

Th1, Th2 a Th17 lymfocyty u autoimunitních tyreopatií

Karolína Absolonová, Petr Matucha, Ivan Šterzl

Endokrinologický ústav, Oddělení klinické imunoendokrinologie, Praha

Mezi nejčastější orgánově specifická autoimunitní onemocnění patří autoimunitní tyreopatie. Zaměřili jsme se na význam stanovení Th1, Th2 a Th17 lymfocytů u autoimunitních tyreoiditid (AT). Soubor tvořilo 136 léčených pacientů v plném klinickém rozvoji AT (24 mužů, prům. věk $41,0 \pm 16,8$ let a 112 žen, prům. věk $44,6 \pm 17,6$ let). Kontrolní soubor tvořilo 17 zdravých mužů (prům. věk $44,0 \pm 5,0$ let). Ke statistickým výpočtům jsme použili Box-Coxovu transformaci dat, t-testy a Pearsonovu korelační analýzu. Subpopulace lymfocytů jsme stanovili průtokovou cytometrií. Zjistili jsme statisticky významné korelace mezi Th a Tc lymfocyty ($r = -0,5605$, $p = 0,0000$), celkovými T a B lymfocyty ($r = -0,4877$, $p = 0,0000$), Th1 a Th17 lymfocyty ($r = 0,4346$, $p = 0,0000$), Tc a Th1 lymfocyty ($r = 0,4124$, $p = 0,0000$), IRI a Th1 lymfocyty ($r = -0,4076$, $p = 0,0000$), celk. T lymfocyty a NK buňkami ($r = -0,8175$, $p = 0,0000$), paměťovými Th a Th1 lymfocyty ($r = 0,7982$, $p = 0,0000$), naivními Th a Th1 lymfocyty ($r = -0,7995$, $p = 0,0000$), Tc lymfocyty a NK buňkami ($r = -0,4014$, $p = 0,0000$), Tc a celk. T lymfocyty ($r = 0,4551$, $p = 0,0000$), Th a celk. T lymfocyty ($r = 0,4135$, $p = 0,0000$). Stanovení subpopulací lymfocytů je pomůckou při diagnostice a léčbě autoimunitních chorob, pomáhá objasnit klinické projevy onemocnění a může doplnit interpretaci běžně stanovovaných autoprotilátek. Může pomoci určit, zda jde o fázi destruktivní (Th1, Th17, Tc lymfocyty), nebo protektivní (Th2 lymfocyty, protilátky).

Klíčová slova: autoimunitní tyreopatie, cytometrie průtoková, pomocné T lymfocyty.

Th1, Th2 and Th17 lymphocytes in autoimmune thyreopathies

Among the most common organ-specific autoimmune diseases are autoimmune thyreopathies. We have focused on the importance of Th1, Th2 and Th17 lymphocytes in autoimmune thyroiditis (AT). The cohort consisted of 136 treated patients in the full clinical course of AT (24 men, mean age 41.0 ± 16.8 years and 112 women, mean age 44.6 ± 17.6 years). The control group consisted of 17 healthy men (mean age 44.0 ± 5.0 years). Box-Cox transformation of the data, t-tests and Pearson correlation analysis were used for statistical calculations. Lymphocyte subpopulations were determined by flow cytometry. We found statistically significant correlations between Th and Tc lymphocytes ($r = -0.5605$, $p = 0.0000$), total T and B lymphocytes ($r = -0.4877$, $p = 0.0000$), Th1 and Th17 lymphocytes ($r = 0.4346$, $p = 0.0000$), Tc and Th1 lymphocytes ($r = 0.4124$, $p = 0.0000$), IRI and Th1 lymphocytes ($r = -0.4076$, $p = 0.0000$), total T lymphocytes and NK cells ($r = -0.8175$, $p = 0.0000$), memory Th and Th1 lymphocytes ($r = 0.7982$, $p = 0.0000$), naive Th and Th1 lymphocytes ($r = -0.7995$, $p = 0.0000$), Tc lymphocytes and NK cells ($r = -0.4014$, $p = 0.0000$), Tc and total T lymphocytes ($r = 0.4551$, $p = 0.0000$), Th and total T lymphocytes ($r = 0.4135$, $p = 0.0000$). The determination of lymphocyte subpopulations is an aid in the diagnosis and treatment of autoimmune diseases, helps to clarify the clinical manifestations of the disease and can complement the interpretation of commonly determined autoantibodies. It can help determine whether the phase is destructive (Th1, Th17, Tc lymphocytes) or protective (Th2 lymphocytes, antibodies).

