

tkáně. To má za následek rozvoj autoimunitních tyreoiditid, projevujících se jako autoimunitní zánět štítné žlázy. Rozlišuje se několik typů tohoto onemocnění (1). U Hashimotovy tyreoiditidy jsou ve tkáni štítné žlázy přítomny především Th1 lymfocyty (5).

Th2 lymfocyty produkují IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13. Podporují protilátkovou imunitní odpověď, stimulují žírné buňky, eosinofily a bazofily. Podporují produkci všech tříd imunoglobulinů včetně IgE a potlačují buněčnou imunitu (6, 7, 11). Ovlivňují produkci paměťových protilátek aktivovanými B lymfocyty, které mohou navodit stimulaci nebo inhibici cílového funkčního receptoru. Protilátky proti TSH receptoru (TRAK) jsou stimulační nebo blokuji – při stimulaci receptoru dochází k rozvoji GB tyreotoxikózy, při jeho inhibici k atrofické tyreoiditidě. U GB tyreotoxikózy dochází k nadměrné tvorbě protilátek, které po vazbě na TSH receptor podněcují štítnou žlázu k růstu a vyšší produkci hormonů. U tohoto onemocnění také často nacházíme endokrinní orbitopatii. Lymfocytární infiltrace tyreoidy u GB tyreotoxikózy je tvořena převážně Th2 lymfocyty.

Th1 a Th2 lymfocyty působí jako **protihráči**, regulují se navzájem a jejich vybalancovaný poměr je znakem dobré imunologické funkce (3). Cytokiny Th1 a Th2 lymfocytů podporují růst vlastních buněk a tlumí růst a diferenciaci opačné subpopulace. Převaha Th1 aktivity se uplatňuje u zánětů a některých autoimunitních onemocnění, převaha Th2 aktivity u alergií a nádorových stavů (4, 5, 10).

Diferenciace Th0 buněk je závislá na jejich bezprostředním okolí, což lze využít i v léčbě. DHEA (dehydroepiandrosteron) podporuje Th1 diferenciaci a tudíž buněčnou imunitu. Kortizol a kortikoidy (obecně imunosuprese s dominantním využitím kortikoidů a v poslední dekádě i biologik, např. rituximab), používané např. při léčbě orbitopatie, podporují Th2 lymfocyty a tedy protilátkovou odpověď. Protilátky při Th2 reakci mají často ochranný charakter proti cytotoxicitě. Při změně na Th1 reakci (cytotoxickou) často dochází ke zhoršení zdravotního stavu pacienta.

Diferenciace **Th17 lymfocytů** je ovlivněna přítomností TGF- β (TGF – transformující růstový faktor, transforming growth factor), IL-6 a IL-21. IL-6 je produkován dendritickými buňkami stimulovanými mikrobiálními agens, IL-21 zesiluje odpověď Th17 lymfocytů a aktivuje NK buňky. Pro udržení a funkci buněk Th17 je důležitý IL-23, který je produkován aktivovanými makrofágy a dendritickými buňkami (3, 7, 10). Th17 lymfocyty jsou prozánětlivé, tvoří cytokiny IL-17, IL-21, IL-22, IL-6 a TNF- α . Ovlivňují migraci neutrofilů a makrofágů do místa zánětu, expanzi myeloidních, dendritických i T buněk, tvorbu antimikrobiálních peptidů, zvyšují zapojení dalších Th17 buněk do zánětlivého procesu a hrají roli ve slizniční bariéře (6, 10). Stimulují B lymfocyty k produkci protilátek (IgG, IgA, IgM, ale ne IgE). Cytokin IL-17 zesiluje expresi chemokínů a prozánětlivých faktorů, podporuje proliferaci, maturaci a migraci neutrofilů a monocytů do místa zánětu, působí kostimulačně na T lymfocyty a zesiluje maturaci dendritických buněk (5, 7). Jeho produkce byla prokázána u autoimunitních chorob, které mají spíše chronický nebo rekurentní průběh, z AIT zejména u dle Volpého Hashimotovy tyreoiditidy (1, 3, 5–7, 10).

