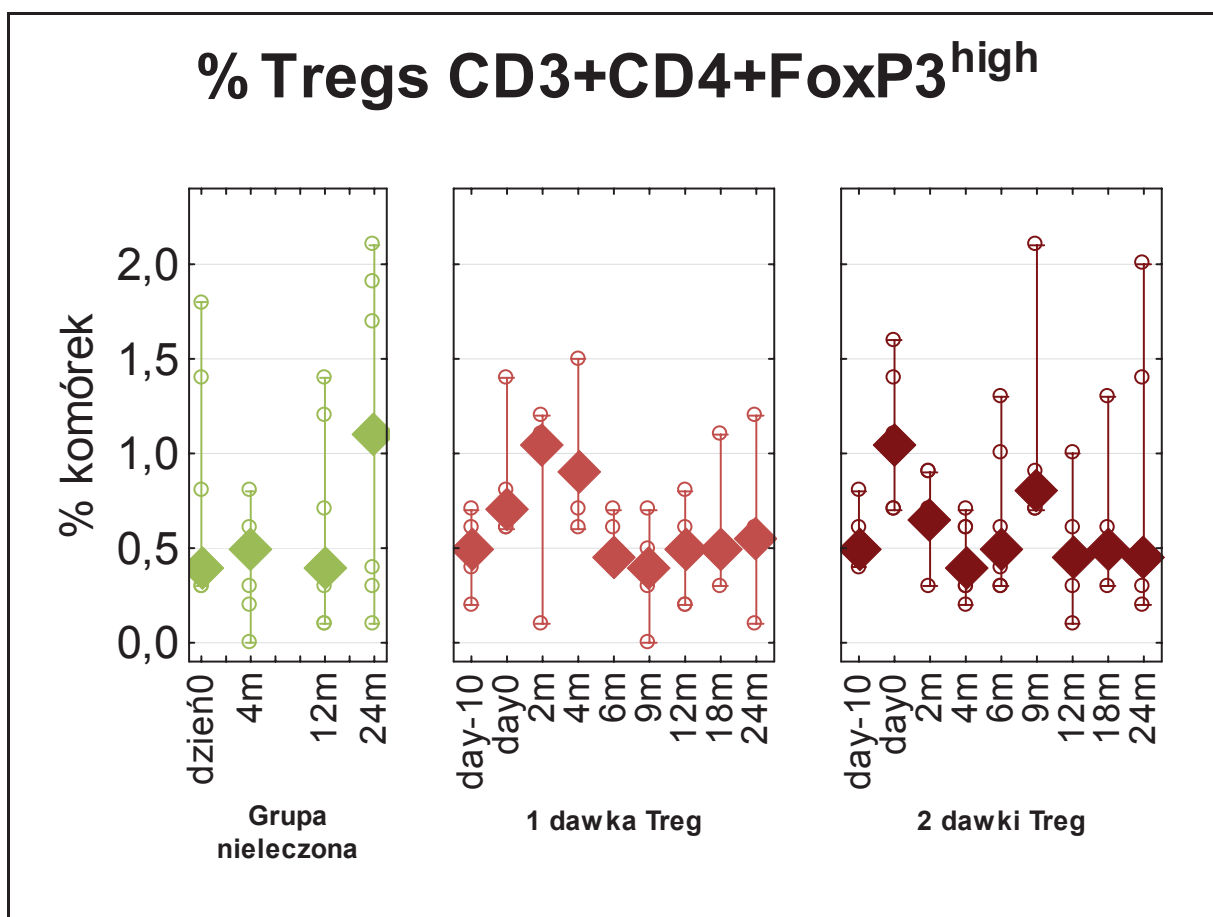
Rysunek 16. Korelacja dwóch fenotypów Tregs: CD3+CD4+FoxP3+ oraz CD3+CD4+CD25highCD127low-

IV.3. Poziom Tregs podanych w preparacie limfocytów Tregs *in vivo*.

Analiza subpopulacji limfocytów Tregs podanych pacjentom ze świeżo wykrytą cukrzycą typu 1 pozwala na ocenę ich dynamiki.

Mediana ekspresji limfocytów Tregs Foxp3 w czasie ich namnażania jest znacznie wyższa niż we krwi obwodowej. Dzięki tej obserwacji można założyć, iż znaczna część analizowanych limfocytów Tregs CD3⁺CD4⁺Foxp3^{high} była najprawdopodobniej z podanego preparatu, a tym samym jest wygodnym i nieinwazyjnym sposobem, który pozwala ocenić właściwości farmakokinetyczne podawanych limfocytów Tregs. Rzeczywiście, zawartość procentowa limfocytów Tregs CD3⁺CD4⁺Foxp3^{high} wzrosła po infuzji w obu grupach, ale spadała do wartości wyjściowych w ciągu kilku miesięcy. (Test Wilcoxon: dzień-10 vs. szczytowy wzrost: Pojedyncza dawka Z = 2,087, p =

0,035; Dwie dawki $Z = 2,28$, $p = 0,022$; 6m vs. 9m w dwóch dawkach: $Z = 1,20$, $p = 0,22$).



Rysunek 17. Poziom Trgs CD3+CD4+FoxP3^{high} w grupie: nieleczonej, leczonej 1dawką Tregs oraz leczonej 2 dawkami Tregs.

IV.4. Subpopulacje Tregs in vivo

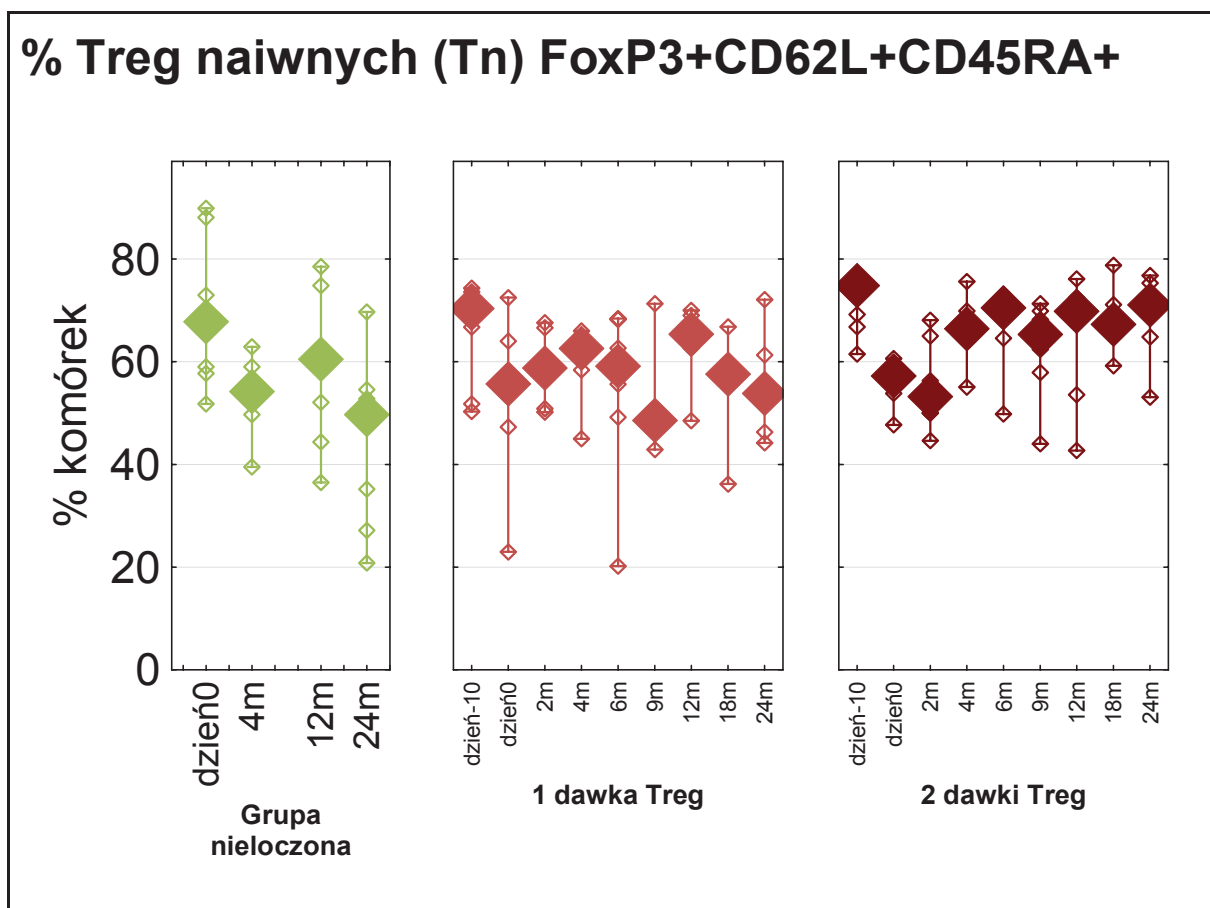
W grupie kontrolnej, nieleczonej zaobserwowano zmianę w odsetkach subpopulacji limfocytów Tregs. W porównaniu do wartości wyjściowych nastąpił wzrost poziomu limfocytów Tregs o fenotypie Tcm kosztem limfocytów Tregs naiwnych w okresie 24 miesięcy od trwania badania. Podobne, ale nie tak znaczące zmiany obserwowano u pacjentów leczonych pojedynczą dawką Tregs. Różnice te były najmniej widoczne w grupie leczonej podwójną dawką Tregs.

[Test Wilcoxon dzień0 vs 24m **Tn Tregs**: grupa nieleczona $Z=2.29$, $p=0.021$, pojedyncza dawka Tregs $Z=1.52$, $p=0.120$; podwójna dawka Tregs $Z=0.50$, $p=0.61$).

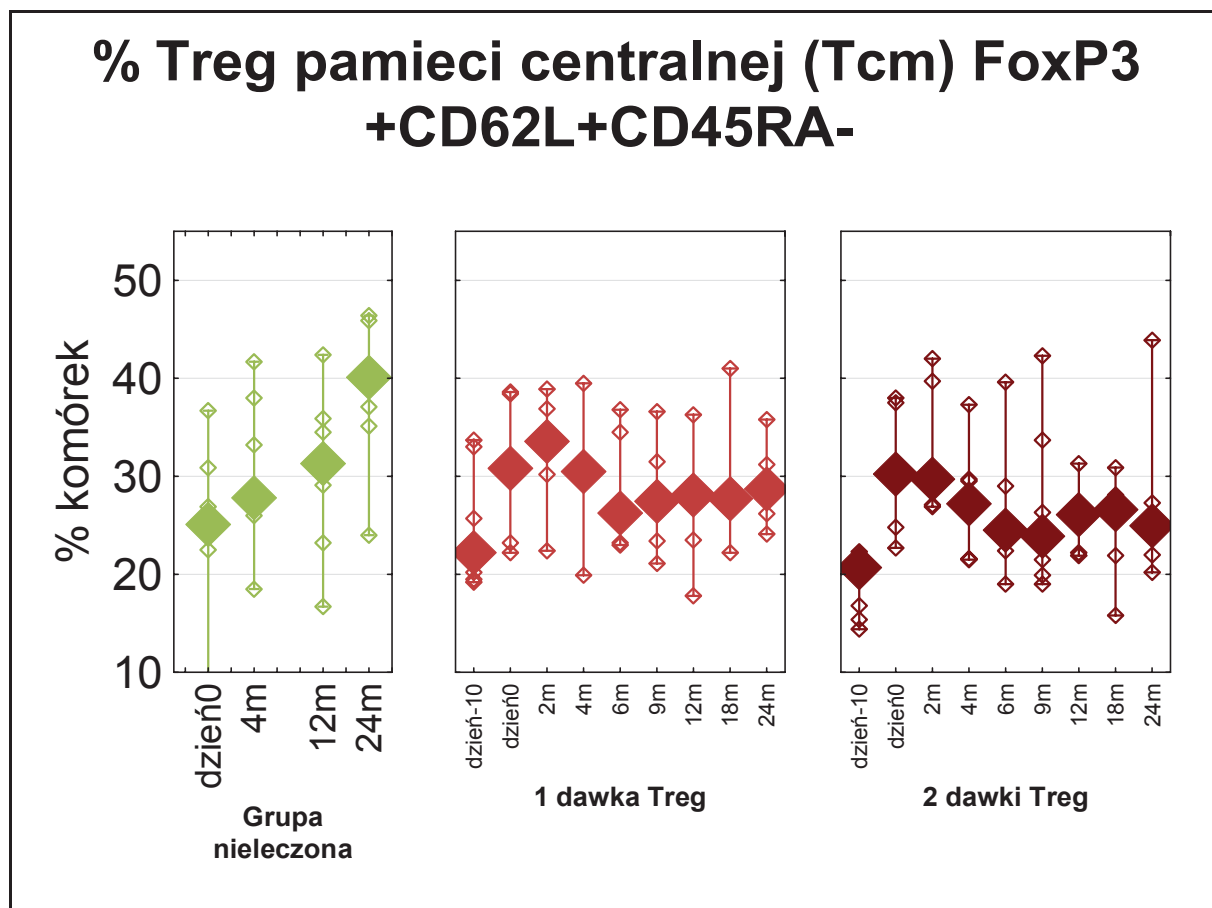
Test Wilcoxon dzień0 vs 24m **Tcm Tregs**: grupa nieleczona $Z=2.42$, $p=0.011$, pojedyncza dawka Tregs $Z=2.21$, $p=0.020$; podwójna dawka Tregs $Z=0.85$, $p=0.39$]

Spośród wszystkich badanych grup pacjenci leczeni dwoma dawkami Tregs charakteryzowali się najlepiej zachowanym (bez zmian) fenotypem - z najwyższym poziomem Tregs Tn i najniższym poziomie Tregs Tem - 24miesiące po infuzji Tregs. (Test Kruskal-Wallis ANOVA – porównanie wartości procentowych Tregs: Tn, Tcm i Tem pomiędzy trzema badanymi grupami pacjentów w czasie 24 miesięcy od rozpoczęcia badania: Tn $\text{Chi}^2 = 6,20$ $\text{df} = 2$ $p = 0,045$, Tcm $\text{Chi}^2 = 7,20$ $\text{df} = 2$ $p = 0,027$, Tem $\text{Chi}^2 = 3,76$ $\text{df} = 2$ $p = 0,152$)

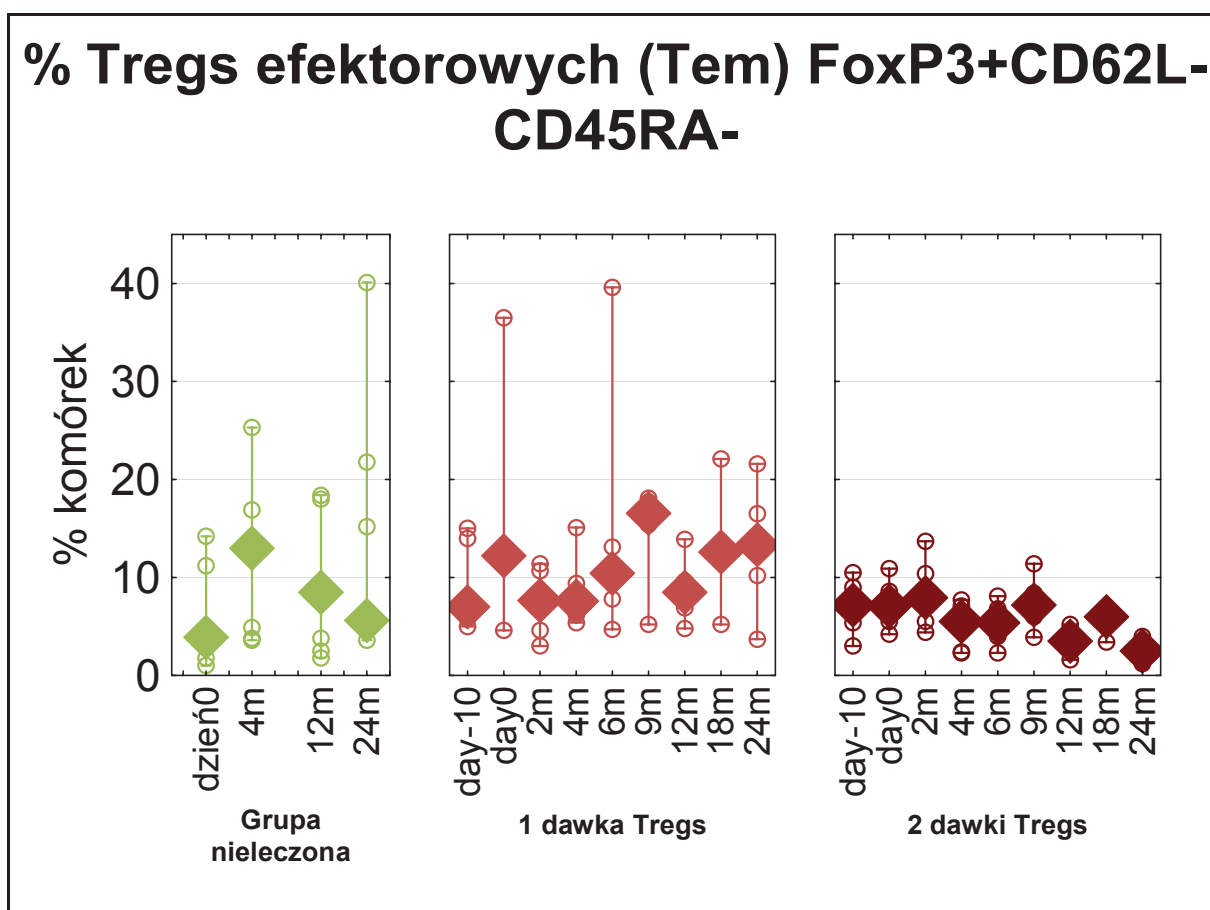
Dynamika zmiany ekspresji limfocytów Tregs naiwnych w Limfocyty Tregs pamięci potwierdziła wyniki opisane wyżej zmiany odsetkowe limfocytów Tregs $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{Foxp3}^{\text{high}}$. Limfocyty T pamięci centralnej (Tcm) $\text{CD45RA}^-\text{CD62L}^+$, których poziom wzrastał w trakcie obserwacji to komórki charakteryzujące się wysokim poziomem ekspresji Foxp3. Dochodziło do znaczącej zamiany z fenotypu limfocytów T naiwnych (Tn), $\text{CD62L}^+\text{CD45RA}^+$, na fenotyp Tregs Tcm $\text{CD62L}^+\text{CD45RA}^-$ po pierwszej infuzji w obu grupach, a mniej znaczącej zamiany po drugiej infuzji. tak więc zmiany dwóch fenotypów Tregs – $\text{FoxP3}^{\text{high}}$ oraz Tcm mają miejsce po podaniu limfocytów Tregs i mogą być śledzone we krwi obwodowej. [Test Wilcoxon dzień-10 vs. dzień0: **Tn Tregs**: Pojedyncza dawka $Z=2.002$, $p=0.031$; Podwójna dawka $Z=2.92$, $p=0.003$; 6m vs. 9m Podwójna dawka: $Z=1.20$ $p=0.23$; **Tcm Tregs**: Pojedyncza dawka $Z=1.32$, $p=0.18$; Podwójna dawka $Z=2.92$, $p=0.003$; 6m vs. 9m Podwójna dawka: $Z=0,33$ $p=0.93$].]