Key words: autoimmune thyroidopathy, flow cytometry, helper T lymphocytes.

Úvod

Autoimunitní tyreopatie (AIT) jsou časté, postihují asi 5 % populace, u žen po menopauze až 20 %. Patří sem autoimunitní tyreoidi-

tida (AT) a Graves-Basedowova (GB) tyreotoxikóza. AT se dále dělí na Hashimotovu, juvenilní, poporodní, silentní, atrofickou, fibrózní, Riedlovu a léky indukovanou tyreoiditidu – po léčbě cytokiny IFN- γ (interferon

gamma) a IL-2 (interleukin 2) (1). Vývoj autoimunitních endokrinopatií ovlivňuje zejména genetická predispozice. Mezi epigenetické faktory patří poruchy regulace v mikroprostředí cílového orgánu (stav hladin cytokinů produkovaných Th1 a Th2 lymfocyty), virové, bakteriální a parazitární infekce, těžké kovy, farmaka (inhibitory tyrosinkinázy, některé imunologické léky – biolog. léčba), vakcíny, vysoký příjem jódu a deficit vitamínu D (2, 3).

K autoimunitnímu poškození endokrinních buněk dochází postupně, zároveň se organismus snaží udržet homeostázu. Průběh nemoci je pozvolný, dlouho inaparentně, kde dochází k pozvolné destrukci štítné žlázy, vývojem hypotyreózy a nodulací. Vzácně začíná tlakem na krku s přechodnou hyperfunkcí štítné žlázy (hashitoxikóza, silentní tyreoiditis). V této době můžeme proces autoimunity detekovat pouze laboratorně, a to především detekcí autoprotilátek, které se mohou vyskytovat i několik let před klinickou manifestací onemocnění. Autoprotilátky se mohou tvořit proti třem typům antigenů. Jsou to povrchové receptory molekul (např. receptor tyreotropního hormonu TSH – thyroid stimulating hormone), intracelulární enzymy (např. tyreoidální peroxidáza – TPO) a sekreční produkty (např. tyreoglobulin – TG). Autoprotilátky byly dříve mylně interpretovány jako laboratorní autoimunitní syndrom a přes rozvoj subklinických příznaků nebyli pacienti v tomto stadiu léčeni; ukazují se, že u časného rozvoje autoimunitního procesu je vhodné nasadit tzv. izohormonální terapii (2). Autoprotilátky mají patognomický význam, který spočívá v detekci uvolněného antigenu z destruovaných cílových buněk endokrinního orgánu buňkami zprostředkovanou

imunitní reakcí (např. anti-TPO, anti-TG). Pouze autoprotilátky proti TSH receptoru (TRAK) mají patogenetický význam při rozvoji GB tyreotoxikózy. Ta se může rozvinout tvorbou stimulačních protilátek proti TSH receptoru. Plně rozvinuté onemocnění, kdy nastává destrukce více než 90 % funkčních endokrinních buněk, je již stav nevratný a pacienta je možné již jen substituovat chybějícími hormony. Proto je nutná včasná laboratorní diagnostika (2).

