

Optimalizace metodického repertoáru určeného pro
laboratorní diagnostiku autoimunitních onemocnění
štítné žlázy

Doktorská disertační práce

MUDr. Dimitar Hadži Nikolov

*Optimalizace metodického repertoáru určeného pro laboratorní
diagnostiku autoimunitních onemocnění štítné žlázy*

MUDr. Hadži Nikolov Dimitar

Fingerlandův ústav patologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta
v Hradci Králové

Obor: Patologie a soudní lékařství

MUDr. Hadži Nikolov Dimitar
Fingerlandův ústav patologie
Fakultní nemocnice
500 05 Hradec Králové

tel: 495832737

fax. 495832004

e-mail: hadzidim@fnhk.cz

Hradec Králové, 2006

Obsah

1. Předmluva	5
2. Úvod	8
2.1. Současný stav vědomostí	8
2.2. Základní imunologické poznatky	9
2.2.1. Lymfatické orgány a tkáně (primární i sekundární)	15
2.2.2. Struktura a funkce imunoglobulinů	17
2.2.3. Imunoglobulinové třídy a podtřídy	20
2.2.4. Biologie T lymfocytů	23
2.2.5. Rozpoznávání antigenu T buňkami	23
2.2.6. Funkce a podtypy T lymfocytů	24
2.2.7. Efektorové T lymfocyty	25
2.2.8. Regulátorové T buňky	25
2.2.9. Aktivace T buněk	26
2.2.10. Aktivační signály pro T buňky	26
2.2.11. Nеспецифická aktivace T buněk	26
2.2.12. Biologie B lymfocytů	27
2.2.13. Aktivace B buněk	28
2.2.14. Antigenní stimulace závislá na T buňkách	28
2.2.15. Aktivace nezávislá na T buňkách	28
2.2.16. Regulace imunitní odpovědi	29
2.2.17. Jerneho teorie sítě	29
3. Autoimunita	31
3.1. Mechanismus vzniku autoimunitní choroby	32
3.1.1. Geneticky podmíněné poruchy imunoreaktivity	33
3.1.2. Polyklonální aktivace B lymfocytů	35
3.1.3. Porucha obranného mechanismu antiidiotypových protilátek	36
3.1.4. Aberantní exprese histokompatibilitních antigenů	37
3.2. Klasifikace autoimunitních chorob	39

3.3. Nosologie imunopatologických onemocnění štítné žlázy	
– (autoimunitní choroby štítné žlázy – AITD)	41
3.3.1. Hashimotova thyreoiditida (HT)	41
3.3.2. Asymptomatická (bezbolestivá) subakutní lymfocytární thyreoiditida	45
3.3.2.1. Poporodní thyreoiditida (PPT)	45
3.3.2.2. Sporadická lymfocytární thyreoiditida	46
3.3.3. Gravesova–Basedowova choroba (GD)	47
3.4. Protilátky proti thyreoglobulinu (TgAb)	48
3.5. Protilátky proti thyreoperoxidáze (TPOAb)	49
3.6. Vlivy životního prostředí a genetické aspekty thyreoidální autoimunity	50
3.6.1. Faktory životního prostředí	50
3.6.2. Genetické faktory	50
3.7. Patogeneza Hashimotovy thyreoiditidy	51
3.8. Role apoptózy v imunopatologii štítné žlázy	53
4. Imunofluorescenční metoda – princip metody	55
4.1. Přímá imunofluorescence (PIF) – jednostupňová metoda	55
4.2. Nepřímá imunofluorescence (NIF) – dvoustupňová metoda	55
4.3. Screeningové vyšetření a použití NIF	56
5. Imunoradiometrická analýza (IRMA)	56
6. Tenkojehlová aspirační cytologie štítné žlázy (FNAC)	57
6.1. Tenkojehlová aspirační cytologie štítné žlázy – poznatky k autoimunitním lymfocytárním chorobám štítné žlázy	57
6.2. Úskalí cytologické diagnostiky (FNAC) Hashimotovy thyreoiditidy a fokální lymfocytární thyreoiditidy	59
7. Bioptické vyšetření štítné žlázy	62
8. Cíle předkládané doktorské disertační práce	63
9. Oddíl A: Porovnání imunofluorescenčních nálezů a imunoradiometrické analýzy (IRMA)	64
9.1. Materiál a metody	64

9.1.1. Metodický postup nepřímé imunofluorescenční techniky (NIF)	65
9.1.2. Metodický postup IRMA techniky	67
9.2. Výsledky	68
9.2.1. Rozbor výskytu protilátek proti koloidu štítné žlázy (thyreoglobulinu) – porovnání výsledků NIF a IRMA	68
9.2.2. Rozbor výskytu protilátek proti epitelu štítné žlázy (thyreoperoxidáze) – porovnání výsledků NIF a IRMA	75
9.2.3. Statistické vyhodnocení	80
9.3. Diskuse	80
10. Oddíl B: Histologie a aspirační cytologie štítné žlázy versus výsledky nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (NIF)	83
10.1. Materiál a metody	83
10.2. Výsledky	84
10.2.1. Hashimotova thyreoiditida (porovnání morfologických a NIF výsledků)	84
10.2.2. Fokální lymfocytární thyreoiditida (porovnání morfologických a NIF výsledků)	86
10.3. Diskuse	87
11. Oddíl C: Aspirační cytologie štítné žlázy versus histologie štítné žlázy	91
11.1. Materiál a metody	91
11.2. Výsledky	92
11.2.1. Hashimotova thyreoiditida (cytologicko–histologické porovnání)	92
11.2.2. Fokální lymfocytární thyreoiditida (cytologicko–histologické porovnání)	93
11.3. Diskuse	93
12. Závěry práce	96
13. Literatura	99
14. Fotodokumentace	123
15. Poděkování	126
16. Seznam použitých zkratk	127

1. Předmluva

Mohlo by se zdát udivující, že z morfologicky orientovaného patologicko-anatomického pracoviště vychází zdánlivě čistě imunologicky pojaté pojednání. Důvod této zvláštnosti pramení ze zaměření ústavu, na který jsem po získání nostrifikace nastoupil. Zaměstnanecké místo jsem získal na Fingerlandově ústavu patologie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Toto pracoviště vždy upřednostňovalo etiologické pojetí patologie. Sám zakladatel prosektury a později přednosta ústavu (MUDr. A. Fingerland) zavedl již ve třicátých letech vyšetřování BWR založené na komplementfixační metodice. Dále absolvoval v roce 1935 bakteriologický kurz na Pasteurově ústavu v Paříži a po válce v roce 1952 dosáhl světového primátu odhalením virové etiologie u Dagradiho inkluzní ezofagitidy (177). Virus tehdy přenesl na rohovku králíka a zajistil jeho serologickou identifikaci (65). V roce 1965 profesor Fingerland zajistil stáž ve Varšavě pro asistenta MUDr. Nožičku a nasměroval jej do imunopatologické laboratoře státního zdravotního ústavu k docentům Brzoskovi a Nowoslawskému. Z tohoto pobytu přinesl Dr. Nožička základy imunofluorescenční techniky, kterou pak aplikoval na tehdy velmi aktuální kapitolu imunopatologie a to na pátrání po orgánových protilátkách objevujících se u autoimunitních chorob v krvi postižených jedinců.

K vyšetření séra na přítomnost orgánové protilátky dvoustupňovou imunofluorescenční metodou je třeba zmrazených řezů z nefixované tkáně (je tedy nezbytný kryostat), dále jako substrát (zdroj řezu) slouží tkáně odpovídající sledované protilátce a tato tkáň je za jistých kautel nejnáze získatelná z pitevný. Samozřejmě je nutný fluorescenční mikroskop (nejlépe s horním chodem excitačního světla). Konečně do výčtu potřeb patří nezbytné reagens, tj. fluorochromovaná protilátka (konjugát). Z tohoto výčtu je na první pohled evidentní, že požadované vybavení (až na poslední položku), je nejlépe dosažitelné na patologicko anatomickém pracovišti.

Když jsem byl v roce 1996 (tedy 30 let po zahájení imunofluorescenčního provozu) do této práce zapojen, dosahoval úhrn všech vyšetřených sér přibližně

160 000. V této době byly již rutinně detekovány následující autoprotilátky: antinukleární faktor, protilátka proti parietálním buňkám žaludku, protilátka proti epitelu a koloidu štítné žlázy, protilátka proti příštítnému tělísku, protilátka proti nadledvinkové kůře, protilátka proti vývodům parotis, protilátka proti hladkému svalu, heterofilní protilátka typu ABBA (protilátka proti kartáčovému lemu resorpčních epitelí) a antimitochondriální faktor, protilátka proti mezibuněčnému tmelu u pemfigu a proti bazální membráně u pemfigoidu. Nověji bylo do rutinní práce zavedeno pátrání po protilátce proti cytoplazmě neutrofilních granulocytů tj. protilátka typu cANCA a pANCA.

U pediatrických pacientů patří ke standardu sledování protilátky proti retikulínu a tak zvanému antiendomysialnímu faktoru. Byla také popsána dosud neznámá protilátka proti bazálním buňkám ve vývodech parotis. Za mého působení v imunofluorescenční laboratoři bylo v souladu s požadavky kliniků zavedeno zjišťování protilátky typu LKM1–protilátka (liver kidney microsomal antibody type 1). Nezmiňujeme se podrobněji o spektru objektů vyšetřovaných metodou přímé imunofluorescence (jednostupňové) proto, že nehrají v našem výzkumném záměru podstatnou roli.

Na ústavu zavedená metoda (blíže popsána v metodické části) a umírněné nároky na kvantitativní stránku imunofluorescenčního vyšetření dovozovaly při pokusu o kvantifikaci imunofluorescenční reakce využít subjektivního semikvantitativního odhadu dělicího pozorované záření co do intenzity na slabě pozitivní (+) dále, pozitivní (++) a konečně, silně pozitivní (+++). Využití titrace zkoumaného séra k hodnocení nálezů dává kvantitativní dobře reprodukovatelné a navzájem porovnatelné výsledky. Tento postup byl ale pro svou pracnost uplatňován jen v ojedinělých případech vybraných k tomuto postupu v situacích, kdy spolehlivě kvantifikovatelný údaj byl nutný ke sledování léčby a to zejména u pacientů podrobených plasmaferéze.

Z literatury je známo, že pokusy získat kvantitativní údaje o intenzitě fluorescence fotometrickou cestou a potom tyto intenzity vztahovat ke kvantu sledovaného parametru (antigen v preparátu), naráželo na nespolehlivou paralelitu mezi oběma veličinami.

Právě v tomto ohledu může vzniknout otázka, na kolik je i zmíněný námi užívaný semikvantitativní odhad vůbec spolehlivým indikátorem intenzity autoprotilátkové tvorby. Rozhodli jsme se prověřit uvedenou závislost obou proměnných, tj. titru protilátky a intenzity fluorescence na modelu typického autoimunitního onemocnění štítné žlázy, jakým je Hashimotova thyreoiditida. Zaměření na tento vztah mělo dva důvody. Jedním z nich je skutečnost, že protilátky proti koloidu a epitelu štítné žlázy jsou dosti časté a že mohou být cenným (prvním) avízem předcházejícím závažnému, dosud nemanifestnímu, onemocnění thyreoidey. Dalším důležitým momentem podněcujícím ke srovnávací studii bylo to, že byly mezitím blíže definovány antigeny, s nimiž autoprotilátky proti štítné žláze reagují (a iniciovaly autoimunitní reakci). V případě protilátky proti koloidu štítné žlázy byl jako rozhodující antigen odhalen thyreoglobulin a v případě protilátky proti epitelu štítné žlázy bylo zjištěno, že antigenem je thyreoperoxidáza. Organizačním důvodem k rozhodnutí prověřit právě tento systém, byla nabídka MUDr. Lomského (vybaveného z vlastní produkce oběma antigeny v čisté formě), že se podejme zajištění výchozích údajů. To jest radioimunodiagnostickou metodou (IRMA) detegovaných a kvantifikovaných údajů o koncentracích obou sledovaných autoprotilátek.

2. Úvod

2.1. *Současný stav vědomostí*

Ze dvou diagnosticky u thyreopathií použitelných autoprotilátek byl v případě jedné z nich korespondující antigen běžně označovaný názvem koloid, poměrně brzy přesněji identifikován jako thyreoglobulin a byl již záhy využíván při navrhování detekčních postupů, založených na precipitaci, nebo pasivní hemaglutinaci (27). Jak již uvedeno, k imunochemické identifikaci antigenu souvisejícího s tvorbou protilátky proti epitelu štítné žlázy (tzv. mikrosomální antigen) a ke zpřesnění, že jde o thyreoperoxidázu, došlo až později (45, 132, 142).

Od té doby se zpřístupnila možnost obě základní antithyreoidní protilátky stanovovat některou z exaktních imunochemických metod a tak získat dobře navzájem porovnatelné údaje o titru autoprotilátek. Současně je také možno vyhnout se nutnosti používat k detekci autoprotilátek výlučně morfologicky orientovaných postupů, jako je námi dlouhodobě využívaná imunofluorescence. Přes svůj kdysi průkopnický význam má tato metoda některé slabé stránky, k nimž na prvním místě patří problém kvantifikace výsledků. Zatím co imunochemické metody poskytují exaktní číselné údaje o titru sledovaných autoprotilátek, tak při imunofluorescenčním vyšetření je možno dosáhnout v řezech jen hodnocení semikvantitativního, založeného na odhadu vyjadřovaného jedním (+) až třemi křížky (+++). Tento semikvantitativní přístup byl v minulosti opakovaně kritizován pro přeceňování jeho výpovědní způsobilosti a byly proto opakovaně podnikány pokusy o zavedení nové metodické disciplíny, jakési kvantitativní imunofluorescence, jejíž podstatou mělo být posuzování titru protilátek za pomoci fotometricky zaznamenávané intenzity fluorescenčního nálezu, tedy ne už odhadem, ale přesným měřením. Tato tzv. kvantitativní imunofluorescence se, přes naděje do ní vkládané, ukázala málo spolehlivou a byla brzy opuštěna (100, 101, 182). Naopak rutinní vyšetřování sér pacientů na orgánové protilátky představovalo trvalou součást „histoserologické praxe“ aniž by byla zajištěna soustavná kontrola prostřednictvím exaktní spolehlivě kvantifikovatelné metody. V této situaci se

přímo nabízela (od doby, kdy byla ujasněna patogenetická role thyreoperoxidázy) možnost direktního určení sledované autoprotilátky radioimunoesejí s vynecháním dosavadního postupu využívajícího zobrazování protilátkové aktivity imunofluorescenčním postupem. Navržené řešení platí v neztenčené míře také o identifikaci antigenní podstaty thyreoglobulinu k čemuž došlo v časovém předstihu před identifikací thyreoperoxidázy. Tím se otevřela cesta k ověření titru autoprotilátek u kontroverzních případů, kdy protilátkový nález byl v zásadním rozporu s klinickými údaji buď v tom smyslu, že byl zjištěn normální klinický stav při masivní autoprotilátkové aktivitě, nebo naopak, kdy se při hrubém nálezu na štítné žláze nepodařilo zaznamenat imunopatologickou odpověď. V podstatě tedy bylo nyní možné provést porovnání imunofluorescenčních výsledků s výsledky radioimunologickými a provést analýzu případů falešně pozitivních i falešně negativních. S tím bylo dosaženo i možnosti posoudit spolehlivost imunofluorescenční metody jako celku, ověřit vliv ředění zkoumaného séra na některé rušivé úkazy.

2.2. Základní imunologické poznatky

K výkladu protilátkových projevů autoimunitních onemocnění nelze přikročit bez základního seznámení s mechanismy imunitních reakcí. Poznatky o nich jsme načerpali z morfologicky podepřeného souborného referátu Clamana z roku 1987 (40). Výklad je rozčleněn na informaci o zvláštlostech imunitního systému, na zmínku o buněčných a humorálních složkách podílejících se na imunitní reakci, dále text rozebírá uspořádání lymfatických orgánů a tkání, a konečně stručně objasňuje regulaci imunitních reakcí.

Aktivity imunitního systému tj. imunitní reakce směřují k ochraně organismu před patogeny pronikajícími do vnitřního prostředí. Přitom musí být imunitní systém schopen nevstupovat do reakce s komponentami vlastního těla. Musí umět rozlišovat mezi strukturami těla vlastními a tělu cizími. Nositel této pozoruhodné schopnosti – imunitní systém, není sloučen do jediného orgánu, nýbrž je rozptýlen po různých místech v těle. Rozhodující roli v početném komplexu různých prvků zúčastňujících se na výstavbě imunitního systému hrají T a B lymfocyty. Jsou to jediné buňky schopné zajistit výše uvedené rozlišování

mezi strukturami tělu vlastními a tělu cizími. Představují tedy specifickou složku imunitního systému. Na výstavbě imunitního systému se zúčastní ještě četné komponenty nespecifické, mezi něž počítáme monocytárně–makrofágový systém, polymorfonukleární leukocyty a systém komplementový (hlavní složky vrozené neadaptivní imunity).

V činnosti imunitního systému lze vystopovat několik charakteristických rysů, jimiž jsou:

- a) specifická, spočívající ve schopnosti rozlišovat nejen, jak již uvedeno, mezi tím, co je tělu vlastní a co cizí, ale i mezi jednotlivými cizorodými antigeny. Touto vlastností se vyznačují jednak lymfocyty, jimž uvedenou schopnost propůjčují povrchové receptory, jednak je vlastní cirkulujícím protilátkám.
- b) imunologická paměť – jejím charakteristickým rysem je skutečnost, že první setkání s antigenem zanechává v části imunokompetentních buněk stopu, která se při druhém setkání projevuje umocněnou imunologickou odpovědí, ve srovnání s reakcí na první kontakt s antigenem. Vedle právě popsaného sledu událostí, který lze označit jako pozitivní imunologickou paměť, existuje také úkaz antigenem navozené imunologické paralýzy, tedy jakási negativní paměť, označovaná jako získaná imunitní tolerance.
- c) mobilita – imunitní systém, jak již výše uvedeno, není vázán na jediné místo, nebo jediný orgán v organismu; navíc však (a to je podstata mobility) nejdůležitější složky tohoto systému tj. T a B lymfocyty, dále imunoglobuliny a komplement mohou cirkulovat po těle. V důsledku toho lokální vpravení antigenu vede zpravidla k systémové senzibilizaci, tedy ke způsobilosti reagovat na nové vpravení antigenu, ať byl aplikován kamkoliv – do kterékoliv části těla.
- d) proliferační schopnost – elementy potřebné pro imunitní odpověď na vpravený antigen se mohou pomnožovat, a tím zajistit dostatečně vydatnou buněčnou základnu pro imunitní odpověď. Tato nabuditelná proliferativní schopnost specifických imunitních buněk je takového stupně, že bez existence tlumivých mechanismů by snadno docházelo k přestřelování četných imunitních reakcí.

- e) součinnost – jednotlivé prvky imunitního systému jsou ve svých funkčních projevech na sobě navzájem závislé a jedny druhé ovlivňují, jak bude blíže vysvětleno v kapitole o regulaci imunitní odpovědi.

Výkladu o průběhu imunitních reakcí je dále třeba předeslat několik slov o jednotlivých složkách imunitního systému – buněčných a humorálních, tj. o lymfocytech, dále o antigen prezentujících buňkách, polymorfonukleárních leukocytech, komplementu, o mediátorech imunitní odpovědi a interferonech.

Nejdůležitější buněčnou složkou imunitního systému jsou lymfocyty. Rozhodující podmínkou imunologické specifity je existence povrchových receptorů, představovaných na B lymfocytech sesilními protilátkami, zakotvenými v plazmatické membráně. Receptor na T lymfocytech je reprezentován strukturami obdobně sestrojenými ze dvou odlišných makromolekul (heterodimer), které jsou podobně jako protilátky schopny reagovat pouze s jedinou antigenní determinantou (92). Jakým způsobem buňky získávají tuto selektivní schopnost, se snažilo vysvětlit několik domněnek, z nichž nejrozšířenější je Burnetova teorie klonální selekce z roku 1959 (35). Říká v podstatě to, že každý lymfocyt je schopen rozpoznat pouze jeden antigen, přesněji jednu antigenní determinantu (epitop) a v důsledku toho také jen na něj reagovat. Takže vlastně lymfoidní systém podle této hypotézy je jakousi mozaikou s neuvěřitelnou pestrostí, tvořenou lymfocyty s miliony individuálních specializovaných reaktivit, eventuálně skupinkami lymfocytů se stejnou reaktivitou vzniklými z jediné specializované buňky (buněčný klon). Imunitní reakce se tedy podle těchto představ odvíjí tak, že specifická buňka nemá na vybranou, nemůže si vyhlédnout jakýkoliv antigen, s nímž by napříště vcházela do reakce, nýbrž v podstatě antigen proniklý do těla reaguje jen se sobě odpovídající buňkou, pokud takovou nalezne. Ostatní buňky zaměřené vůči jiným antigenům nejsou schopny odpovědi. Základním předpokladem, z něhož tato domněnka vychází, je obtížně vysvětlitelná skutečnost, že jednotlivé lymfocyty svou specifickou reaktivitu nabývají dříve, než dojde k jakémukoliv setkání s antigenem. Novější výzkumy se zdají napovídat, že k tomuto pozoruhodnému

vývoji neobyčejně pestré palety antigenních receptorů na T buňkách dochází v thymu cestou somatických mutací a přeskupování genů (117).

Lymfocyty jsou díky svým receptorům pro antigeny jedinými nositeli imunologické specificity (rozlišovací schopnosti), ale plně rozvinutí imunitního děje není myslitelné bez pomocných mechanismů buněčných a humorálních, které imunitní odpověď podporují nebo jinak ovlivňují. Mezi těmito nescifickými podílníky na imunitní reakci zaujímají nejdůležitější místo antigen prezentující (akcesorní) buňky (APC), polymorfonukleární leukocyty a z humorálních složek komplement.

Antigen prezentující (akcesorní) buňky (APC) jsou nezbytné pro předání antigenního podnětu T buňkám (B lymfocyty je v takové míře nepotřebují). K této součinnosti může dojít jen za předpokladu, že akcesorní buňky i T lymfocyty mají shodné histokompatibilitní antigeny, na jejichž pozadí se uskutečňuje přejmutí antigenního podnětu. Funkci akcesorních buněk mohou plnit nejen makrofágy (histiocyty), ale také Langerhansovy buňky epidermis, dendritické buňky ve foliklech lymfatických uzlin a snad i endotelie a gliální elementy.

Polymorfonukleární leukocyty jsou významné hlavně v závěrečné fázi imunologické odpovědi, pokud vede k zánětlivé reakci. Část aktivované páté složky komplementu (C5a), vznikající při imunokomplexových reakcích, má významný leukotaktický efekt a přispívá k nakupení segmentovaných leukocytů v místě imunitní reakce.

Komplement (série 9 bílkovin) je nezbytný v závěrečných fázích všech protilátkových reakcí, pokud jejich konečným výsledkem má být lýza bakterií, nebo cílových buněk. Protilátka sama o sobě není způsobila vykonat destrukci cílového objektu (koná ji komplement). Protilátka vlastně cíl jenom vyhlédne a označuje (155).

Dalšími nescifickými účastníky imunitního děje jsou i humorální mediátory produkované buňkami, jež se na reakci podílejí. Obecně se takové látky nazývají cytokiny, nebo v užším slova smyslu lymfokiny, pokud pocházejí z lymfocytů. Cytokiny jsou proteiny (obvykle glykoproteiny) relativně nízké

molekulární hmotnosti. Zahrnují interleukiny, lymfokiny a další buněčné signální molekuly, např. interferony a tumor nekrotizující faktor.