Rysunek 18. % Tregs naiwnych (Tn) FoxP3+CD62L+CD45RA+ w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs



Rysunek 19. % Tregs pamięci centralnej (Tcm) FoxP3+CD62L+CD45RA- w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs

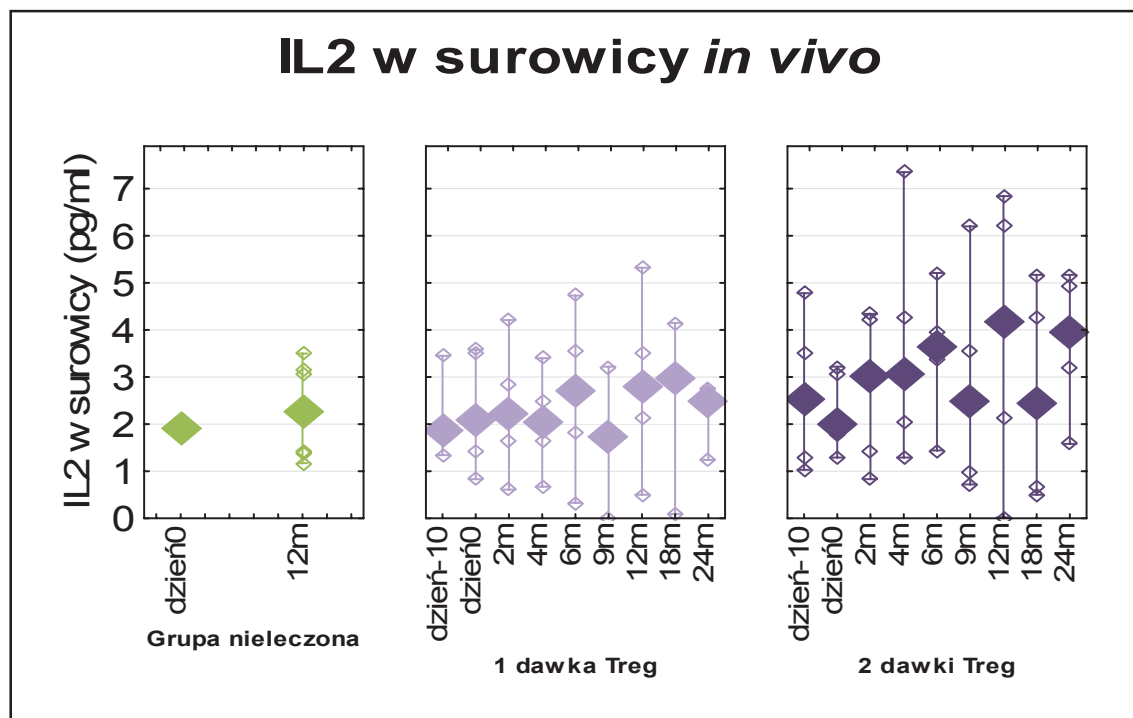


Rysunek 20. Poziom limfocytów Tregs efektorowych (Tem) FoxP3+CD62L-CD45RA- w grupie nieleczonej i grupach leczonych 1 i 2 dawkami Tregs.

IV.5. Limfocyty Tregs i IL-2

Poziom limfocytów Tregs po infuzji może być związany z poziomem IL2. Jest to cytokina, związana z przeżyciem i funkcjonowaniem limfocytów Tregs. Jest również stosowana w wysokich stężeniach do namnażania limfocytów Tregs *in vitro* w badaniach klinicznych.

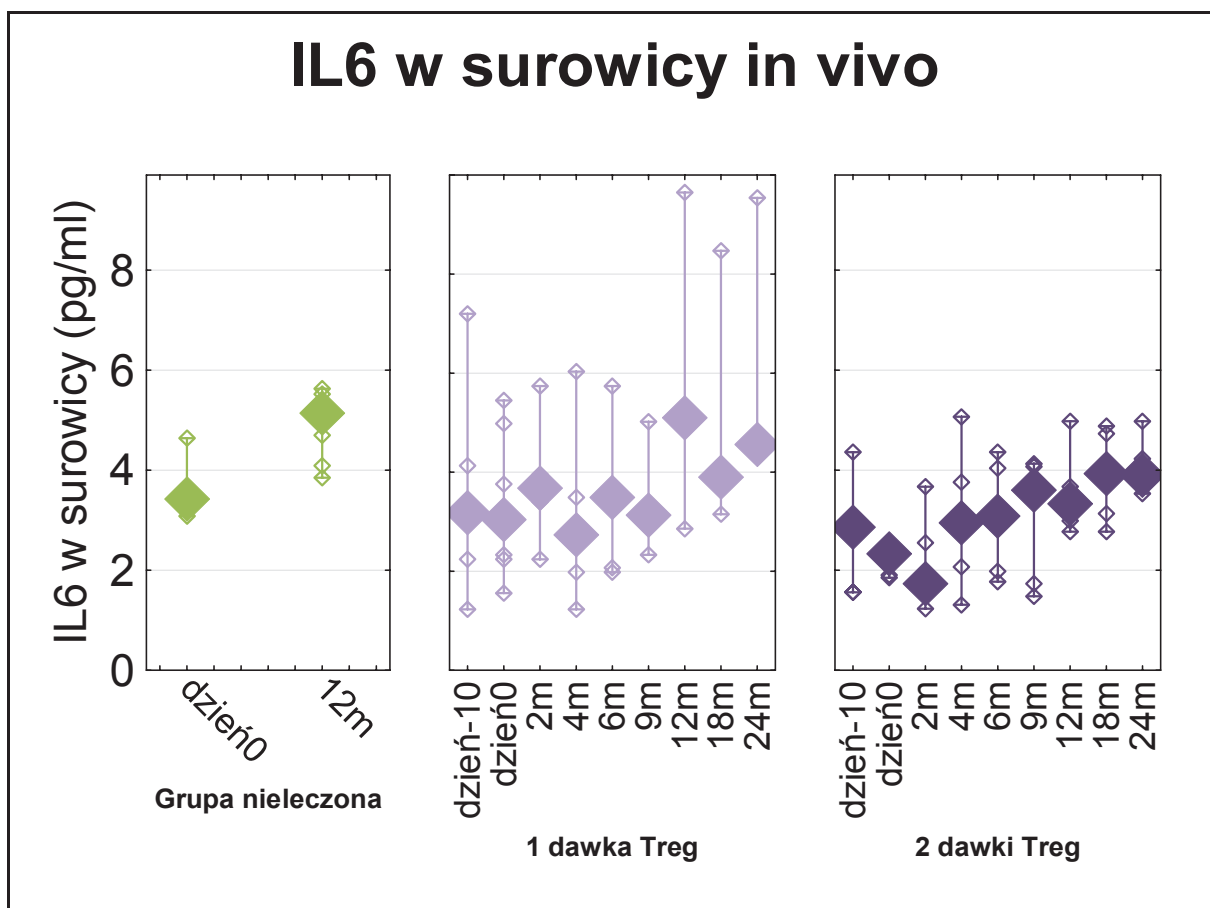
Zależność poziomu limfocytów Tregs od IL-2 znalazła swoje odbicie w poziomie tej cytokiny mierzonej w surowicy pacjentów. Krótco po infuzji Tregs, zwłaszcza w grupie leczonej w dwóch dawkach Tregs, stężenie IL-2 było przejściowo niskie, prawdopodobnie miało to związek ze wzmożonym metabolizmem tej cytokiny przez podane Limfocyty Tregs (test Wilcozona dnia-10 vs dzień0: pojedyncza dawka $Z = 0,50$, $p = 0,61$; dwie dawki $Z = 0,67$, $p = 0,50$; 6m vs. 9m w dwóch dawkach: $Z = 2,01$ $p = 0,04$).



Rysunek 21. Poziom IL2 w surowicy pacjentów w grupie nieleczonej oraz w grupie leczonej 1 i 2 dawkami Tregs.

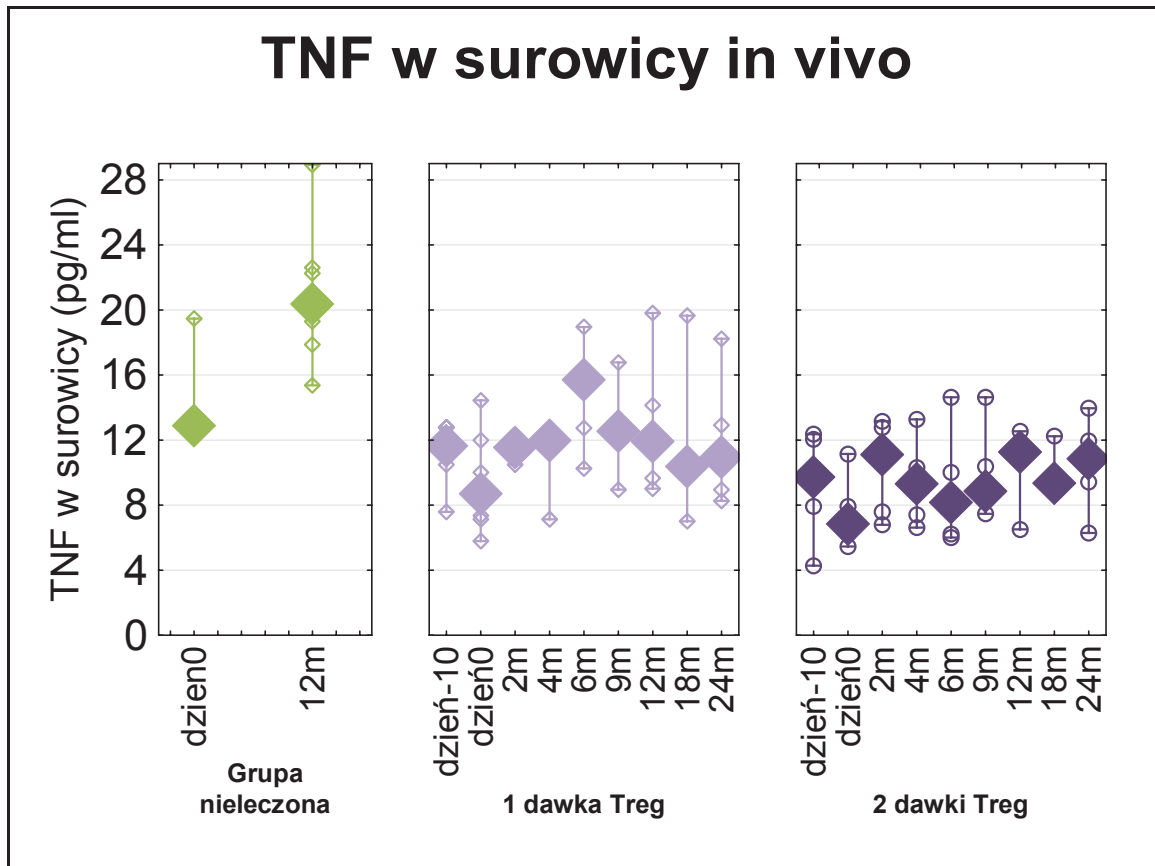
IV.6. Markery immunologiczne w ocenie progresji choroby

Wśród badanych cytokin w surowicy pacjentów, cytokiny prozapalne wykazywały pewien schemat wzrostu w czasie. Stężenia IL6 konsekwentnie zwiększało się z czasem, niezależnie od terapii (wystąpiło niewielkie i przejściowe zmniejszenie po pierwszej dawce w grupie, której podawano dwie dawki Tregs). Wszyscy pacjenci wykazywali wyższy poziom IL6 po 24 miesiącach od daty rozpoczęcia badania. (Test Wilcoxon dzień0 vs 24m: Pojedyncza dawka $Z=1.66$, $p=0.020$; podwójna dawka $Z=2.5$, $p=0.001$, nieleczeni dzień0 vs 12m: $Z=1.93$ $p=0.012$)

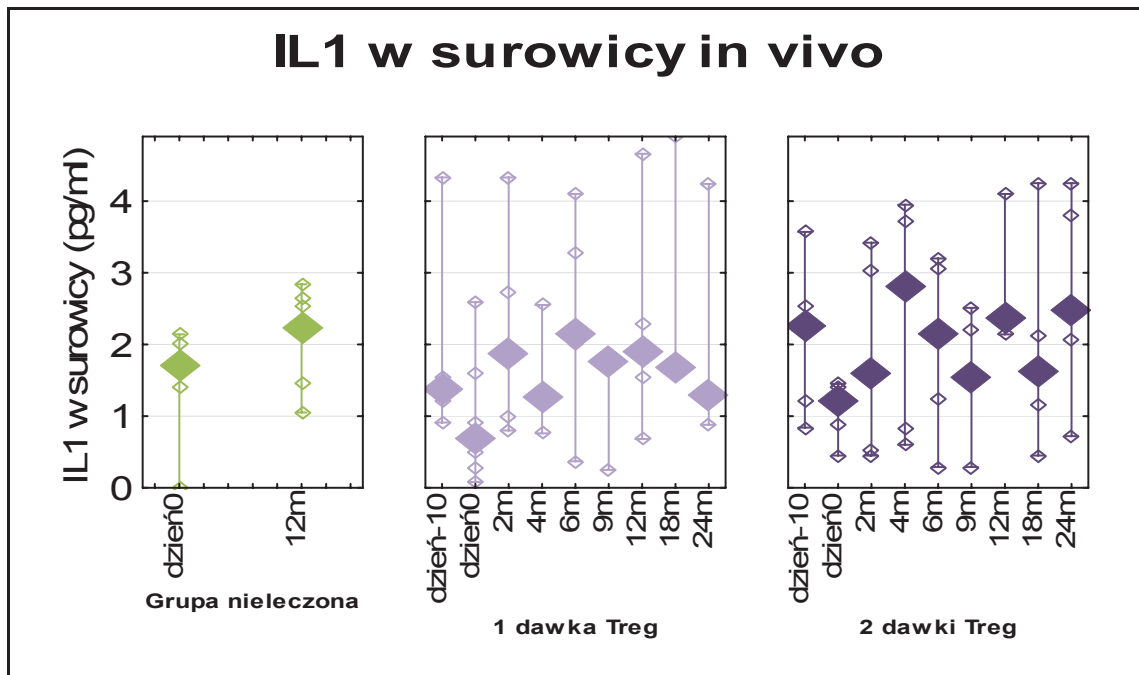


Rysunek 22. Poziom IL6 w surowicy pacjentów w grupie nieleczonej jak i w dwóch grupach leczonych 1 lub 2 dawkami Tregs.