U některých AIT může být hladina autoprotilátek i přechodně negativní, kde diagnóza spočívá především v sonografickém vyšetření potvrzujícím destruktivní autoimunitní složku. Dochází k tomu v případě převahy aktivace Th1 a suprese Th2 lymfocytů (Th – T helper lymphocyte, pomocný T lymfocyt) vlivem inhibice příslušnými cytokiny nebo při vymizení antigenu.

Autoimunitní endokrinopatie jsou často doprovázeny výskytem i dalších orgánově specifických autoprotilátek. U AIT je častá pozitivita protilátek proti cílovým antigenům dalších orgánů, charakterizující autoimunitní polyglandulární syndrom (APS I.-III. typ, tab. 1 a 2). U AT je častý výskyt autoprotilátek proti steroidy produkujícím buňkám – proti nadledvinám a ovariím (2).

Efektorové Th lymfocyty se vyvíjejí z antigenem neaktivovaných naivních Th0 buněk (4). Ty se aktivují po vazbě svého T-buněčného receptoru (TCR – T-cell receptor) na komplex antigen-MHC II. třídy (MHC – major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex) a svého receptoru CD28 (CD – cluster of differentiation) na molekulu CD80 nebo CD86 na povrchu antigen prezentující buňky (APC – antigen-presenting cell). Antigenem aktivované Th0 lymfocyty se diferencují vlivem okolního prostředí do subpopulací efektorových buněk – Th1, Th2, Th17 a T regulačních buněk (Treg) (5, 6). Na diferenciaci Th0 buněk mají vliv také cytokiny produkované APC buňkami i samotnými Th lymfocyty. Th lymfocyty se mohou zpětně měnit v jiné typy Th buněk vlivem různých cytokinů, např. v podmínkách zánětu (6).

Th1 lymfocyty jsou prozánětlivé, produkují cytokiny IL-2, IFN- γ , TNF- α (tumor necrosis factor α , faktor nádorové nekrozy α). Jejich cytokiny spouští prozánětlivou imunitní odpověď a zvyšují proliferaci a cytotoxickou aktivitu NK buněk (NK – natural killer cells, přirození zabíječi) (7–10). Th1 lymfocyty stimulují buněčnou imunitu (přeměna makrofágů na aktivované makrofágy, aktivace cytotoxických Tc lymfocytů a NK buněk), která může vést k autoimunitní destrukci cílové

Tab. 1. APS III. typu

Poškozená tkáň	Cílový antigen	Zúčastněné Th lymfocyty	Imunitní proces	Autoimunitní onemocnění
Folikulární buňky štítné žlázy	TPO, TG, NIS (natrium iodide symporter)	Th1	Cytotoxické působení imunitních buněk	Autoimunitní tyreoiditida
TSH receptor	TSH receptor	Th2	Autoprotilátky	Stimulace receptoru – GB tyreotoxikóza Inhibice receptoru – Atrofická tyreoiditida

Tab. 2. Klasifikace APS III, upraveno podle (20)

Autoimunitní tyreoidální choroby			
Hashimotova tyreoiditida, idiopatický myxedém, asymptomatická tyreoiditida, endokrinní exoftalmus, Graves-Basedowova choroba			
+			
3A Endokrinní onemocnění	3B Gastrointestinální aparát	3C Kůže–hemopoietický–nervový systém	3D Onemocnění pojivové tkáně – vaskulitida
Diabetes mellitus I. typu Hirátův syndrom	Atrofická gastritida Perniciózní anémie Celiakie	Vitiligo Alopecie	SLE, Diskoidní lupus erythematosus MCTD (Smíšené onemocnění pojivové tkáně) RA (revmatoidní artritida) Systémová skleróza Sjögrenův syndrom
	Chronické zánětlivé onemocnění střev	Autoimunitní hemolytická anémie Autoimunitní trombocytopenie Anti-fosfolipidový syndrom	
Předčasné ovariální selhání Lymfocytická neurohypofyzitida	Autoimunitní hepatitida Primární biliární cirhóza Sklerozující cholangitida	Myasthenia gravis Roztroušená skleróza Stiff-man syndrom	Systémová vaskulitida

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 chemokinů 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).