Treg lymfocyty udržují imunologickou toleranci tím, že blokují efektorové Th1 lymfocyty a tím destrukci tkání Tc lymfocyty, tlumí

aktivaci B lymfocytů, produkci protilátek a funkci APC buněk. Porucha v jejich počtu nebo funkci vede k rozvoji autoimunitních chorob (5, 8, 10, 11). Treg lymfocyty tlumí aktivitu Th17 lymfocytů, proto je důležité sledovat index Th17/Treg. Při jeho zvýšení se rozvíjejí autoimunitní choroby (3, 6). Zvýšený počet Th17 lymfocytů může hrát roli u Hashimotovy tyreoiditidy, snížený počet Treg lymfocytů u GB tyreotoxikózy (12).

Materiál a metodika

Pro stanovení Th lymfocytů jsme použili průtokový cytometr Navios se 3 lasery. Použili jsme plnou krev, odebranou do zkumavky s heparinátem sodným (zelený uzávěr). Pro stimulaci produkce cytokinů byly použity zkumavky DurActive 1 (C11101). Pro zpracování buněk jsme použili PerFix nc kit (B31167). Pro stanovení CD znaků a cytokinů byly použity značené protilátky CD4-APC-Alexa Fluor 750 (A94682) pro všechny Th lymfocyty, anti-IFN- γ -FITC (IM2716U) pro Th1, anti-IL-4-PE (IM2719U) pro Th2 a anti-IL-17A-Pacific Blue (B76266) pro Th17 lymfocyty.

Měřili jsme i další parametry buněčné imunity: Celkové T lymfocyty (CD3+), pomocné Th lymfocyty (CD3+CD4+), cytotoxické Tc lymfocyty (CD3+CD8+), dvojité negativní T lymfocyty (CD3+CD4-CD8-), regulační Treg lymfocyty (CD4+CD25+CD127dim/-), paměťové Th lymfocyty (CD4+CD45RO+), naivní Th lymfocyty (CD4+CD45RA+), B lymfocyty (CD3-CD19+) a NK buňky (CD3-CD16+CD56+). Byly vypočteny indexy IRI (CD4+/CD8+), Th1/Th2 a Th17/Treg. Pro stanovení celkových T, Th, Tc, dvojité neg. T, B lymfocytů a NK buněk byly použity protilátky CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (6607073), CD8-PC7 (737661), CD16-PE (A07766) a CD4-APC-Alexa Fluor 750 (A94682). Pro stanovení paměťových a naivních Th lymfocytů byly použity protilátky CD45RO-PE (A07787), CD45RA-ECD (B49193) a CD4-APC-Alexa Fluor 750 (A94682). Pro Treg lymfocyty jsme použili protilátky CD25-PC5 (IM2646), CD127-PE (B49220) a CD4-APC-Alexa Fluor 750 (A94682).

Cytometr jsme kalibrovali pomocí Flow-Check Pro Fluorospheres (A63493). Jako kontrolní materiál byly použity IMMUNO-TROL Cells (6607077) a pro lýzu erytrocytů VersaLyse Lysing Solution (A09777). Ke zpracování dat byl využit program Navios Software.Ink. Analýzátor i reagentie byly dodány výrobcem Beckman Coulter Inc.

Sledovali jsme sérové hladiny TSH, FT3, FT4 (ECLIA, Roche s. r. o., Cobas 6000), protilátek proti TG a TPO (ELISA, Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG, Immunomat Base), potvrzující diagnózu AT.

Statistické zpracování

Soubor tvořilo 136 pacientů s AT (dg E063), 24 mužů (průměrný věk $41,0 \pm 16,8$ let) a 112 žen (průměrný věk $44,6 \pm 17,6$ let). Šlo o pacienty, u kterých došlo k plnému rozvoji AT a jejího klinického stavu (potvrzené laboratorně a sonograficky). Tito pacienti byli substitučně léčeni. Počáteční fázi onemocnění jsme neměli k dispozici, jelikož jsme následně pracovali, kam jsou odesíláni pacienti již s probíhající terapií a stanovenou diagnózou. Kontrolní soubor tvořilo 17 zdravých mužů (průměrný věk $44,0 \pm 5,0$ let). Box-Coxova transformace dat, t-testy a Pearsonova korelační analýza byly provedeny pomocí programu Statgraphics (Manugistics, USA).