W przypadku $TNF\alpha$ i IL1 każda infuzja limfocytów Tregs w obu grupach była związana z tymczasowym spadkiem poziomu tych cytokin. (Test Wilcoxon: **TNF α** dzień-10 vs dzień0: Pojedyncza dawka $Z=2.95$, $p=0.033$; Podwójna dawka $Z=2.67$, $p=0.046$; 6m vs. 9m w dwóch dawkach: $Z=0.34$ $p=0.67$; **IL1** dzień-10 vs dzień0: Pojedyncza dawka $Z=1.16$, $p=0.09$; Podwójna dawka $Z=1.48$, $p=0.013$; 6m vs. 9m w dwóch dawkach: $Z=0.34$ $p=0.67$).



Rysunek 23. Poziom $TNF\alpha$ w surowicy pacjentów w grupie nieleczonej jak i w dwóch grupach leczonych 1 lub 2 dawkami Tregs.



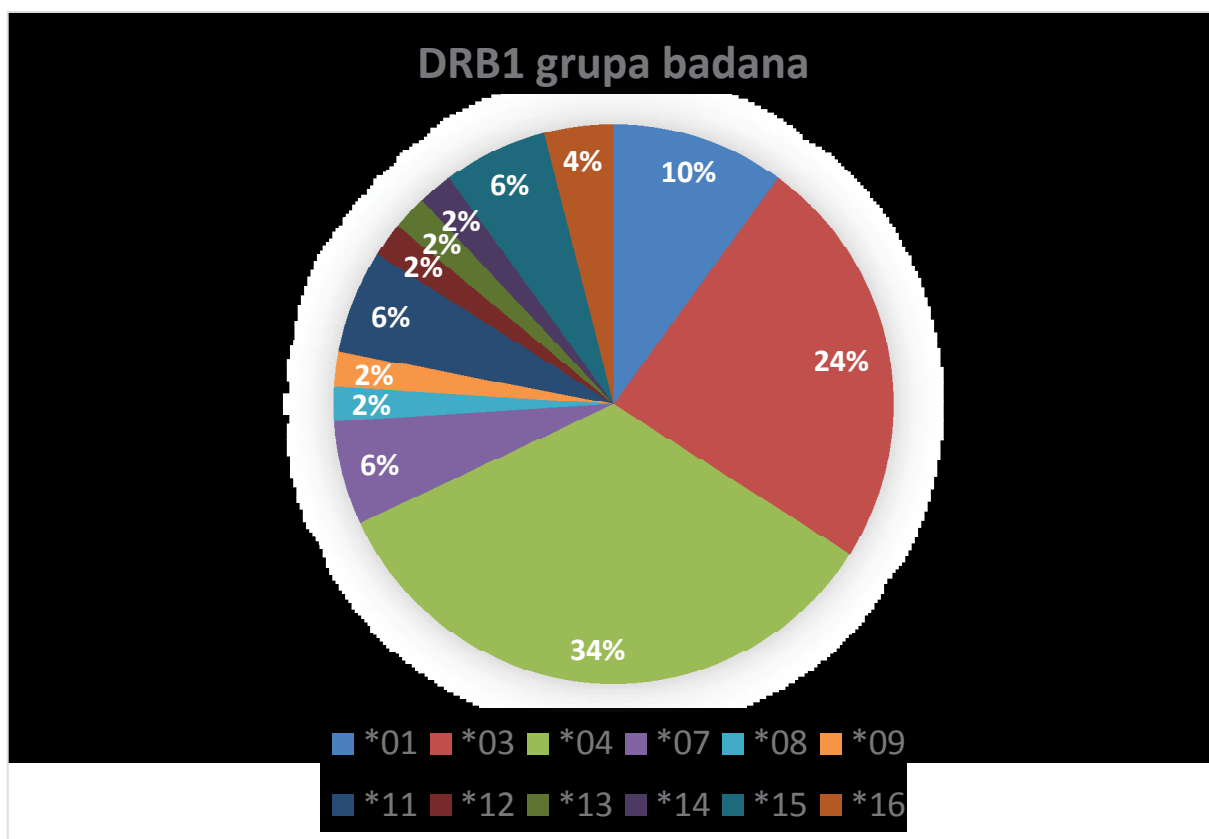
Rysunek 24. Poziom IL1 oznaczony w surowicy pacjentów w grupie nieleczonej jak i w dwóch grupach leczonych 1 lub 2 dawkami Tregs.

W stosunku do wartości wyjściowych, poziom TNF α i IL1 zwiększał się po 12 miesiącach w grupie nieleczonej. (Test Wilcoxon dzień0 vs 12m: TNF α Z=1.50, p=0.076; IL1 Z=1.82, p=0.022).

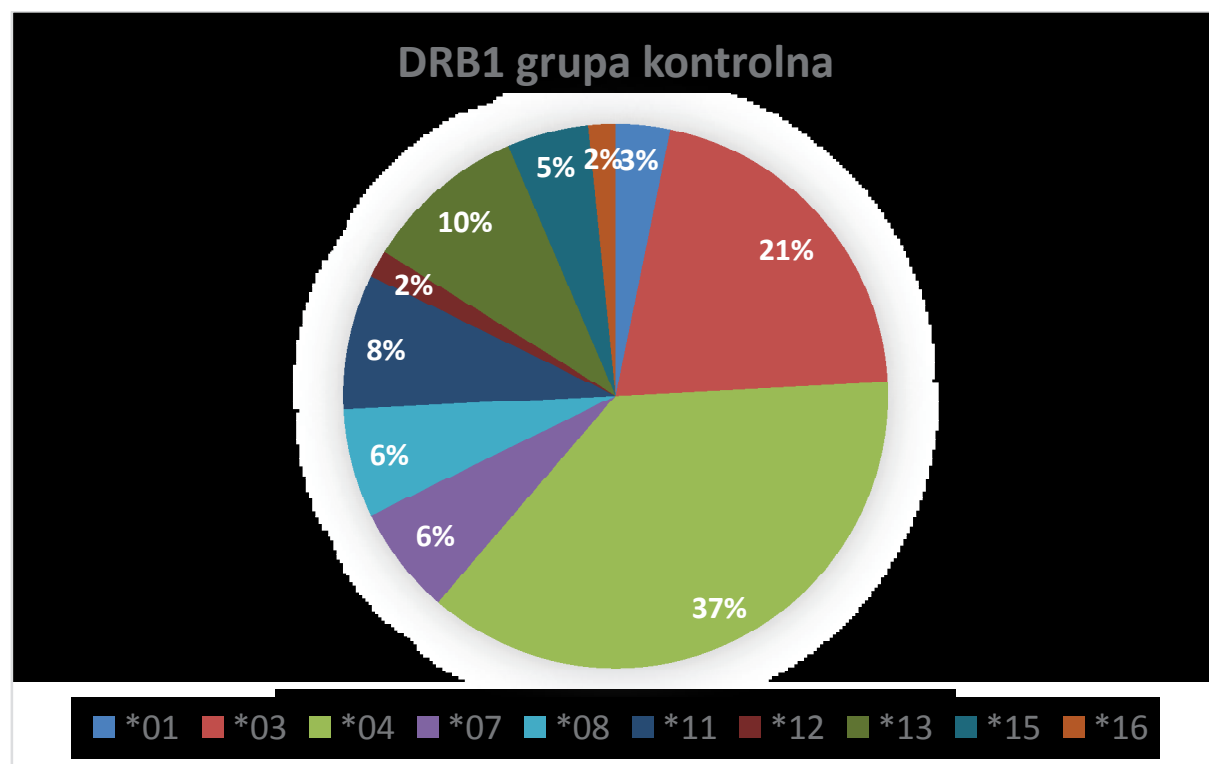
W przypadku pozostałych analizowanych cytokin (IL4, IL8, IL10, IL12, IFN γ , VEGF) nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie różnic.

IV.7. Antygeny HLA

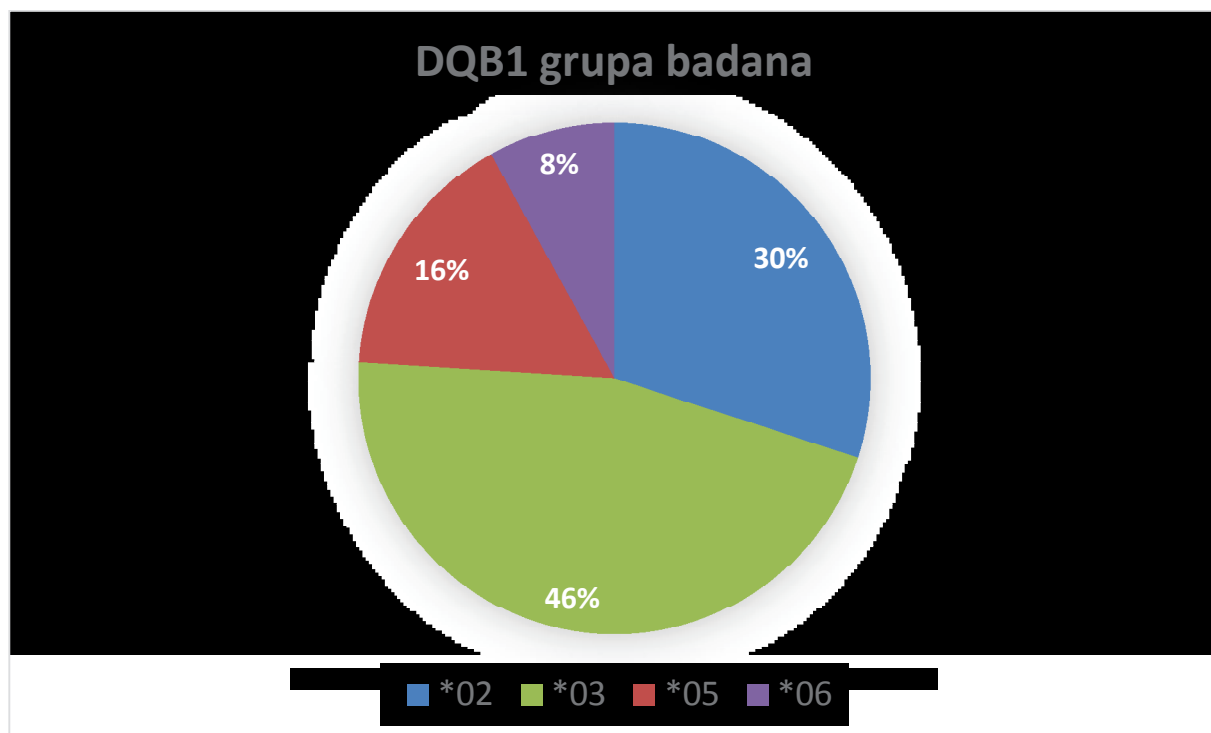
Typowanie antygenów HLA wykonano w grupie kontrolnej, nieleczonej, która liczyła 31 pacjentów z T1D oraz w grupach leczonych 1 lub 2 dawkami Tregs, liczącej 25 osób. W obu tych grupach zaobserwowano częstsze występowanie specyficznego heterozygotycznego genotypu składającego się z następujących antygenów: HLA-DRB1*03,DQB1*02, na jednym chromosomie oraz HLA-DRB1*04,DQB1*03 na drugim chromosomie, co potwierdzałoby największe prawdopodobieństwo wystąpienia T1D. Genotyp ten określa się mianem DR3/DR4.



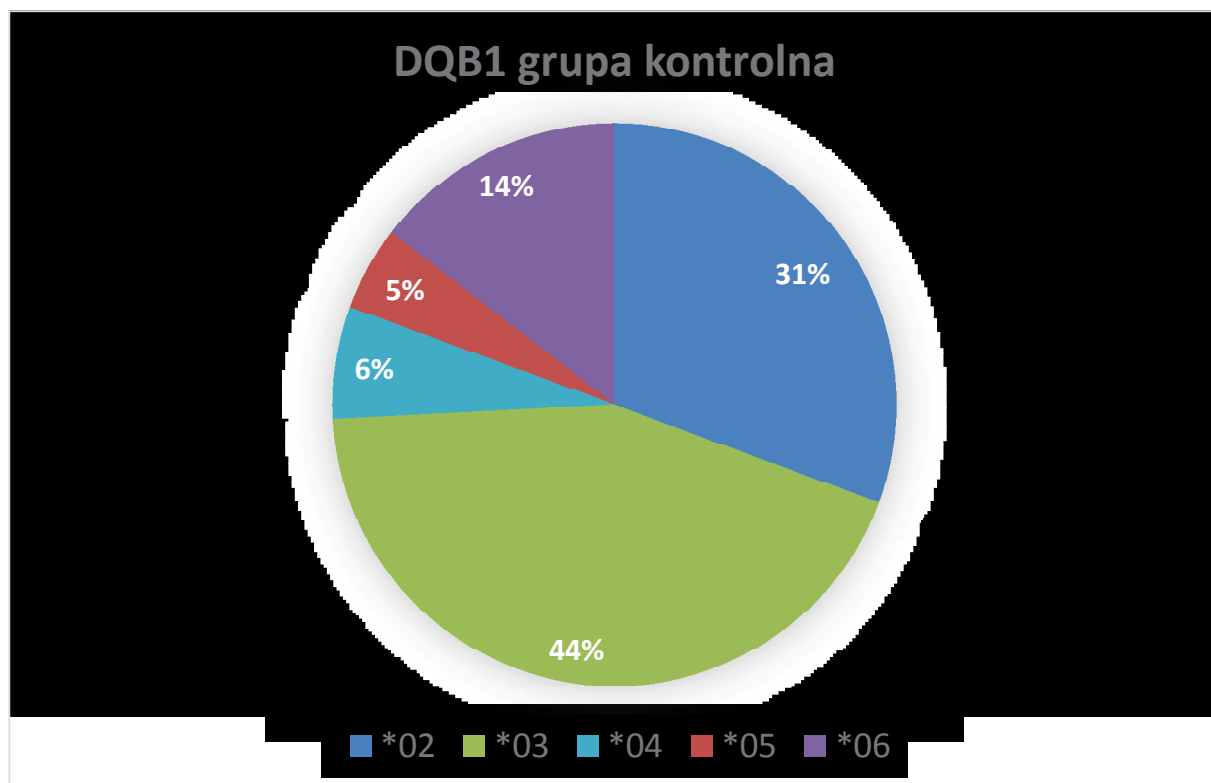
Rysunek 25. Częstość występowania antygenów HLA-DRB1w grupie chorych na T1D leczonych Tregs.



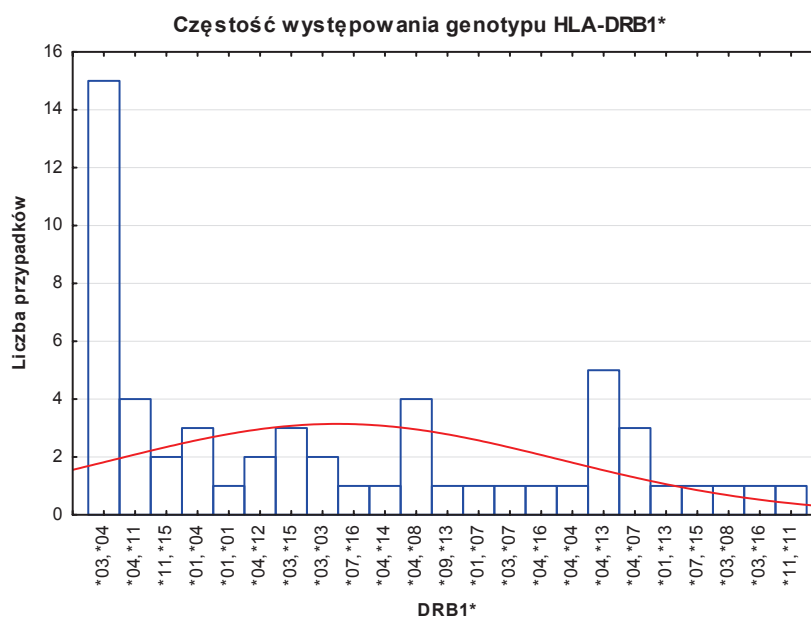
Rysunek 26. Częstość występowania antygenów HLA-DRB1 w grupie chorych na T1D nieleczonych Tregs.