K nim patří i skupina látek zprostředkávajících signály mezi lymfocytárními elementy, označovaných jako interleukiny. Nazývají se tak proto, že z lymfocytů většinou pocházejí a na jiné lymfocyty působí (54). Mají různorodou funkci, ale nejvíce jsou zapojeny do řízení dalších imunitních buněk. Každý interleukin působí specificky, na omezenou skupinu buněk v závislosti na typu receptoru pro interleukin. Interleukiny řídí obě, indukční efektorovou fázi imunitní odpovědi.

Interleukin-1 (IL-1) je produkován buňkami monocytárně makrofágového systému a jeho vliv na lymfocyty se uplatňuje současně s předáváním antigenního podnětu. Bez něho nedojde k aktivaci T lymfocytů. Tato aktivační funkce však není jeho funkcí jedinou. Interleukin-1 funguje i jako endogenní pyrogen nebo stimulant růstu pro fibroblasty (60).

Interleukin-2 (IL-2) je regulační cytokin který podporuje klonální proliferaci a diferenciaci CD4⁺ buněk, cytotoxických T-buněk (CD8⁺), diferenciaci B buněk, aktivaci makrofágů a zabíjácích buněk (NK) (64, 212).

Interleukin-3 (IL-3) má stejný původ jako předešlý mediátor, ale na rozdíl od něho podněcuje růst kmenových buněk v krvotvorné kostní dřeni (210).

Interleukin-4 (IL-4) podněcuje aktivitu B lymfocytů, vedoucí k produkci IgG a IgE (176).

Interleukin-5 (IL-5, EDF – eosinophil differentiation factor) je hlavně růstový a aktivační faktor pro eozinofily (podskupina granulocytů) (42, 139).

Interleukin-6 (IL-6, BSF-2 – B-cell stimulatory factor-2) je prozanětlivý cytokin, který stimuluje několik typů leukocytů a produkci bílkovin akutní fáze v játrech. Je zvláště důležitý při přeměně B lymfocytů v buňky plazmatické (90).

Interleukin-7 (IL-7) je T-buněčný růstový a aktivační faktor (70).

Interleukin-8 (IL-8) je produkován většinou tělesných buněk, zvláště makrofágy a endoteliálními buňkami. Podporuje zánět, umožňuje imunním buňkám stěhovat se do tkání, a silně navozuje chemotaxi pro neutrofilní buňky (14).

Interleukin-9 (IL-9) je multifunkční cytokin vylučovaný Th2 lymfocyty. Kromě jeho účasti v imunitní odpovědi, je to růstový faktor a má také antiapoptotickou roli (111).

Interleukin-10 (IL-10, CSIF – cytokine synthesis inhibitory factor) je protein který zabraňuje syntéze mnoha cytokinů, včetně IFN- γ , IL-2, IL-3 a TNF- α produkovaných aktivovanými makrofágy a Th buňkami (266).

Interleukin-11 (IL-11) je produkovaný různými stromálními buňkami zahrnujícími fibroblasty a osteoblasty. Dále stimuluje hematopoézu a produkci bílkovin akutní fáze v játrech (61, 130).

Interleukin-12 (IL-12) podporuje Th1 imunní odezvu u makrofágů a NK buněk, a navozuje IFN- γ produkci (233).

Interleukin-13 (IL-13) má strukturální a funkční podobnost s IL-4 a podporuje B buněčnou diferenciaci (268).

Interleukin-15 (IL-15) je produkován epiteliálními buňkami a monocyty, společně s IL-2 zahajuje několik biologických aktivit. IL-15 navozuje T-buněčnou diferenciaci, zvyšuje cytotoxicitu NK buněk a stimuluje B buňky, aby mohly proliferovat a vylučovat protilátky (105).

Interleukin-17 (IL-17) prozánětlivý cytokin produkovaný aktivovanými memory T buňkami (2).

Interleukin-18 (IL-18) prozánětlivý cytokin, který navozuje produkci interferonu-gama (IFN- γ) (55).

Postupně jsou definovány stále další mediátory z této kategorie a dnes je známo kolem 32 typů interleukinů (IL-1 až IL-32).

Interferony jsou dalšími humorálními činiteli, podílejícími se výrazně na imunitní odpovědi. Jejich objev původně naznačoval úzce vymezenou působnost v tom smyslu, že zabraňují uchycení jiného viru na buňce již jedním virem napadené (interference) (95). Z kultivačního media virem nakažených buněk se skutečně interferon dá izolovat. Nejde o jednotnou látku (232), odlišují se obvykle 3 třídy interferonů (IFN- α z leukocytů, IFN- β z fibroblastů, IFN- γ z lymfocytů). Poslední z nich má velmi zajímavou schopnost podněcovat expresi MHC proteinů a Fc receptorů na povrchu buněk normálně tyto antigeny

neexprimujících, čímž se otevírá pravděpodobně pojitko mezi banálními virovými horečnatými infekcemi a rekrudescencemi některých zčásti imunopatologicky podmíněných chorobných dějů (267), zvláště na kůži, ale i v CNS (např. roztroušená skleróza mozkomíšní).

Tumor nekrotizující factor α (TNF- α – tumor necrosis factor alfa) je multifunkční prozánětlivý cytokin uvolňovaný aktivovanými makrofágy a monocyty, podobně jako lymfotoxin alfa (také nazvaný tumor nekrotizující faktor beta – TNF- β), aktivuje T buněčnou sekreci. To posiluje aktivaci T buněk, a podporuje proliferaci T a B buněk (22, 202, 222).

2.2.1. Lymfatické orgány a tkáně (primární i sekundární)

V postnatálním životě se lymfocyty vytvářejí převážně v primárních lymfatických orgánech, tj. v kostní dřeni a thymu. V těchto orgánech má také docházet ke vzniku charakteristické rozmanitosti receptorových struktur. Naproti tomu klonální expanze (tj. proliferace určitého specializovaného lymfocytárního klonu po setkání s odpovídajícím antigenem) může probíhat kdekoliv v těle.

Thymus má dvě složky: stromální a epiteliální. Obě pocházejí ze třetí a čtvrté žaberní výchlípky a hrají zřejmě důležitou roli ve vývoji MHC restrikce vnucené lymfocytům, které sem (do thymu) přicházejí ze žloutkového vaku, fetálních jater a kostní dřeně. Intenzivní mitotická aktivita a zánik buněk jsou nezbytnou podmínkou ke vzniku celého sortimentu specificit T lymfocytů, které následně odputují z thymu do periferie. Vývojové defekty brzlíku jsou spojeny s vážnými defekty imunity (200).

Kostní dřeň: má v imunitním dění dvojí roli. Jednak je skutečným primárním lymfatickým orgánem, kde se tvoří v celém postnatálním životě B lymfocyty (prenatálně se v dřeni a játrech tvoří nejen B lymfocyty, ale i prekurzory T buněk). Vedle této produkční funkce je však dřeň i významným periferním (sekundárním) lymfatickým orgánem obsahujícím zralé T a B lymfocyty. Po té, co lymfocyty opustí místa svého vzniku nebo zrání, tj. tzv. primární lymfatické orgány, stěhují se do periferie a kolonizují sekundární lymfatické orgány (níže podrobněji uvedené) a zachovávají v nich standardní

vzájemný poměr v počtu T a B lymfocytů. Jako sekundární lymfatické orgány se chovají hlavně následující struktury:

Slezina: (T:B=45:55) představuje hlavní místo pro vychytávání opsonizovaných, v krvi cirkulujících cizorodých částic a současně nejvýznamnější místo produkce protilátek vůči těmto antigenům.

Mízní uzliny: (T:B=60:40) mají podobnou vychytávací roli jako slezina, ale v jiném, tj. mízním systému. Mízní uzliny reagují na antigen, který pronikl tělním povrchem na vzdálené periferii a který byl z této periferie přisunut lymfatickými cévami (241). Lymfa je mízními cévami do uzlin nejen přiváděna, ale také je jimi odváděna. Terminální, do krve ústící ductus thoracicus nese lymfu a pozoruhodně selektivní populaci buněk, tvořených převážně T lymfocyty. Proto lze drenáže duktů využít k imunosupresi.

Některé orgánově vázané lymfatické struktury mají svoje zvláštnosti, pro které jsou dnes projednávány samostatně, aniž by však šlo co do anatomického uspořádání o nějaké výlučné formace. Takto vyčleněny jsou tyto oddíly:

- 1) Na střevo vázaný lymfatický systém (GALT = gut associated lymphatic tissue) zahrnuje nejen střevní, ale i jaterní lymfatické struktury. Produkuje hlavně IgA a je pro něj charakterická zvláštní recirkulace lymfocytů z Peyerských plaků (kde se vyvíjejí pre-B lymfocyty), které po setkání s antigeny ze střevního obsahu pronikají do cirkulace, aby se opět navrátily zpět do střevní stěny (175). Tento systém má zřejmě i svou roli při vzniku tolerance na antigeny z potravy.
- 2) Bronchiální lymfoidní systém (BALT = bronchus associated lymphatic tissue) má podobnou roli jako předchozí střevní, také produkuje převážně IgA, a to ve vztahu k inhalovaným antigenům. Lokalizován je hlavně v dolních oddílech dýchacích cest a také v hilových uzlinách.
- 3) Kožní lymfoidní systém se od předchozích odlišuje nepřítomností kompaktních lymfatických struktur a dále svérázným typem antigen prezentujících buněk, tj. buňkami Langerhansovými, vyvíjejícími svou

činnost v nejpovrchnější vrstvě, tj. epidermis. Mohou však proniknout lymfatickými cévami až do mízních uzlin, kde při dermatopatické lymfadenopatii vytvářejí charakteristická buněčná uskupení.

- 4) Krev (T:B=80:20) je častým místem direktního imunologického střetu mezi antigenem a protilátkou, a navíc je mediem přenášejícím lymfoidní a nelymfoidní elementy, podílející se na imunologických reakcích. Jak vyplývá z čísel týkajících se poměru T a B buněk uvedených u jednotlivých orgánů, není buněčná bilance v krvi přesným obrazem bilance v jiných orgánech, což je ještě zdůrazněno u některých chorobných stavů; např. u sarkoidozy je inverzní vztah mezi krví a plicemi co do obsahu T lymfocytů (47).

- 5) Kostní dřeň (T:B=10:90) jak již uvedeno výše, je vedle základní role primárního lymfatického orgánu také orgánem sekundárním s běžnými úkoly periferní lymfatické tkáně.

Cirkulace lymfocytů je poněkud odlišná pro T a B buňky. T lymfocyty po opuštění thymu osídlují tzv. „T zóny“ v jednotlivých sekundárních lymfatických orgánech (v uzlině např. parakortikální okrsky), odkud mohou zvláště při klonální expanzi přecházet do krve a z ní do sekundárních lymfatických orgánů (skrz stěnu epiteloidních venul v parakortikální vrstvě); jen do thymu se nemohou vrátit. Jejich životnost se počítá na léta. Podobná je i cirkulace B lymfocytů, jen s tím rozdílem, že jejich životnost je podstatně kratší.

2.2.2. Struktura a funkce imunoglobulinů

Imunoglobuliny jsou bílkoviny produkované B lymfocyty, konkrétně jejich terminálním diferenciacním stadiem, tj. plazmatickými buňkami. Jde o bílkoviny se zajímavou, zhruba jednotnou stavbou, spočívající ve spojení dvou těžkých a dvou lehkých polypeptidových řetězců do jedné molekuly za pomoci disulfidických můstků. Mezi těžkými řetězci bylo rozpoznáno pět odlišných typů (alfa, gama, delta, mí a epsilon) a podle jejich přítomnosti v molekule

imunoglobulinu se rozlišuje pět imunoglobulinových tříd (izotypy). U některých imunoglobulinů lze jít v jejich členění ještě dále a rozlišit existenci podtříd, což platí zejména o imunoglobulinu G, ale také A. Lehké řetězce se vyskytují jen ve dvou variantách kappa a lambda a na zařazení imunoglobulinu do třídy nemají žádný vliv. Zvláštní je že v jedné molekule imunoglobulinu nemohou být dva nesteré lehké řetězce.

Některé řetězce mají větší či menší polysacharidovou komponentu, která se však na vlastní interakci s antigenem nepodílí. Všechny čtyři řetězce jsou do společné molekuly začleněny tak, že jsou stejně orientovány, tj. jejich konce ukončené aminokyselinou s volnou aminoskupinou (NH_2), zvané N-terminální konce, směřují k místu určenému pro vazbu antigenu a vytvářejí zde jakousi prohlubeň s vazebnými místy, odpovídajícími příslušnému antigenu. Pro neobyčejnou rozmanitost ve stavbě této části protilátkové molekuly se tato její partie označuje jako variabilní doména a jednotlivá, vůči individuálnímu antigenu zacílená struktura, jako idiotyp (na rozdíl od výše uvedeného izotypu). Všechny čtyři řetězce mají pochopitelně také opačný konec, který je osazen molekulou aminokyseliny s volnou karboxylovou skupinou (COOH), označovaný jako C-terminální konec. Pouze u těžkých řetězců však dosahují C-terminální konce k okraji celé protilátkové molekuly, mající zhruba tvar písmene Y; C-terminální zakončení lehkých řetězců končí naopak již uprostřed délky celé imunoglobulinové molekuly. Při použití pepsinu vznikne jednak úlomek spojující oba konce schopné vázat antigen (fragment antigen binding = Fab) jednak fragment z konce opačného, označovaný Fc ne proto, že pochází z C-terminálního konce molekuly, ale pro svou schopnost krystalizovat (fragment crystallisable = Fc). Tento fragment Fc, i když se neúčastní na vazbě antigenu je nositelem mnoha jiných důležitých vlastností, rozhoduje například o schopnosti protilátky procházet placentou, podílet se na vazbě komplementu a je nezbytný pro součinnost s buňkami vybavenými Fc receptorem. Dále má rozhodující podíl v situaci, kdy se mají tvořit protilátky proti této protilátce. Fragment Fc funguje potom sám jako antigen a po vpravení do těla živočicha jiného druhu navodí tvorbu antiglobulinových protilátek (např. imunizace prasete lidským gama globulinem). Zajímavé je, že protilátková molekula nemá genetickou informaci

pro svůj vznik soustředěnou na jednom místě lidského genomu. Genové lokusy pro těžké řetězce jsou na chromozomu 14, pro lehký řetězec kappa na chromozomu 22 a lehký řetězec lambda na chromozomu 2. Každý řetězec se člení na menší, relativně samostatné oddíly tzv. domény. Lehké řetězce mají tyto domény jen dvě (jednu variabilní V a jednu konstantní C); těžké řetězce mají každý domény celkem čtyři (jednu variabilní V a tři konstantní C). Variabilní domény jsou u obou řetězců na N-terminálním konci polypeptidového řetězce.

Z řečeného je tedy patrné, že na jeden funkční celek molekuly imunoglobulinu se skládají se svými příspěvky geny situované na značně vzdálených místech genomu, tedy dokonce na různých chromozomech. Okolnost, že vedle sebe v jednom řetězci může existovat tak přísně konzervativní část konstantní (C) vedle neobyčejně proměnlivé části (V) vedla Dreyera a Bennetta již v roce 1965 k vyslovení hypotézy (58), že tyto části jsou kódovány dvěma nezávislými geny a ty umožňují vznik jednoho souvislého polypeptidového řetězce tak, že se k sobě přibližují v rámci reorganizace DNK při vývoji a diferenciaci embryonální buňky, v níž ležely příslušné segmenty DNK ještě odděleně (205).

Žádný z těchto poznatků ještě však neřešil otázku jaký mechanismus je odpovědný za mimořádnou proměnlivost variabilního úseku zejména jeho hypervariabilní části. Právě tato proměnlivost umožňuje vznik mimořádného počtu idiotypů a tím rozlišování obrovského počtu antigenních specifit. Teprve v roce 1983 Susuma Tonegawa odhalil (231), že výše popsany princip skládání bílkovinného řetězce z úseků kódovaných na různých místech genomu je uplatněn znovu v jemnějších podrobnostech i při konstrukci variabilního úseku. Tonegawa dovozuje, že se na skladbě tohoto článku (variabilní úsek) podílejí standardně 3 kratší podúseky. Embryonální DNK kódující variabilní segment postrádá informaci pro část jeho aminokyselin. Tato informace je lokalizována v místě odhalení genu pro tzv. J segment (joining). Tento gen se teprve dodatečně, během individuálního vývoje imunokompetentní buňky spojí s hlavní částí genu pro variabilní řetězec. Vlohy pro V, J i C segment leží tedy v DNK embryonální buňky roztroušeně, bez vzájemné spojitosti a teprve

v průběhu zrání buněk uschopněných k tvorbě protilátek se sdružují ve spojité celek v průběhu procesu označovaného jako somatická rekombinace (28).

To co bylo řečeno o lehkém řetězci platí i o řetězci těžkém, kde navíc byl zjištěn další nezávislý úsek geonomu, podílející se na kódování malé části těžkého řetězce označovaný D (diversity) (123).

Gen pro variabilní úsek lehkého řetězce pozůstává tedy ze dvou oblastí DNK a sice oblasti kódující DL a oblasti pro JL; gen pro variabilní úsek těžkého řetězce ze tří oblastí kódujících VH, D a JH. Žádná z těchto oblastí není v lidském genomu reprezentována jen jednou, naopak se počítá, že v každém genomu je přes sto variant oblastí pro VH, 4 pro D a 6 pro JH komponentu variabilního úseku; stejně početné jsou zastoupeny i oblasti kódující VL a JL komponenty v řetězci lehkém. Také genové oblasti pro konstantní domény těžkého i lehkého řetězce jsou zastoupeny vícečetně (33). Vzájemnými kombinacemi uvedených úseků dochází ke známé mnohotvárnosti idiotypů, přičemž vedle matematicky propočitatelných kombinací vyplývajících z daného počtu výchozích prvků je počet dosažených proměn ještě zvyšován velmi častými mutacemi nastávajícími při proliferaci B lymfocytů po antigenní stimulaci (88), eventuálně nedokonalostmi při spojování oblastí DNK v průběhu somatické rekombinace (231), takže počet možných protilátkových idiotypů se řádově odhaduje na miliardové počty.

2.2.3. Imunoglobulinové třídy a podtřídy

IgG je v krvi zastoupen kvantitativně nejvýznamněji. Je důležitý v ochraně proti virům a bakteriím, váže komplement a aktivuje jej klasickou cestou. Jako jediný prostupuje placentou, takže při poločasné své biologické existence kolem tří týdnů může poskytnout novorozenci ochranu nejméně na dobu tří měsíců, kdy jeho koncentrace (po prvních třech týdnech poklesne na polovinu, po dalších třech týdnech na $\frac{1}{4}$ a na konci devátého týdne dosahuje $\frac{1}{8}$ původní výše), stále ještě poskytuje dostatečnou ochranu.

Uvnitř tohoto izotypu lze vyčlenit ještě čtyři podtřídy IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄. Liší se (z hlediska molekulární chemie) nevelkými obměnami v Fc části těžkého řetězce. Tyto obměny se projevují i funkčními zvláštnostmi. IgG₁ má

vyčníkající opsonizační vlastnosti, v této podtřídě jsou také často protilátky vzniklé jako reakce na vpravení toxinů nebo dextranu. Rh protilátky patří hlavně do podtřídy IgG₁ a IgG₃. IgG₄ má ve srovnání s ostatními imunoglobuliny podstatě vyšší schopnost senzibilizovat kůži (ne však v takovém stupni jako IgE), protože jeho Fc fragment má zřetelnou afinitu ke tkáni (Fc fragment imunoglobulinu IgE má tuto schopnost ještě vyšší). Fc fragment totiž rozhoduje o tzv. homocytotropii, tj. schopnosti vázat se ve tkáních takovým způsobem, že Fab fragment přitom zůstává volný, připraven svým neobsazeným koncem k reakci s antigenem.

IgA je hlavním imunoglobulinem obsaženým v sekretech dýchacích cest, urogenitálního traktu a zažívacího ústrojí. Skýtá těmto slizničním povrchům hlavně antimikrobiální ochranu a vzhledem k tomu, že nemá zřetelnou schopnost aktivovat komplement, není jeho vazba odpovídajícími antigeny provázána zánětlivými projevy, ke kterým jinak běžně při aktivaci komplementu dochází. Imunoglobulin A v tělních sekretech nemá zcela běžnou strukturu. Je složen ze dvou molekul (dimer) imunoglobulinu A spojených dohromady zvláštním řetězcem označeným J (joining piece). Dále jsou tyto dvě molekuly imunoglobulinu A navzájem spojeny zvláštním polypeptidovým řetězcem secernovaným slizničními epitelii a označeným SP (secretory piece, sekreční komponenta). Jde o glykoprotein o molekulové hmotnosti 58 000 daltonů, který dodává tomuto novému celku odolnost proti natrávení proteolytickými fermenty, jimž je secernovaný imunoglobulin vystaven zvláště v zažívacím traktu (118). V krvi se IgA vyskytuje jako monomer se dvěma podtřídami IgA₁ i IgA₂.

IgM má ze všech imunoglobulinů největší molekulu vzniklou spojením pěti základních imunoglobulinových molekul (z nichž každá obsahuje dva řetězce typu μ a dva řetězce lehké) do kruhu, na způsob dřevěného kočárového kola se špicemi. Fc fragmenty v tomto spojení směřují do středu útvaru. IgM má zvláštní poslání v počátečních fázích tvorby protilátek – je přítomen v cytoplazmě i na povrchu B lymfocytů v průběhu jejich maturace a IgM je také první protilátkou, která se objevuje po imunizaci kterýmkoliv antigenem. Teprve později dochází k vzestupu hladin protilátek příslušných k dalším izotypům. Ve třídě IgM se nacházejí spontánně vzniklé protilátky proti krevním skupinám z ABO systému

(izohemaglutininy), nebo patologické chladové aglutininy. IgM je vynikajícím aktivátorem komplementu klasickou cestou.

IgD má molekulu tvořenou dvěma řetězci delta a dvěma lehkými řetězci. O jeho biologickém poslání není stále jasno. Ví se však, že se vyskytuje na povrchu zcela nezralých B lymfocytů. V séru je ve velmi nízké koncentraci. Podle jedné z domněnek představuje IgD jakési předstadium budoucí tvorby protilátek, přesněji řečeno imunoglobulin bez zaměření proti jakémukoliv antigenu – tedy molekulu sice protilátkové struktury, ale bez protilátkových vlastností.

IgE se skládá ze dvou řetězců ypsilon a dvou lehkých řetězců. Má vysokou homocytotropii, proto je většinou vázán ve tkáních, takže v séru je jen ve velmi nízké koncentraci. Tato vazba je podmíněna neobyčejnou afinitou jeho Fc fragmentu k povrchu žírných buněk a současně i krevních bazofilů. Touto svojí pozicí (žírné buňky jsou ve větším počtu fyziologicky v kůži a dále ve střevní a bronchiální sliznici) se stává IgE hlavním nositelem přecitlivělosti reaginového typu u astmatu, senné rýmy a některých kožních projevů (kopřivka). Svůj patogenní vliv rozvíjí po setkání s antigenem, kterému se pro habituálně nízkou produkci IgA podařilo prostoupit ze slizničního povrchu do tunica propria mucosae a zde reagovat s imunoglobulinem E, trčícím na povrchu slizničních mastocytů. Nastalá reakce vede k rozpadu žírných buněk (degranulace), uvolnění mediátorů v nich obsažených (i následně syntezovaných) a vzniku závažných klinických projevů (spasmus bronchiální svaloviny, hyperémie sliznic, hypersekrece hlenu atd.). Stručně zmíněná závislost patogenního působení slizničních alergenů na snížené hladině IgA, přesněji řečeno na jeho úbytku v hlenové vrstvě na povrchu sliznic je důležitá pro výklad vzniku atopických reakcí. Jako atopik je označován jedinec který na určité typy antigenů, zejména těch, které vstupují do organismu inhalační cestou reaguje nadměrnou tvorbou protilátek ze třídy IgE, při čemž jeho protilátková odpověď v okruhu ostatních imunoglobulinových tříd je nedostatečná. Nízká produkce IgA usnadňuje alergenům (nevychytaným pro nedostatek IgA) proniknout povrchovým hlenem do sliznice spojit se s molekulami IgE usazenými (jak již uvedeno) na žírných buňkách v okolí slizničních cév. Sklon k odchylné protilátkové odpovědi je u atopických jedinců vlastností trvalou, geneticky zakódovanou.