Výsledky

Zaznamenali jsme množství statisticky významných korelací, které zde ale neuvádíme, protože byly velmi slabé až slabé, kdy $|r| < 0,4000$. Uvádíme pouze korelace středně až velmi silné, kde $|r| \geq 0,4000$ (13).

V souboru pacientů s E063 jsme zjistili tyto statisticky významné korelace:

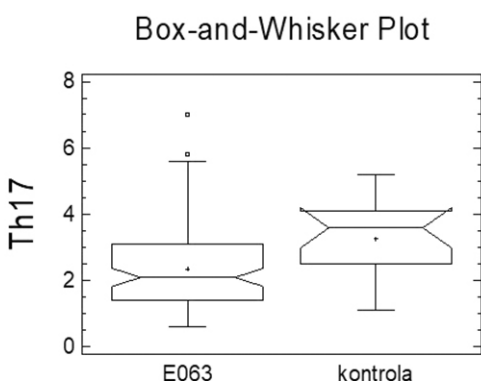
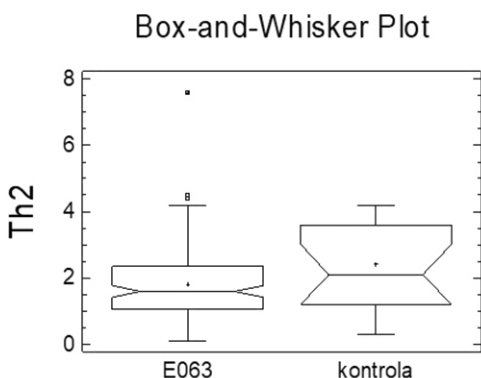
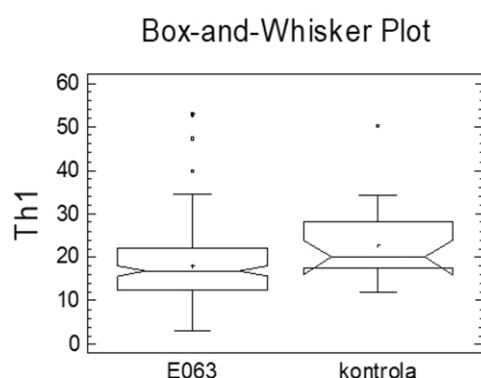
Mezi Th a Tc lymfocyty ($r = -0,5605$, $p = 0,0000$), celk. T a B lymfocyty ($r = -0,4877$, $p = 0,0000$), Th1 a Th17 lymfocyty ($r = 0,4346$, $p = 0,0000$), Tc a Th1 lymfocyty ($r = 0,4124$, $p = 0,0000$), IRI a Th1 lymfocyty ($r = -0,4076$, $p = 0,0000$), celk. T lymfocyty a NK buňkami ($r = -0,8175$, $p = 0,0000$), pamět. Th a Th1 lymfocyty ($r = 0,7982$, $p = 0,0000$), naiv. Th a Th1 lym-

focyty ($r = -0,7995$, $p = 0,0000$), Tc lymfocyty a NK buňkami ($r = -0,4014$, $p = 0,0000$), Tc a celk. T lymfocyty ($r = 0,4551$, $p = 0,0000$), Th a celk. T lymfocyty ($r = 0,4135$, $p = 0,0000$). Mezi subpopulacemi lymfocytů a hodnotami TSH, FT3, FT4, anti-TG a anti-TPO jsme našli jen slabé statisticky významné korelace ($|r| < 0,4000$). Korelace zjištěné u jednotlivých pohlaví zde s ohledem na rozsah textu neuvádíme, protože ref. meze lymfocytů se obvykle uvádějí bez rozlišení pohlaví.