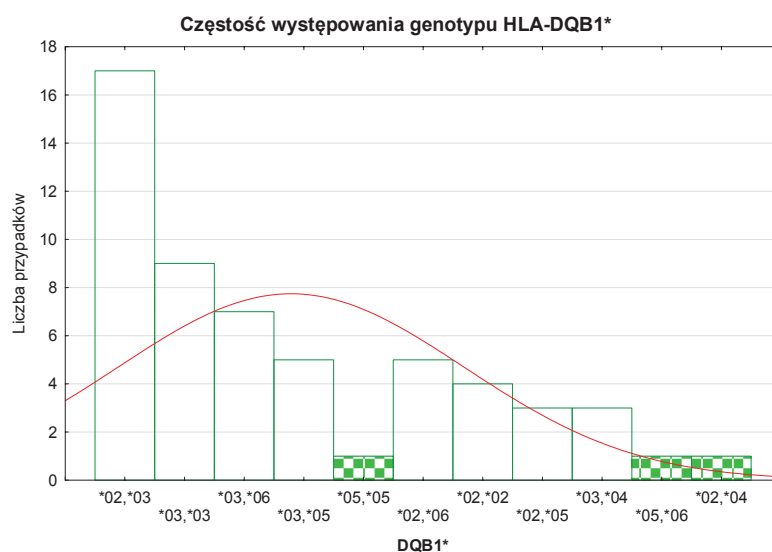
Rysunek 27. Częstość występowania antygenów HLA-DQB1 w grupie chorych na T1D leczonych Tregs



Rysunek 28. Częstość występowania antygenów HLA-DQB1 w grupie chorych na T1D nieleczonych Tregs.

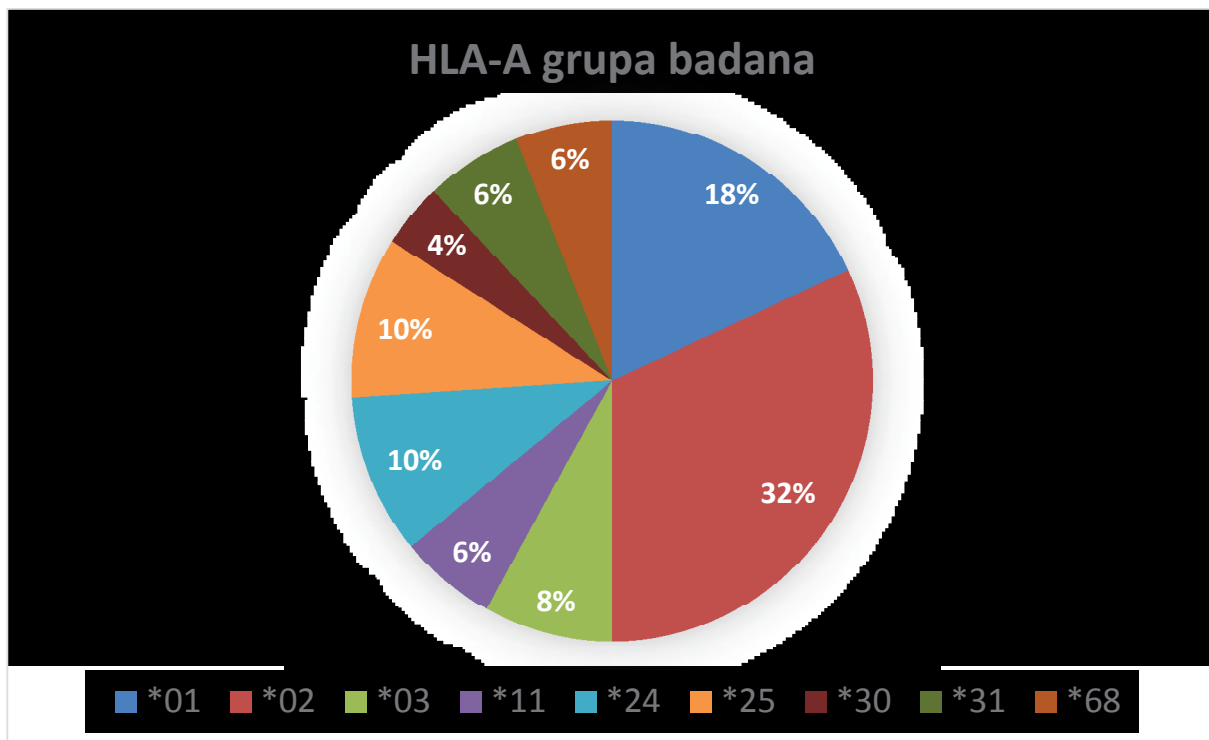


Rysunek 29. Częstość występowania genotypu HLA-DRB1 w grupie kontrolnej i leczonej razem.

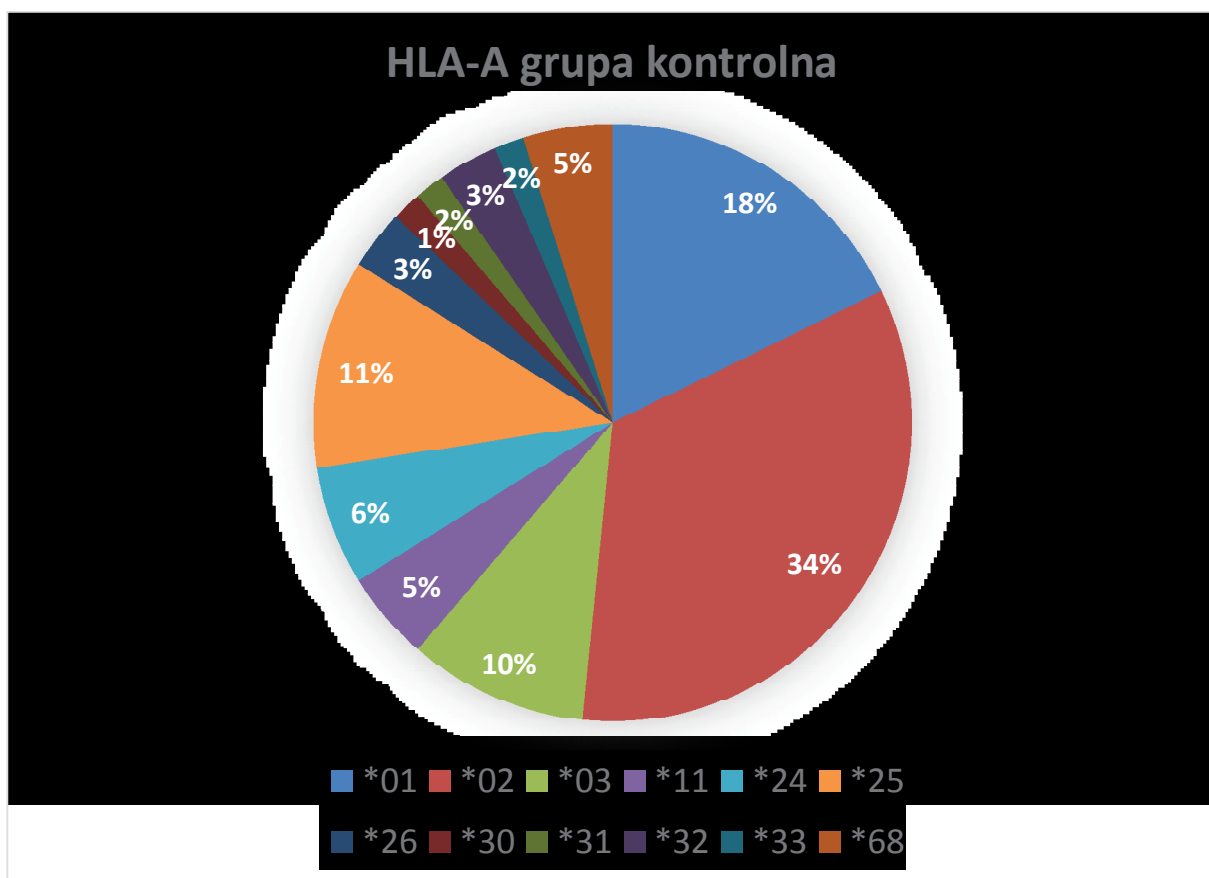


Rysunek 30. Częstość występowania genotypu HLA-DQB1 w grupie kontrolnej i leczonej razem.

W badanej grupie osób leczonych Tregs i grupie kontrolnej, nieleczoney zaobserwowano znaczącą przewagę występowania antygeny HLA-A*02. Mogłoby to potwierdzić tezę, że obecność antygeny HLA-A*02, jak również A*24 zwiększa ryzyko zachorowania na T1D u osób posiadających haplotyp DR3/DR4, co pozwala nazywać je antygenami „predysponującymi”.



Rysunek 31. Antygeny HLA-A w grupie leczonej 1 lub 2 dawkami Tregs.



Rysunek 32. Antygeny HLA-A w grupie kontrolnej, nieleczonej

Analiza antygenów HLA versus wyniki fenotypu dotyczą wyłącznie grupy leczonej 12 osobowej 1 lub 2 dawkami Tregs i 10 osobowej grupy kontrolnej.

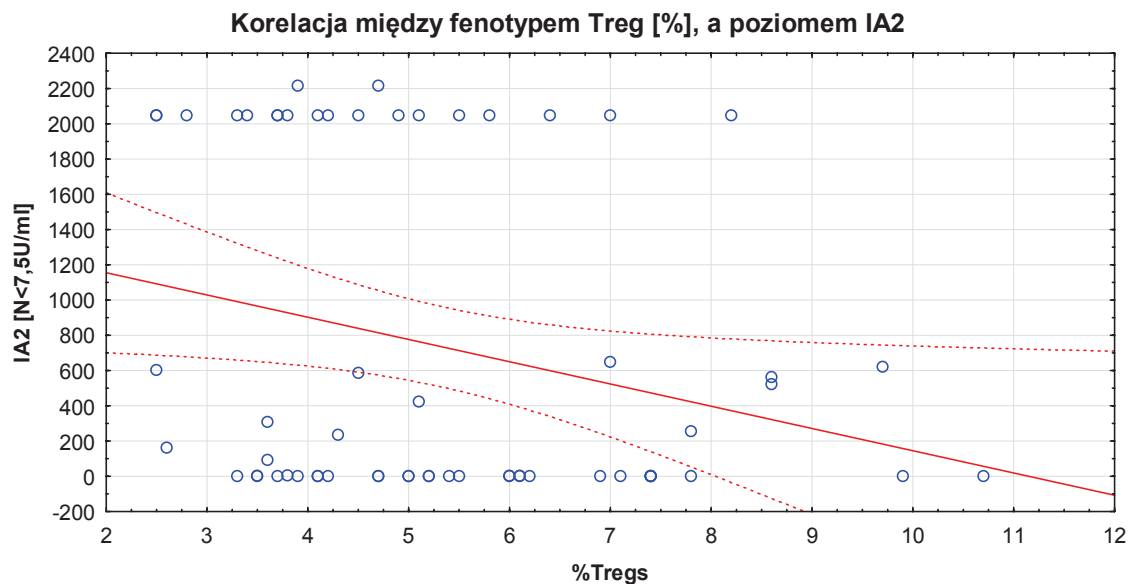
U osób z genotypem DRB1*03,*04 i DQB1*02,*03 można zaobserwować niższy wyjściowy poziom limfocytów Tregs (dzień -10 w grupie leczonej i dzień 0 w grupie kontrolnej) w porównaniu do osób nie posiadających ww. wymienionych antygenów. Wartości % Tregs u tych osób kształtują się przeważnie na poziomie <5% (1 wyjątek).

W badanej grupie zaobserwowano również pacjentów z antygenami „ochronnymi”, takimi jak: DRB1*07 czy DRB1*15. Pacjent z antygenem DRB1*07 miał znacznie wyższy utrzymujący się poziom limfocytów Tregs w porównaniu do innych pacjentów. Również u pacjentów z DRB1*15, bez drugiego antygeny DRB1*04 lub DRB1*03 możemy zaobserwować wyższy poziom limfocytów Tregs ale nie jest to, aż tak znaczna różnica. Z powodu zbyt małej ilości przypadków nie potwierdzono tego statystycznie.

IV.7. Autoprzeciwiąca

Wśród badanych osób z grupy nieleczonej i grupy leczonej 1 lub 2 dawkami Tregs w dniu -10 lub 0 obecne były podwyższone poziomy średnio 3 z 4 badanych przeciwiac. Nie zauważyliśmy statystycznie istotnych różnic między grupą leczoną i kontrolną w wartościach autoprzeciwiac: GAD, IA2, IAA oraz ZnT8.

Z uzyskanych wyników badań nie wykazano korelacji między fenotypem % Tregs, a poziomem autoprzeciwiac GAD, IAA oraz ZnT8 z wyjątkiem IA2, przy którym stwierdzono trend w kierunku odwrotnie proporcjonalnej korelacji z odsetkiem limfocytów Tregs (Wsp. R Spearmana; po 24 miesiącach: $R = -0.304$, $p = 0.05$).



Rysunek 33. Korelacja między fenotypem Tregs [%], a poziomem autoprzeciwiac IA2

V. Dyskusja

T1D stwarza poważne obciążenie ekonomiczne dla każdego systemu opieki zdrowotnej. Wszelkie nowe metody terapeutyczne, które są wprowadzane do leczenia muszą udowodnić nie tylko ich efektywność w odniesieniu do utrzymania pożądanego poziomu glikemii, ale również powinny okazać się uzasadnione ekonomicznie. Bezpieczeństwo w nowych terapiach T1D powinno być najważniejsze, jako że jest to choroba przewlekła, która nie zagraża bezpośrednio życiu. W związku z tym, stosunek ryzyka i korzyści powinny być tak niski, jak to możliwe (Jędrzejczak i inni, 2015). Każda nowa metoda powinna mieć jak najmniej skutków ubocznych i nie wpływać negatywnie na jakość życia pacjenta.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena odpowiedzi immunologicznej na terapię komórkową cukrzycy typu 1 w oparciu o namnożone sztucznie limfocyty T regulatorowe $CD4^+CD25^+CD127^-$. Dodatkowo, próbowano odnieść wyniki powyższych 2 letnich obserwacji do grupy kontrolnej, nieleczonej dzieci w podobnym wieku z T1D.

Przedstawione przez autorów tego projektu wyniki badań sugerują, że terapia adoptywna limfocytami Tregs spełnia wszystkie kryteria, aby uznać ją za bezpieczną. W ciągu 2 lat od rozpoczęcia terapii nie odnotowano żadnych zdarzeń i reakcji niepożądanych. Żadna pojedyncza ani podwójna dawka Tregs nie była związana z poważnymi negatywnymi skutkami. Odnotowano 3 lekkie infekcje wśród pacjentów z grupy leczonej Tregs lecz nie było żadnych przesłanek aby stwierdzić, że były one skutkiem zastosowanej terapii. Warto podkreślić, że prezentowana terapia nie osłabiła odporności nabytej, ponieważ poziom przeciwciał ochronnych nie został naruszony (Marek-Trzonkowska i inni, 2014)).

Rok od daty włączenia do badania, 8 z 12 pacjentów (66%), nadal spełniało kryteria remisji klinicznej ($DDI \leq 0,5$ UI/kg b.w.). Ponadto w tym czasie dwoje z nich nadal było niezależnych od przyjmowania insuliny. Zarówno pacjenci insulinoniezależni, jak i 3 innych pacjentów w remisji otrzymało w sumie 30×10^6 Tregs na kg masy ciała po przez dwie oddzielne infuzje (podwójna dawka). Innych dwóch pacjentów w remisji otrzymała 20×10^6 Tregs na kg masy ciała (pojedyncza dawka), natomiast ostatni otrzymał 10×10^6 Tregs na kg masy ciała (pojedyncza dawka). Remisja

we wszystkich przypadkach była związana z poziomem C- peptydu na czczo $> 0,5$ ng/ml. W tym samym czasie wszystkie osoby w nieleczonej grupie kontrolnej były insulinozależne i tylko dwoje z nich spełniało kryteria remisji, którą zdefiniowano powyżej. Ponadto dawki insuliny były niższe u osób leczonych Tregs w porównaniu do grupy nieleczonej, kontrolnej, również poziom C- peptydu na czczo był wyższy w grupie leczonej.

Dwa lata od włączenia terapii T1D postępowała, a wszyscy pacjenci byli insulinozależni. Funkcja komórek β mierzona poziomem C-peptydu i podawanej egzogennej insuliny były najlepiej zachowane u pacjentów leczonych dwoma dawkami Tregs (3/6 w remisji), gorsze wyniki zaobserwowano u pacjentów leczonych jedną dawką Tregs (1/6 w remisji), a najgorsze w grupie kontrolnej, nieleczonej (brak remisji).

Najlepiej na terapię reagowały dzieci z krótkim czasem trwania choroby oraz poziomem C- peptydu na czczo ≥ 0.7 ng/ml. Zwiększanie dawki Tregs do 30×10^6 Tregs /kg masy przy infuzji uzupełniającej wydawało się poprawić skuteczność terapii patrząc na efekty metaboliczne w pierwszym roku obserwacji.

V.1. Efekt metaboliczny leczenia adoptywnego limfocytami Tregs.