Na druhé straně však podání téhož antigenu (alergenu) jinou než inhalační cestou (parenterálně) může podnítit tvorbu protilátek jiných imunoglobulinových tříd včetně IgA, což je vlastně podstata desenzibilizační léčby (empiricky praktikované dlouho předtím než byly uvedené závislosti známy).

2.2.4. Biologie T lymfocytů

T lymfocyty, tj. ty které prošly průpravou v brzlíku – thymu, jsou nejzajímavější buňky imunního systému. Nejen že jsou nadány rozpoznávací schopností (imunologická specifita), ale jsou i nositeli imunologické paměti. Samy jsou schopny imunologických efektorových úkonů a navíc významně zasahují do regulace imunitní odpovědi.

2.2.5. Rozpoznávání antigenu T buňkami

T lymfocyty jsou ve své imunologické reaktivitě klonálně restringovány. Další omezení spočívá v tom, že mohou rozpoznávat jen jediný antigen a s tímto jediným antigenem také reagovat.

Ve vyjímecných případech je možná reakce s antigenem ne zcela totožným, nýbrž jen podobným (příbuzným) a pak se mluví o tzv. zkřížené reakci (jeden antigen imunitu navodil, reakce ale nastala proti jinému).

Nositelem rozpoznávací specifity jsou receptory na povrchu lymfocytů, jež mají některé strukturální rysy podobné s protilátkami (145). Jsou to také heterodiméry (podobně jako protilátky a MHC proteiny) propojené uvnitř molekuly disulfidovými můstky. Úplně totožné však se žádnou známou protilátkou nejsou. Snad nejlépe tuto odlišnost dokresluje funkční poměry. T lymfocyty nejsou na rozdíl od B lymfocytů schopné rozpoznat antigen v jeho surové formě.

Většina antigenů v původním neupraveném stavu postrádá schopnost podnítit T lymfocyty k imunitní odpovědi. Běžné antigeny musí být napřed pohlceny antigen prezentujícími buňkami (většinou makrofágy), v nichž jsou částečně natráveny a pak jimi přesouvány k lymfocytům. V průběhu tohoto procesu, který zvyšuje schopnost antigenů stimulovat T lymfocyty až 1 000 x (238, 239, 258), se však postupná degradace antigenní molekuly musí včas

zarazit. Fragментy antigenů, nesoucí epitop schopný reagovat s T lymfocyty, nesmí klesnout pod velikostní úroveň hepta či octapeptidů. Tento peptid je pak prezentován T lymfocytům – avšak až po té, co se napřed spojil na povrchu antigen prezentující buňky s molekulou HLA z I. nebo II. třídy (24,145). K této vazbě je na molekule HLA vytvořeno zvláštní místo vzhledu prohlubiny, kam se parciálně degradovaný antigen zasouvá. Protože zdaleka není tolik allelických modifikací v HLA systému, kolik je možných antigenních specifit, je zřejmé, že prohlubeň na jedné a téže molekule HLA determinanty musí mít schopnost spojit se s nepřehlednou řadou různých antigenních specifit. Teprve s tímto sdruženým útvarem (reziduální antigenní peptid + HLA determinanta) je schopen vejít ve styk receptor T buněk (T cell receptor). Pro interakci s T lymfocyty imunopotenciačními jsou rozhodující HLA determinanty (MHC proteiny) ze II. třídy (DP, DQ, DR), jež jsou exprimovány na povrchu jen několika buněčných typů, a to monocytů, B lymfocytů a aktivovaných T buněk. Naproti tomu MHC proteiny I. třídy (HLA-A, HLA-B, HLA-C), jež jsou na povrchu všech jaderných buněk (nejsou tedy na erytrocytech) a navíc i na povrchu trombocytů, hrají rozhodující roli při aktivaci ostatních T lymfocytů tj. cytotoxických a supresorových (29).

Bjorkman názorně vykládá potřebu vazby antigenních oligopeptidů na MHC protein kresbou, kde receptor T buněk je představován jako vidlička, která pro přílišný rozestup svých bodců není schopna nabodnout titěrný (nízkomolekulární) antigenní peptid, rezultující z předchozí degradace (24). Peptid musí být zasazen mezi molekuly MHC proteinu a v jejich sevření je teprve uchopen výše popsaným receptorem T buněk.

2.2.6. Funkce a podtypy T lymfocytů

T lymfocyty mají přísně provedenou dělbu funkčních úkolů vázanou na příslušnost k jednotlivým podtypům, charakterizované určitými povrchovými znaky, kterých T lymfocyty nabývají během zrání v brzlíku. Tyto znaky je možno rozlišovat pomocí monoklonálních protilátek. Skupina lymfocytů reagující s jednou konkrétní monoklonální protilátkou se označuje obecně symbolem CD (cluster designation) doplněná pořadovým číslem. Část těchto znaků je společná

všem lymfocytům, jiné jsou pak na nich přítomny jen po dobu pobytu lymfocytů v brzlíku a opět jiné jsou jen na povrchu těch lymfocytů, které již brzlík opustily (periferní T lymfocyty).

Vedle tohoto dělení lymfocytů, podle povrchových markerů, lze pro jejich dělení použít i hledisko funkční, kterého se pro jednoduchost přidržíme v následujícím výkladu a rozdělíme T lymfocyty na efektorové a regulátorové.

2.2.7. Efaktorové T lymfocyty

Jde o tzv. cytotoxické T lymfocyty. Je o nich možno říci, že patří mezi nejméně studované buňky vůbec (159). Rozeznávají antigen za asistence MHC antigenu I. třídy (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Jestliže jsou senzibilizovány určitým antigenem, mohou destruovat cílové buňky nesoucí tento antigen ovšem za předpokladu, že cílová buňka má stejné znaky v rámci HLA systému. Takže individuum, které je odolné vůči určitému viru, např. spalniček, je odolné proto, že má cytotoxické T lymfocyty schopné lyzovat buňky tímto virem infikované a pozměněné, pokud se shodují v již připomenutých histokompatibilních antigenech I. třídy. Cytotoxické T lymfocyty jsou vedeny pod označením CD 8 (dříve OKT 8). Stejný znak nesou na svém povrchu i supresorové T lymfocyty.

2.2.8. Regulátorové T buňky

Jejich úkolem je řízení rozvoje efektorových T i B buněk, a to jak ve smyslu jejich stimulace, tak i útlumu. Mezi regulátorové T lymfocyty patří lymfocyty imunopotenciační čili Th buňky (dříve označované T gama). Jako imunopotenciační byly označeny pro svou schopnost podporovat B lymfocyty v produkci protilátek (proto helper cells – H). Antigen rozpoznávají za součinnosti MHC determinant II. třídy. Patří tedy dnes do skupiny CD 4 (dříve OKT 4). Jsou snadno stimulovatelné, a proto také buňky, které se množí po stimulaci některými mitogeny, jsou hlavně Th buňky.

Supresorové T buňky jsou dalším typem regulátorových buněk. Učinkují tlumivě na rozvoj imunitní reakce. Na povrchu nesou znak CD 8, mohou rozvíjet svou aktivitu na podnět zprostředkovaný specifickou stimulací antigenem a snižují počet lymfocytů imunopotenciačních. V podrobnostech není dosud

známo, jakým mechanismem se tak děje. Některé supresorové T buňky snad mohou secernovat supresivně účinkující faktory. Mohou hrát důležitou roli při nabývání získané imunotolerance, a snad i autotolerance.

2.2.9. Aktivace T buněk

Periferní T buňky jsou elementy s dlouhou životností a vyskytují se obvykle v klidové formě (G_0 nebo G_1). Jakmile jsou aktivovány odpovídajícím podnětem, mohou vyvíjet některou z níže uvedených aktivit: proliferace, diferenciaci, produkce lymfokinů nebo výkon vlastních efektorových funkcí. T buňky mohou být aktivovány specificky, to znamená, že dotyčný lymfocytární klon se setká s odpovídajícím antigenem za součinnosti příslušné komponenty MHC systému. Na druhé straně mohou být T buňky aktivovány také nespecificky, jak je uvedeno níže.

2.2.10. Aktivační signály pro T buňky

Ke specifické aktivaci T buněk dojde tehdy, pokud je jim předestřen akcesorními buňkami (APC) odpovídající antigen, a to ve spojení s příslušnými determinantami z MHC systému. Podmínkou samozřejmě je, že příslušná T buňka musí mít receptor pro komplex představovaný antigenem a determinantami MHC. Pravidelně je k aktivaci nezbytný ještě podpůrný signál v podobě interleukinu-1 produkovaného rovněž akcesorními buňkami. T buňka na tuto aktivaci odpovídá klonální expanzí a obvykle také produkcí interleukinu-2, jehož mohutný účinek je udržován v mezích přirozeně se vyskytujícím inhibítorem (119). Uvedený amplifikační děj je sledovatelný i morfologicky: jeví se jako dělení T lymfocytů.

2.2.11. Nespecifická aktivace T buněk

Značný počet substancí nazývaných mitogeny může stimulovat velmi četné T buňky způsobem, který se zcela vymyká představám o klonální specifitě. Tyto mitogeny jsou obvykle také předestřeny lymfocytům prostřednictvím akcesorních buněk. Nespecifičnost této aktivace spočívá v tom, že několik různých klonů T buněk může být podníceno současně k činnosti jediným

polyklonálním aktivátorem, jako je například rostlinný lektin concanavalin A nebo, fytohemaglutinin a podobně. Schopnost odpovědět proliferací na tyto podněty se často užívá jako laboratorní zkouška funkčních schopností T lymfocytů. Test sice neříká nic o schopnosti reagovat na některý určitý specifický antigen, nicméně dává rámcově informativní výsledky u pacientů s defekty T buněk nebo při imunosupresivní léčbě.

2.2.12. Biologie B lymfocytů

O vývoji B buněk jsme dobře informováni, protože mají velice charakteristické znaky odlišující jednotlivá stádia jejich zrání. Říká se jim proto diferenciační markery. Nejsnáze zjistitelným diferenciačním markerem je molekula imunoglobulinu. V průběhu zrání B buněk se obsah imunoglobulinu mění. B buňky vznikají z příslušných prekurzorů jak v prenatálním, tak i v postnatálním životě. Primitivní stadia B buněk mají samotné těžké řetězce typu μ v cytoplasmě, na povrchu však žádné imunoglobuliny. V cytoplasmě jde tedy o nekompletní molekulu imunoglobulinu. Diferencovanější B buňky, stále však dosud nezralé, mají v cytoplasmě již kompletní molekulu IgM a tutéž molekulu mají na buněčném povrchu. Zralé B buňky ztrácejí cytoplazmatické molekuly IgM, naproti tomu ale zachovávají IgM na povrchové membráně a vedle něj se na povrchové membráně objevuje také IgD. Všechny právě vyjmenované změny jsou projevem buněčné maturace, probíhající zcela samočinně, bez jakékoliv antigenní stimulace.

Zralé, ale klidové tj. nestimulované, B lymfocyty užívají povrchový IgM jako receptor pro antigen vůči kterému byly svým klonálním původem předurčeny. Pokud jde o výše uvedenou molekulu IgD, její funkce není jasná. Vedle právě jmenovaných povrchových znaků exprimují B buňky na buněčné membráně ještě determinanty MHC systému, a to I. i II. třídy, dále receptory pro Fc fragmenty některých imunoglobulinových tříd. Je zajímavé, že konečná vývojová fáze zralých aktivovaných B buněk, tj. buňka plazmatická, ztrácí sesilní povrchové imunoglobuliny.

2.2.13. Aktivace B buněk

B buňky podobně jako T buňky mohou být stimulovány tj. vyvedeny ze svého klidového stavu a podníceny k tomu, aby se zvětšovaly (blastoidní transformace), aby vyvinuly proteosyntetický aparát, aby se dělily, vyžrávaly v plazmatické buňky a secernovaly protilátky. Na této proměně se podílí vliv interleukinu-6. Odpovídající podnět k těmto dějům může být specifický nebo nespecifický, tj. polyklonální. Specifická aktivace předpokládá přítomnost antigenu odpovídajícího povrchovému receptoru, v případě B buněk představovanému povrchovým imunoglobulinem. Nespecifická aktivace B buněk je navozována podobně jako u T buněk mitogeny.

2.2.14. Antigenní stimulace závislá na T buňkách

Účinná produkce protilátek proti komplexním bílkovinným antigenům vyžaduje podporu ze strany T buněk. Míněny jsou Th buňky, které byly aktivovány specifickým antigenem za pomoci akcesorních buněk. Tyto aktivované T buňky secernují celou řadu lymfokinů, které spolu se specifickým antigenem podnítí B buňky k tomu, aby se vyvinuly v definitivní elementy schopné produkovat protilátky a secernovat je navenek, tj. buňky plazmatické. V průběhu tohoto děje dochází také k přesmyku v produkci imunoglobulinových tříd z části podobné nestimulované maturaci. Neboť i zde z počátku B buňky vytvářejí protilátky typu IgM, zatímco později v rámci primární odpovědi, anebo také v rámci anamnestické reakce převažujícím imunoglobulinovým izotypem je třída IgG a IgA, někdy dokonce i IgE.

2.2.15. Aktivace nezávislá na T buňkách

Některé antigeny se obejdou při stimulaci B buněk bez zprostředkovatelské účasti T lymfocytů, říká se jim T-independentní antigeny a patří sem zejména některé polysacharidové polyméry (např. dextran). Vesměs jde o antigeny relativně nízké imunogenní, vyvolávající protilátkovou odpověď jen ve třídě IgM a obvykle s krátkodobou paměťovou stopou.

2.2.16. Regulace imunitní odpovědi

Dá se říci, že každá imunitní reakce je regulována, což znamená, že co do kvality i rozsahu je výsledkem soupeření mezi vlivy stimulujícími imunitní odpověď a vlivy imunitní odpověď tlumícími. Značná část imunitních problémů nějak souvisí s narušenou regulací. I tak komplexní problémy jako imunotolerance, autoimunita nebo i stárnutí jsou jejím odrazem. Část regulačních mechanismů je vrozených a je geneticky vázána na MHC komplex. Ostatní regulační vlivy vyplývají z pohlaví, věku či nutričního stavu zkoumaného jedince. Dobře je znám vliv těhotenství na útlum některých imunitních projevů. Velmi záleží i na úpravě antigenu, použitém vehikulu (Freundovo adjuvans), způsobu a místu aplikace a samozřejmě na dávce antigenu (imunologická paralýza při nadlimitních dávkách). Uvedené faktory rozhodují i o takových skutečnostech, zda imunitní reakce bude převážně protilátková, nebo buněčná. Mohou ovlivnit i třídu vytvářené protilátky, její vazebnou schopnost a trvání její produkce.

2.2.17. Jerneho teorie sítě

Imunitní odpověď má sklon k určité samoregulaci. Jerne vykládá tento úkaz pomocí své teorie sítě (99). Podle ní každý specifický receptor (idiotyp) na variabilním konci Fab fragmentu může podnítit tvorbu protilátek proti své vazebné formaci, čímž vznikne antiidiotypová protilátka, která pak může zatlačovat produkci protilátky původní (receptoru). Tato úvaha platí nejen pro protilátky, ale i pro imunitu buněčnou. Uvedený fenomén je však nejlépe prostudován na příkladu antiidiotypových protilátek, které vlastně u části případů mohou svými vazebnými vlastnostmi imitovat původní antigen. Jde tedy vlastně o antireceptorové protilátky, které mohou přispět k zabrzdění imunitní odpovědi ve fázi, kdy by hrozilo její přestřelení a vlastně zapojení celého imunitního systému do boje s jediným, třeba i bezvýznamným antigenem. Genetické aspekty imunoregulace jsou nejlépe doloženy pokusy s inbredními kmeny laboratorních živočichů, mezi nimiž mohou existovat překvapující rozdíly, když antigen, který se u jednoho inbredního kmene jeví jako mocně imunogenní, u jiného kmene naopak nevyvolává žádnou odpověď. Úkazy tohoto typu nemají jednotnou

genezu. Mohou být podmíněny např. neschopností vytvořit odpovídající buněčný klon (jakoby byl defekt v receptorovém sortimentu) nebo zdánlivě neúčinný antigen stimuluje více supresorové lymfocyty než lymfocyty imunopotenciační.

V lidské populaci se pochopitelně žádné dokonale inbrední enklávy nevyskytují a k pozorování výše uvedeného úkazu není příležitost. Nicméně některé závislosti pozorované mezi výskytem určitého onemocnění a antigenní skladbou MHC postižených jedinců naznačují podobné závislosti. Nejznámějším příkladem je vazba mezi Bechtěrevovou ankylozující spondylartritidou a MHC determinantou HLA-B27 (225). Geneticky je alespoň zčásti podmíněna i tzv. atopie, tj. náchylnost k ekzémům a alergickým projevům v oblasti dýchacích cest, jež souvisí s neobvyklou skladbou protilátkových izotypů v rámci protilátkové odpovědi. Stigmatizovaní jedinci reagují nadměrnou tvorbou IgE s nedostatečnou tvorbou IgA.

Z hlediska cíle našeho pojednání je zvláště pozorně zvažovanou poruchou imunitní regulace autoimunita jejímž jedním projevem je právě tvorba autoprotilátek. Principiální defekt, tj. neschopnost rozlišovat, co je tělu vlastní a co je tělu cizí struktura, či spíše sklon reagovat na některé tělu vlastní antigeny jako na cizí, může postihnout jak B, tak T buňky. Velmi zajímavým úkazem, který posunuje alespoň některé autoimunní poruchy z výše uvedené oblasti specifické poruchy tolerance do oblasti porušené globální imunoregulace, je pozorování, že nadměrnou nesespecifickou stimulací normálních B lymfocytů lze dosáhnout také tvorby autoprotilátek (39, 83). Podrobněji je tato problematika rozebrána v následující kapitole.

3. Autoimunita

Autoimunitu definujeme jako náchylnost imunitního systému reagovat na antigenní součásti vlastního těla tak, že proti nim sestrojí buď protilátkovou, nebo buněčnou, či obojí odpověď. Je vhodné si hned úvodem ujasnit, že pojmy autoimunita a autoimunitní nemoc se zcela nekryjí. Autoimunita je pojem zřetelně širší, zahrnuje i takové odpovědi, které slouží k likvidaci buněk narušených virovou infekcí, zestárnutím, chemickými vlivy či nádorovou transformací. Autoimunita může tedy sloužit k odstranění trosek po jiných chorobných dějích k likvidaci nádorových buněk či selekci opotřebovaných erytrocytů. Za autoimunitní onemocnění se pokládá jen takový proces, kde se autoimunní pochody významně podílejí na vytvoření tkáňových lézí (161).

Účast lymfocytů na destrukci cílových orgánů i výskyt protilátek reagujících s normálními antigeny vlastního těla svědčí pro poruchu T i B lymfocytů. Co je příčinou selhání schopnosti imunitního systému tolerovat antigeny vlastního těla (Paul Ehrlich označoval tuto toleranci jako obavu ze sebenarušení – horror autotoxicus) je objasněno jen z části (62).

Burnetova teorie imunity nabízí následující výklad (35). Mezi lymfocyty každého jedince se v průběhu embryonálního vývoje nacházejí takové buňky, které mají schopnost reagovat s vlastními tělními antigeny. Tyto nežádoucí lymfocyty jsou však vystaveny velké koncentraci stále přítomných autoantigenů v době, kdy ony lymfocyty ještě nejsou funkčně vyzrálé, což vede k přetížení jejich funkční kapacity a zániku (klonální selekce). Normální jedinec by se tedy měl narodit s imunitním systémem již očištěným od lymfocytů schopných autoagrese. I kdyby tomu tak skutečně bylo, tak nicméně v dalším postnatálním životě může dojít cestou somatické mutace ke změně specificity jednotlivého lymfocytu v tom smyslu, že se u něj de novo manifestuje schopnost reagovat na antigeny tělu vlastní a takový lymfocyt může za podmínek pro něj příznivých dát vzniknout celému autoagresivně reagujícímu lymfocytárnímu klonu. Pro tento klonální charakter autoimunitní odpovědi svědčí průkopnické pozorování, že protilátka charakteristická pro pacienty s Gravesovou–Basedowovou chorobou tj. namířená proti TSH receptoru thyreocytů je uniformní co do lehkých řetězců;

buď jen kappa nebo lambda (265). Při polyklonálním původu by bylo nutno očekávat výskyt protilátkových molekul s oběma typy lehkých řetězců.

Ani po odstupu 47 let nelze tuto Burnetovu teorii prohlásit za překonanou. Představuje však jen jakýsi rámcový popis zkoumaného jevu; poslední desetiletí ji naplnilo podstatně hlubšími pohledy na detaily této problematiky.

3.1. Mechanismus vzniku autoimunitní choroby

Ukazuje se, že autoimunita nemá jednotný mechanismus vzniku, že se na jejím rozvoji podílejí četné mechanismy, které shrnul Shoenfeld pod tato záhlaví (208):

- I. Vlivy genetické
- II. Parciální defekty imunity (deficience IgA, deficience jednotlivých složek komplementu, kvantitativní a kvalitativní defekty T lymfocytů, defekty NK buněk, poruchy v produkci interleukinu-2 a v expresi příslušných receptorů)
- III. Hormonální vlivy: u žen převaha autoimunitních onemocnění a asymptomatického výskytu autoprotilátek, exacerbace autoimunitních onemocnění v průběhu puberty, těhotenství a hormonální antikoncepce.
- IV. Vlivy prostředí: insolace, léky, kouření, infekce.

Přes značný počet uvažovaných faktorů není v Shoenfeldově přehledu zmíněn význam stáří, ačkoli nárůst autoimunitních projevů s věkem je zcela evidentní (30).

Mnohé z vypočítaných faktorů jsou spíše jen činitele modifikující, nebo spouštějící patologický autoimunitní děj, jehož rozvoj by nebyl možný bez přítomnosti principiálních poruch imunoregulačních. Podrobněji je nutno se zmínit o genetických vlivech, dále o polyklonální aktivaci, o poslání antiidiotypových protilátek a o posunech v expresi MHC antigenů.