Statisticky významný rozdíl mezi kontrolním souborem a souborem pacientů s E063 jsme našli u Th1 ($p = 0,0270$), Th2 ($p = 0,0309$) a Th17 lymfocytů ($p = 0,0070$) (Obr. 1).

U kontrolního souboru jsme zjistili tyto statisticky významné korelace: Mezi Th lymfocyty a NK buňkami ($r = -0,5936$, $p = 0,0120$), mezi Th lymfocyty a FT3 ($r = -0,5218$, $p = 0,0317$), mezi Tc a B lymfocyty ($r = -0,7059$, $p = 0,0015$), mezi Tc lymfocyty a FT3 ($r = 0,4880$, $p = 0,0469$), mezi Tc a celk. T lymfocyty ($r = 0,6008$, $p = 0,0108$), mezi Th a celk. T lymfocyty ($r = 0,5115$, $p = 0,0358$), mezi celk. T lymfocyty a NK buňkami ($r = -0,7260$, $p = 0,0010$), mezi IRI a B lymfocyty ($r = 0,6968$, $p = 0,0019$), mezi B lymfocyty a FT4 ($r = -0,6724$, $p = 0,0031$), mezi dvojité neg. T lymfocyty a Treg ($r = -0,4949$, $p = 0,0434$), mezi IRI a FT3 ($r = -0,5489$, $p = 0,0225$), mezi Th1 a Treg lymfocyty ($r = 0,5798$, $p = 0,0147$) a mezi Treg lymfocyty a anti-TPO ($r = 0,4955$, $p = 0,0431$), mezi naiv. Th a Th1 lymfocyty ($r = -0,7614$, $p = 0,0004$), mezi pamět. Th a Th1 lymfocyty ($r = 0,7612$, $p = 0,0004$).

Obr. 1. Rozdíl mezi souborem s dg E063 a kontrolním souborem



Diskuze

Mezi Th1 a Th17 lymfocyty jsme našli pozitivní korelaci. Je to v rozporu s literaturou, která uvádí, že cytokin Th1 lymfocytů IFN- γ inhibuje diferenciaci Th17 lymfocytů (10).

Tab. 3. Referenční meze pro Th1, Th2 a Th17 lymfocyty v plné krvi od 19 let věku, upraveno podle (15)

Subpopulace Th lymfocytů	Referenční meze	Jednotka
Th1 lymfocyty	6,66–8,01	%
Th2 lymfocyty	4,86–5,98	%
Th17 lymfocyty	9,50–11,47	%

Tab. 4. Referenční meze pro Th1 a Th2 lymfocyty v plné krvi u japonských dospělých, upraveno podle (16)

Subpopulace Th lymfocytů	Referenční meze	Jednotka
Th1 lymfocyty	13,1–29,5	% CD4+
Th1 lymfocyty	26–53	% CD3+
Th2 lymfocyty	1,6–3,8	% CD4+
Th2 lymfocyty	0,9–2,5	% CD3+

Tab. 5. Referenční meze pro Th1, Th2 a Th17 lymfocyty u čínských dospělých, upraveno podle (17)

Subpopulace Th lymfocytů	Referenční meze	Jednotka
Th1 lymfocyty	0,43–39,62	% CD4+
Th2 lymfocyty	0,27–3,57	% CD4+
Th17 lymfocyty	0,22–2,62	% CD4+

Mezi Th1 lymfocyty a NK buňkami jsme statisticky významnou korelaci nenalezli, ačkoli literatura uvádí, že Th1 lymfocyty zvyšují působením svých cytokinů proliferaci NK buněk (9).

V našem souboru pacientů jsme nenalezli ani statisticky významnou korelaci mezi Th17 lymfocyty a NK buňkami. V literatuře se však uvádí, že IL-21 produkovaný Th17 lymfocyty aktivuje NK buňky (7, 10).