Początkowy poziom w surowicy C-peptydu odzwierciedlał masę komórek- β trzustki, im wyższy był ten poziom tym dłużej pacjent pozostawał w remisji. Pierwsze analizy po pierwszym roku od rozpoczęcia obserwacji poziomu C-peptydu wskazywały, że jego wartość była najwyższa u osób, które otrzymały 2 dawki Tregs, a najniższy u osób, których nie poddano leczeniu, tj. grupie kontrolnej. Z przedstawionych w tej pracy wyników badań z okresu 2 lat od momentu rozpoczęcia badania przedstawiona wyżej zależność nieco się zmieniła. Różnica ta stała się nieistotna w okresie 2 lat po zakończeniu badania w grupie z pojedynczą dawką Tregs oraz grupą kontrolną, nieleczoną. W porównaniu z grupą nieleczoną, a grupą z dwiema dawkami Tregs różnica ta była statystycznie znamienne.

Dodatkowo, jeśli dane leczonych i nieleczonych pacjentów analizowano razem po 4 miesiącu i po roku od rozpoczęcia obserwacji, zaobserwowano, że poziom C-peptydu

był skorelowany z procentem Tregs we krwi obwodowej (Marek-Trzonkowska i inni, 2014). Ta sytuacja zmieniła się po 2 latach obserwacji, gdzie korelacja ta już nie wystąpiła - przeanalizowano dane leczonych i nieleczonych pacjentów razem po 24 miesiącach od rozpoczęcia obserwacji.

Kolejną obiecującą różnicą była również dobowy dawka podawania insuliny. Obie grupy leczone Tregs wymagały niższych dawek insuliny w czasie trwania całego badania. W grupie leczonej dwoma dawkami Tregs dwóch pacjentów było całkowicie niezależnych od podawania insuliny na ponad rok czasu po podaniu limfocytów Tregs. Ponadto wszyscy oprócz jednego pacjenta wymagali mniej niż 0,5 UI dawki insuliny na kg masy ciała. Istotne jest, że podawane dawki insuliny dostosowywano w sposób standardowy do markerów kontroli metabolicznej, takich jak: Hb1C i stężenie glukozy na czczo. Stąd, szczególnie ważne jest, że w grupie leczonej wymagane było podawanie niższych dawek egzogennej insuliny, a parametry te były przez cały okres badania lepsze od grupy kontrolnej, zwłaszcza na dwa lata od włączenia terapii. Poziom HbA1c był najniższy w grupie leczonej 2 dawkami Tregs, średni w grupie leczonej jedną dawką Tregs, a najwyższy w grupie nieleczonej.

Po 2 latach od włączenia terapii Tregs zaobserwowano lepsze funkcjonowanie wysp trzustkowych, potwierdzone testem tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego, z dużą częstotliwością pobierania próbek (MMTT ang. mixed meal tolerance test). Różnica między grupą leczoną 2 dawkami, a grupą tych nie poddanych leczeniu była istotna. Natomiast podobne wyniki testu MMTT zaobserwowano pomiędzy pacjentami leczonymi jedną dawką, a grupą nieleczoną - tu różnica była nieistotna.

V.2. Fenotyp i analiza limfocytów T regulatorowe *in vivo*.

Każda infuzja limfocytów Tregs powodowała wzrost poziomu Tregs w krwi obwodowej, jednak przy drugiej dawce Tregs ten wzrost nie był tak wysoki, jak przy pierwszej dawce. Nie wykazano, że wzrost w procentach Tregs we krwi obwodowej bezpośrednio po infuzji Tregs może wpływać na późniejszy poziom DDI. Chociaż większość leczonych pacjentów pozostawała w remisji w ciągu 1 roku obserwacji, zaobserwowano powolny postęp T1D i spadek liczby Tregs, które wracały do wartości

wyjściowych. Po 2 latach obserwacji nie było różnic w poziomie limfocytów Tregs między grupą leczoną Tregs, a grupą nieleczoną, kontrolną. Dane te mogą sugerować, że limfocyty Tregs w czasie hodowli *in vitro* przechodzą kilka cykli podziałów, które mogą skutkować ich krótkim okresem półtrwania po podaniu *ex vivo*. Ponadto, toczą się dyskusje odnośnie stabilności limfocytów Tregs (Miyao i inni, 2012). Innym wytłumaczeniem dla zmniejszającej się liczby Tregs u leczonych pacjentów jest ich prawdopodobna migracja do tkanek obwodowych. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych sugerują, że limfocyty Tregs gromadzą się w węzłach chłonnych obwodowych i w wysepkach trzustkowych, a tym samym opóźniają progresję cukrzycy. Nie możemy zweryfikować tego u człowieka, ale ten scenariusz wydaje się prawdopodobny jedynie w ciągu pierwszych miesięcy po podaniu Tregs, gdy niewielki spadek liczby Tregs jest związany z lepszą kontrolą glikemii, ale nie później (około 9 miesięcy po pierwszym wlewie Tregs), gdy ich efekt terapeutyczny zanika. Spadek liczebności Tregs w długim okresie może również wynikać z „wyczerpania” Tregs z powodu trwałej aktywacji na skutek odpowiedzi autoimmunologicznej.

Podsumowując istnieje wiele możliwych przyczyn zmniejszenia się liczby krążących Tregs, w tym również śmierć komórkowa, czy wspomniana wyżej migracja do tkanek limfatycznych i miejsc zapalnych, takich jak trzustka, lub miejsc o wysokim stopniu proliferacji. Obecny projekt badania i dane nie były w stanie rozstrzygnąć tych wątpliwości. Pozostaje również możliwe, że Tregs zmieniły swój fenotyp, natomiast projekt tego badania nie ujął tego w strategii sortowania i fenotypowania Tregs.

Podobne obserwacje wyciągnięto z analizy dwóch fenotypów limfocytów Tregs: $CD3^+CD4^+Foxp3^+$, a fenotypem $Foxp3^+CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^-$, gdzie wykazano rosnącą rozbieżność z czasem trwania choroby. Analiza zawartości bramki $CD25^{high}CD127^-$ wykazała, że w czasie rozwoju cukrzycy zmniejszyła się w niej odsetek komórek $FOXP3^+$, niezależnie od liczby podawanych dawek Tregs. Ten efekt był przejściowy i odwracalny u pacjentów po podaniu drugiej dawki Tregs ale nie był trwały i poziom komórek $FOXP3^+$ zmniejszył się w czasie.

W przeprowadzonym badaniu udowodniono, że możliwa jest ocena dynamiki limfocytów Tregs *in vivo* za pomocą mediany ekspresji czynnika Foxp3 limfocytów Tregs, która w czasie namnażania jest znacznie wyższa niż w krwi obwodowej. Dzięki tej obserwacji można założyć, iż znaczna część analizowanych limfocytów Tregs

CD3⁺CD4⁺Foxp3^{high} była najprawdopodobniej z podanego preparatu. Jest to wygodny i nieinwazyjny sposób, który pozwala ocenić właściwości farmakokinetyczne podawanych limfocytów Tregs.

Istotne przy tym jest, że spadek ekspresji limfocytów Tregs FoxP3, jak wynika z badań, może być spowodowany zaburzeniami immunoregulacyjnymi u pacjentów z chorobami o podłożu zapalnym i autoimmunizacyjnym. Wiadomo, że do prawidłowej funkcji limfocytów Tregs konieczna jest nie tylko obecność czynnika transkrypcyjnego Foxp3, ale także odpowiedni poziom jego ekspresji (Ryba, i inni, 2010).

Z przeprowadzonej analizy subpopulacji limfocytów Tregs wynika, że u pacjentów nieleczonych w porównaniu do wartości wyjściowych nastąpił wzrost poziomu limfocytów Tregs o fenotypie T_{cm} (pamięci centralnej) kosztem limfocytów Tregs naiwnych w okresie 24 miesięcy od trwania badania. Podobne, ale nie tak znaczące zmiany obserwowano u pacjentów leczonych pojedynczą dawką Tregs. Różnice te były najmniej widoczne w grupie leczonej podwójną dawką Tregs. Spośród wszystkich badanych grup pacjenci leczeni dwoma dawkami Tregs charakteryzowali się w 24 miesiącu po infuzji najlepiej zachowanym (bez zmian) fenotypem - z najwyższym poziomem Tregs T_n i najniższym poziomie Tregs T_{cm} (FoxP3+CD62L-CD45RA-) chociaż dochodziło do znaczącej zamiany fenotypu tuż po infuzji: z fenotypu limfocytów T naiwnych (T_n), CD62L⁺CD45RA⁺, na fenotyp Tregs T_{cm} CD62L⁺CD45RA⁻ po pierwszej infuzji w obu grupach, a mniej znaczącej zamiany po drugiej infuzji.

Zmiana proporcji fenotypu Tregs w T1D z naiwnych na Tregs pamięci mogło być związane z progresją choroby, zwłaszcza w grupie kontrolnej nieleczonej. Na podstawie uzyskanych wyników cytometrycznych zaobserwowano, że był to stały spadek T_n w populacji Tregs z jednoczesną zmianą w kierunku bardziej zróżnicowanych subpopulacji pamięci. Najprawdopodobniej było to związane z prozapalną gotowością opisywaną w T1D i z postępem choroby (Ryba-Stanisławowska i inni, 2013). Wcześniejsze badania sugerowały, że stan zapalny związany z długotrwałą T1D wpływa niekorzystnie na Tregs, które tracą ekspresję FoxP3 i CD62L, wpływ ten może zostać cofnięty za pomocą środków przeciwzapalnych (Ryba i inni, 2011). Interesujący jest fakt, że stopniowy wzrost poziomu cytokin prozapalnych nie mógł być całkowicie zatrzymany przez infuzje Tregs.

Jak wspomniano wyżej zmiana proporcji między limfocytami Tregs naiwne na Tregs pamięci może być również widoczna u pacjentów leczonych bezpośrednio po podaniu adoptywnym Tregs, ale z czasem proporcje te wracały do wartości wyjściowych. Dwa lata po rozpoczęciu próby te proporcje były zbliżone do tych, które zauważono na początku badania. Pacjenci po dwóch dawkach Tregs mieli te proporcje najbardziej zbliżone do wartości z początku terapii badania. Ta tymczasowa zmiana była spowodowana prawdopodobnie podaniem dużej ilości limfocytów Tregs, które są zwykle Tcm FoxP3^{high}. (Marek i inni, 2011). Fakt, że powróciły one do wartości wyjściowych u pacjentów poddanych leczeniu wskazują na możliwość, że poziom i proporcje Tregs, są regulowane homostatycznie. Gdy znaczną ilość Tregs podaje się do organizmu, proporcje i liczba Tregs wracają do wartości wyjściowych bez dodatkowych bodźców. W naszych badaniach tuż po infuzji zaobserwowano zwiększony poziom Tregs Tcm CD62L+CD45RA- wraz ze zmniejszoną proporcją Tregs Tn CD62L+CD45RA- ale zarówno proporcje, jak i liczba Tregs w krwi obwodowej wróciły z powrotem do wartości wyjściowych. Interesujące jest, że wzrost odsetka Tregs we krwi obwodowej po infuzji nie korelował wyraźnie z dawką podawanych Tregs, natomiast korelował z poziomem C-peptydu, jak pokazano we wcześniejszej publikacji (Marek-Trzonkowska i inni, 2014).

V.3. Stężenia cytokin podczas leczenia limfocytami Tregs

Wśród cytokin, IL-2 ma zasadnicze znaczenie dla zachowania liczby i funkcji limfocytów Tregs. Limfocyty Tregs nie są zdolne do samodzielnej syntezy IL2. Z drugiej strony, jednym z głównych mechanizmów supresji wywieranej przez nTregs jest szybkie zużywanie IL-2 obecnej w środowisku reakcji zapalnej i hamowanie transkrypcji genu dla IL-2 w limfocytach efektorowych (Pham i inni, 2016). IL-2 jest także wytwarzana na niższym poziomie, przez aktywowane limfocyty TCD8⁺, komórki dendrytyczne, komórki NK i komórki NKT. Jest to cytokina, związana z przeżyciem i funkcjonowaniem limfocytów Tregs. Jest również stosowana w wysokich stężeniach do namnażania limfocytów Tregs *in vitro* w badaniach klinicznych.

Zależność poziomu Tregs od IL-2 została potwierdzona w poziomie tej cytokiny mierzonej w surowicy pacjentów. Krótco po infuzji Tregs, zwłaszcza w grupie leczonej

dwoma dawkami Tregs, stężenie IL2 było przejściowo niskie, prawdopodobnie miało to związek z wykorzystaniem tej cytokiny przez wcześniej podane Limfocyty Tregs.

Mimo, iż IL2 jest wskazana jako produkt leczniczy, przeciwnowotworowy, to jednoczesne podawanie IL2 z Tregs mogłoby się wiązać z manifestacją choroby nowotworowej. Ze względu na to, że IL2 jest silnym aktywatorem supresyjnych limfocytów T regulatorowych, zamiast chemotaksji do tkanek zapalnych (np. *insulitis*), Tregs w obecności dużych dawek IL2 może wywołać uogólnioną immunosupresję ułatwiając rozwój nowotworów. Taki efekt został już opisany w klinice człowieka stąd należy podchodzić do takich rozwiązań bardzo ostrożnie (Theil i inni, 2015).

Wśród badanych cytokin w surowicy pacjentów, cytokiny prozapalne wykazywały pewien schemat wzrostu w czasie. Wraz z progresją cukrzycy można było wręcz śledzić wzrastające stężenia tych cytokin. Stężenia IL6 konsekwentnie zwiększało się z czasem, niezależnie od terapii (wystąpiło niewielkie i przejściowe zmniejszenie po pierwszej dawce w grupie, której podawano dwie dawki Tregs). Wszyscy pacjenci wykazywali wyższy poziom IL6 po 24 miesiącach od daty rozpoczęcia badania. Wskazywało to na utrzymujący się proces zapalny, który jest charakterystyczny dla chorób autoimmunologicznych.

W przypadku TNF α i IL1 każda infuzja Tregs w obu grupach była związana z tymczasowym spadkiem poziomu tych cytokin, co potwierdziłoby dotychczasowe badania mówiące o współzależności między Tregs, a poziomem TNF α . Wiadome jest, że wzrost TNF α sprzyja rozwojowi T1D.

W przypadku pozostałych badanych cytokin (IL4, IL8, IL10, IL12, IFN γ , VEGF) nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie różnic.

V.4. Antygeny zgodności tkankowej HLA

W obu grupach zaobserwowano częstsze występowanie specyficznego heterozygotycznego genotypu DR3/DR4 składającego się z następujących antygenów: HLA-DRB1*03,DQB1*02, na jednym chromosomie oraz HLA-DRB1*04,DQB1*03 na drugim chromosomie, co potwierdzałoby największe prawdopodobieństwo wystąpienia

T1D. Taki wynik wskazuje, że obie te grupy miały podobne predyspozycje genetyczne do zachorowania na T1D.

W badanej grupie osób leczonych Tregs i grupie kontrolnej, nieleczonej zaobserwowano przewagę występowania antygeny HLA-A*02. Mogłoby to potwierdzić tezę, że obecność antygeny HLA-A*02, jak również A*24 zwiększa ryzyko zachorowania na T1D u osób posiadających haplotyp DR3/DR4, co pozawala nazywać je antygenami „predysponującymi”.

U osób z grupy leczonej i kontrolnej z genotypem DRB1*03,*04 i DQB1*02,*03 można zaobserwować niższy wyjściowy poziom limfocytów Tregs (dzień -10 w grupie leczonej i dzień 0 w grupie kontrolnej) w porównaniu do osób nie posiadających wyżej wymienionych antygenów. Wartości % Tregs u tych osób kształtują się przeważnie na poziomie <5% (1 wyjątek). Aby zweryfikować tę tezę należałoby przebadac większą grupę badaną.

Analizując grupę leczoną i kontrolną razem, zaobserwowano również pacjentów z antygenami nazywanymi „ochronnymi”, takimi jak: DRB1*07 czy DRB1*15. Pacjent z antygenem DRB1*07 miał znacznie wyższy utrzymujący się poziom limfocytów Tregs w porównaniu do innych pacjentów. Również u pacjentów z DRB1*15, bez drugiego antygeny DRB1*04 lub DRB1*03 możemy zaobserwować wyższy poziom limfocytów Tregs, ale nie była to różnica istotna statystycznie.

V.5. Autoprzeciwciała

Wśród badanych osób z grupy nieleczonej i grupy leczonej 1 lub 2 dawkami Tregs większość badanych miała w dniu -10 lub 0 dodatni wynik trzech z czterech badanych autoprzeciwciał. Potwierdza się to z badaniami przeprowadzonymi przez zespół La Gasse i wsp., którzy wysokie ryzyko wystąpienia T1D wiążą z dodatnim wynikiem co najmniej dwóch przeciwciał dla trzech głównych autoantygenów cukrzycy (GAD, IA2 / ICA512 i insuliny). Nie zauważyliśmy statystycznie istotnych różnic między grupą leczoną i kontrolną w wartościach autoprzeciwciał: GAD, IA2, IAA oraz ZnT8.