3.1.1. Geneticky podmíněné poruchy imunoreaktivity

Jde o soubor jevů, jejichž podstata je obtížně vysvětlitelná bez krátké exkurze do imunogenetiky laboratorních zvířat, u nichž jsou mnohé vztahy mezi genotypem a imunologickým fenotypem daleko lépe objasněny než u člověka a to jednak pro rychlou obměnu zvířecích generací, jednak pro možnost plánovaných chovatelských zásahů, jako je vytváření čistých imbredních linií a sledování v jakém stupni se na sebe čisté znaky vážou při rekombinačních pokusech. A tak při pokusech s myšimi chovy zjistil McDevitt a Benacerraf (148), že schopnost reagovat protilátkovou odpovědí na některé syntetické polypeptidy je pod kontrolou genů, které se podařilo podle jejich genetických rekombinačních vlastností lokalizovat do blízkosti genů pro hlavní histokompatibilitní komplex (MHC) označovaný u myši jako systém H₂. Gen odpovědný za schopnost pozitivně odpovídat na zkoušený antigenní podnět byl označen jako Ir (immune response). Protože tvorba protilátek vykazovala jednoznačnou závislost na spolupráci imunopotenciačních lymfocytů (Th), uvažovalo se původně, že Ir gen je odpovědný za expresi receptoru na T buňkách. Když se však dalším výzkumem zjistilo, že jeden z povrchových buněčných antigenů, představujících histokompatibilitní antigen II. třídy, je kódován genem lokalizovaným v téže oblasti, byl tento antigen, považovaný za produkt Ir genu, označen u myši jako Ia antigen (tj. I associated antigen). Tento tehdejší předpoklad se podařilo ověřit až později metodami molekulární genetiky (65). Za definitivní ověření těchto vztahů lze považovat úspěšný přenos pozitivní imunoreaktivity vůči syntetickému polypeptidu a to přenos z myši na polypeptid reagující, na myš jinou – do té doby areaktivní za pomoci klonovaného genu pro MHC II. třídy (131). Předpokládá se, že i u člověka existuje podobná vazba mezi selektivní imunoreaktivitou a genovými produkty MHC komplexu. Tyto produkty se totiž podílejí na přenosu antigenní informace na T lymfocyty v průběhu vytváření imunitní odpovědi. Od pevnosti spojení s MHC proteinem závisí i imunogennost použitého antigenu. O pevnosti uvedeného spojení rozhoduje skladba MHC proteinu a právě zde lze hledat spojovací článek, vysvětlující, proč mezi MHC výbavou daného jedince a jeho schopností reagovat či nereagovat na některé antigenní podněty je určitá spojitost. Stručně řečeno

MHC proteiny na povrchu antigen prezentujících buněk spolurozhodují o tom, s kterým antigenem a v jaké intenzitě budou dané imunokompetentní buňky reagovat a s kterým nikoliv. Tím se otevírá možnost vysvětlit, proč některá onemocnění s autoimunitní patogenezi se váží s určitými histokompatibilními antigeny, např. dermatitis herpetiformis a celiakie se pojí s antigenem HLA-DR3, pemphigus vulgaris a revmatoidní arthritida s HLA-DR4 (49, 57).

Jiné autoimunitní choroby se pojí převážně s determinanty příslušejícími k první třídě histokompatibilních antigenů. Patří sem dobře známá a dnes již i diagnosticky využívaná vazba mezi histokompatibilním antigenem HLA-B27 a sklonem ke vzniku Bechtěrevovy choroby (více než 90% těchto pacientů má uvedený znak pozitivní). Dále sem patří vazba mezi antigenem HLA-B6 na straně jedné a nespecifickou epinefritidou, Sjögrenovou chorobou, Gravesovou–Basedowovou chorobou, insulin dependentním diabetem a chronickou hepatitidou na druhé straně.

Skutečnost, že určitá sada HLA-antigenů nahrává vzniku scestných imunologických reakcí se odráží i v tom, že sourozenci, kteří jsou nositeli takové (chorobnou náchylnost přinášející) soupravy HLA-antigenů, vykazují podobné autoimunitní poruchy (familiární dispozice). Je to dáno tím, že se pravidelně dědí daný haplotyp jako celek. Na témž základě může vzniknout porucha tolerance i proti několika autoantigenům najednou, takže dochází u postiženého jedince ke kumulaci autoimunitních chorob (36, 56, 162, 209).

Pro úplnost musíme podotknout, že vazba autoimunitních chorob na určitou sestavu MHC proteinů je pouze jednou, i když významnou stránkou poruch v této oblasti. Řadí se sem např. i vznik některých selektivních imunodeficiencí (překvapivá neschopnost reagovat na jeden určitý antigen při jinak dobré imunoreaktivitě) jež se vysvětlují tak, že při ustavování imunologické tolerance během fetálního vývoje zanikají také lymfocyty náchylné reagovat s tělu vlastní sestavou HLA-antigenů, čímž vzniknou jakési hiáty v sortimentu lymfocytů, pokud jde o jejich reaktivní schopnosti (96).

3.1.2. Polyklonální aktivace B lymfocytů

Mechanismus polyklonální aktivace lymfocytů lze stručně charakterizovat jako obejití imunopotenciační role T lymfocytů. Za normálních okolností je většina antigenů schopna podnítit imunitní systém k reakci jen přes relativně složitý několikaetapový mechanismus vzájemného předávání vhodně modifikované antigenní informace tj. přes antigen prezentující buňky na T lymfocyty a z nich spolu s příslušným posilujícím podnětem (interleukin-2) na B lymfocyty.

Existují však situace, kdy úloha normálně příslušející imunopotenciačním lymfocytům je nahrazena nespecifickým signálem např. viry (zvláště EB virem), bakteriálními lipopolysacharidy, eventuálně muramylpeptidem B a dalšími. Fenomén polyklonální aktivace B lymfocytů je dobře znám i z experimentu; jde o tzv. adjuvantní nemoc navozenou pouhým Freundovým adjuvans bez přidání jakéhokoliv specifického orgánového antigenu. Jejím hlavním projevem je „adjuvantní arthritida“ (221).

B lymfocyty, jež po takovéto nespecifické stimulaci nabyly patogenetického významu v autoimunním dění, mohou mít přinejmenším dvojitý původ. Buď jde o elementy, které unikly během vývoje klonální selekci a při dostatečně intenzivní nespecifické stimulaci mohou i ojedinělé elementy dát vzniknout dostatečně objemnému patogeneticky účinnému klonu. Druhým zdrojem autoimunně reagujících B lymfocytů jsou somatické mutace V genu, tj. genu pro variabilní oblast imunoglobulinu. Tyto mutace jsou usnadněny v době zvýšené mitotické aktivity B lymfocytů navozené antigenní stimulací při infekci apod. (21, 73, 256).

Z řečeného však vyplývá, že i při uplatnění mechanismu polyklonální aktivace nakonec převládne jeden buněčný klon, takže výsledná protilátková odpověď o podílu aktivace polyklonální nic nevypovídá (74).

Mutací v život vyvolaný klon však ještě nemusí pro organizmus představovat osudovou nehodu. Ze zkušenosti je známo, že např. u poinfekční thyreoiditidy de Quervainovy se mohou dočasně objevit protilátky proti štítné žláze, které ale za čas vymizí a imunitní systém je znovu náležitě vyladěn.

Podmínkou tohoto znovunabytí rovnováhy je normálně fungující systém supresorových T lymfocytů.

3.1.3. Porucha obranného mechanizmu antiidiotypových protilátek

V kapitole, týkající se obecných imunologických pojmů, již bylo vyloženo, že imunoglobulin se sám může stát antigenem a vyvolat tvorbu protilátek. Na uvedeném místě bylo také zdůrazněno, že pravidelně k tomu dává podnět jen Fc fragment. Někdy se ale antigenním podnětem také může stát charakteristické uspořádání polypeptidového řetězce na Fab fragmentu, tedy v místě schopném vázat antigen. Jde tedy také o protilátku proti protilátce, ale tentokrát nikoliv proti jejímu izotypu (Fc), ale proti jejímu idiotypu. Poprvé byly tyto antiidiotypové protilátky popsány v pokusech s imunizací králíků imunoglobulinem M získaným od pacientů s chladovými aglutininy (260). Překvapující bylo zjištění, že takto získaná antiidiotypová protilátka reagovala s chladovými aglutininy ode všech podobně postižených pacientů bez ohledu na to, že aglutinin vznikl jako reakce na červené krvinky nejrůznějších krevních skupin. Tato dokonalá podobnost uvedených chladových protilátek (jev souborně označovaný jako zkříženě reagující idiotypy) není výlučným rysem choroby z chladových aglutininů; vyskytuje se i u jiných onemocnění jako myasthenia gravis (protilátka proti acetylcholinovým receptorům) u revmatoidního faktoru i u anti DNK protilátky, provázející subakutní lupus erythematoses (194).

Existence zkříženě reagujících idiotypů vyvolala mnoho dohadů o mechanismu jejich vzniku, přičemž převážná většina autorů se přiklání k názoru, že jde o projev společné geneticky podmíněné dispozice k tvorbě těchto protilátek. Že genetický defekt těmto pacientům společný, a až dosud latentní, pouze potřeboval ke své manifestaci nějaký nespecifický podnět (například virovou infekci). Čili společné rysy nacházených protilátek nejsou odrazem stejné vyvolávající příčiny, ale stejného genetického defektu. Zajímavým příspěvkem na podporu těchto geneticky orientovaných teorií je zjištění, že pacienti postižení SLE mají ve svém příbuzenstvu osoby, v jejichž séru jsou imunoglobuliny se zkříženě reagujícími idiotypy, přitom však nemají protilátkovou DNK aktivitu (81).

Další výzkum ukázal, že u četných autoimunitních chorob se vyskytují spontánně antiidiotypové protilátky, které jsou namířeny proti idiotypům patologických autoproti látek. Autoproti látky jsou jimi zřejmě blokovány ve své účinnosti, neboť se vzestupem titru antiidiotypových protilátek dochází (překvapivě, ale ve skutečnosti logicky) k útlumu chorobné aktivity autoimunitního děje (128, 224). Imunolog teoretik může v těchto pozorováních vidět potvrzení Jerneho teorie, týkající se regulace imunního děje. Tato teorie přisuzuje v imunoregulaci právě antiidiotypovým protilátkám rozhodující a to tlumivou roli (98).

3.1.4. Aberantní exprese histokompatibilitních antigenů

Mezi doplňující poznatky, upravující Burnetovu teorii, patří také zjištění, že prekursor lymfocytu recentně vytvořený v kostní dřeni nemá na svém povrchu vůbec žádnou receptorovou strukturu pro antigenní podněty a je tedy v tomto směru inertní.

Receptorové struktury pro antigeny exprimují na svém povrchu teprve během zrání v thymu (213), kde se také setkává se zde přítomnými (nebo s krví došlými) antigeny a teprve zde dochází u T lymfocytů v období jejich neúplné zralosti (tj. receptor je již exprimován, buňka schopná reagovat, není však dosud plně vybavena) k eliminaci potenciálně autoreaktivních elementů (151). Toto očištění od autoreaktivních elementů však nemůže být dokonalé. V thymu prodlévající lymfocyty nemají totiž příležitost potkat všechny autoantigeny a to proto, že jen některé normální tělní antigeny jsou v thymu trvale přítomny (myoidní buňky, epitel Hassalových tělísek) nebo tam proniknou z oběhu. Navíc některé antigenní struktury nejsou v období nejintenzivnější aktivity thymu ani vytvořeny (spermie). Za této situace budí spíše podiv ani ne tak to, že autoimunní choroby vznikají, jako spíše to, že nejsou častější. Jednou z okolností, které vzniku autoreaktivity zabraňují je tzv. MHC restrikce imunopotenciačních T lymfocytů. Restrikce spočívá, jak již stručně nastíněno v úvodní kapitole v tom, že imunopotenciační lymfocyty nejsou schopné imunitní odpovědi, pokud jim antigenní podnět není prezentován akcesorní buňkou současně s příslušným histokompatibilitním antigenem z II. třídy (HLA-D). Tento antigen je však

normálně exprimován jen omezeným počtem tělních buněk a to makrofágy, Langerhansovými buňkami, dendritickými buňkami a B lymfocyty (238).

Zajímavé však je, že se antigeny MHC komplexu dají prokázat na povrchu buněk těch orgánů, které jsou postiženy v rámci některého autoimunitního onemocnění (26). Exprese histokompatibilního antigenu tyto buňky učinila schopnými stimulovat imunopotenciační T lymfocyty (jsou potom schopny zastoupit antigen prezentující buňky). Současně je učinila zranitelnými, samy si přivolávají poškození takto atypicky nastartovaným dějem (138).

Zajímavým zjištěním v této souvislosti je skutečnost již jednou připomenutá v předchozí kapitole, že interferon gama, vznikající při různých virových onemocněních, je schopen expresi MHC antigenů na povrchu buněk, jinak tento antigen neexprimujících, podnítit (229); lze tak alespoň vysvětlit nepříznivý účinek banálních infekcí na manifestaci nebo exacerbaci některých autoimunitních chorob.

Všechny uvedené poznatky, umožňující poněkud nahlédnout do nitra narušeného imunitního děje, byly získány převážně prostředky molekulární genetiky. Uvádíme je jen proto, aby neunikala naší pozornosti složitost této problematiky. Náš metodický přístup nedovoluje nic jiného, než zachytit některé výsledné stavy této poruchy (přítomnost autoprotilátky), ke studiu podstaty těchto dějů není schopen přispět.

3.2. *Klasifikace autoimunitních chorob*

- Endokrinní orgánově specifické autoimunitní choroby:
 - Nadledvinka: Addisonova choroba
 - Ovaria: předčasná ovariální hormonální nedostatečnost (premature ovarian failure)
 - Langerhansovy buňky pankreatu: inzulín–rezistentní diabetes mellitus
 - Příštítná tělíska: hypoparathyreóza
 - Štítná žláza: Hashimotova autoimunní thyreoiditis; Gravesova–Basedowova choroba; primární myxedém

- Systémové autoimunitní choroby („skupina lupusu“):
 - Lupus erythematosus disseminatus
 - Smíšená pojivová choroba
 - Léky–indukovaný lupus erythematosus
 - Sjögrenův syndrom
 - Sklerodermie/CREST syndrom (kalcinóza, Raynaudův fenomén, ezofageální dysfunkce, sklerodaktylie a teleangiektazie)
 - Dermatomyositis/polymyositis
 - Rheumatoidní artritida

- Orgánově specifické autoimunitní choroby:
 - Játra:
 - Autoimunitní chronická aktivní hepatitida
 - Primární biliární cirhóza
 - Svaly:
 - Myasthenia gravis
 - Krev:
 - Autoimunitní hemolytická anémie

- Autoimunitní leukopenie
- Autoimunitní trombocytopenie
- Gastrointestinální trakt:
 - Atrofická autoimunitní gastritida (spojená s perniciózní anémií)
 - Ulcerózní kolitida
 - Crohnova choroba
 - Enteropatie (např. gluten senzitivní enteropatie – celiakální sprue)
- Nervový systém:
 - Demyelinizační choroby (např. roztroušená mozkomíšní skleróza, amyotrofická laterální skleróza, senzomotorická neuropatie)
 - Paraneoplastické syndromy
 - Lambert–Eatonův paraneoplastický syndrom
- Ledvina:
 - Goodpastureův syndrom
 - Imunokomplexové glomerulonefritidy
- Kůže:
 - Pemfigus vulgaris
 - Bulózní pemfigoid
 - Jizevnatý pemfigus
 - Dermatitis herpetiformis
 - Vitiligo
- Ostatní autoimunitní choroby:
 - Wegenerova granulomatóza
 - Spontánní ženská neplodnost

3.3. *Nosologie imunopatologických onemocnění štítné žlázy – (autoimunitní choroby štítné žlázy – AITD)*

V každém souborném pojednání o imunologických onemocněních mají důležité místo autoimunitní onemocnění štítné žlázy (autoimmune thyroid diseases – AITD). Jsou to nejběžnější orgánově–specifické autoimunitní poruchy, které mají za následek dysfunkci (hyperfunkci, hypofunkci, nebo obojí) štítné žlázy. Autoimunitní thyreoidní choroba se rozvine, jestliže v imunitním systému selže tolerance k vlastním antigenům štítné žlázy. Dva dost časté autoimunitní thyreoidní stavy jsou Gravesova–Basedowova choroba (GD) a Hashimotova thyreoiditida (HT). HT a GD představují přes 30 % všech orgánově–specifických autoimunitních poruch. HT je nejběžnější orgánově–specifická autoimunitní choroba, ovlivňující asi 3 % obyvatelstva převážně staršího věku (254).

Nyní přijatá klinická klasifikace autoimunitních chorob štítné žlázy zahrnuje následující položky (50, 178, 211):

- Hashimotova thyreoiditida (lymfomatózní struma, chronická autoimunitní lymfocytární thyreoiditida, lymfadenoidní struma)
- atrofická autoimunitní thyreoiditida (primární myxedém)
- asymptomatická subakutní lymfocytární thyreoiditida:
 - sporadická forma
 - poporodní forma (PPT)
- Schmidtův syndrom (autoimunitní Addisonova choroba (adrenalitida) ve spojení s autoimunitní thyreoiditidou)
- Gravesova–Basedowova choroba (difúzní toxická hyperplazie)

3.3.1. Hashimotova thyreoiditida (HT)

Hashimotova thyreoiditida (HT) byla prvním onemocněním, u kterého byly spolehlivě prokázány vztahy mezi výskytem specifických protiorgánových protilátek (proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze) na straně jedné a nosologicky jednoznačně definovanou chorobou na straně druhé. Hashimotova thyreoiditida je charakterizována klinickou manifestací hypothyreózy a difúzní

uzlovitou strumou. Histologická diagnóza HT byla poprvé popsána japonským chirurgem pracujícím v Berlíně, Hakaru Hashimotem; pozorování publikoval v roce 1912 (84). Jeho zpráva byla založena na vyšetření 4 operovaných případů štítné žlázy, u nichž popsal lymfocytární infiltraci, fibrózu, epiteliální buněčnou atrofii, a eozinofilní změny v některých buňkách štítné žlázy. Tuto poruchu nazval jako struma lymphomatosa. Etiologie Hashimotovy thyreoiditidy není známá. Prvním náznakem, že nejde jen o morfologickou zvláštnost bylo zjištění, že hladina gama globulinu je u tohoto onemocnění skoro pravidelně zvýšena (69). V roce 1956 Witebsky a Rose publikovali své pozorování, že se jim podařilo forsírovanou imunizací extraktem ze štítné žlázy ve směsi s Freundovým adjuvans vyvolat u králíků ložiskovou thyreoiditidu a zároveň, že u těchto živočichů došlo k výskytu antithyreoidních autoprotilátek (261). Ve stejném roce se zdařil první úspěšný průkaz precipitujících protilátek proti thyreoglobulinu metodou dvojité difuze v agaru (196), případně prostou precipitací (262), později také metodou precipitace taninovaných erytrocytů povlečených thyreoglobulinem (72). Dále významně k tomu přispělo zavedení dvoustupňové imunofluorescenční metody (NIF) a její použití k detekci cirkulujících autoprotilátek namířených proti patogeneticky důležitým antigenům štítné žlázy. Bylo tak možno naráz, díky odlišné tkáňové distribuci příslušných antigenů, z jediného preparátu hodnotit přítomnost autoprotilátek jak proti koloidu, tak proti epitelu štítné žlázy (91, 259).

Po zavedení imunofluorescenční metody se podařilo prokázat imunohistologicky, že precipitující faktor v séru případů s vysokým titrem protilátek proti thyreoglobulinu se váže na obsah foliklů za vzniku nehomogenního skvrnitě–vláknitého fluorescenčního obrazce (obr. 1) (23).

Důležitější je další protilátka, rovněž imunofluorescenční metodou prokazatelná, a to ta, která se v komplementfixační reakci spojuje s mikrosomální frakcí tkáňového homogenátu štítné žlázy. Tato protilátka dává pozitivní reakci se žlázovým epitelem foliklů a je zřejmě tatáž, která je odpovědná za cytotoxické působení na tkáňové kultury embryonální štítné žlázy (188). Už před dvaceti léty se podařilo blíže specifikovat antigen, se kterým daná protilátka reaguje – je zřejmě namířena proti peroxidáze thyreocytů – thyreoperoxidáza (82). Tento

antigen je imunofluorescenčně lokalizován v apikální části folikulárních buněk (obr. 2) (189).

Ačkoli 95 % pacientů s Hashimotovou thyreoiditidou jsou ženy, princip vlivu pohlaví zůstává nejasný (177). Zvířecí studie ukázaly, že testosteron potlačuje a estrogen obnovuje experimentální autoimunitní thyreoiditidu indukovanou imunizací, nebo thymektomií, a že kastrace samičích zvířat zvyšuje agresivitu autoimunitní thyreoiditidy (11, 171). Expresí estrogenových receptorů na thyreoidních buňkách ukazuje, že thyreocyty mohou být přímo ovlivněny pohlavním hormonem (41).

Makroskopicky je štítná žláza symetricky zvětšená a tuhá, její povrch je hrbolatý nebo nepravidelný. Na řezu je štítná žláza uzlovitá a bledá.

Histologický obraz autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy rozdělujeme na dvě formy – fokální a difúzní, podle intenzity lymfocytární infiltrace a stupně poškození parenchymu štítné žlázy. Difúzní lymfocytární thyreoiditida (tj. klasická HT) je charakterizována masivní difúzní lymfocytární infiltrací s tvorbou zárodečných center (obr. 3). Thyreoidní folikly jsou zmenšené a obsahují rozptýlený koloid. Projev fibrózy parenchymu štítné žlázy dosahuje různého stupně. Ačkoli folikly jsou malé, jednotlivé thyreoidní buňky jsou často zvětšené a obsahují cytoplazmu, která je zrnitá a růžová (oxyfilní změny); Takové metaplastické buňky jsou známé jako Askanazy/Hürthleho buňky. Plazmatické buňky, histiocyty a intrafolikulární mnohojaderné obrovské buňky mohou být přítomny.

Fokální lymfocytární forma je morfologicky charakterizována menším stupněm lymfocytární infiltrace, velmi ojediněle s tvorbou zárodečných center a menší intenzitou destrukce parenchymu štítné žlázy, než klasická forma (obr. 4). Diagnóza FLT je přítomna u 5 až 20 % pitev dospělých a je častější u starších žen (135). Makroskopicky je štítná žláza obvykle normální velikosti. Náhodně mohou být ve štítné žláze nalezeny uzlovité struktury.

Fokální a difúzní forma lymfocytární thyreoiditidy jsou v podstatě identické autoimunitní choroby jen s kvantitativními rozdíly. Fokální thyreoiditis se morfologicky jeví jako neúplná varianta difúzní formy, stejné antithyreoidní autoprotilátky se vyskytují v sérech pacientů jak s fokální, tak s difúzní

thyreoiditidou. Patofyziologická podobnost mezi difúzní a fokální thyreoiditidou může být manifestována klinicky. Přítomnost cirkulujících antithyreoidních protilátek je odraz přítomnosti zánětu štítné žlázy, a vysoké titry autoprotilátek naznačují rozsah zánětu štítné žlázy. Na druhé straně, pouhá přítomnost antithyreoidních protilátek nemusí být klinicky manifestní, protože většina případů zánětu štítné žlázy je fokální a asymptomatická, a projev fokální léze může vykazovat slabou tendenci postupu do klinicky se projevující choroby, například tvorbou strumy (79).

Zavedení imunologických metod také dovolilo objasnit některé dříve neřešitelné problémy jako byla morfologická klasifikace málo výrazných ložiskových změn štítné žlázy charakteru lymfocytárních infiltrátů, které nabyly na významu teprve poté, co se zjistilo, že jejich přítomnost je provázána autoimunitními fenomény, i když kvantitativně mnohem slabší intenzity než HT. Od té doby byly tyto projevy označovány jako fokální lymfocytární thyreoiditida, začleněny do všech morfologických klasifikací chorob štítné žlázy (264). I pozdější klasifikace se naznačeného dělení přidržely (19, 135, 257). FLT je zřejmě morfologickým projevem symptomatické subakutní lymfocytární thyreoiditidy.

U atrofické (fibrózní) varianty autoimunitní thyreoiditidy (tj. terminálního stadia Hashimotovy thyreoiditidy) je štítná žláza malá a značně tuhá, větší část parenchymu je kompletně nahrazena jizevnatou fibrózní tkání. Lymfocytární infiltrace je přítomna jen v zachovalých částech štítné žlázy, potvrzující zánětlivý charakter procesu. Kolem 10 % pacientů s chronickou autoimunitní thyreoiditidou má atrofickou štítnou žlázu, která reprezentuje konečné stadium Hashimotovy thyreoiditidy (237).