Nenalezli jsme statisticky významnou korelaci mezi buňkami Th17 a Treg. Tuto korelaci jsme očekávali, jelikož dle literatury by měly Treg lymfocyty tlumit aktivitu Th17 lymfocytů a zvýšený poměr Th17/Treg má význam při rozvoji autoimunitních onemocnění (3, 6). Možným vysvětlením může být, že některé Treg buňky jsou schopny produkovat IL-17 (3). Rovněž existují buňky Th1/17, které produkují IFN- γ a IL-17. Ty mohou svou produkci cytokinů zkreslit výsledky měření, i když se jejich výskyt uvádí jako nízký (<1 % z Th lymfocytů) (3, 5). Jinde bylo zjištěno, že Treg lymfocyty byly u pacientů s AIT sniženy, zatímco Th17 zůstaly stejné jako u zdravých jedinců (14). Rozdíly mezi výsledky studií mohou být také ovlivněny odlišným genetickým pozadím probandů nebo různým uspořádáním testů (3).

Očekávali jsme pozitivní korelaci mezi Th2 lymfocyty a indexem Th17/Treg, kterou jsme sice našli, ale nebyla dostatečně silná ($r = 0,3373$). Pouze u mužů s dg E063 měla tato korelace $r = 0,5336$. Literatura říká, že IL-6 produkovaný Th2 lymfocyty zvyšuje index Th17/Treg, podporuje diferenciaci Th17 a tlumí vznik Treg (7, 10). Korelace mezi Th2 a Treg nebyla v našem souboru statisticky významná.

Mezi Th2 a B lymfocyty jsme nenalezli statisticky významnou korelaci, ačkoli mezi nimi existuje funkční vztah, kdy Th2 lymfocyty podporují funkci B lymfocytů. Tuto korelaci jsme proto očekávali.

Th1 lymfocyty stimulují buněčnou imunitu včetně Tc lymfocytů. Tento předpoklad se potvrdil, našli jsme mezi nimi pozitivní korelaci. V kontrolním souboru a u mužů s dg E063 tato korelace nebyla statisticky významná. Může zde tedy být i vliv pohlaví.

Zajímavé je, že ačkoli Th1 lymfocyty mají zvyšovat aktivitu NK buněk a zároveň Tc lymfocytů, v našem souboru jsme našli negativní korelaci mezi Tc lymfocyty a NK buňkami. Zde se zřejmě také projevil vliv pohlaví, jelikož v kontrolním souboru a u mužů s dg E063 nebyla tato korelace statisticky významná.

Určitým problémem při klinickém využití Th1, Th2 a Th17 lymfocytů může být nedostatek údajů o jejich referenčních mezích v literatuře. Laboratoře používají různé buněčné znaky ke stanovení subpopulací lymfocytů, takže nelze ref. meze mnohdy zcela převzít. Jeden z návrhů podali Italové (15) (Tab. 3), kteří použili povrchové CD znaky buněk. My jsme použili intracelulární značení cytokinů (IFN- γ , IL-4, IL-17A) spolu s povrchovým značením buněk (CD4). Japonští a čínští autoři (16, 17) použili obdobné značení buněk jako my (Tab. 4, 5). Každá laboratoř musí při přebírání ref. mezí hledět na to, na základě jakých znaků byly jednotlivé subpopulace stanoveny. I přes tyto obtíže si myslíme, že stanovení Th1, Th2 a Th17 lymfocytů může přinést užitečnou informaci o možné převaze cytotoxické nebo protilátkové reakce.