V.6. Leczenie adoptywne limfocytami Tregs.

Poznanie i zrozumienie mechanizmów funkcjonowania limfocytów Tregs pozwoliło na ich wykorzystanie w leczeniu różnych chorób. Wzmocnienie ich funkcji może znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób o podłożu autoimmunologicznym, alergicznym oraz w indukowaniu stanu tolerancji u pacjentów po przeszczepach allogenicznym. Zasadniczą zaletą tego leczenia w porównaniu do konwencjonalnej immunosupresji farmakologicznej jest fakt, iż komórki te mają zdolność migracji do miejsc zapalenia i uszkodzenia własnych tkanek i wywierają swój efekt tylko w takiej tkance nie wpływając na odporność ogólną. Dlatego immunosupresyjne działanie limfocytów Tregs określane jest czasami przez analogię, jako „inteligentne sterydy”.

Wcześniejsze badania wykazały, że komórki Tregs pochodzące od chorych z T1D wykazują taką samą zdolność do proliferacji, jak komórki osób zdrowych. W związku z tym przeprowadzenie ekspansji tych komórek w warunkach *in vitro* nie jest problemem (Putnam i inni, 2009).

Wiadome jest, że za większość zaburzeń immunologicznych leżących u podłoża T1D odpowiedzialne są aktywowane autoreaktywne komórki efektorowe (Teff), a nie defekt funkcji/proliferaacji limfocytów Tregs. Pogląd ten popiera fakt, że obecność aktywowanych komórek Teff rozpoznających antygeny własnych wysp trzustkowych jest udokumentowana u człowieka. Wcześniejsze badania z zastosowaniem zwierzęcych modeli T1D wykazały, że podanie wielokrotnionej liczby limfocytów Tregs hamuje działanie autoreaktywnych limfocytów Teff i chroni przed wystąpieniem T1D. Przedstawiona terapia jest pierwszym tego rodzaju działaniem przeprowadzonym u człowieka, a jej wyniki potwierdzają celowość proponowanego podejścia również w leczeniu T1D u ludzi (Marek-Trzonkowska i inni, 2012).

Terapia Tregs po pojedynczej infuzji nie uzdrowia z chorób autoimmunologicznych. Optymalna dawka i punkt czasowy, w jakim należałoby zastosować terapię muszą zostać jeszcze dopracowane (Marek-Trzonkowska i inni, 2012) (Marek-Trzonkowska i inni, 2013).

W badaniach na modelach zwierzęcych udowodniono, iż leczenie adoptywne limfocytami Tregs może zapobiec niszczeniu wysp trzustkowych oraz może całkowicie chronić przed rozwojem T1D (Marek i inni, 2011). Jednak trzeba pamiętać o różnicach w tych doświadczeniach. Przede wszystkim w modelach zwierzęcych względna dawka podawanych Tregs była znacznie wyższa, u myszy było to 7×10^6 Tregs/mysz co daje

166×10^6 /kg m.c, przy założeniu, że m.c. myszy równa się 60g. Niemniej jednak zwiększanie dawek Tregs może teoretycznie doprowadzić do zwiększenia ryzyka infekcji oportunistycznych lub nowotworu, jak obserwuje się w przypadku innych form immunosupresji. Inną ważną kwestią jest czas podawania Tregs po ich wyizolowaniu. W modelu zwierzęcym limfocyty Tregs są zwykle podawane bezpośrednio po izolacji. Uważano, że czas od izolacji do infuzji ma wpływ na utratę ich właściwości i istnieje wręcz bariera 14 dni od pobrania do podania, która nie powinna być przekraczana (Marek i inni, 2011). Ilość limfocytów Tregs we krwi obwodowej pozostaje także w związku z wiekiem i stanem zdrowia. W przyszłości można zastanowić się nad innymi sposobami podawania i źródłami limfocytów Tregs, np. przy użyciu alternatywnego dawcy krwi pępowinowej. Preparaty komórek macierzystych ze szpiku kostnego i krwi pępowinowej są bogate w limfocyty Tregs i mogą być wykorzystane do ich transplantacji. Badania takie, choć okazały się skuteczne w odwracaniu autoimmunizacji u myszy NOD zmniejszając poziom autooprzeciwciał i poziom glukozy we krwi, nie przyniosły jednak poprawy parametrów metabolicznych (Mesples i inni, 2013) (Tan i inni, 2014) (Snarski i inni, 2010).

Z drugiej strony próby terapii T1D przy pomocy HSCT u ludzi udowodniły, że inną skuteczną metodą terapeutyczną dla T1D może być przeszczep autologicznych komórek macierzystych układu krwiotwórczego (AHSCT). AHSCT w cukrzycy typu 1 po raz pierwszy wykonano w Brazylii w 2003 roku (Dr Couri, prof. Voltarelli). Zabieg pozwala na zniszczenie klonu autoreaktywnego i powstanie „naiwnego” układu immunologicznego. Drugim ośrodkiem na świecie (pierwszym w Europie), który podjął się próby przeprowadzenia takiego zabiegu była Klinika Onkologii, Hematologii i Chorób Wewnętrznych WUM (pierwszy przeszczep 6. maja 2008 dr Emil Snarski, prof. dr hab. n. med. W.W. Jędrzejczak). Według polskich naukowców z Katedry Hematologii i Onkologii Chorób Wewnętrznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierownictwem prof. dr hab. med. Wiesława Wiktora Jędrzejczaka, AHSCT w T1D prowadzi do remisji przez dłuższy czas u 50% pacjentów, 40% z nich pozostała wolna od insuliny w ciągu 48 tygodni od momentu przeszczepu. Niektórzy pacjenci pozostają insulinoniezależni przez okres ponad 5 lat po zabiegu. Jako pierwsi przedstawili analizę farmakologiczno-ekonomiczną AHSCT, jako terapii T1D. Przeanalizowano dane uzyskane z trzech ośrodków i wysunięto tezę, iż AHSCT, może być opłacalne w leczeniu świeżo wykrytej cukrzycy typu 1, pod warunkiem, że korzyści

z przeszczepu trwałyby od 3 do 8 lat, w zależności od zastosowanej procedury (Jędrzejczak i inni, 2015)

Większość terapii eksperymentalnych T1D koncentruje się na zachowaniu u pacjentów odpowiedniego poziomu C-peptydu. Podczas gdy w przypadku pacjentów z długotrwałą T1D i niewykrywalnym C-peptydem, jedyną szansą na uzyskanie insulinoniezależności jest przeszczepienie trzustki lub przeszczepianie wysp trzustkowych. Jednakże przeszczepienie trzustki wiąże się z wysokim ryzykiem wystąpienia powikłań. Z kolei, główne ograniczenia pozytywnego rezultatu w przeszczepianiu wysp trzustkowych to nie tylko ryzyko odrzucenia przeszczepu, ale także reaktywacja odpowiedzi autoreaktywnych limfocytów wobec przeszczepionych wysepek. Ponadto stosowana immunosupresja farmakologiczna jest toksyczna dla samego przeszczepu (Montiel-Casado i inni, 2012) (Marek-Trzonkowska i inni, 2013).

Immunoterapia z użyciem limfocytów Tregs w zależności od potrzeb, opiera się na wytworzeniu u pacjentów stanu wzmożonej supresji, bądź też aktywacji układu odpornościowego. W pierwszym przypadku, wzrost liczebności i aktywność limfocytów Tregs, uzyskuje się m.in. poprzez kontrolowaną w warunkach *in vitro* ekspansję tych komórek po stymulacji przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28, w obecności IL-2 (Golshayan i inni, 2007). Namnażane w ten sposób komórki zachowują swoistość antygenową.

Eksperymentalna terapia adoptywna z użyciem namnożonych *ex vivo* limfocytów Tregs znajduje potencjalne zastosowanie w zapobieganiu rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych, zapalnych, jak również alergicznych. Obecnie trwają zaawansowane próby wykorzystania komórek supresorowych w leczeniu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu, zapalenia śluzówki żołądka, zapalenia tarczycy, jajników, SLE i chorób zapalnych jelit, w stwardnieniu rozsianym (SM) a także we wczesnie wykrytej T1D u dzieci (Kohm i inni, 2002) (Frey i inni, 2005) (DiPaolo R.J., 2005) (Marek-Trzonkowska i inni, 2013).

Mała liczba leczonych pacjentów jest ograniczeniem przedstawionego badania. W związku z tym wykazujemy indywidualne dane pacjenta. Niemniej jednak wyniki tego badania zachęcają do dalszych badań na większej liczbie osób. Badania na podawaniu Tregs pacjentom ze świeżo wykrytą T1D prowadzone są w ośrodku w USA,

gdzie opublikowano niedawno wyniki badań z 1 fazy prób klinicznych (Bluestone i inni, 2015). Badaniem objęto cztery kohorty (4grupy dawkowania) w sumie 14 dorosłych pacjentów, z nowo rozpoznaną T1D, którzy otrzymali namnożone ex vivo autologiczne poliklonalne Tregs (polyTregs) CD4⁺CD127^{low/-}CD25⁺ w czterech grupach dawkowania w zakresie od $\sim 5 \times 10^6$ do około $2,6 \times 10^9$ komórek w pojedynczej infuzji. Średni wiek badanych wynosił $30,3 \pm 8,7$ lat, a średni czas trwania choroby $39 \pm 26,4$ tygodni od badania przesiewowego. Proces namnażania Tregs odbywał się ze zwiększoną fosforylacją STAT5 (sygnał dla cytokin regulujący ekspresję FOXP3) w odpowiedzi na IL-2, co zwiększało aktywność supresyjną Tregs in vitro i długoterminowe przeżycie Tregs w warunkach in vivo (ponad 1 rok). Terapia komórkowa była dobrze tolerowana bez oznak toksyczności krótkoterminowych (w tym reakcji na wlew lub zespołu uwalniania cytokin), gwałtowny spadek produkcji endogennej insuliny lub zakażeń oportunistycznych. W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano również dobrą odpowiedź metaboliczną w postaci stabilnego poziomu C-peptydu, który utrzymywał się na stałym poziomie nawet do kilkudziesięciu tygodni od podania adoptywnych Tregs. Ponadto wyniki tego badania sugerują, że bezpieczne są dawki infuzji adoptywnych Tregs w zakresie 500-krotnym.

W projekcie badawczym Jeffrey A. Bluestone i wsp. zasugerowali, że zwiększenie immunosupresji w warunkach *in vitro* oraz w warunkach aktywacji i ekspansji Tregs z IL-2, może spowodować, że zostanie zwiększona skuteczność terapii. Taka skojarzona terapia komórkowa jest obecnie w fazie rozwoju. Podsumowując, wykazano, że autologiczne Tregs mogą być podawane adoptywnie i są dobrze tolerowane przez pacjentów z nowo rozpoznaną T1D. Wyniki uzyskane przez amerykańskich naukowców pokrywają się z wynikami badań, jakie zostały przedstawione wcześniej przez polskich autorów niniejszego badania.

Identyfikacja limfocytów Tregs jest jednym z najważniejszych osiągnięć współczesnej immunologii. Postęp prac naukowych nad limfocytami Tregs, oraz rozwój możliwości technicznych dają wyraźną nadzieję na podejmowanie, w niedalekiej przyszłości, terapii w pełni wykorzystujących potencjał limfocytów o właściwościach regulacyjnych. Przedstawione w tej pracy wyniki badań innowacyjnej terapii są tego najlepszym przykładem.

Warto pamiętać, że z punktu widzenia klinicznego istotna jest nie tylko efektywność infuzji komórek T regulatorowych w leczeniu cukrzycy, ale także inne aspekty tej swoistej ingerencji w układ odpornościowy człowieka, w tym możliwość wystąpienia głębokiej immunosupresji.

Wstępne wyniki są zachęcające, pozwalające uwierzyć, że przeprogramowanie Tregs lub infuzja autologicznych lub alogenicznych limfocytów Tregs może zmienić naturalny przebieg choroby autoimmunologicznej. Potrzebne są wysiłki mających na celu opracowanie leków zdolnych przeprogramować Tregs i ustalić, które subpopulacje limfocytów Tregs najlepiej nadają się do wykorzystania w terapii komórkowej (Miyara i inni, 2014) (Himmel i inni, 2012).

Z uwagi na stosunkowo późne rozpoznanie pacjentów z T1D, gdzie tylko 10 do 30% wysp trzustkowych nadal funkcjonuje i tylko taki zakres może być objęty ochroną, czas rozpoznania T1D i włączenie prezentowanego leczenia było oczywistym ograniczeniem medycznym tego badania. Rutynowe markery autoimmunizacji istotne dla T1D, takie jak autoprzeciwciała mogą identyfikować pacjentów zagrożonych rozwojem choroby, jednak ich dokładność w przewidywaniu choroby, nie jest wystarczająca do identyfikacji wczesnego stadium T1D. Jest zatem konieczne opracowanie wiarygodnych kryteriów wczesnego wykrywania T1D, gdy masa komórek β jest znacznie wyższa. Wzbogacenie rutynowego algorytmu rozpoznania T1D o: typowanie HLA, ocenę konkretnych polimorfizmów nie-HLA, ocenę limfocytów T autoreaktywnych lub krążącego DNA wysp trzustkowych, może zwiększyć czułość i swoistość, oraz identyfikować pacjentów w bardzo wczesnym stadium choroby z wyższą masą wysp trzustkowych. Podawanie Tregs w takim wczesnym stadium cukrzycy na pewno poprawiłaby skuteczność terapii. (Akirav i inni, 2011) (Steck i inni, 2014)

Podsumowując, przedstawiona terapia wykorzystująca adoptywne limfocyty T regulatorowe CD3(+)CD4(+)CD25(high)CD127(-) jest bezpieczna. Terapia chroni wyspy przed procesem autoimmunologicznym, jeśli zastosujemy ją na wczesnym etapie rozwoju T1D (do 6 miesięcy od diagnozy). Kilka możliwych przyczyn wpływających na skuteczność terapii zostało zidentyfikowanych. Tregs są bardzo zależne od IL-2. Progresja choroby wiązała się ze zmianą proporcji Tregs naiwnych/pamięci oraz z

powoli zwiększając się aktywnością cytokin prozapalnych, które zostały tylko częściowo kontrolowane przez podawanie Tregs. W związku z tym, leczenie powinno się podejmować na jak najwcześniejszym etapie od rozpoznania, aby chronić możliwie najwyższą masę wysepek trzustkowych, ale także wykorzystując zachowaną prawidłową aktywność Tregs we wczesnym etapie T1D. Warto zastanowić się w przyszłości nad zoptymalizowaniem metody i skojarzeniem przedstawionej terapii z odpowiednimi lekami lub w połączeniu z przeszczepem trzustki lub przeszczepem wysp trzustkowych, aby zwiększyć szanse na jeszcze lepszy efekt terapeutyczny.

VI. Streszczenie

W cukrzycy typu 1 (T1D) komórki wysp trzustkowych są niszczone przez autoreaktywne limfocyty T, co skutkuje brakiem produkcji insuliny. Przedstawiona w tej pracy nowatorska immunoterapia limfocytami T regulatorowymi (Tregs) jest w stanie przedłużyć remisję u chorych ze świeżo rozpoznaną T1D.

Niemniejsza rozprawa jest oceną odpowiedzi metabolicznej i immunologicznej na leczenie limfocytami T regulatorowymi CD3(+)CD4(+)CD25(high)CD127(-). Przedstawiono wyniki 2-letniej obserwacji dwanaściorga dzieci z nowo rozpoznaną T1D, którym podano wcześniej namnożone *in vitro* autologiczne Limfocyty Tregs. Dodatkowo, próbowano odnieść uzyskane wyniki do grupy kontrolnej, nieleczonej.

Dwa lata po włączeniu terapii T1D postępowała, a wszyscy pacjenci byli insulinozależni. Funkcja komórek β mierzona poziomem C-peptydu i dawkami podawanej egzogennej insuliny były najlepiej zachowane u pacjentów leczonych dwoma dawkami Tregs (3/6 w remisji), gorsze wyniki zaobserwowano u pacjentów leczonych jedną dawką Tregs (1/6 w remisji), a najgorsze w grupie kontrolnej, nieleczonej (brak remisji). Po podaniu pacjentom limfocytów Tregs zaobserwowano zwiększony poziom limfocytów Tregs w krwi obwodowej w ciągu kilku pierwszych miesięcy oraz zmianę fenotypu Tregs z naiwnych CD62L⁺CD45RA⁺CD62L⁺ na pamięci CD45RA⁻. Ta zmiana była odwracalna w grupach leczonych, natomiast w grupie kontrolnej nieleczonej nie była odwracalna i postępowała z czasem trwania choroby. Ponadto zaobserwowano utrzymujący się wzrost stężenia w surowicy krwi cytokin prozapalnych. Poziom IL6 wzrósł we wszystkich badanych grupach, natomiast poziom IL1 i TNF α dodatkowo wzrosły także w grupie nieleczonych pacjentów.