Další morfologické změny které mohou být nalezeny u HT zahrnují dlaždicobuněčnou metaplazii folikulárních epiteliálních buněk (dost často patrnou ve fibrózní variantě) a intrathyreoidní cesty, které jsou vystlané buď dlaždicobuněčným nebo řasinkovým respiračním epitelem.

Hashimotova thyreoidita může být na autoimunitním základě spojená s lymfocytární infiltrací jiných orgánů, jako je lymfocytární adrenalitis

(kombinace známá jako Schmidtův syndrom) a lymfocytární intersticiální pneumonitis (36, 107).

3.3.2. Asymptomatická (bezbolestivá) subakutní lymfocytární thyreoiditida

Asymptomatická subakutní lymfocytární thyreoiditida se nejčastěji objevuje převážně v poporodním období, ale může se vyskytovat i sporadicky (50). Proto se asymptomatická lymfocytární subakutní thyreoiditida člení do dvou skupin: poporodní thyreoiditida a sporadická thyreoiditida. Tuto autoimunitní chorobu je nutné nozologicky rozlišit od subakutní bolestivé granulomatózní thyreoiditidy (de Quervainova thyreoiditida), která je klinicky a morfoloogicky značně odlišná.

Asymptomatická subakutní lymfocytární thyreoiditida je klinický syndrom, který se manifestuje přechodnou thyreotoxikózou, jež je následována přechodnou hypothyreózou. Je to autoimunitní choroba, která je charakterizována zvýšeným titrem autoprotilátek proti thyreoperoxidáze (TPOAb) a thyreoglobulinu (TgAb) (149).

3.3.2.1. Poporodní thyreoiditida (PPT)

Poporodní thyreoiditis (PPT) je přechodná postpartální thyreoidní dysfunkce spojená s autoimunitní thyreoiditidou; její průběh je charakterizován třemi fázemi: počáteční přechodnou hyperthyreózou, která je následována přechodnou hypothyreózou a nakonec s návratem do euthyreoidního stavu, během prvního roku po porodu. Hyperthyreózní stav předcházející hypothyreózní fázi se objevuje mezi 2. a 6. měsícem postpartálního období. Hypothyreózní fáze se projevuje kdykoliv mezi 3. a 12. měsícem po porodu. Přetrvávající hypothyreóza, trvající déle než 1 rok po porodu, již nemůže být hodnocena jako PPT a je klasifikována jako chronická (216). Ženy s anamnézou PPT mají zvýšené riziko rozvoje permanentní hypothyreózy v následujících 5–10 letech. Poprvé byl tento jev popsán v roce 1948 praktickým lékařem z Nového Zélandu Robertsonem (195).

Další klinické případy podrobně popsal až Amino et al. u 6 žen se známkami lehké hypothyreózy 3–4 měsíce po porodu (8). Prevalence PPT je 7,5 %, kolísající od 1,1 do 21,1 % (158). Důležitými autoprotilátkami vyskytujícími se u PPT jsou ty, které jsou zaměřeny proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze. Přítomnost druhé z nich byla popsána jako významnější rizikový faktor pro rozvoj PPT: kolem 70% žen u kterých se během těhotenství vyvine PPT má pozitivní protilátky proti thyreoperoxidáze (120, 184). Ženy, které mají pozitivní thyreoidní protilátky v prvním trimestru těhotenství, mají o 33 – 50 % větší riziko rozvoje postpartální thyreoiditidy, než protilátkově negativní ženy (80, 125, 127, 252). Vyšší titer thyreoidních protilátek, znamená větší pravděpodobnost, že se PPT projeví (215). Přibližně 2/3 žen, které měly epizodu postpartální thyreoiditidy v minulosti, mohou mít recidivu v následujícím těhotenství (126).

Výskyt spontánních post–potratových thyreoiditid byl rovněž popsán, ale jeho frekvence zůstává neznámá (144, 146, 187, 217).

3.3.2.2. Sporadická lymfocytární thyreoiditida

Sporadická thyreoiditida je porucha štítné žlázy, která je klinicky velmi podobná postpartální thyreoiditidě kromě toho, že se může vyskytovat nejen u žen, ale i u mužů v každém věku. Může se opakovat, ale příčina recidiv není známa. Asi 20% z těchto případů se vyvine v chronickou hypothyreózu (165).

Histologicky mohou mít pacienti fokální nebo difúzní formu chronické thyreoiditidy. Destrukce folikulárních buněk a hyperplastické změny folikulů štítné žlázy jsou hlavním histologickým nálezem této choroby. Biopsie štítné žlázy při spontánní thyreoiditidě se histologicky příliš neliší od mikroskopického nálezu u pacientek s poporodní thyreoiditidou (153, 154, 166). V současné době je postpartální a sporadická thyreoiditida řazena do stejné kategorie – jedná se o subakutní varianty chronické autoimunitní thyreoiditidy (86). U postpartální thyreoiditidy se počítá se zvýšenou imunoreaktivitou v době těhotenství a po porodu (9).

3.3.3. Gravesova–Basedowova choroba (GD)

K imunopatologickým onemocněním štítné žlázy patří také Gravesova–Basedowova choroba, která je klinicky a morfolologicky odlišná od Hashimotovy thyreoiditidy. Gravesova–Basedowova choroba se klinicky projevuje hyperthyreózou, difúzní strumou, oftalmopatií, a pretibiálním myxedémem. Je nazvána po irském lékaři Gravesovi, který poprvé publikoval její klinický popis v roce 1835 (77) a německém chirurgovi von Basedowovi, který v roce 1840 popsal klinickou triádu: exoftalmus, struma a tachykardie (246). Téměř 50 let po Gravesově popisu byla zvýšená produkce thyreoidních hormonů označena jako příčina choroby. V roce 1956 Adams a Purves popsali v séru pacientů s Gravesovou–Basedowovou chorobou abnormální protein stimulující proliferaci a hormonální funkci štítné žlázy, nazvaný LATS (long–acting thyroid stimulator) (1). Později se ukázalo, že jde o imunoglobulin ze třídy IgG (převažně IgG₁ podtřída) (249, 250), a že jeho protilátková specificita je zacílená na antigen receptorů pro thyreoideu–stimulující hormon (TSHR–Ab) (116). Tyto receptory jsou situovány na buněčné membráně folikulárních buněk štítné žlázy (190, 193). Od této doby je Gravesova–Basedowova choroba klasifikována jako choroba autoimunitní. Prevalence TSHR protilátek u GD je přibližně 95 % (244).

Gravesova–Basedowova choroba se patomorfologicky standardně vyznačuje folikulární hyperplazií, nerovnoměrnou lymfocytární infiltrací štítné žlázy, ne tak masivní jako u Hashimotovy thyreoiditidy, příležitostně s tvorbou lymfoidních zárodečných center (12). Většina autothyreoidních T lymfocytů infiltrujících štítnou žlázu jsou CD4⁺ Th2 buňky, ačkoli buňky typu Th1 jsou také přítomny (201).

U obou GD a HT mohou být přítomny podobné nálezy, včetně lymfocytární infiltrace štítné žlázy a anti–Tg a anti–TPO autoprotilátky v séru. Klinické projevy mohou také kolísat mezi oběma poruchami. To může vést k předpokladu, že HT a GD mohou mít podobnou patogenezu.

3.4. *Protilátky proti thyreoglobulinu (TgAb)*

Protilátky proti Tg byly prvními autoprotiilátkami detegovanými u AITD (196). Thyreoglobulin je zrnitý, homodimerický glykoprotein, molekulární hmotnosti 660 kDa. Každá jeho subjednotka zahrnuje 2748 aminokyselin a obsahuje 4 hormonogenní místa lokalizovaná na konci (141). Hormony štítné žlázy thyroxin (T4) a 3,5,3' trijodthyronin (T3) jsou syntetizovány z tyrozinových zbytků thyreoglobulinu v epiteliálních buňkách štítné žlázy. Thyreoglobulin samotný není biologicky aktivní, a tvoří kolem 75 % celkového proteinu v lumen folikulů štítné žlázy. Hormony T3 a T4 jsou uvolněny poté, co thyreoglobulin je endocytován a proteolyticky rozložen v thyreocytech (263).

U AITD je většina protiilátkové aktivity soustředěna v IgG třídě (60% je IgG₄, a IgG₁ je další častou podtřídou) a jenom okolo 1% je v IgM (150, 248, 249). Burek a Rose ukazují, že Tg protiilátky jsou pravděpodobně prvním autoimunním markerem, teprve po něm následuje tvorba protiilátek proti thyreoperoxidáze. Od týchž autorů pochází zjištění, že děti s juvenilní Hashimotovou thyreoiditidou mají většinou Tg protiilátky samotné (34). Nicméně mnozí AITD pacienti nevykazují zvýšený titer protiilátky proti Tg (167). Protilátky proti thyreoperoxidáze se zdají mít bližší vztah k thyreoidní dysfunkci (87, 167, 243). Protilátky proti Tg se nacházejí nejčastěji v sérech pacientů s Hashimotovou thyreoiditidou (76%), dále s primárním myxedémem (72%), hyperthyreózou (33%), koloidní strumou (8%) nodulární strumou (8%), adenomem (28%), a karcinomem štítné žlázy (13–65% v souvislosti s histologickým typem). Protilátka proti thyreoglobulinu je také detegována u pacientů s jinými autoimunitními endokrinopatiemi, jako jsou perniciozní anémie (27%), Addisonova choroba (28%) a inzulin dependentní diabetes mellitus (20%) (34).

Protilátka proti Tg je detegována především RIA (radioimunoanalýza), IRMA (imunoradiometrická analýza) a enzymoimunoanalytickou metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), a ostatními metodami, jako je pasivní aglutinační metoda TRCA (tanned red cell hemagglutination assay) (27) a nepřímá imunofluorescence (NIF) (34, 63, 124).

3.5. *Protilátky proti thyreoperoxidáze (TPOAb)*

Jde o protilátku v minulosti známou jako antimikrozomální tj. protilátku proti „mikrozomálním komponentám“ folikulárních buněk štítné žlázy. Termín antithyreoperoxidázová protilátka byl poprvé použit v roce 1959 (20). TPO je membránově-vázaný 107 kDa protein s hem prostetickou skupinou (207), hlavní enzym je zapojen do mnohonásobných kroků thyreoidní hormonální syntézy, při které katalyzuje oxidaci jodu na tyrozinových zbytcích thyreoglobulinu (51). Tento antigen je imunofluorescenčně lokalizován v apikální části folikulárních buněk (189). V roce 1985 byl thyreoidní mikrozomální antigen identifikován jako thyreoperoxidáza – TPO (45). A v roce 1987, molekulárním klonováním cDNA pro thyreoidní mikrozomální antigen potvrdili jeho identitu jako TPO další autoři (133, 207). Protilátka proti TPO je u AITD polyklonální, převážně třídy IgG, a může být nalezena ve všech čtyřech IgG podtřídách. Existují také TPO protilátky typu IgA s mnohem nižšími hodnotami, než IgG (207).

TPO protilátky mohou být detegovány pomocí komplement fixační metody, nepřímou imunofluorescencí (NIF), RIA, IRMA a ELISA (38, 143, 179, 243).

Otázka role TPO protilátek v patogenezi hypothyreózy je kontroverzní; Jako protilátka, která se váže na katalytická místa může inhibovat enzymovou aktivitu, jež příležitostně může mít za následek hypothyreózu (112, 251). Navíc, na rozdíl od Tg může jako komplement–fixační protilátka zprostředkovat tkáňové poškození štítné žlázy (108). Je dobrá korelace mezi titrem TPO protilátek, histologickou thyreoiditidou a stupněm thyreoidní tkáňové destrukce (189, 243). TPO protilátky jsou zřejmě patogenetické, protože jsou přítomny u většiny pacientů s Hashimotovou thyreoiditidou a korelují s aktivní fází choroby. Detekce protilátek proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze je proto používána při stanovení diagnózy autoimunitních chorob štítné žlázy. Skutečně nález TPO protilátek v raném stádiu těhotenství má schopnost předpovědět postpartální thyreoiditidu (245).

3.6. Vlivy životního prostředí a genetické aspekty thyreoidální autoimunity

3.6.1. Faktory životního prostředí

Thyreoidní autoimunní choroby (AITD) jsou považovány za polygenetické multifaktoriální poruchy vyplývající z kombinace mnohočetných genetických vloh a faktorů prostředí. Sklon k vývoji AITD je ovlivněn oběma činiteli.

Činitelé prostředí indukující autoimunitní choroby zahrnují jód (199), léky – amiodaron (234), IFN-alfa (172), kouření (71, 242) a infekční organismy (230, 186). To ukazuje, že protilátky tvořené jako odpověď na určitá infekční agens (např. *Yersinia enterocolitica*) mohou také reagovat s lidskými buněčnými proteiny, kvůli jejich strukturální podobě (mechanismus molekulární podobnosti – molecular mimicry) (3, 16, 44). Mezi faktory urychlující, nebo predisponující ke vzniku z AITD patří i stres (122, 147).

Experimentálně bylo potvrzeno, že je jód považován za důležitého zevního činitele zvyšujícího riziko vzniku thyreoidní autoimunity. U pokusných zvířat urychluje vysoký přívod jódu modelovou autoimunitní thyreoiditidu (15, 156, 191, 198).

3.6.2. Genetické faktory

Podezření na genetickou závislost autoimunitních thyreoidních chorob je podporováno výsledky studia dvojčat a zvýšeným výskytem AITD v některých rodinách (familiární predispozice) (31, 140). Asi u 10 až 20 % případů Gravesovy–Basedowovy choroby lze pozorovat familiární výskyt, ale většině případů se GD vyskytuje sporadicky (89).

Specifické geny byly vyšetřeny u AITD, včetně MHC genů, histokompatibilních leukocytárních antigenových (HLA) genů, genů cytotoxického T leukocytárního antigenu–4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 – CTLA-4) a jiných. Geny mohou ovlivňovat chorobu dvěma způsoby: buď samy spouštějí chorobu, nebo zvyšují citlivost jedinců k rozvoji choroby.

Několik kontrolních studií demonstrovalo spojitost HLA třídy II. MHC–HLA alely u GD a HT a „linkage“ analýza potvrdila tuto asociaci (5). Specifická

role MHC–HLA genového komplexu u AITD zůstává nejasná a nemůže být nosograficky – specifická (255). Nejen tyto, ale i další MHC antigeny HLA třídy II., včetně antigenu smrtícího receptoru (DR), jsou v podezření, že jsou aberantně exprimovány jak thyreoidními folikulárními buňkami, tak aktivovanými lymfocyty u pacientů s Gravesovou–Basedowovou chorobou (89).

CTLA–4 je lymfocytární buněčný povrchový receptor, člen imunoglobulinové superrodiny, původně objevený při pátrání po molekulách, jež hrají roli v T buněčné cytotoxicitě (32, 48). Ačkoli byla původně identifikovaná jako cytolytická T–buněčná přidružující molekula, její exprese byla rozeznána s použitím monoklonálních protilátek u obou aktivovaných CD4 a CD8 buněčných populací, stejně jako v B buňkách s použitím monoklonálních protilátek (180, 121). CTLA–4 lokus je umístěn na chromozómu 2q33 a také byl zahrnut do patogenezy obou GD a HT (17, 94, 114, 255).

Genetické vlivy MHC–HLA a CTLA–4 se tedy významně podílejí na patogenezi AITD, ale zatím je nedostatečně vysvětlen rozsah genetického příspěvku k jednotlivým jmenovitým poruchám.

3.7. Patogeneza Hashimotovy thyreoiditidy

Patogeneze Hashimotovy thyreoiditidy je komplexní proces se zjevnou autoimunitní buněčnou a humorální imunitní odpovědí.

Autoimunitní proces, který vede k rozvoji HT pravděpodobně začíná aktivací CD4+ T lymfocytů, specifických pro thyreoidní antigeny (50, 253, 254). Mechanismus iničiální aktivace T buněk dosud není znám. Předpokládá se, že patogeny infekce, obsahujícími protein podobný thyreoidnímu proteinu (molecular mimicry – molekulární podobnost (3)) může být příčinou aktivace specifických–antithyreoidních T buněk (230). Jednou aktivované autoreaktivní CD4+ T lymfocyty přitahují cytotoxické CD8+ T lymfocyty a B lymfocyty ve štítné žláze a přitom stimulují B buňky k sekreci antithyreoidních autoprottilátek (52). Další aktivace imunitní odpovědi může nastat pokud samotné thyreoidní buňky jsou podníceny k expresi MHC molekul třídy II. po aktivaci lymfocytů které vylučují interferon– γ , případně ko–stimulující autoreaktivní populaci T buněk (26, 137).

V rámci HT, aktivované T buňky vykazují převážně Th1 fenotyp a produkují cytokiny spojené se zánětem a s buněčně–zprostředkovanou imunitní odpovědí, jako je interferon gama. U Gravesovy–Basedowovy choroby je chronický autoimunitní stav charakterizován hyperthyreózou a převážně Th2 infiltrátem (201), thyrocyty nepropadají apoptóze, navzdory sdružené expresi Fas a FasL (103). Znamená, to že typ lymfocytární infiltrace může diktovat expresi intracelulárních faktorů, které regulují apoptotickou cestu.

Antigenní stimulace aktivuje CD4+ T pomocné buňky rozdělené do dvou odlišných podpopulací Th1 a Th2 buněk, založených na jejich cytokinovém sekrečním profilu (37, 157, 204). Th1 buňky exprimují IL–2, IFN– γ a TNF– α , které řídí buněčně–zprostředkovanou imunitní odpověď a indukují poškození tkáně aktivací cytolytických buněk, nebo dalších cytotoxických mechanismů. Th2 buňky vylučují hlavně IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10, které podporují humorální odpověď, tj. pomáhají B lymfocytům při specifické imunoglobulinové produkci (25, 134, 157).

Patogenetické mechanismy thyreoidní autoimunity byly podrobně studovány na zvířecích modelech, schopných spontánně vyvinout autoimunitní thyreoiditidu. Taková studia ukázala, že patogeneze thyreoidní autoimunity je vícestupňový proces (203). V časných fázích se uplatňují dva imunitní procesy. Pokud jde o první fázi, zdá se, že zvýšené množství intrathyreoidních antigen prezentujících buněk (APC) je rozhodujícím krokem při nástupu autoimunitní reakce (247). Příliv APC v štítné žláze může být indukován zánětlivými signály, které následují po poškození, nebo nekróze cílových buněk, virovou nebo bakteriální infekcí, nebo jódovým nadbytkem. Změny v metabolismu, nebo v mikroprostředí thyreoidních buněk mohou být rovněž navozujícím faktorem pro kumulaci APC v štítné žláze. Během tohoto raného stadia se APC stěhují a současně prezentují autoantigeny T helper lymfocytům v drénujících lymfatických uzlinách štítné žlázy.

V další fázi lymfocyty vzájemně reagují s přítomnými autoantigeny. Pokud je imunitní tolerance defektní, výsledek tohoto vzájemného působení je aktivace antigen-specifických T pomocných lymfocytů. Tyto buňky střídavě stimulují, prostřednictvím rozpustných cytokinů, jak celulární imunitní odpověď, tak

humorální imunitní odpověď pomocí B lymfocytů. Takže, namísto posílení imunitní tolerance tedy APC generují autoimunitní reakci. Zpočátku se autoreaktivní T lymfocyty a protilátky produkují v lymfatických uzlinách, ale později se lymfoidní tkáň tvoří lokálně v samotné štítné žláze. Thyreocyty mohou také exprimovat MHC molekuly třídy II., které jsou nutné pro prezentaci antigenu CD4+ T buňkám a tak působí jako APC (26, 214). Tato exprese MHC molekul třídy II. na thyreocytech může mít za následek i cytokinovou produkci (IFN- γ) aktivními T lymfocyty infiltrujícími štítnou žlázu (229).

V posledním stádiu se navozené a pomnožené autoreaktivní T a B lymfocyty ve velkém počtu nahromadí a infiltrují parenchym štítné žlázy. Nakonec se štítná žláza proměňuje v jakési bojiště, ve kterém se thyreocyty utkávají s infiltrujícími lymfocyty. Výsledek této bitvy určí klinický fenotyp choroby. Apoptóza v tomto případě hraje významnější roli v koncovém stupni (10, 235).

3.8. Role apoptózy v imunopatologii štítné žlázy

Apoptóza neboli naprogramovaná buněčná smrt (PCD) zahrnuje sukcesivní aktivaci série proteolytických enzymů známých jako kaspázy, které postupně stráví buňky a jejich genetický materiál. Název "apoptóza" (řecky apo = z, ptosis = padat) byl zaveden v roce 1972 badatelem Kerrym a spolupracovníky, kteří popsali zvláštní morfologii fyziologické buněčné smrti (106). Apoptóza je vysoce řízená forma buněčné smrti a hraje centrální roli v dohledu nad počtem buněk ve tkáních během vývoje a nad homeostázou důležitých funkcí, jako je buněčná proliferace a diferenciací (7, 18, 206). Na druhé straně, dysregulace apoptózy může být zapojena do patogeneze některých chorob, jako Hashimotova thyreoiditida, Gravesova-Basedowova choroba a diabetes mellitus typu I. (228).

Kaspázová kaskáda (rodina cysteinových proteáz, která je zapojená v destrukci buněk během apoptózy) je aktivovaná dvěma cestami: smrtícími receptory, nebo mitochondriální cestou. Specifické signály, jako jsou ligandy, které váží smrtící receptory, mají za úkol vynechat růstový faktor a trofické hormony, čímž mohou aktivovat apoptotickou mašinerii. Nejlépe studovaný receptor zprostředkovávající apoptotickou cestu je Fas/FasL (Fas a Fas Ligand)

system. Jsou známy i rozpustné formy Fas (sFas) a FasL (sFasL). Solubilní receptor sFas může inhibovat Fas/FasL interakci a tím ochrání cílové buňky před apoptózou (93). Solubilní forma FasL (sFasL) se uvolňuje po FasL rozštěpu metaloproteinázou, a to předpokládá indukci apoptózy (104).

Fas (také označovaný jako CD95, APO-1) je 45 kDa typ I. transmembránový receptor, který patří do rodiny receptorů ze skupiny tumor nekrotizujícího faktoru (tumor necrosis factor – TNF) (170), zodpovědný za řízení tkáňové homeostázy a imunitní odpovědi (115, 160). Je vylučován různými buňkami hematopoetického a nehematopoetického původu (ve slezině, lymfatických uzlinách, játrech, plicích, ledvinách a ovariích) (115, 129, 160). Extracelulární region Fas obsahuje 3 repeticce bohaté na cystein, zatímco vnitrobuněčná část molekuly zahrnuje sekvenci 70 aminokyselin nazvanou „smrtící doména“, mající schopnost aktivovat vnitrobuněčné smrtící mediátory (115, 160, 220).