Je důležité brát v úvahu i další aspekty. Absolutní počty a/nebo procentuální zastoupení Th lymfocytů se mohou lišit podle pohlaví, kouření, těhotenství nebo menstruačního cyklu (MC). U žen je počet

i procento Th buněk vyšší než u mužů, stejně tak u kuřáků oproti nekuřákům. Menstruující ženy mají vyšší procento Th než nemenstruující, v proliferaci fázi MC je vyšší procento Th než ve fázi sekreční. Období ovulace odlišnosti nevykazuje. Změny v MC se týkají pouze procenta buněk, nikoliv absolutních počtů. Užívání antikoncepce odlišnosti nevykazuje (18). Odlišnosti mezi pohlavími byly nalezeny i u NK buněk a celkových T lymfocytů (19). Nadváha se projevuje u absolutního počtu celk. T, Th a B lymfocytů. Kouření má vliv na téměř všechny parametry lymfocytů. Sportující jedinci se od nesportujících neliší (19). Protože odborná literatura obvykle uvádí referenční meze lymfocytů bez rozlišení pohlaví, použili jsme pro naše výpočty soubor pacientů s dg E063 jako celek. Mezi pohlavími jsme našli rozdíl pouze v celkových T lymfocytech ($p = 0,0139$), B lymfocytech ($p = 0,0462$), dvojité negativní T lymfocytech ($p = 0,0055$), TSH ($p = 0,0459$) a FT3 ($p = 0,0000$). Kouření, těhotenství a MC nebylo u našeho souboru k dispozici. Významným prvkem variability výsledků je podle některých autorů také značka průtokového cytometru, množství vzorku, postup přípravy vzorku a protilátky různých výrobců (19).

Stanovení subpopulací Th lymfocytů je vhodným předmětem dalšího zkoumání, včetně zjištění a zhodnocení vlivu věku a pohlaví na vztah Th lymfocytů k dalším laboratorním parametrům u pacientů s AIT.

Závěr

Stanovení subpopulací lymfocytů může být významnou pomůckou při diagnostice a léčbě autoimunitních chorob, způsobených buněčnou cytotoxicitou. Diagnóza závisí na kombinaci a převaze jednotlivých imunokompetentních buněk, které se při rozvoji autoimunity uplatňují. Ty mohou charakterizovat i odlišnosti stejné diagnózy u mladého a staršího jedince.

Pokusili jsme se zjistit, zda analýza Th1, Th2 a Th17 lymfocytů zlepšuje možnosti diagnostiky u autoimunitních tyreoidit. Zastoupení subpopulací Th lymfocytů můžeme stanovit pomocí průtokové cytometrie. Tato informace nám pomůže objasnit klinické projevy a imunopatologické mechanismy, u kterých se mohou uplatnit Th, případně Tc lymfocyty. Tato metodika by se mohla stát doplněním stanovení B a T lymfocytů a může představovat zlepšení interpretace autoprotilátek anti-TG a anti-TPO. V případě, že se výsledek některé ze subpopulací Th lymfocytů dostane mimo své ref. meze, může nám to pomoci odhadnout, zda jde o fázi destruktivní (Th1, Th17, Tc lymfocyty), nebo protektivní (Th2 lymfocyty, protilátky). Předpokládáme, že při převaze Th1 a Th17 lymfocytů dochází ke zhoršení stavu pacienta, naopak při převaze Th2 a Treg lymfocytů můžeme očekávat zlepšení nebo zpomalení rozvoje destrukce cílových buněk (tyreocytů). Interpretace fenotypizace lymfocytů je u každého pacienta individuální, s přihlédnutím k dalším laboratorním parametrům a klinickému stavu.

Stanovení subpopulací Th lymfocytů může přinést detailnější vhled do průběhu onemocnění zejména u pacientů v prvotních fázích choroby. Může být užitečné také u mladých jedinců, kde lze zasáhnout izohormonální terapií. U plně rozvinutého onemocnění, kde je léčba již jen substituční, nemá při běžné udržovací terapii velký význam.