Wyniki przedstawionych przez autorów tego projektu badań sugerują, że terapia adoptywna limfocytami Tregs spełnia wszystkie kryteria, aby uznać ją za bezpieczną. Mała liczba leczonych pacjentów jest ograniczeniem przedstawionego badania. Niemniej jednak wyniki tej nowatorskiej terapii zachęcają do dalszych badań na większej liczbie osób. Infuzja autologicznych limfocytów Tregs może zmienić naturalny przebieg choroby autoimmunologicznej. W celu poprawienia skuteczności przedstawionej terapii potrzebne są wysiłki mające na celu opracowanie leków zdolnych przeprogramować Tregs i ustalić, które subpopulacje limfocytów Tregs najlepiej nadają się do wykorzystania w terapii komórkowej.

VII. Abstract

Type 1 diabetes is a condition in which the pancreatic islets are destroyed by selfreacted T cells. This report aims at finding factors affecting the efficacy of Tregs therapy.

We present metabolic and immune background of twelve children with recent onset T1DM treated with up to 30×10^6 /kg b.w. of autologous expanded *ex vivo* CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ Tregs and respective non-treated control subjects in two-years-lasting follow-up.

T1DM progressed and all patients were insulin dependent two years after inclusion. β -cell function measured with c-peptide levels and consumption of exogenous insulin were the best preserved in those treated with two doses of Tregs (3/6 in remission), worse in those treated with one dose (1/6 in remission) and the worst in non-treated controls (no remissions).

Increased levels of Tregs could be seen in peripheral blood for few months after their adoptive transfer together with the shift from naive CD62L⁺CD45RA⁺ to memory CD62L⁺CD45RA⁻ Tregs. The shift was reversible in the treated groups but slowly progressing in non-treated controls. Sustained increase in serum levels of proinflammatory cytokines was found in the follow-up. IL6 levels increased in all examined groups and those of IL1 and TNF α increased also in control non-treated subjects. The survival of expanded Tregs *in vitro* was dependent on IL2 and the presence of other lymphocytes in the cultures. Several possible reasons affecting the efficacy were identified. Tregs were highly dependent on IL2. The disease progression was associated with changing proportions of naïve/memory Tregs and slowly increasing proinflammatory activity, which was only partially controlled by administered Tregs. Hence, the therapy should be administered at earliest convenience to protect the highest possible mass of the islets but also to utilize preserved content of Tregs in early phase of T1DM.

Presented study confirmed safety of the Tregs therapy Additional dose of Tregs later in the study improved the results but the effects were limited Tregs can stop the destruction of pancreatic islets and protect from autoimmune type 1 diabetes

Spis rysunków

Rysunek 1. Patologiczne cechy trzustki w cukrzycy typu 1: Naciek wyspy trzustkowej u pacjenta z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1. Immunohistochemia pokazuje wewnątrzwyspową obecność komórek CD3-dodatnich (brązowy) i komórek alfa produkujących glukagon (różowy). (Atkinson i inni, 2014)	16
Rysunek 2. Częstość występowania cukrzycy typu 1 u dzieci w wieku 0-14 lat, zależna od rejonu geograficznego i czasu. (A) szacowaną częstością występowania cukrzycy typu 1, wg. regionu, w 2011r. (B) trendy czasowe oparte na częstości występowania cukrzycy typu 1 u dzieci w wieku 0-14 lat na obszarach o wysokim lub pośrednim wskaźniku choroby (Atkinson i inni, 2014).	18
Rysunek 3. Zwiększona ekspansja i aktywność limfocytów T _H 17 o ograniczonej liczbie Tregs i funkcji w chorobach autoimmunologicznych, takich jak T1D. Źródło: (Pham i inni, 2016).....	32
Rysunek 4. Rozwój i charakterystyka limfocytów Tregs (Tregs) pochodzących z grasicy (tTregs) i obwodu Tregs (pTregs). Przedstawiono główne markery obecne w subpopulacjach limfocytów Tregs (Petrillo i inni, 2015).....	34
Rysunek 5. Przebieg analizy typowania HLA, PCR-SSP firmy BioRad. 1a. Zdjęcie żelu HLA-DQB1, oraz widoczne dodatnie reakcje amplifikacji. 1b. Zdjęcie żelu HLA-DRB1 oraz widoczne dodatnie reakcje amplifikacji. 2. Raportowanie dodatnich reakcji w programie BioRad. 3. Uzyskany wynik HLA-DQB1 w badanej próbce.	60
Rysunek 6. Przykładowa analiza cytometryczna limfocytów Tregs. Źródło: (Trzonkowski i inni, 2009)	65
Rysunek 7. Reakcje dodatnie wysp trzustkowych w badaniu ICA metodą IFE (substrat tkankowy - trzustka mały) u pacjenta ze świeżo wykrytą T1D. Źródło: dr Julia Kulczycka, zasoby własne.	68
Rysunek 8. Stężenie C-peptydu na czczo w grupie kontrolnej i w grupach leczonych 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA – porównanie dla 3 grup w czasie: 0: $\chi^2 = 3,43$; $p = 0,180$, 4 miesiące: $\chi^2 = 8,57$; $p = 0,014$, 1 rok: $\chi^2 = 10,15$; $p = 0,006$ 2 lata: $\chi^2 = 3,46$; $p = 0,177$	75
Rysunek 9. Korelacja między Limfocytami Tregs [%], poziomem C-peptydu.	76
Rysunek 10. Dobowa dawka insuliny (DDI) w grupie kontrolnej i grupach leczonych 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA – porównanie 3 grup w czasie: 0: $\chi^2 = 5,21$; $p = 0,074$, 4 miesiące: $\chi^2 = 8,351$; $p = 0,015$, 1 roku: $\chi^2 = 7,86$; $p = 0,020$, 2 lat: $\chi^2 = 5,88$; $p = 0,052$	77
Rysunek 11. Poziom glukozy na czczo obserwowany w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA dla glukozy na czczo – porównanie trzech grup w czasie: 0 $\chi^2 = 2,27$; $p = 0,322$, 4 miesiące $\chi^2 = 6,95$; $p = 0,031$, 1 rok $\chi^2 = 0,89$; $p = 0,639$, 2 lata: $\chi^2 = 6,79$; $p = 0,034$	78
Rysunek 12. Poziom HbA1c czczo obserwowany w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA dla HbA1c – porównanie trzech grup w czasie: 0 $\chi^2 = 8,06$; $p = 0,018$, 4 miesiące $\chi^2 = 0,78$; $p = 0,676$, 1 roku: $\chi^2 = 7,13$; $p = 0,028$ i 2 lat: $\chi^2 = 3,233$; $p = 0,197$	78
Rysunek 13. Test tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego, z dużą częstotliwością pobierania próbek przeprowadzony w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA dla MMTT – porównanie trzech grup w czasie: 0: $\chi^2 = 3,93$; $p = 0,139$, 15': $\chi^2 = 3,88$; $p = 0,143$, 30': $\chi^2 = 5,40$; $p = 0,067$,	

60': Chi ² = 5,92; p = 0,051, 90': Chi ² = 4,90; p = 0,085, 120': Chi ² = 4,90; p = 0,085, 150': Chi ² = 5,27; p = 0,071, 180': Chi ² = 4,90; p = 0,085, 210': Chi ² = 5,32; p = 0,069, 240': Chi ² = 4,27; p = 0,118.....	79
Rysunek 14. Poziom limfocytów Tregs CD3 ⁺ CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs. Test Kruskal-Wallis ANOVA dla porównania poziomu limfocytów Tregs CD3 ⁺ CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ w trzech badanych grupach w czasie: 0 Chi ² = 12,83; p = 0,002, 4 miesiące: Chi ² = 5,98; p = 0,050, 1 roku: Chi ² = 9,98; p = 0,006 oraz 2 lat: Chi ² = 0,379; p = 0,827	80
Rysunek 15. Poziom limfocytów Tregs CD3+CD4+CD25highCD127- w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs.....	81
Rysunek 16. Korelacja dwóch fenotypów Tregs: CD3+CD4+FoxP3+ oraz CD3+CD4+CD25highCD127low-.....	82
Rysunek 17. Poziom Trgs CD3+CD4+FoxP3high w grupie: nieleczonej, leczonej 1dawką Tregs oraz leczonej 2 dawkami Tregs.....	83
Rysunek 18. % Tregs naiwnych (Tn) FoxP3+CD62L+CD45RA+ w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs.....	85
Rysunek 19. % Tregs pamięci centralnej (Tcm) FoxP3+CD62L+CD45RA- w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych z 1 i 2 dawkami Tregs	86
Rysunek 20. Poziom limfocytów Tregs efektorowych (Tem) FoxP3+CD62L-CD45RA- w grupie nieleczonej i grupach leczonych 1 i 2 dawkami Tregs.....	87
Rysunek 21. Poziom IL2 w surowicy pacjentów w grupie nieleczonej oraz w grupie leczonej 1 i 2 dawkami Tregs.....	88
Rysunek 22. Poziom IL6 w surowicy pacjentów w grupie nieleczonej jak i w dwóch grupach leczonych 1 lub 2 dawkami Tregs.	89
Rysunek 23. Poziom TNF α w surowicy pacjentów w grupie nieleczonej jak i w dwóch grupach leczonych 1 lub 2 dawkami Tregs.	90
Rysunek 24. Poziom IL1 oznaczony w surowicy pacjentów w grupie nieleczonej jak i w dwóch grupach leczonych 1 lub 2 dawkami Tregs.....	91
Rysunek 25. Częstość występowania antygenów HLA-DRB1w grupie chorych na T1D leczonych Tregs.....	93
Rysunek 26. Częstość występowania antygenów HLA-DRB1 w grupie chorych na T1D nieleczonych Tregs.....	93
Rysunek 27. Częstość występowania antygenów HLA-DQB1 w grupie chorych na T1D leczonych Tregs.....	94
Rysunek 28. Częstość występowania antygenów HLA-DQB1 w grupie chorych na T1D nieleczonych Tregs.....	94
Rysunek 29. Częstość występowania genotypu HLA-DRB1 w grupie kontrolnej i leczonej razem.	95
Rysunek 30. Częstość występowania genotypu HLA-DQB1 w grupie kontrolnej i leczonej razem.....	95
Rysunek 31. Antygeny HLA-A w grupie leczonej 1 lub 2 dawkami Tregs.....	96
Rysunek 32. Antygeny HLA-A w grupie kontrolnej, nieleczonej.....	96
Rysunek 33. Korelacja między fenotypem Tregs [%], a poziomem autooprzeciwciał IA2	98

Spis tabel

Tabela 1. Prawdopodobieństwo wystąpienia T1D wśród najbliższej rodziny chorego (Tuomilehto, 2013) (Hansen i inni, 2015).....	20
Tabela 2. Charakterystyka istotnych autoprzeciwciał w cukrzycy typu 1. (Lebastchi i inni, 2012), (Hansen i inni, 2015)	28
Tabela 3. Charakterystyka kliniczna grup badanych.	47
Tabela 4. Grafiki wizyt kontrolnych, R-rekrutacja, P- pobranie, I- infuzja.....	51
Tabela 5. Materiał badany wykorzystywany w obserwacji pacjentów.	52
Tabela 6. Odczynniki do izolacji DNA używane w pracy.....	52
Tabela 7. Odczynniki do typowania HLA używane w pracy.....	52
Tabela 8. Przygotowanie żelu do elektroforezy.....	53
Tabela 9. Pożywka hodowlana do bankowania komórek używana w pracy.....	53
Tabela 10. Roztwory i bufory używane w pracy.	53
Tabela 11. Przeciwciała monoklonalne sprzężone z fluorochromami używane w pracy.....	54
Tabela 12. Charakterystyka fluorochromów, którymi były znakowane przeciwciała monoklonalne używane w pracy	54
Tabela 13. Odczynniki do permeabilizacji komórek.....	55
Tabela 14. Odczynniki użyte do oznaczenia autoprzeciwciał ICA.	55
Tabela 15. Odczynniki wykorzystane w badaniu AD i IAA.	55
Tabela 16. Sposób sporządzenia mieszaniny reakcyjnej.	58
Tabela 17. Program amplifikacji PCR-SSP dla testów BioTest (BioRad).	59
Tabela 18. Schemat dodawania przeciwciał I rzutu w trakcie barwienia PBMC.....	63

Bibliografia

- Akirav, EM, i inni. 2011.** Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, strony 19018-23.
- Association, American Diabetes. 2012.** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* January 2012, strony 64-71.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, George E. i Michels, Aaron. 2014.** Type 1 diabetes—progress and prospects. *The Lancet.* 2014, strony 69–82.
- Barbeau, WE, Bassaganya-Riera, J i Hontecillas, R. 2007.** Putting the pieces of the puzzle together – a series of hypotheses on the etiology and pathogenesis of type 1 diabetes. *Medical Hypotheses.* 68 2007, strony 607–619.
- Battaglia, M i Roncarolo, MG. 2011.** Immune intervention with T regulatory cells: Past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. *Seminars in Immunology.* 23 2011, strony 182-194.
- Bennett, CL, i inni. 2001.** The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001, 27.
- Black, MH i Lawrence, JM. 2013.** HLA-Associated Phenotypes in Youth with Autoimmune Diabetes. *Pediatric Diabetes.* March 2013, strony 121–128.
- Bluestone, JA. 2013.** T1DM Immunotherapy Using CD4 + CD127lo/- CD25+ Polyclonal Tregs. *Pubmed Clinical Trials; study no NCT01210664.* 2013, str. <http://www.clinicaltrials.gov>.
- Bluestone, Jeffrey A, i inni. 2015.** Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science Translational Medicine.* November 2015, str. 315ra189.
- Bluestone, Jeffrey A, i inni. 2015.** Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *IMMUNOTHERAPY.* 2015.
- Bodalski, J. 2003.** Stężenie peptydu C a remisja kliniczna w pierwszym roku trwania klinicznie jawnej cukrzycy typu 1 u dzieci. *Prz Pediat.* 33 2003, strony 149-153.
- Bonifacio, E i Ziegler, AG. 2010.** Advances in the prediction and natural history of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010, strony 513–525.
- Bottazzo, GF. 2005.** IA-2 antibody prevalence and risk assessment of early insulin requirement in subjects presenting with type 2 diabetes. *Diabetologia* 48,. 2005, strony 703–708.
- Bottazzo, GF, Florin-Christensen, A i Doniach, D. 1974.** Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *The Lancet.* Volume 304 Novembre 1974.
- Brusko, T, i inni. 2007.** No alterations in the frequency of FoxP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes.* 604-612. 56 2007, strony 604-612.

- Brusko, TM, Putnam, AL i Bluestone, JA. 2008.** Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev.* 223 2008, strony 371-90.
- Callahan, MK, Wolchok, JD i Allison, JP. 2010.** Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Semin Oncol.* 2010, strony 473-84.
- Campbell, DJ i Ziegler, SF. 2007.** FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, strony 305-310.
- Canivell, Silvia i Gomis, Ramon. 2014.** Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmunity Reviews.* 13 2014, strony 403-407.
- Chobot, PJ i Otto-Buczowska, E. 2009.** Epidemiologia Cukrzycy Typu 1. *Przegląd Pediatryczny.* VOL 39, NO 4 2009, strony 229-234.
- Christie, MR, i inni. 1997.** Validity of screening for individuals at risk for type I diabetes by combined analysis of antibodies to recombinant proteins. *Diabetes Care.* 1997, strony 965–970.
- Cooper, JD i al., et. 2011.** Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes.* 60 2011, strony 1624–1631.
- Cvetanowich, GL i Hafler, DA. 2011.** Human Regulatory T Cells in Autoimmune Diseases. *Curr Opin Immunology.* 22 2011, strony 753-60.
- D'Angeli, MA, i inni. 2010.** Environmental factors associated with childhood-onset type 1 diabetes mellitus: an exploration of the hygiene and overload hypotheses. *Arch. Pediatr Adolesc. Med.* 164 2010, strony 732–738.
- Di Ianni, M, i inni. 2011.** Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood.* 117 2011, strony 3921–3928.
- DiPaolo, RJ, i inni. 2005.** CD4+CD25+ T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. *J Immunol.* 175(11) 2005, strony 7135-42.
- Erlich, H, i inni. 2008.** HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes.* 57: 2008, strony 1084–92.
- Ermann, J, i inni. 2005.** Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVH. *Blood.* 105 2005, strony 2220-222.
- Frey, O, i inni. 2005.** The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther.* 7(2) 2005, strony 291-301.
- Fu, S, i inni. 2004.** CD4+CD25+CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am. J. Transplant.* 4 2004, strony 65-78.