FasL (CD95L) je 40 kDa typ II. transmembránový protein, který rovněž patří do rodiny receptorů ze skupiny tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) (223). Ačkoli je hlavně exprimován aktivovanými T a NK–buňkami (160, 183), je exprimován i neutrofily, neurony, thyroocyty, stromálními buňkami sítnice, acinárními buňkami slinných žláz a Sertoliho buňkami myších varlat (67). Membránově vázaná forma FasL může být odloučena metaloproteinázou, a to za současného vzniku rozpustné formy (sFasL), která je méně aktivní v indukci apoptózy. Interakce mezi Fas a FasL spouští na buněčném povrchu Fas molekuly, vedoucí k buněčné smrti. FasL je jedna z hlavních efektorových molekul cytotoxických T buněk a přispívá k eliminaci viry infikovaných, nebo nádorově transformovaných buněk (160). Fas/FasL systém hraje důležitou roli v normální imunitní regulaci při odstranění autoreaktivních T a B lymfocytů na konci imunitních odpovědí (240). Kvůli této centrální roli Fas–FasL systému v regulaci imunitně–zprostředkované cytotoxicity, samotná dysregulace Fas–zprostředkované apoptózy může být nahlížena jako možný hlavní efektor tkáňové destrukce u orgánově–specifických autoimunitních chorob. Normální thyroocyty sice autonomně vylučují funkceschopný Fas (13, 102, 152, 227), ale v dosti malém, relativně neškodném množství FasL (152), které není dostačující k

navození apoptotické odezvy (75, 218). Teprve následující thyreoidní zánět v rámci celulární a humorální autoreaktivity indukuje zánětlivé cytokiny vycházející z aktivovaných makrofágů a T lymfocytů k masivní Fas nadprodukcii v thyreoidních buňkách. Čerstvě izolované thyreocyty z HT pacientů silně exprimují Fas a FasL, jejichž hodnoty jsou zvýšené během aktivní fáze HT (218, 219). Současná, simultánní exprese Fas a FasL má za následek thyreocytární apoptózu a progresivní destrukci štítné žlázy (53). Tento cytotoxický model by měl být považován za hlavní mechanismus thyreoidní degradace u Hashimotovy thyreoiditidy.

4. Imunofluorescenční metoda – princip metody

Imunofluorescence je semikvantitativní metoda která byla zavedena před více než 50 lety (43). Podstatou imunofluorescenční metody je průkaz antigenu pomocí protilátky, která je označena fluoreskující barvou (např. fluorescein, rhodamin). Takto upravená protilátka se nazývá konjugát. Vazbu antigenu s protilátkou můžeme pozorovat luminiscenčním mikroskopem (4).

Podle způsobu aplikace imunofluorescenci rozdělujeme na přímou a nepřímou.

4.1. Přímá imunofluorescence (PIF) – jednostupňová metoda

Při tomto postupu vyšetřujeme vzorek pacientovy tkáně s předpokládaným antigenem (např. biopsie ledviny nebo kůže, kde pátráme po imunodepozitech různého charakteru). Následovně se na řezy aplikuje protilidský imunoglobulin (prasečí, nebo jiný), označený FITC (fluoresceinizotiocyanátem). V případě reakce antigenu s protilátkou se tato vazba dá vizualizovat v mikroskopu. Nevýhodou tohoto postupu je nutnost biopsie tkáně, což zatěžuje pacienta.

4.2. Nepřímá imunofluorescence (NIF) – dvoustupňová metoda

Tento postup detekce autoprotištěk je nenáročný pro pacienta, neboť stačí získat jeho sérum. Princip metody je podobný. V tomto případě se používá tkáň

odpovídajícího zdravého orgánu, odebraná při operaci nebo pitvě. Na řez z tkání se nejprve nechá působit sérum pacienta (I. fáze) s předpokládanou autoimunitní chorobou. Pokud se v séru nacházejí cirkulující autoprotilátky, naváží se na antigen ve tkáňovém řezu, a po přidání prasečího protilidského antiglobulinu, označeného FITC (SwAHu/FITC) (II. fáze), se vazba projeví ve fluorescenčním mikroskopu.

NIF je běžně užívaná imunohistochemická metoda, která se využívá jako screening v algoritmu vyšetřovacích metod u pacientů s autoimunitními chorobami.

4.3. Screeningové vyšetření a použití NIF

Metoda nepřímé imunofluorescence (NIF) pro svoji dostupnost a zároveň finanční nenáročnost je vhodná pro screeningové vyšetření pacientů s autoimunitními chorobami. Podle jejího výsledku se indikují náročnější dražší imunologické kvantitativní metody pro stanovení hladiny autoprotilátek (RIA, ELISA a IRMA). Proto by NIF metoda měla být prvotním vyšetřením, při vyšetření na orgánově–specifické i orgánově–nespecifické protilátky, před použitím dalších složitějších diagnostických postupů.

5. Imunoradiometrická analýza (IRMA)

Imunoradiometrická analýza (IRMA) je kvantitativní vysoce senzitivní a specifická radiometrická nekompetitivní metoda, která se používá k měření koncentrace protilátek v séru. Základním principem metody je specifická imunochemická interakce mezi dvojicí protilátek, jedna z protilátek je značena radioizotopem. První protilátka (kotvící na pevnou fázi) naváže stanovovaný antigen a pak se přidává druhá protilátka (značená ^{125}I) v nadbytku. Pro měření gama–záření se používají vícekanálové gama–měřiče (gama–počítače). Radioaktivita se měří jako počet impulzů za minutu.

6. Tenkojehlová aspirační cytologie štítné žlázy (FNAC)

Tenkojehlová aspirační cytologie (FNAC) štítné žlázy je rychlé základní předoperační a ve stejnou dobu nejcitlivější vyšetření týkající se diagnostiky solitárních uzlů štítné žlázy. Hlavní výhody FNAC jsou: možnost selekce uzlů pacientů pro okamžité chirurgické ošetření, nízká invazivnost a relativně nízká cena vyšetření. Cytologické diagnostiky není užíváno jen pro jednotlivé, tuhé a rychle rostoucí uzlíky štítné žlázy, ale také pro uzlovité strumy, záněty a další léze štítné žlázy, odhalené ultrazvukovým skenováním, nebo scintigrafickým vyšetřením. Důležitým standardem při provedení aspirační cytologie je odebrání materiálu z různých míst štítné žlázy tj. vzorkování (sampling).

Z hlediska technologického zpracování cytologických nátěrů se nejčastěji používá barvení metodou May–Giemsa–Grünwald (MGG).

6.1. Tenkojehlová aspirační cytologie štítné žlázy (FNAC) – poznatky k autoimunitním lymfocytárním chorobám štítné žlázy

Ke správnému rozeznání patologických změn štítné žlázy v aspirační biopsii je nezbytné dobře znát struktury které mohou být obsažené v normálním cytologickém nátěru.

Normální struktury při tenkojehlové cytologii štítné žlázy (173, 174):

- folikulární epiteliální buňky
- koloid
- C–buňky
- chrupavka
- epitel trachey
- kosterní svalovina

Folikulární epiteliální buňky jsou křehké, proto v cytologickém nátěru převážně nacházíme holá jádra bez cytoplazmy. Co do velikosti a tvaru se

podobají normálním lymfocytům. Cytoplazma se barví světle–modře v May–Grünwald–Giemsa barvení (MGG) a hranice ojedinelých buněk je nejasná nebo neurčitá.

Koloid se barví modře a tvoří tenké blanité potahy, často s drážkami a trhlinami. Koloid může být odstraněn ze sklíčka během zpracování.

C–buňky se mohou podobat buňkám medulárního karcinomu, ale v nátěru se mohou těžko identifikovat.

V nátěru se může objevit i epitel trachey, jako malý hlouček cylindrických buněk s řasinkami. Chrupavka se objevuje jako zářivá purpurová skvrna s fibrilárními okraji.

Fragmenty kosterní svaloviny se objevují jako svazek tmavě–modré částice s četnými, bledě oválnými jádry.

Cytologický obraz klasické Hashimotovy thyreoiditidy zahrnuje (173, 174):

- oxyfilní epiteliální (Askanazy/Hürthleho) buňky
- střední množství lymfocytů a ojedinelé plazmatické buňky
- malé množství obrovských mnohojaderných buněk; epiteloidní histiocyty
- malá přítomnost, nebo úplná absence koloidu

Floridní forma lymfocytární thyreoiditidy je charakterizována přítomností četných lymfoidních elementů ve všech stupních vyzrání zahrnujících centroblasty, imunoblasty a dendritické retikulární buňky ze zárodečných center s velmi malou přítomností normálních epiteliálních folikulárních buněk.

Vzorový nátěr „klasické Hashimotovy thyreoiditidy“ se obecně objevuje u starších pacientů, kteří jsou často hypothyroidní. „Floridní lymfocytární“ cytologický nátěr se objevuje u mladších a asymptomatických pacientů, a u populace středního věku, nebo u těch osob, s krátkou anamnézou choroby a s nízkými, nebo negativními hodnotami autoprotilátek (185).

Oxyfilní (Askanazy/Hürthleho) buňky nebo oxyfilní metaplastické folikulární epiteliální buňky se v nátěru objevují ve větším počtu ve formě syncytiálních shluků (obr. 5). Cytoplazma těchto buněk je dobře patrná,

denzní a barví se hnědo–modře (MGG); u normálních folikulárních epiteliálních buněk je cytoplazma bledá. V cytoplazmě může být přítomna jemná granularita. Jádra jsou 2–4krát větší než normální jádra folikulárních buněk, ale jejich velikost je variabilní. Lymfocyty jsou přítomny ve variabilním množství. Některé lymfocyty se spojují s epiteliálními buňkami a podporují tak teorii přímého epiteliálního poškození lymfocyty.

Centroblasty odvozené ze zárodečných center lymfoidních folikulů mají bledá jádra s hojnější modrou cytoplazmou než mají lymfocyty. Velké imunoblasty mohou být rovněž přítomny. Směs malých a velkých lymfoidních elementů je charakteristická pro aktivní proces. Histiocyty ze zárodečných center (dendritické retikulární buňky) mají hojnou bledou cytoplazmu a oválné, nebo histocytoidní jádro se zrnitým chromatinem. Tyto buňky jsou často seskupené a přidružené k lymfoidním buňkám.

Cytologicky obraz fokální lymfocytární thyreoiditidy bývá někdy obtížně odlišitelný od HT. Většinou je v nátěrech přítomno kromě folikulárních buněk a koloidu pouze malé či střední množství lymfoidních elementů s výraznou převahou zralých lymfocytů. Tento nález pomáhá v odlišení od HT (46, 236).

6.2. Úskalí cytologické diagnostiky (FNAC) Hashimotovy thyreoiditidy a fokální lymfocytární thyreoiditidy

Při určování diagnózy Hashimotovy thyreoiditidy a fokální thyreoiditidy se mohou vyskytnout obtíže, spojené s přesným určením cytologické diagnózy. Proto je nutné znát a přesně rozlišit struktury, které mohou vést k diagnostické chybě (tj. falešně negativních a falešně pozitivních cytologických nálezů ve smyslu Hashimotovy thyreoiditidy a fokální lymfocytární thyreoiditidy).

Hlavní úskalí cytodiagnostiky autoimunitních onemocnění štítné žlázy (173,174):

- rozlišit holá jádra folikulárních buněk od lymfocytů
- lymfocytární infiltrace doprovázející jiné léze
- lymfom

- problémy s oxyfilními buňkami
- „hyperthyreoiditis“ / „Hashitoxikóza“
- unilaterální nebo fokální autoimunitní lymfocytární thyreoiditida
- obrovské mnohojaderné buňky v autoimunitní lymfocytární thyreoiditidě
- proliferace epiteliálních folikulárních buněk při floridní lymfocytární thyreoiditidě
- psamomatózní tělíska

Holá jádra folikulárních buněk se podobají lymfocytům, zvláště pokud je nátěr špatně fixován. Tenký lem cytoplazmy je charakteristický pro lymfocyty a není přítomen kolem holých epiteliálních jader. Jádra folikulárních buněk jsou značně kulatější než jádra lymfocytů a mají více homogenní chromatin a hustší jaderný lem. Lymfocyty se tedy liší i podle velikosti a jsou často přítomny větší a nezralé formy.

Lymfocytární infiltrát může být spojen s neoplazií, např. difúzní sklerotizující forma papilárního karcinomu, proto je důležitý vícenásobný sampling štítné žlázy. Menší fokální lymfocytární infiltrace u jinak normální štítné žlázy mohou vést k podezření na fokální autoimunitní lymfocytární thyreoiditidu. Avšak jenom v malém procentu takových případů jsou lymfocyty přítomny v nátěru, takže cytologické nadhodnocení Hashimotovy thyreoiditidy je nepravděpodobné (181).

U některých pacientů s klinickou hyperthyreózou FNAC štítné žlázy povoluje četné lymfocyty (97). Průběh choroby je někdy přechodný, s destruktivní autoimunitní lymfocytární infiltrací („Hashitoxicosis“), a u některých případech proces vlastní destrukce může být omezen („hyperthyreoiditis“). Toto může být pozorováno u pacientů s postpartální thyreoiditidou (PPT). Klinické známky hyperthyreózy a zvýšené hodnoty thyroxinu v séru by mohly upozornit lékaře na tuto ne tak častou afekci, která ukazuje blízkou příbuznost s ostatními autoimunitními chorobami štítné žlázy. V takovém případě rozlišení mezi těmito případy a Gravesovou–Basedowovou chorobou s přítomností ojedinělých lymfocytárních buněk může být obtížné.

Cytologický rozdíl mezi autoimunitní lymfocytární thyreoiditidou a lymfomem může být rovněž těžko rozlišitelný. „Floridní lymfocytární“ nátěr s téměř kompletní nepřítomností epiteliálních buněk je častý u mladších lidí. U této skupiny pacientů je třeba velké opatrnosti. Přibližně 75% lymfomů se objevuje na pozadí autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy. V některých případech, imunohistochemická demonstrace monoklonality v aspirovaném materiálu může být nezbytná pro stanovení diagnózy (226).

Oxyfilní buňky v lymfocytární thyreoiditidě mohou být dost pleomorfní. U tak zvané „vypálené“ Hashimotovy thyreoiditidy a v případech fokální nodulární hyperplazie oxyfilních buněk, mohou být v aspirátu pouze oxyfilní buňky (76, 109). Rozlišení od neoplastických oxyfilních buněk není možné a v tomto případě je chirurgická excize nezbytná pro histologickou verifikaci (163). Některé formy větších, ne-lymfoidních buněk v thyreoidních aspirátech mohou být zaměněny s oxyfilními buňkami. V raném stádiu choroby to mohou být hypertrofické epiteliální buňky s bohatou cytoplazmou. To jsou pravděpodobně TSH-stimulované buňky. Epiteloidně-vyhlížející buňky s protáhlými nebo zrnkovitými jádry mohou být přítomny v některých případech a mohou se podobat oxyfilním buňkám. Histiocyty, nebo dendritické retikulární buňky ze zárodečných center se mohou zaměnit s oxyfilními buňkami, ale postrádají charakteristickou cytoplazmatickou denzitu.

Obrovské mnohojaderné buňky jsou přítomny u 30 % případů Hashimotovy thyreoiditidy a společně s epiteloidními buňkami mohou přivodit záměnu s de Quervainovou thyreoiditidou (181). Ačkoli intenzivní lymfocytární infiltrace není běžná, u subakutní thyreoiditidy je směs zánětlivých buněčných infiltrátů dokladem dost těžké tkáňové destrukce.

V některých případech bylo popsáno překrývání cytologických nálezů od Hashimotovy thyreoiditidy s nálezy od subakutní thyreoiditidy (97).

Psamomatózní tělíška mohou být přítomna u Hashimotovy thyreoiditidy, ale mohou být patrna i u jiných benigních procesů. Jejich přítomnost v nátěrech opravňuje chirurgickou biopsii, protože nejčastěji se vyskytují ve spojení s papilárním karcinomem štítné žlázy (59).

7. Bioptické vyšetření štítné žlázy

Histologické vyšetření bioptického materiálu štítné žlázy je standardní vyšetřovací postup ke stanovení přesné diagnózy. U případů s nejasnou cytologickou diagnózou je proto nutný následný odběr tkáně štítné žlázy na histologické vyšetření.

Veškerý bioptický materiál štítné žlázy určený k histologickému vyšetření je fixován v 10% formalinu, zpracován standardní parafínovou technikou a obarven hematoxylinem–eozinem.

8. Cíle předkládané doktorské disertační práce

- 1) Provéřit spolehlivost semikvantitativní dvoustupňové (nepřímé) imunofluorescenční metody při detekci cirkulujících autoprotilátek proti koloidu (thyreoglobulinu) a epitelu (thyreoperoxidáze) štítné žlázy.
- 2) Předsevzatý záměr realizovat komparaci NIF s kvantitativně exaktními výsledky IRMA metody upravené pro detekci autoprotilátek proti thyreoglobulinu a proti thyreoperoxidáze.
- 3) Stanovit upravené meze použitelnosti nepřímé imunofluorescenční detekce antithyreoidních autoprotilátek.
- 4) Zformulovat statisticky nepodchycené a literárně nezpracované zkušenosti z rutinní praxe.
- 5) Zmapovat zjistitelné imunofluorescenční rozdíly ve výskytu thyreoidních protilátek mezi cytologicky a biopticky diagnostikovanými difúzními lymfocytárními thyreoiditidami a fokálními lymfocytárním thyreoiditidami.
- 6) Posoudit použitelnost imunofluorescenční detekce thyreoidních protilátek ke kontrole vybraných cytologických a bioptických nálezů (Hashimotovy thyreoiditidy a fokální lymfocytární thyreoiditidy).
- 7) Zformulovat diagnostický algoritmus pro diagnostiku autoimunitních onemocnění štítné žlázy s použitím nepřímé imunofluorescence.
- 8) Posoudit cytodiagnostickou přesnost FNAC porovnáním výsledků cytologických a histologických u Hashimotovy thyreoiditidy a fokální lymfocytární thyreoiditidy.

Porovnávány byly následující kombinace:

Oddíl A – Výsledky nepřímé imunofluorescenční metody (NIF) versus IRMA metody

Oddíl B – Histologie a aspirační cytologie štítné žlázy versus výsledky nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (NIF)

Oddíl C – Aspirační cytologie štítné žlázy versus histologie štítné žlázy (cytodiagnostická přesnost)

9. Oddíl A: Porovnání imunofluorescenčních nálezů (NIF) versus IRMA štítné žlázy

9.1. Materiál a metody

Nejistota, týkající se kvantitativních aspektů imunofluorescence, nás podnítila k prověření imunofluorescenčních výsledků porovnáním se spolehlivě kvantifikovatelným standardem. V našem případě byl za takový standard vybrán metodický postup typu imunoradiometrické analýzy (IRMA), kterou Dr. Lomský rozpracoval v nemocniční laboratoři pro hormonální proteiny (136). V souladu s naznačenými cíly bylo zajištěno souběžné vyšetření každého do sestavy zavzatého pacienta (jeho krevní sérum) dvěma metodami zaměřenými na obě sledované thyreoidální autoprottilátky (thyreoglobulin a thyreoperoxidáza), tedy jednak nepřímou imunofluorescencí (NIF), jednak imunoradiometrickou analýzou (IRMA). Šlo o část sér odebraných pacientům z endokrinologické poradny a postupně odesílaných na uvedená vyšetření. O tom, která séra budou odeslána k vyšetření, rozhodoval nahodilý výběr, jehož kritériem byl ohled na množství séra, které bylo k dispozici. Šlo o to, aby bylo možno k dispozici jsoucí sérum rozdělit na dva separátní vzorky. Tímto způsobem bylo zpracováno 973 vzorků.

Vlastní laboratorní metodický postup byl jiný pro nepřímou imunofluorescenci a pro imunoradiometrickou analýzu, a to následující:

9.1.1. Metodický postup nepřímé imunofluorescenční techniky (NIF)

Imunofluorescenční metoda použitá k detekci antithyreoidálních protilátek vycházela ze standardního dvoustupňového způsobu vyšetřování využívajícího jako antigenní substrát zdravou lidskou štítnou žlázu. Tkáň štítné žlázy odebíráme na pitevně od zemřelých s krevní skupinou 0, odběr musí být proveden nejpozději za 6 hodin po smrti. Odebraný materiál co nejdříve uložíme na 2 hodiny do mrazničky na -30°C , aby zatuhnul. Pak materiál urychleně zabalíme do igelitového sáčku, který pečlivě utěsníme proti vysychání v mrazničce, označíme a uložíme v mrazícím boxu při -70°C . Takto opatřený a uskladněný materiál je možno přechovávat až jeden rok. Zhoršená použitelnost po tomto termínu souvisí s přeschnutím způsobujícím drobné řezů; antigenní vlastnosti odolávají účinku času. V průběhu této „záruční lhůty“ je možno materiál kdykoliv zpracovat, tj. přikrojit na drobné kvádříčky o velikosti 12x 4x 7 mm, které se pokládají na kryostatový stoleček. Pro rutinní cíle lze úsporně montovat do jednoho bločku několik orgánů najednou. Zpravidla je bloček složen z pěti orgánů, tj. nadledvinky, příušní žlázy, štítné žlázy, žaludku a příštítného tělíska.

Kryostatový stoleček s takto sestaveným bločkem se prudce zmrazí v petroleteru vychlazeném asi na -70°C (přesná výparná teplota pevného CO_2 – suchého ledu je -78°C , teplota směsi suchý led + aceton činí -86°C). Postup mražení je následující: do větší nádoby se nalije aceton a přidají kousky suchého ledu. Do této větší nádoby pak ponoříme nádobku menší s petroleterem. Při vychlazování petroleteru je důležité dávat pozor, aby bublající aceton nevníkl do nádoby s petroleterem, a tak došlo k nechtěné a nekontrolovatelné fixaci tkáňového bločku.

Tkáňový bloček ponoříme do předchlazeného petroleteru, kde během 15–30 vteřin zmrzne, viditelně zbledne a je možno jej vyjmout. Ulpívající petroleter na povrchu se odfoukne a bloček se zabalí do igelitového sáčku. Při balení bločku do igelitu je potřebné mechanicky vytlačit vzduch, aby tkáňový bloček rychle

nevysychal. Takto opatřený bloček je možno přechovávat velmi dlouhou dobu v mrazícím boxu při -70°C (až 12 měsíců); podobně jako materiál zásobní, výše uvedený.

Z bločku pořizujeme v kryostatů při -20°C řezy síly 3–4 μm . Získané kryostatové řezy stahujeme z kryostatového nože a následovně nalepíme na čistá odmaštěná podložní skla. Dále se kryostatové řezy suší při pokojové teplotě 30 minut a pak se fixují v bezvodém acetonu po dobu přesně 10 minut. Tato fixace je nutná, aby se zabránilo vyplavování antigenu, který spolu s použitým konjugátem vytváří na povrchu řezu precipitáty působící rušivě při prohlížení preparátů. Po skončení fixace jsou kryostatové řezy opláchnuty v 0,15 M roztoku NaCl s 0,01 M fosfátovým pufrům (phosphate buffered saline – PBS) o pH 7,6.

Tento vypírací roztok se připravuje následujícím způsobem: k 950ml fyziologického roztoku (8,5 g NaCl se rozpustí v destilované vodě a doplní na 1 litr) přidáme 50 ml fosfátového pufru o pH 7,6.

Po opláchnutí na kryostatové řezy aplikujeme 100 μl vyšetřovaného séra, a to většinou ředěné v poměru 1:10. Sklíčka se séry inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Po inkubaci každé sklíčko samostatně splachujeme roztokem PBS. Poté preparáty vypíráme ve třech výměnách PBS o pH 7,6 za mírného protřepávání po dobu 15 min. Následovně je na sklíčko aplikován konjugát a následuje další 30 minutová inkubace při pokojové teplotě ve vlhké komůrce.

V ústavním provozu je běžně jako konjugát používán prasečí protilidský imunoglobulin konjugovaný s fluoresceinisothiokyanátem (SwAHu / FITC) z produkce firmy SEVAPHARMA a.s., Praha. Lyofilizovaný obsah ampule (2 ml) se rozpustí ve 2 ml destilované vody.

Po inkubaci konjugát z preparátů slijeme a sklíčka znovu vypíráme ve třech výměnách PBS o pH 7,6 po dobu 15 min. Po otření okrajů se preparáty montují do směsi glycerinu (9 dílů) a PBS (1 díl). Preparáty prohlížíme v den zhotovení, vydrží však i několik dnů v chladničce.

Každá denní série preparátů je opatřena 2 kontrolními preparáty. Jeden se známým pozitivním sérem a druhý s pouhým konjugátem na řezu, k vyloučení nespecifické reakce.