Podpořeno MZ ČR - RVO (Endokrinnologický ústav – EÚ, 00023761)

LITERATURA

1. Volpé R. The immunology of human autoimmune thyroid disease. In: Volpé R (ed). Autoimmune endocrinopathies. Contemporary Endocrinology, vol 15. Humana Press: Totowa, NJ 1999: 217–244. ISBN 978-1-4757-4572-6.
2. Hrdá P, Šterzl I. Autoimunitní endokrinopatie. Med. Pro Praxi 2008; 5(5): 196–199.
3. Li Q, Wang B, Mu K et al. The pathogenesis of thyroid autoimmune diseases: New T lymphocytes – Cytokines circuits beyond the Th1-Th2 paradigm. J Cell Physiol. 2019 Mar; 234(3): 2204–2216.
4. Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y et al. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. J Leukoc Biol. 2000 Oct; 68(4): 568–574.
5. Nanba T, Watanabe M, Inoue N et al. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. Thyroid. 2009 May; 19(5): 495–501.
6. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. Int J Mol Sci. 2018 Mar 3; 19(3): 730.
7. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T_H-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. Nat Immunol. 2007 Apr; 8(4): 345–350.
8. Ursaciuc C, Surcel M, Ciotaru D et al. Regulatory T cells and TH1/TH2 cytokines as immunodiagnosis keys in systemic autoimmune diseases. Roum Arch Microbiol Immunol. Apr-Jun 2010; 69(2): 79–84.
9. Neuschlová M, Nováková E, Kompaníková J. Imunológia – ako pracuje imunitný systém. KO&KA spol. s. r. o.: Bratislava 2017. ISBN 978-80-8187-031-6.
10. Svobodová M, Štourač P. Role specifické buněčné imunity v patogenезi roztroušené sklerózy se zaměřením na Th17 a Treg lymfocyty. Cesk Slov Neurol N 2017; 80/113(2): 173–179.
11. Kutukculer N, Azarsiz E, Aksu G et al. CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells, Th1 (CCR5, IL-2, IFN-γ) and Th2 (CCR4, IL-4, IL-13) type chemokine receptors and intracellular cytokines in children with common variable immunodeficiency. Int J Immunopathol Pharmacol. 2016 Jun; 29(2): 241–251.
12. Li C, Yuan J, Zhu YF et al. Imbalance of Th17/Treg in Different Subtypes of Autoimmune Thyroid Diseases. Cell Physiol Biochem. 2016; 40(1–2): 245–252.
13. Evans JD. Straightforward statistics for the behavioral sciences. Thomson Brooks/Cole Publishing Co: Pacific Grove (CA, USA) 1996. ISBN 10 0534231004.
14. Zhou J, Bi M, Fan C et al. Regulatory T cells but not T helper 17 cells are modulated in an animal model of Graves' hyperthyroidism. Clin Exp Med. 2012 Mar; 12(1): 39–46.
15. Sorrenti V, Marenda B, Fortinguerra S et al. Reference Values for a Panel of Cytokinergic and Regulatory Lymphocyte Subpopulations. Immune Netw. 2016 Dec; 16(6): 344–357.
16. Tanaka K, Kemmotsu K, Ogawa K et al. Flow cytometric analysis of helper T cell subsets (Th1 and Th2) in healthy adults. Rinsho Byori. 1998 Dec; 46(12): 1247–1251.
17. Niu HQ, Zhao XC, Li W et al. Characteristics and reference ranges of CD4+T cell subpopulations among healthy adult Han Chinese in Shanxi Province, North China. BMC Immunol. 2020 Aug 3; 21(1): 44.
18. Maini MK, Gilson RJ, Chavda N et al. Reference ranges and sources of variability of CD4 counts in HIV-seronegative women and men. Genitourin Med. 1996 Feb; 72(1): 27–31.
19. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A et al. An Italian national multicenter study for the definition of a reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. Haematologica. 1999 Jun; 84(6): 499–504.
20. Betterle C, Dalpra C, Greggio N et al. Autoimmunity in isolated Addison's disease and in polyglandular autoimmune diseases type 1, 2 and 4. Ann Endocrinol (Paris). 2001 Apr; 62(2): 193–201.