- Gandhi Forouhi, N i Wareham, Nicholas J. 2014.** Epidemiology of diabetes. *Medicine*. December 2014, strony 698–702.
- Geiger, TL i Tauro, S. 2012.** Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function. *Hum Immunol*. 73 2012, strony 232–239.
- Golab, Karolina, i inni. 2013.** Challenges in cryopreservation of regulatory T cells (Tregs) for clinical therapeutic applications. *International Immunopharmacology*. February 2013, strony 371–375.
- Golshayan, D, i inni. 2007.** In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 109(2) 2007, strony 827-35.
- Grant, Charlotte R, i inni. 2015.** Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and—yet—unanswered questions. *Autoimmunity Reviews*,. February 2015, strony 105-116.
- Gregg, R, i inni. 2005.** The number of human peripheral blood cd4+ cd25high regulatoryt cells increases with age. *Clinical and experimental immunology*. 140 2005, strony 540-546.
- Gregori, S, i inni. 2003.** Dynamics of pathogenetic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *J. Immunol*. 2003, strony 4040-4047.
- Hansen, MP, Matheis, N i Kahaly, GJ. 2015.** Type 1 diabetes and polyglandular autoimmune syndrome: A review. *World Journal of Diabetes*. February 2015, strony 67-79.
- Hiemstra, HS, i inni. 2001.** Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,. 2001, strony 3988–3991.
- Himmel, ME, i inni. 2012.** Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers. *Immunology*,. 136 2012, strony 115–122.
- Honeyman, MC, i inni. 2010.** Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. *J. Immunol*,. 2010, strony 2204–2210.
- Hori, S, Nomura, T i Sakaguchi, S. 2003.** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003, strony 1057–1061.
- Jae-Ryong, Kim, i inni. 2012.** Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease. *J Korean Med Sci*,. 27 2012, strony 1009–1013.
- Jarosz-Chobot, P, i inni. 2011.** Rapid increase in the incidence of type 1 diabetes in Polish children from 1989 to 2004, and predictions for 2010 to 2025. *Diabetologia*. 54 (3) 2011, strony 508-15.
- Jędrzejczak, Wiesław Wiktor, i inni. 2015.** An economic analysis of autologous hematopoietic stem cell transplantation (AH SCT) in the treatment of new onset type 1 diabetes. *Acta Diabetologia*. 52 2015, strony :881–888.

- Jones, AG i Hattersley, AT. 2013.** The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet Med.* 2013, strony 803-817.
- Khattari, R, i inni. 2003.** An essential role for scurf in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4 2003, strony 337-342.
- Kim, CH. 2006.** Migration and function of FoxP3+ regulatory T cells in the hematolymphoid system. *Exp Hematol.* 34 2006, strony 1033-1040.
- Kohm, AP, i inni. 2002.** Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 169(9) 2002, strony 4712-6.
- Kulmala, P, i inni. 1998.** The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J. Clin. Invest.* 1998, strony 327–336.
- LaGasse, JM, i inni. 2002.** Successful Prospective Prediction of Type 1 Diabetes in Schoolchildren Through Multiple Defined Autoantibodies. *Diabetes Care.* march 2002, strony 505-511.
- Lamb, MM, i inni. 2009.** Height growth velocity, islet autoimmunity and type 1 diabetes development: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Diabetologia.* 52 2009, strony 2064–2071.
- Lampasona, V. 2010.** Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study Group. Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care* 33. 2010, strony 104–108.
- Laugesen, E. 2015.** Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabet. Med.* 32 2015, strony 843–852.
- Lawson, CA, i inni. 2006.** Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology.* 45 2006, strony 1210–1217.
- Lebastchi, J i Herold, KC. 2012.** Immunologic and Metabolic Biomarkers of b-Cell Destruction in the Diagnosis of Type 1 Diabetes,. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2;. 2012, str. :a007708.
- Lepault, F i Gagnerault, MC. 2000.** Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 164 2000, strony 240-247.
- Lernmark, A. 2013.** Depleting T cells in newly diagnosed autoimmune (type 1) diabetes, are we getting anywhere? . *Diabetes.* 2013, strony 3669-3679.
- Li, CR, BJ, Baaten i Bradley, LM. 2012.** Harnessing memory adaptive regulatory T cells to control autoimmunity in type 1 diabetes. *J. Mol. Cell. Biol.* 4 2012, strony 38-47.
- Li, N, i inni. 2014.** Increased apoptosis induction in CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to enhanced disease activity in patients with rheumatoid arthritis through IL-10 regulation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 18 2014, strony 78–85.

- Li, S, i inni. 2013.** Identification of novel HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from Zinc Transporter 8. *Vaccine*. 2013, strony 1610–1615.
- Lin, W, i inni. 2007.** Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat. Immunol.*, 8 2007, strony 359-368.
- Liu, W, i inni. 2006.** CD127 expression inversely correlates with foxp3 and suppressive function of human cd4+ t reg cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006, strony 1701-1711.
- Maahs, DM, i inni. 2010.** Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010, strony 481–497.
- Marek, N, i inni. 2011.** The time is crucial for ex vivo expansion of T regulatory cells for therapy. *Cell Transplantation*. 11-12 2011, strony 1747-1758.
- Marek-Trzonkowska, N, i inni. 2013.** Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Pediatric diabetes*. 2013.
- Marek-Trzonkowska, N, i inni. 2014.** Therapy of type 1 diabetes with CD4+CD25highCD127- regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets — Results of one year follow-up. *Clinical Immunology*. July 2014, strony 23–30.
- Marek-Trzonkowska, Natalia, i inni. 2012.** Administration of CD4+CD25highCD127- Regulatory T Cells Preserves β -Cell Function in Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes Care*. September 2012, strony 1817–1820.
- Marek-Trzonkowska, Natalia, i inni. 2012.** Terapia limfocytami T regulatorowymi CD4+CD25highCD127- chroni komórki β trzustki w cukrzycy typu 1 u dzieci . *Endokrynologia Pediatria*. 2012.
- Matzinger, P. 1994.** Tolerance, danger and the extender family. *Rev. Immunol*. 12 1994, strony 991-1045.
- McLaughlin, KA, i inni. 2014.** HLA-DR4-associated T- and B-cell responses to specific determinants on the IA-2 autoantigen in Type 1 diabetes. *J Immunol*. November 2014, strony 4448–4456.
- McMurchy, AN, i inni. 2011.** Moving to tolerance: Clinical Application of T regulatory cells. *Semin Immunol*. August 2011, strony 1-15.
- Mesples, A, i inni. 2013.** Early immunotherapy using autologous adult stem cells reversed the effect of antipancreatic islets in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus: preliminary results. *Med. Sci. Monit: Int Med J Exp Clin Res*. 19 2013, strony 852–857.
- Miyao, T, i inni. 2012.** Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells,. *Immunity*. 2012, strony 262–275.
- Miyara, M, i inni. 2011.** Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 10 2011, strony 744–755.

- Miyara, M, Ito, Y i Sakaguchi, S. 2014.** TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*,. 10 2014, strony 543–551.
- Montiel-Casado, MC, i inni. 2012.** Impact of blood amylase peak over vascular graft thrombosis in pancreas transplantation. *Transplant Proc.* 2012, strony 2627–2630.
- Myśliwiec, Małgorzata. 2007.** Cukrzyca u dzieci – etiopatogeneza diagnostyka i terapia. *Forum Medycyny Rodzinnej*. tom 1 nr 2 2007, strony 125-133.
- Nerup, J, i inni. 1994.** On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*. 1994, strony 82-89.
- Ng, WF, i inni. 2001.** Human CD4+CD25+cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*. 98 2001, strony 2736-2744.
- Nguyen, C, i inni. 2013.** Definition of High-Risk Type 1 Diabetes HLA-DR and HLA-DQ Types Using Only Three Single Nucleotide Polymorphisms. *Diabetes*. 2013, strony 2135–2140.
- Nishikawa, H i Sakaguchi, S. 2010.** Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer*. 127 2010, strony 759–767.
- Noble, JA i Valdes, AM. 2011.** Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 11 2011, strony 533-542.
- Nocentini, G, i inni. 2014.** Expansion of regulatory GITR+CD25 Low/-CD4+ T cells in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther*,. 16 2014, str. 444.
- Notkins, Abner Louis. 2002.** Immunologic and Genetic Factors in Type 1 Diabetes. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. september 2002, strony 43545–43548,.
- Otto-Buczowska, E. 2014.** Przydatność oznaczania peptydu C w diabetologii. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2014, strony 63-68.
- Palmer, JP. 2009.** C-peptide in the natural history of type 1 diabetes. *Diabetes Med. Rev.* 2009, strony 325-328.
- Palmer, JP. 2004.** C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop. *Diabetes*. 2004, strony 250-264.
- Patterson, CC, i inni. 2012.** Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*. 2012, strony 2142–2147.
- Petrillo, MG, i inni. 2015.** GITR+ regulatory T cells in the treatment of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. February 2015, strony 117–126.
- Pham, Minh N, Herrath, Matthias G. von i Vela, Jose Luis. 2016.** Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of iL-2 in Treatment of Type 1 Diabetes. *Frontiers in Immunology*. January 2016.

Pham, MN, von Herrath, MG i Vela, JL. 2016. Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of IL-2 in Treatment of Type 1 Diabetes. *Frontiers in Immunology*. January 2016.

Piccirillo, CA i Thornton, AM. 2004. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells;. *Trends. Immunol.* 2004, strony 374-380.

Pociot, F i McDermott, MF. 2002. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes and Immunity*. 3 2002, strony 235–249.

Polskie Towarzystwo Diabetologiczne. 2016. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2016. *Diabetologia Kliniczna*. tom 5, suplement A 2016, strony A1-A70.

Putnam, A.L, i inni. 2009. Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2009.

Rables, DT i Eisenbarth, GS. 2002. TL.Millenniumaward recipient contribution. Identification of children with early onset and high incidence of antiislet autoantibodies. *Clinical Immunology*. 2002, strony 217–224,.

Rewers, JM i Gottlieb, P. 2009. Immunotherapy for the prevention and treatment of type 1 diabetes: human trials and a look into the future. *Diabetes Care*. 32 2009, strony 1769–82.

Roep, BO, i inni. 2002. Molecular mimicry in type 1 diabetes immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002, strony 163–165.

Ronningen, KS i Markussen, G. 1989. An increased risk of insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) among HLA-DR4, DQw8/DRw8, DQw4 heterozygotes. *Humm. Immunol.* 24 1989, strony 165-173.

Ryba, M i J, Myśliwska. 2010. CD4+CD25+Foxp3+ T lymphocytes: naturally occurring regulatory T cells. *Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism*. 16 4 2010, strony 289-294.

Ryba, M i Myśliwska, J. 2006. BIOLOGIA NATURALNYCH LIMFOCYTÓW REGULATORYWYCH CD4+CD25+. *Postępy Biologii Komórki*. Tom 33 2006, strony 427-436.

Ryba, M, i inni. 2011. Anti-TNF rescue CD4+Foxp3+ regulatory T cells in patients with type 1 diabetes from effects mediated by TNF. *Cytokine*. 55 (3) 2011, strony 353-61.

Ryba-Stanisławowska, M, Myśliwska, J i Myśliwiec, M. 2013. The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with type 1 diabetes. *Mediators Inflamm*. 2013, str. 205284.

Sakaguchi, S, i inni. 2010. FOXP3+regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 10 2010, strony 490-500.

Sakaguchi, S, i inni. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*,. 1995, strony 1151–1164.

- Sato, E, i inni. 2005.** Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*,. 102 2005, strony 18538–18543.
- Schiffrin, A, i inni. 1992.** Factors predicting course of beta-cell function in IDDM. *Diabetes Care*. 15 1992, strony 997–1001.
- Shimizu, J, i inni. 2002.** Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 3(2) 2002, strony 135-42.
- Snarski, E, i inni. 2010.** Potential role of immunoablation and hematopoietic cell transplantation in the treatment of early diabetes type 1. *Ann Transplant*. 2010.
- Sosenko, JM, i inni. 2010.** Trends of earlier and later responses of C-peptide to oral glucose challenges with progression to type 1 diabetes in diabetes prevention trial-type 1 participants. *Diabetes Care*,. 33 2010, strony 620–625.
- Staeva-Vieira, T, Peakman, M i von Herrath, M. 2007.** Translational mini-review series on type 1 diabetes: Immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 18 2007, strony 17-31.
- Steck, AK, i inni. 2014.** Improving prediction of type 1 diabetes by testing non-HLA genetic variants in addition to HLA markers. *Pediatr Diabetes*. 2014, strony 355-62.
- Szanya, V, i inni. 2002.** The subpopulation of CD4*CD25+splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol*. 169 2002, strony 2461-2465.
- Tan, T, i inni. 2014.** Alteration of Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes Mellitus: A Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol*. August 2014, strony :234–243.
- Theil, T, i inni. 2015.** Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2015, strony 473-86.
- Thornton, AM, i inni. 2010.** Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2010, strony 3433–3441.
- Todd, JA. 2010.** Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 32 2010, strony 457–467.
- Trzonkowski, P, i inni. 2004.** CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol*. 112 2004, strony 258-67.
- Trzonkowski, P, i inni. 2009.** Ex Vivo Expansion of CD41CD251 T Regulatory Cells for Immunosuppressive Therapy. *Cytometry Part*. 2009, strony 175-188,.
- Trzonkowski, P, i inni. 2009.** First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127– Tregulatory cells. *Clinical Immunology*. June 2009, strony 22–26.

- Trzonkowski, P, i inni. 2015.** Hurdles in therapy with regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2015.
- Tuomilehto, Jaakko. 2013.** The Emerging Global Epidemic of Type 1 Diabetes. *Springer Science+Business Media New York 2013.* 27 september 2013, strony 795–804.
- Valdes, AM, i inni. 2005.** D6S265*15 marks a DRB1*15, DQB1*0602 haplotype associated with attenuated protection from type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 48(12) 2005, strony 2540-2543.
- Vrabelova, Z, i inni. 2008.** CD 127- and FoxP3+ expression on CD25+CD4+ T regulatory cells upon specific diabetogenetic stimulation in high-risk relatives of type 1 diabetes mellitus patients. *Scand. J. Immunol.* 67 2008, strony 404-410.
- Vukmanovic-Stejic, M, i inni. 2006.** Human CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest.* 116 2006, strony 2423-33.
- Wallberg, Maja i Cooke, Anne. 2013.** Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends in Immunology.* December 2013, strony 583-591.
- Wang, XJ, i inni. 2013.** Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4+CD25highFoxP3+ T regulatory cells in humans. *International Immunopharmacology.* March 2013, strony 364–370.
- Wenzlau, JM, i inni. 2009.** Novel antigens in type 1 diabetes: the importance of ZnT8. *Curr Diab Rep.* April 2009, strony 105–12.
- Wenzlau, JM, i inni. 2007.** The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci.* October 2007, strony 17040–5.
- Winkler, C, i inni. 2014.** Feature ranking of type 1 diabetes susceptibility genes improves prediction of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2014, strony 2521–2529.
- Wu, AJ, i inni. 2002.** Tumor necrosis factor- α regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 2002, strony 12287-12292.
- You, S, i inni. 2004.** Unique role of CD4+CD62L+ regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes in T cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 2004, strony 14580-14585.
- Zembala, M i Pituch-Noworolska, A. 2001.** Immunopatogeneza i spektrum schorzeń autoimmunizacyjnych. *Zarys Immunologii Klinicznej.* 2001, strony 59-66.
- Zheng, SG, i inni. 2004.** Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J. Immunol.* May 2004, strony 5213–5221.
- Ziegler, Anette-G. 2010.** Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes. *Immunity Review* 32. april 2010, strony 468-478.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę serdecznie podziękować:

Twórcą projektu STRATEGMED Tregs:

- *Profesorowi Piotrowi Trzonkowskiemu za umożliwienie wzięcia udziału w tak wspaniałym projekcie, za nieocenioną pomoc i wielkie wsparcie.*
- *Dr hab. Natalii Marek-Trzonkowskiej za chęć współpracy, za naukę, cierpliwość, poświęcony czas i życzliwość, oraz wyrozumiałość przy pojawiających się problemach.*

Kierownikowi Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej:

- *Pani dr Grażynie Moszkowskiej, za umożliwienie rozwoju zawodowego w tym podjęcia się napisania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

Pracownikom Katedry i Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

- *Ordynatorowi Kliniki: Pani Profesor Małgorzacie Myśliwiec, za umożliwienie współpracy.*
- *Dr Ilonie Techmańskiej, za miłą współpracę zapewniającą ciągłość wykonywanych badań.*
- *Pani Lucynie Szumacher-Sharma za poświęcenie przy pobieraniu materiału od pacjentów i okazaną życzliwość.*

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii, w szczególności Dr Annie Wardowskiej i Pani mgr Anicie Dobyszek za okazywane wsparcie i pomoc w trudach codziennej pracy.

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej za stworzenie przyjaznej atmosfery oraz wszechstronną pomoc w trakcie wykonywania badań. W szczególności Maciejowi Zielińskiemu za pomoc przy pojawiających się problemach.