Hotové preparáty jsme prohlíželi ve fluorescenčním mikroskopu Olympus typu BH-2 v dopadajícím světle. Jako zdroj světla neslouží v tomto mikroskopu rtuťová vysokotlaká výbojka, nýbrž halogenová žárovka jejíž krátkovlnný úsek viditelného spektra postačí ke stimulaci luminiscenčních projevů FITC. Navíc není zrak obsluhujícího personálu ohrožován chronickou expozicí tvrdému UV záření. Intenzita fluorescence je s touto žárovkou pochopitelně nižší. Pozitivní fluorescenční efekty nápadné svojí světlezelenou barvou jsme registrovali okem a odhadem kvantifikovali co do intenzity na 1 (+) až 3 (+++) křížky (169).

Hodnocení výsledků NIF metody je semikvantitativní:

- = negativní
- + = slabě pozitivní
- ++ = pozitivní
- +++ = silně pozitivní

9.1.2. Metodický postup IRMA techniky

Imunoradiometrická dvoufázová kvantitativní analýza byla používána v modifikaci vypracované v laboratoři pro hormonální proteiny pod vedením MUDr. Lomského (136). Stanovení autoprotilátky proti thyreoglobulinu i thyreoperoxidáze probíhalo následovně:

Na začátku je do zkumavky s antigenem (thyreoglobulin nebo thyreoperoxidáza) navázaným na pevnou fázi, napipetováno 100 μ l vyšetřovaného séra nebo kalibračního standardu. Po inkubaci oplachujeme 1 % roztokem BSA/PBS (BSA – hovězí krevní albumin s PBS) a inkubujeme s roztokem PBS/Tween20 0,005% 2 hodiny. Ve druhém kroku je přidáno 200 μ l roztoku stafylokokového proteinu A, značeného radioaktivním jódem I^{125} . Po inkubaci a promytí s roztokem PBS/Tween20 0,005% je navázaná radioaktivita měřena gama počítadlem (gama scintilační počítač) během 1 minuty, která je přímo proporcionální koncentraci autoprotilátek ve vyšetřovaném séru. Kalibrační křivka pro thyreoglobulin má rozsah od 12 do 10 000 U/ml a pro thyreoperoxidázu od 10 do 1000 U/ml. Chyba stanovení, vyjádřená variačním

koeficientem, je pro oba autoantigeny obdobná a pohybuje se (v závislosti na měřené koncentraci) v rozmezí 8,4 až 14 % v rámci eseje; a 8,9 až 15,9 % mezi esejemi. Kontrolní skupinu tvořil soubor 120 dárců krve, u nichž byla průměrná hladina protilátek proti thyreoglobulinu 28 U/ml a 95. percentil bylo 52 U/ml; u autoprotiilátky proti thyreoperoxidáze byl průměr 15 U/ml a 95. percentil bylo 29 U/ml. Jako další kontrolní opatření byla ve 190 vzorcích současně stanovena koncentrace autoprotiilátek proti thyreoglobulinu jednak uvedeným postupem (z laboratoře pro hormonální proteiny), jednak za pomoci komerčního kitu. Mezi oběma výsledky byla zjištěna dobrá korelace ($r = 0,694$). Důležité je i zjištění, že po čtyřech dnech stání vyšetřovaného séra při pokojové teplotě se koncentrace autoprotiilátek proti thyreoglobulinu, ani proti thyreoperoxidáze nemění. Z toho vyplývá, že séra je možno zasílat na vyšetření běžným způsobem, poštou.

Referenční hodnoty (pásma) IRMA pro TGAb a TPOAb

IRMA	TGAb (U/ml)	IRMA	TPOAb (U/ml)
negativní	0 – 100	negativní	0 – 80
„šedá zóna“	101 – 200	„šedá zóna“	81 – 150
pozitivní	> 200	pozitivní	> 150

9.2. Výsledky

9.2.1. Rozbor výskytu protilátek proti koloidu štítné žlázy

(thyreoglobulinu) – porovnání výsledků NIF a IRMA

Vztah mezi výsledky duplicitního vyšetření zkoumaného séra dvěma nezávislými metodami, tj. nepřímou imunofluorescencí (NIF) na straně jedné a metodou IRMA na straně druhé je předmětem hodnocení v tomto oddílu. Obvyklé číselné uvádění údajů je doplněno, pro přehlednost, grafickým a tabulkovým zpracováním sledovaných parametrů. Aby byly porovnávané skupiny co nejhomogennější, byl odděleně posuzován každý stupeň protilátkové aktivity včetně stupně 0 (tj. negativní výsledky NIF při pátrání po sledované

autoprotilátce). Nálezy v tomto oddílu jsou shrnuty do osmi grafů, z toho čtyři grafy (graf 1a. až 1d.) shrnují údaje o autoprotilátkách proti thyreoglobulinu (koloidu štítné žlázy) a čtyři grafy (graf 2a. až 2d.) jsou zaměřené na údaje o autoprotilátkách proti thyreoperoxidáze (epitelu štítné žlázy).

Na grafu 1a. jsou zachyceny případy, kdy imunofluorescenční vyšetření potvrdilo, na strukturách užívaných k detekci protilátek proti koloidu štítné žlázy, negativní výsledek. Takových případů bylo z celé sestavy 973 vyšetřovaných 764. K nim byly vyhledány údaje o hodnotách vyšetření zjištěných metodou IRMA a společně zaznamenány do osnovy grafu představované vzestupně řazenými údaji z vyšetření metodou IRMA. Ke každému negativnímu údaji při vyšetření NIF byl tedy přiřazen údaj získaný vyšetřením stejného vzorku séra metodou IRMA. Ukazuje se, že většina případů s imunofluorescenčně negativní protilátkou proti koloidu štítné žlázy je současně negativní při vyšetření metodou IRMA na autoprotilátku proti thyreoglobulinu. Které hodnoty IRMA jsou negativní a které již nikoliv, bylo řešeno na podkladě informací převzatých z dříve publikovaného sdělení (136). Citovaní autoři tehdy na podkladě vyšetření sestavy dobrovolných dárců krve získali základ pro kalibraci křivky hodnot IRMA, takže posléze mohli stanovit meze hodnot ryze negativních na straně jedné a ryze pozitivních na straně druhé.

Nelze přehlédnout, že na osnově grafu 1a., při levém okraji, jsou zachycena pásma s údaji tak nízkými, že jsou hodnoceny jako negativní. Vedle (vpravo) je pásmo výsledků rovněž nízkých hodnot, ne sice negativních, ale nepřínosných (nediagnostických), jakási „šedá zóna“ stanovená pro protilátku proti thyreoglobulinu v rozmezí od 101 do 200 U/ml. Teprve vpravo od nich je pásmo výsledků pozitivních. Takže výsledky IRMA metody pohybující se mezi 0 a 100 U/ml jsou, i přes stopovou přítomnost protilátek hodnoceny jako negativní a výsledky nad 200 U/ml jako jednoznačně pozitivní.

Negativní NIF výsledky se kryjí s negativními výsledky IRMA metody ve 757 případech (99,1 %) (viz graf 1a.; tab.I: TgAb NIF neg.). S nediagnostickými (nepřínosnými) hodnotami IRMA metody (tj. od 101 do 200 U/ml) se kryjí na koloid negativní NIF výsledky ve 4 případech (0,5 %). Pouze 3 případy (0,4 %)

Tab. I: Procentuální rozložení výsledků IRMA pro TgAb a TPOAb rozdělené podle semikvantitativního hodnocení NIF

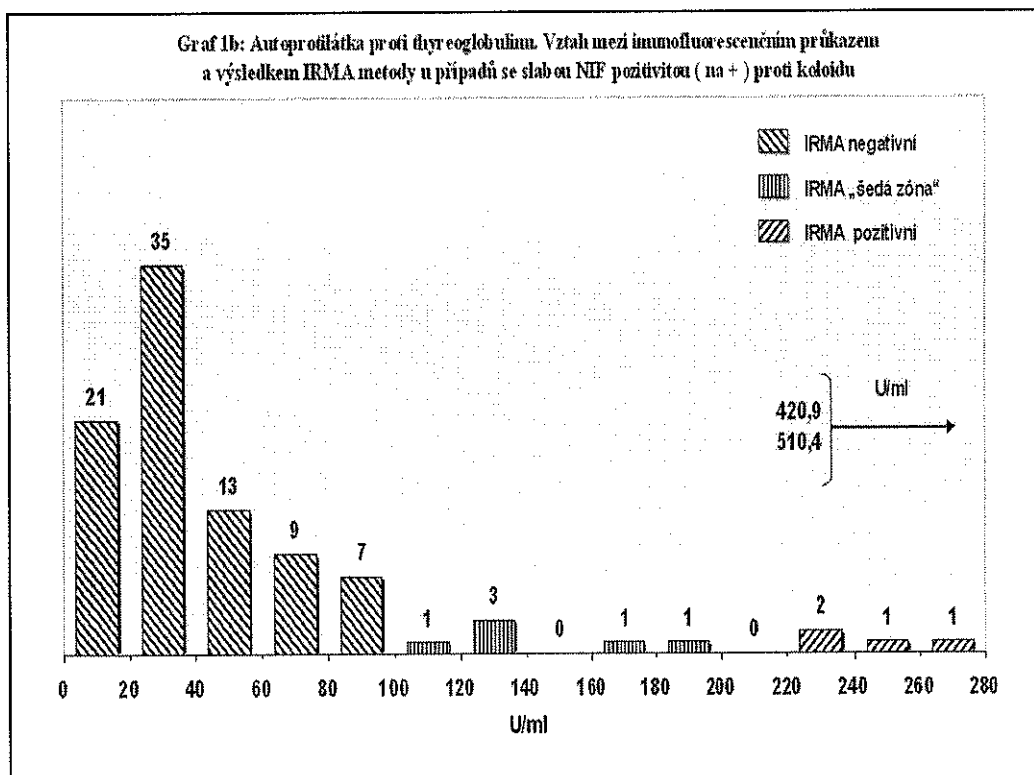
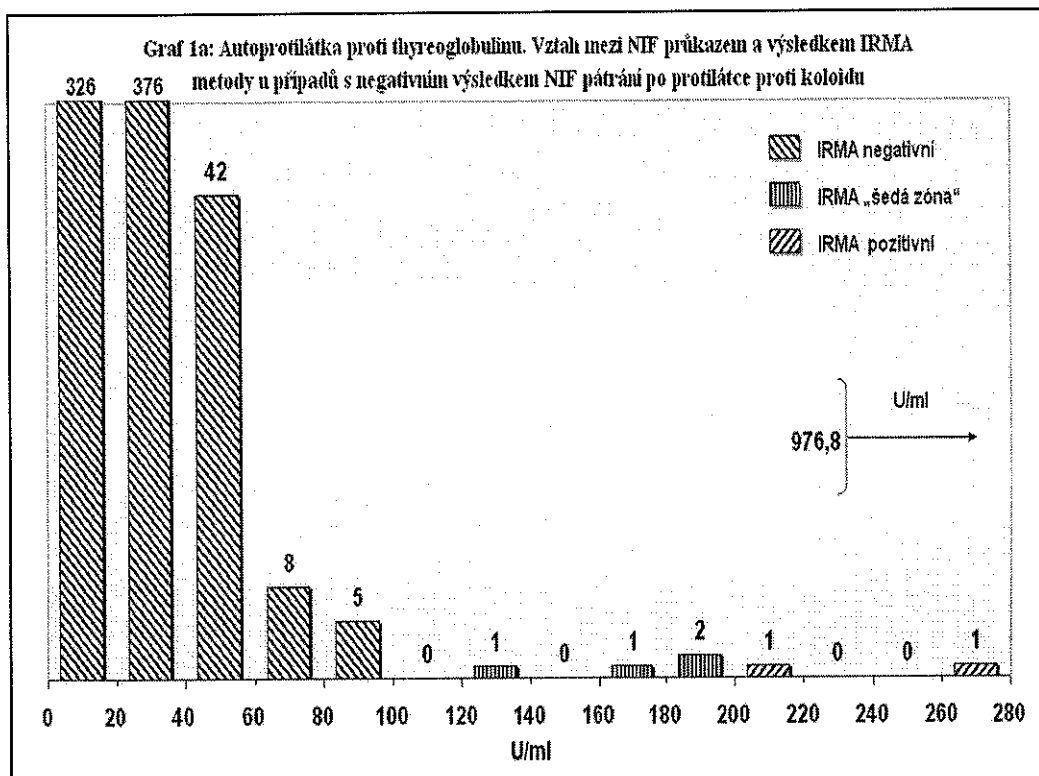
TgAb NIF neg.			TPOAb NIF neg.		
IRMA (U/ml)	Počet	%	IRMA (U/ml)	Počet	%
0 – 100	757	99,1	0 – 80	741	99,3
101 – 200	4	0,5	81 – 150	2	0,3
> 200	3	0,4	> 150	3	0,4
Celkem	764		Celkem	746	

TgAb NIF +			TPOAb NIF +		
IRMA (U/ml)	Počet	%	IRMA (U/ml)	Počet	%
0 – 100	85	87,6	0 – 80	81	91,0
101 – 200	6	6,2	81 – 150	5	5,6
> 200	6	6,2	> 150	3	3,4
Celkem	97		Celkem	89	

TgAb NIF ++			TPOAb NIF ++		
IRMA (U/ml)	Počet	%	IRMA (U/ml)	Počet	%
0 – 100	19	47,5	0 – 80	26	44,8
101 – 200	6	15,0	81 – 150	5	8,6
> 200	15	37,5	> 150	27	46,6
Celkem	40		Celkem	58	

TgAb NIF +++			TPOAb NIF +++		
IRMA (U/ml)	Počet	%	IRMA (U/ml)	Počet	%
0 – 100	6	8,3	0 – 80	19	23,7
101 – 200	6	8,3	81 – 150	7	8,7
> 200	60	83,3	> 150	54	67,5
Celkem	72		Celkem	80	

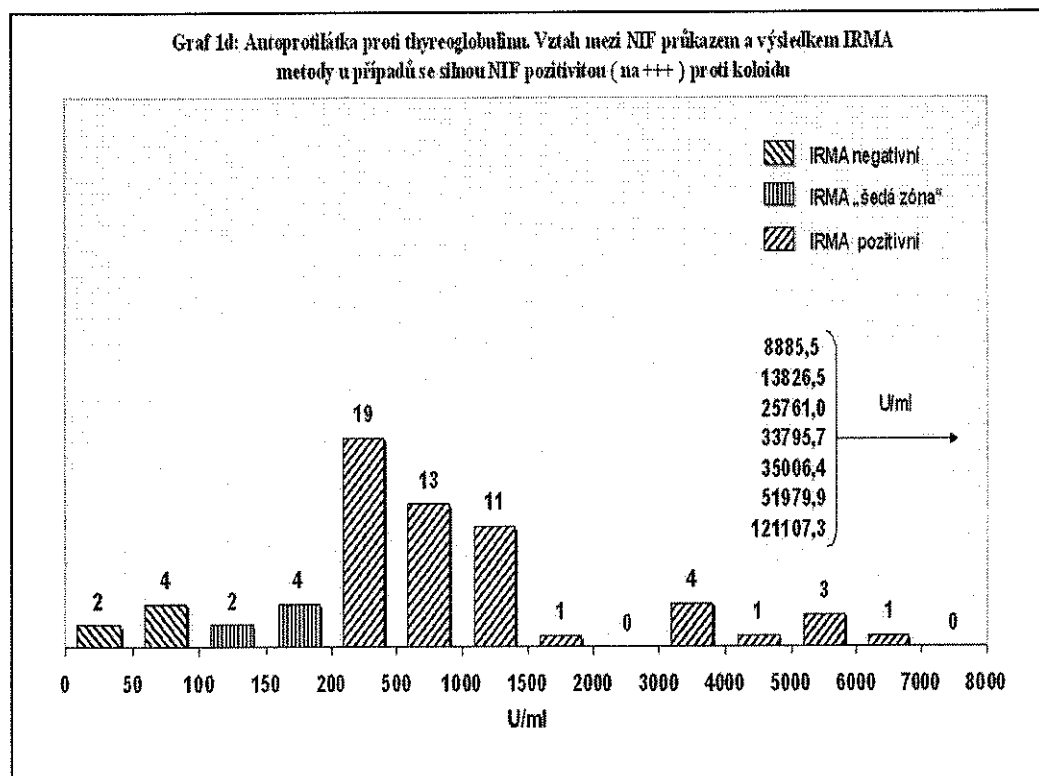
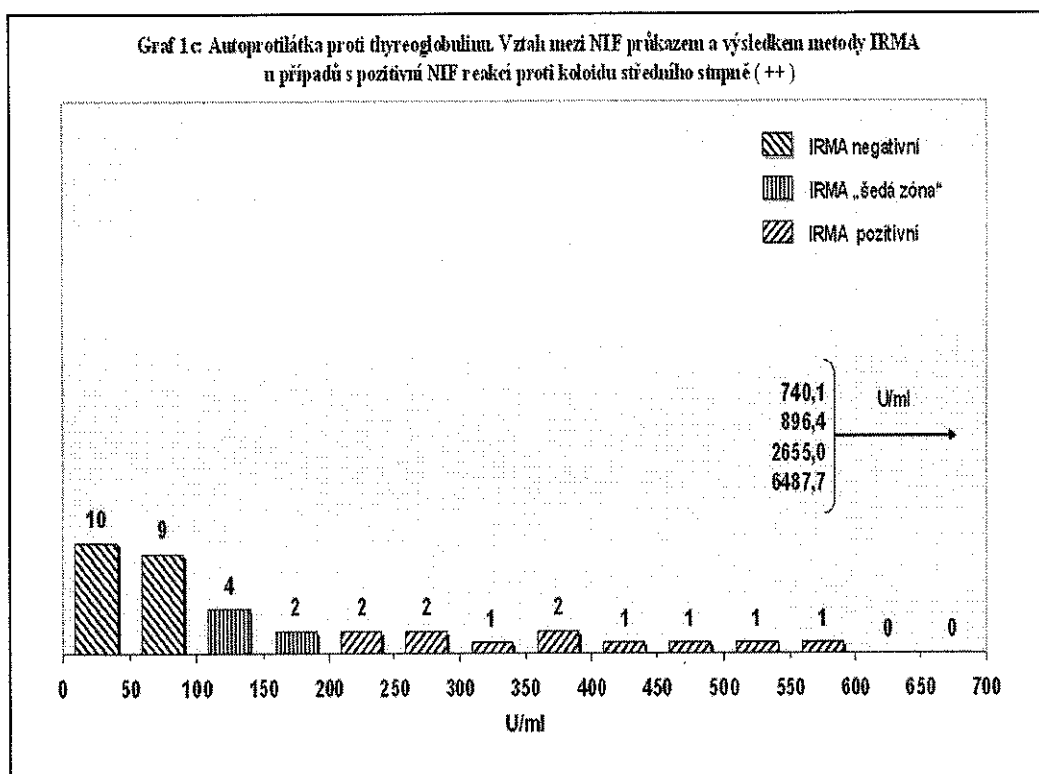
se družily s pozitivními výsledky získanými IRMA metodou. Za předpokladu, že z nedagnostických výsledků IRMA metody by nemohly být vyvozovány žádné závěry, lze obě skupiny tj. negativní i nejisté (nediagnostické) sečíst. Lze tak dospět k číslu 761 (757 + 4) výsledků pro účely diagnosticky shodného významu, jako výsledky neindikující žádný chorobný stav štítné žlázy. Toto číslo pak stojí proti 3 klamně NIF negativním výsledkům, což činí jen 0,4 %. Ale i bez zahrnutí



„šedé zóny“ do našeho výpočtu je možno považovat výsledek 757 případů (99,1 %), za velmi dobrou známku selektivity (tab. I: TgAb NIF neg.).

Následovně u 3 falešně NIF negativních případů byla provedena sérologická titrace až do ředění 1 : 64 (použité ředění 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64), na průkaz tzv. fenoménu prozóny. Toto vyšetření ani v jednom titrovaném imunofluorescenčním vzorku tento fenomén neprokázalo.

Další graf 1b. zpřehledňuje rovněž situaci, která nastane pátráme-li po vztahu mezi semikvantitativně určenými NIF nálezy a exaktně kvantifikovatelnými nálezy získanými metodou IRMA. Tento vztah je v popisovaném grafu řešen výlučně pro případy se slabou NIF pozitivitou proti koloidu štítné žlázy (tj. na +). Takových případů bylo ze základní sestavy 973 probandů celkem 97. Hledaný vztah NIF k IRMA, pokrývá široké rozpětí imunoradiometrických hodnot. V nečekaně velkém počtu 85 případů (87,6 %) korespondoval slabě pozitivní imunofluorescenční nález s negativní oblastí imunoradiometrických hodnot (nálezy spadající do pásma od nuly do 100 U/ml). Dalších 6 případů (6,2 %) mělo korespondující hodnotu IRMA metody z pásma 101 až 200 U/ml, tedy z pásma nedagnostických hodnot (tzv. „šedá zóna“). Jen 6x (6,2 %) odpovídal slabě pozitivní NIF nález také pozitivitě IRMA metody a to vesměs jen nižším titrům mezi 200 až 510 U/ml. Důvěryhodnost této nízkostupňové NIF positivity je tedy jak patrně podlomena dvěma úkazy. Jedním z nich je značně početná skupina 85 případů, jimž při pozitivním nálezu NIF odpovídá protějšek z pásma jednoznačně negativních nálezů IRMA. Druhým závažným nedostatkem se jeví to, že zbylá část nálezů (12 případů) se vztahuje stejným dílem (pokud jde o údaj IRMA metody) k „šedé zóně“ (6 případů) a dalších 6 případů koresponduje s pozitivitou IRMA nálezů (pozitivita proti pozitivitě). Lze říci, že v 87,6 % (85 z 97 případů) je NIF výsledek falešně pozitivní (malá selektivita) (tab. I: TgAb NIF +). Je tedy nutno nížce pozitivní hodnoty autoprotilátek namířených proti koloidu štítné žlázy považovat za zdroj ukazatelů postrádajících potřebnou rozlišovací schopnost, co do vztahu k pásmům pro hodnoty vzešlé z aplikace IRMA metody.



Graf 1c. řeší stejnou problematiku jako předchozí, ale pro jinou podskupinu semikvantitativních údajů, a to pro případy mající jako společný znak NIF zjištěnou pozitivitu středního stupně, tj. na ++ proti koloidu štítné žlázy. Z celé výchozí sestavy s 973 položkami uvedenou podmínku středně intenzivní positivity splňovalo 40 vzorků séra. Jejich vztah k radiometricky stanoveným hodnotám IRMA metody jeví následující závislosti. V 19 případech padl výsledek do sloupce negativních IRMA údajů (47,5 %). Pokud jde o pásmo nedagnostických hodnot (mezi 101 až 200 U/ml), přiřadilo se k nim 6 případů (15,0 %). Do zóny IRMA pozitivních výsledků se přiřadilo 15 vyšetření (37,5 %) (tab. I: TgAb NIF ++). Pouze tento poslední výsledek představuje využitelnou shodu bez ohledu na to, že výsledky vycházející z IRMA metody jeví velký kvantitativní rozptyl od 200 U/ml až do 6487 U/ml.

Právě tento velký rozptyl IRMA pozitivních hodnot si vynutil nestandardní úpravu grafu spočívající v jakémsi vytknutí čtyř nejvyšších hodnot titrů (zjištěných IRMA metodou) mimo osnovu grafu a naznačení jejich správného umístění pomocí šipky. Bez této úpravy by byl graf velmi nepřehledný. Na jeho omezený rozsah by při použití měřítku nebyly extrémní hodnoty protilátkových koncentrací umístitelné.

Graf 1d. je zaměřen na prověření vztahu mezi silně pozitivními (na +++) imunofluorescenčními nálezy (v podobě pozitivit proti koloidu štítné žlázy) na straně jedné a pozitivitami IRMA testu provedeného na témž vzorku séra na straně druhé.

Na první pohled je však patrný rozdíl od předchozích grafů, kde zjištěné titry byly spíše nízké, zde naproti tomu mnohé výsledky dosahují vysokých hodnot v titrech měrných jednotek (U/ml).

Z celkem 72 případů imunofluorescenčních pozitivit splňujících uvedenou podmínku (pozitivita na +++) připadlo 6 případů na IRMA negativní protějšek (8,3 %). V pásmu „nediagnostické zóny“ (101 až 200 U/ml) našlo svůj protějšek 6 případů (8,3 %), ostatní (60 případů, tj. 83,3 %) se kryly s pozitivitami v pravé části grafu (tab. 1: TgAb NIF +++) (Tuto pravou část bylo nutno uměle zkrátit,

jelikož 7 případů s nejvyššími titry nebylo možno do grafu pojmout a jejich místo v rastru grafu je naznačeno šipkou, stojící na čele vypsanych číselných položek).

Z celkového počtu 973 probandů pouze 84 pacientů mělo pozitivní protilátky proti thyreoglobulinu stanovené metodou IRMA, z toho 71 žen (84,5 %) a 13 mužů (15,4 %), poměr muž : žena = 1 : 5,4. Věkové rozmezí pacientů se pohybovalo od 11 do 80 let (medián 52 let).

9.2.2. Rozbor výskytu protilátek proti epitelu štítné žlázy

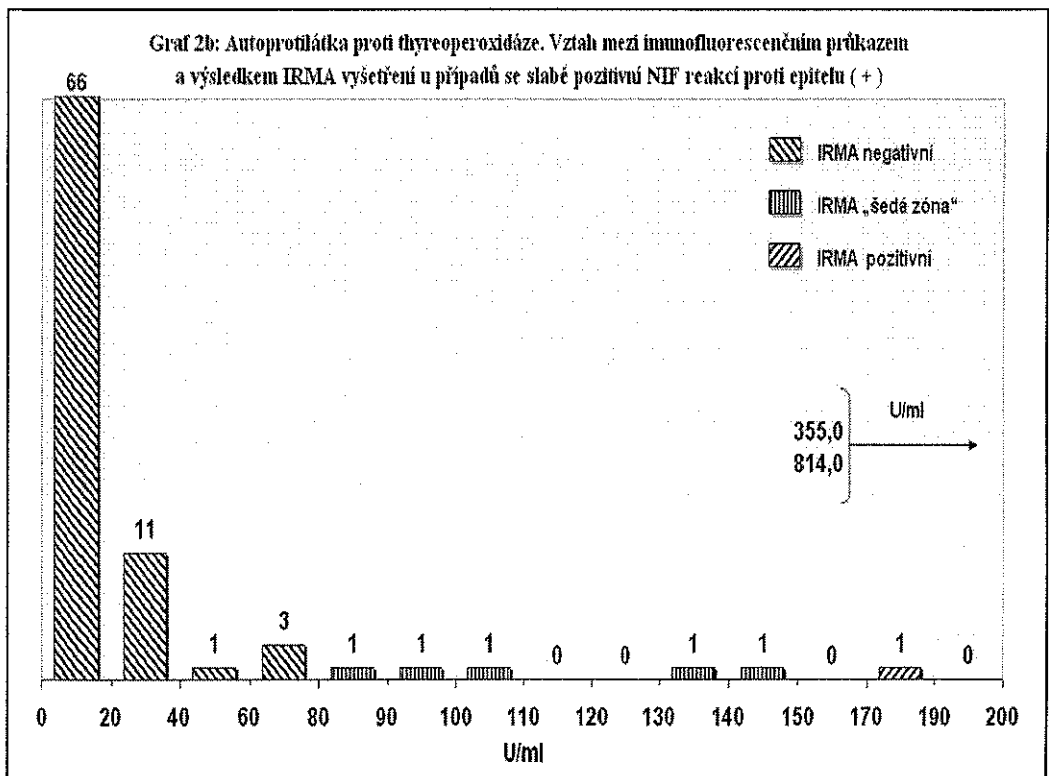
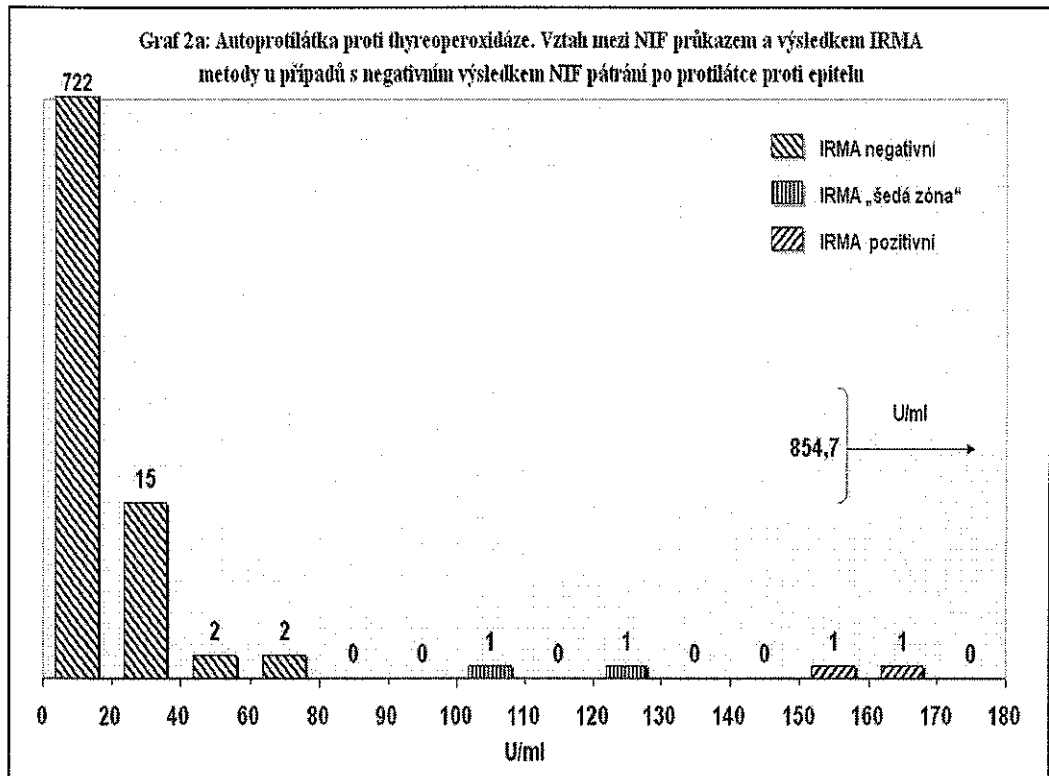
(thyreoperoxidáze) – porovnání výsledků NIF a IRMA

Východiskem pro graf 2a. byla selekce případů, u nichž při vyšetření séra technikou NIF nebyly detegovány protilátky proti epitelu štítné žlázy (thyreoperoxidáze). Takových případů bylo mezi 973 probandy celkem 746, z nich byla dohledána hodnota autoprotiátek proti thyreoperoxidáze IRMA metodou a v grafu bylo pro každý vyselektovaný případ nalezeno místo podle titru protilátek proti TPO.

Z těchto 746 NIF negativních případů připadlo do negativní zóny (tj. mezi 0 až 80 U/ml) 741 vyšetřených sér, tj. 99,3 %, což představuje dobrou známku selektivity. Do nediagnostické zóny („šedé zóny“) padly 2 případy (0,3 %) a do pásma pozitivních hodnot (nad 150 U/ml) se promítly 3 případy (0,4 %) (tab. I: TPOAb NIF neg.). I tento graf bylo nutno modifikovat uvedením jedné položky mimo osnovu grafu pro její nezačlenitelnost (vyšší hodnota TPOAb).

U 3 falešně NIF negativních výsledků následovně byla provedena sérologická titrace až do ředění 1 : 64 (použité ředění 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) na průkaz tzv. fenoménu prozóny, který nebyl prokázán v žádném vzorku.

Graf 2b. zachycuje situaci při posuzování výsledků vázaných na zjištění slabé positivity (na +) autoprotiátek proti epitelu štítné žlázy pomocí NIF metody. Z 89 sér splňujících tuto vstupní podmínku patří korespondující výsledek získaný vyšetřením IRMA metodou (výsledek získaný ze stejného séra, ve kterém bylo pátráno po NIF pozitivitě) v 81 případech (91,0 %) do oblasti 0 – 80 U/ml, tedy pásma deklarovaného jako pásmo negativit.



Korespondující údaj o NIF pozitivitě séra se 5x (5,6 %) promítl do pásma nediagnosticského (81–150 U/ml) a zbylé 3 případy (3,4 %) se promítly mezi pozitivní hodnoty IRMA (tab. I: TPOAb NIF +).

Z nich 2 případy nebylo možno pro omezené rozměry grafu vynést na určené místo a bylo nutné naznačit jejich umístění do grafu šipkou. U celé této sestavy, tj. tab. 2b. je shoda mezi NIF a IRMA velmi špatná, převažují nepoužitelné a rozporné výsledky, u nichž se neshoda mezi výsledky obou metod jednoznačně dotýká 91 % případů.

Ani sloučení výsledků z pásma negativních s výsledky „šedé zóny“ a tedy vytvoření jakési „super zóny“ nevedlo k užitečnému protřídění a diferenciaci, ale spíše naopak ke zhoršení shody NIF versus IRMA z 91% na 96%.

Tento výsledek patří ke kategorii selhání diagnostické funkce NIF metody. Je však v kontrastu k příznivým korelacím zaznamenaných v grafech, ve kterých jsou zachyceny krajní hodnoty nálezů (tj. případy s negativními výsledky v NIF, nebo naopak s výsledky maximální positivity).

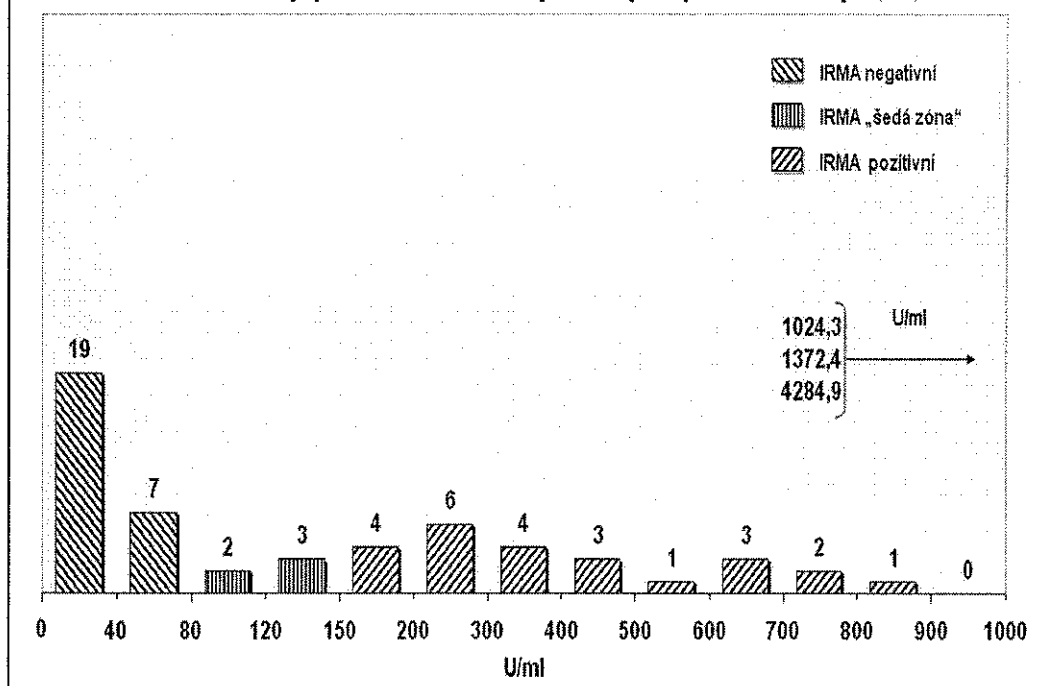
Graf 2c. řeší podobnou problematiku jako graf předchozí, ale pro jinou podskupinu semikvantitativních údajů, a to pro případy mající jako společný znak imunofluorescenčně zjištěnou pozitivitu středního stupně intenzity (na ++) proti epitelu folikulárních buněk štítné žlázy. Z celé výchozí sestavy s 973 položkami splňovalo uvedenou podmínku této středně intenzivní positivity 58 vzorků séra.

Jejich vztah k radiometricky stanoveným hodnotám IRMA metody jevil následující závislost:

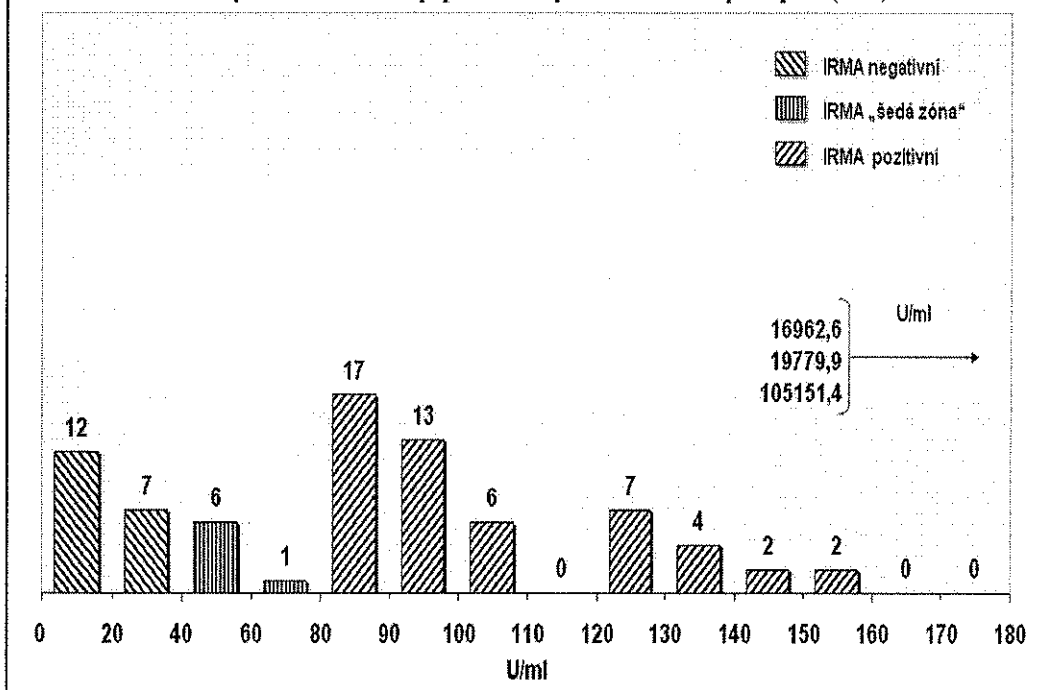
- ve 26 případech padl výsledek do sloupce negativních údajů IRMA
- v 5 případech padl údaj do pásma nediagnosticského, a ve
- 27 případech se korespondující IRMA nález nacházel v pásmu pozitivních hodnot.

První položka 26 případů se tedy ve srovnání s radioimunometrickým standardem jeví jako falešně pozitivní ve 44,8 % případů. Téměř stejný poměr, a

Graf 2c: Autoprotilátka proti thyreoperoxidáze. Vztah mezi NIF průkazem a výsledky získanými IRMA metodou u případů s imunofluorescencí pozitivitou proti epitelu středního stupně (++)



Graf 2d: Autoprotilátka proti thyreoperoxidáze. Vztah mezi výsledky NIF vyšetření a údaji získanými IRMA metodou u případů se silně pozitivní NIF reakcí proti epitelu (+++)



to 46,6 % se jeví u 27 případů, které vykazaly žádoucí korelace, t.j. pozitivní NIF nález k IRMA výsledkům z pozitivního pásma (tab. I: TPOAb NIF ++).

Pokus o predisponování výsledků z šedé zóny k jedné nebo druhé položce nevedl k příznivému obratu ve stupni shody.

Graf 2d. již od prvního pohledu značně připomíná situaci zaznamenanou v grafu 1d., kde pozorujeme maximální hodnoty autoprotilátkových aktivit (v případě tohoto grafu 2d., jde o pozorování silných pozitivit konstatovaných při imunofluorescenčním vyšetření autoprotilátek proti epitelu štítné žlázy) a jejich porovnání s výsledky získanými metodou IRMA na týchž vzorcích séra.

K tomuto hodnocení bylo k dispozici celkem 80 sér s požadovanými vlastnostmi a duplicitně vyšetřených. Distribuce pozitivit co do vztahu k výsledkovým pásmům je v grafu přehledně zachycena. Dělí se na 3 třídy, kde v prvním pásmu (negativní hodnoty) svůj protějšek našlo 19 případů (23,7 %), do pásma nedagnostických údajů spadá 7 případů (8,7 %). Nejpočetnější je skupina 54 případů (67,5 %) vykazujících pozitivitu shodnou s pozitivním pásmem v pravé části grafu kam připadly (tab. I: TPOAb NIF +++). V této poslední skupině jsou také zahrnuty případy s maximálně vysokými titry až do hodnot dosahujících několika desítek tisíc arbitrárních jednotek (105151 U/ml). To si vynutilo geometrickou úpravu grafu s nasměrováním nezakreslitelných hodnot do samostatného grafu.

Velká podobnost obou grafů (tj. 2d. a 1d.) je dána tou okolností, že při imunofluorescenčním vyšetření se právě hodnocené dvě autoprotilátky při použití metody NIF nevyskytují alternativně, ale spíše naopak pozitivita v jedné položce (proti epitelu štítné žlázy) jakoby přitahovala vznik pozitivity druhé (proti koloidu štítné žlázy). Zřejmě imunitní systém častěji spojí imunitní odpověď proti oběma autoantigenům, se kterými v rozhodující dobu přijde do styku.

Z celkového počtu 973 vyšetřených pacientů pomocí metody IRMA mělo pouze 87 pacientů pozitivní protilátky proti thyreoperoxidáze, z toho 73 žen (83,9 %) a 14 mužů (16,1 %), poměr muž : žena = 1 : 5,2. Věkové rozmezí pacientů činilo 11 – 82 let (medián 52 let).

9.2.3. Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí software NCSS verze 2004 a PASS verze 2002 (85).

Pomocí parametru $\kappa = 0,984 \pm 0,027$ byla zjištěna velmi dobrá statistická shoda mezi autoprotílátkami proti koloidu a epitelu štítné žlázy při vyšetření provedeném metodou IRMA (6).

Pomocí parametru $\kappa = 0,927 \pm 0,025$ byla zjištěna velmi dobrá statistická shoda mezi autoprotílátkami proti koloidu a epitelu štítné žlázy při vyšetření provedeném metodou NIF (6).

Pomocí parametru $\kappa = 0,594 \pm 0,021$ byla zjištěna středně dobrá statistická shoda mezi autoprotílátkami proti koloidu štítné žlázy při vyšetření provedeném metodami NIF a IRMA (6).

Pomocí parametru $\kappa = 0,571 \pm 0,021$ byla zjištěna středně dobrá statistická shoda mezi autoprotílátkami proti epitelu štítné žlázy při vyšetření provedeném metodami NIF a IRMA (6).

9.3. *Diskuse*

Oddíl A byl věnován objasnění vztahu mezi semikvantitativními imunofluorescenčními výsledky (NIF) a exaktně kvantifikovatelnými výsledky metody IRMA. Předchozí publikace na toto téma ukazovala na nedostatečnou shodu mezi oběma přístupy (136). Největší rozpaky budil negativní výsledek imunofluorescenčního vyšetření u případů, kde vyšetření IRMA metodou vykazovalo řádově stotisícovou hodnotu protilátkové aktivity proti thyreoperoxidáze. Tento flagrantní nesouhlas si vyžádal NIF vyšetření s postupným ředěním zkoumaného séra na způsob sérologické titrace, kdy se ukázalo, že při dosažení určitého stupně ředění (1:40), podobně jako při vyšetřování protilátek proti mezibuněčnému tmelu epidermis u pemphigu, bylo dosaženo pozitivního výsledku. Zábrana imunofluorescenční reakce v tomto případě spočívala v tzv. fenoménu prozóny známém z klasické sérologie, kdy přítomnost jednoho z účastníků podílejících se na tvorbě komplexu antigen–protilátka je v příliš vysoké koncentraci a vzniku trvalého imunokomplexu je tak zabráňováno.

V našem souboru pouze 6 případů (3x TgAb, 3x TPOAb) vykazovalo falešně negativní výsledek imunofluorescenčního vyšetření (NIF) při pozitivitě IRMA vyšetření (tab.I.: TgAb NIF neg. a TPOAb NIF neg.). I v tomto případě byla provedena sérologická titrace NIF metodou, která neprokázala tzv. fenomén prozóny.

Ukázalo se dále, že velmi špatná je korelace s IRMA metodou na úrovni středních imunofluorescenčních protilátkových pozitivit, tedy u výsledků označených jako pozitivní na + a nebo ++. Velmi často se promítly tyto pozitivní výsledky do pásma, v němž výsledky IRMA metody neměly diagnostický význam (pásmo „šedá zóna“) nebo přímo padly do pásma deklarovaného jako negativní.

Poněkud jiného vzhledu nabudou získané výsledky, když se obě sestavy neposuzují jako celek, ale odděleně nejen podle charakteru antigenu (thyreoglobulin, thyreoperoxidáza), ale i podle stupně intenzity imunofluorescenční reakce (tab. I)

Hodnocení se tak rozpadlo do osmi nových menších celků, ale výsledky po tomto postupu jsou podstatně členitější a ukazuje se, že nálezy v jednotlivých osmi kategoriích nejsou podílem z průměru celé sestavy. Naopak se ukazuje, že hlavní břemeno nespolehlivosti připadá na výsledky se středně pozitivními intenzitami v imunofluorescenčním vyšetření, zatímco okrajové výsledky, tj. negativní na straně jedné a maximálně pozitivní na straně druhé vykazují vynikající korelaci. Negativní imunofluorescenční nález má tedy pro odpovídající pásmo IRMA negativních hodnot (pro thyreoglobulin i thyreoperoxidázu) shodně příznivý vztah dosahující pro protilátky proti thyreoglobulinu 99,1 % a proti thyreoperoxidáze 99,3 %. Také pro maximální imunofluorescenční odpovědi je patrné, že se zařazují do pozitivního pásma IRMA hodnot v 67,5 % pro thyreoperoxidázu a 83,3 % pro thyreoglobulin. Je tedy možno konstatovat, že jednoznačně negativní a jednoznačně silně pozitivní výsledky imunofluorescenčního vyšetření dovolují s velkou spolehlivostí odlišit případy negativní a případy spolehlivě pozitivní. Jako použitelný výsledek vystupující z přehledné tabulky I. (část TgAb + a TPOAb +) znázorňující slabě pozitivní (na +) výsledky pro obě sledované protilátky, které se řadí dle příslušnosti

převážně do pásma IRMA hodnot jako negativní v 87,6 % pro thyreoglobulin a v 91,0 % pro thyreoperoxidázu (jde o falešně pozitivní výsledky NIF).

Na pracovištích, kde je imunofluorescence zavedena a využívána systematicky pro diagnostiku i jiných autoimunitních onemocnění, než jen štítné žlázy, má tato metoda stále svoje oprávnění jako vylučovací metoda platná v rámci naznačených mezí. Pro středně intenzivní positivity v imunofluorescenčním vyšetření je třeba prověřit údaje jinou metodou, nejlépe IRMA.

Významný aspekt NIF diagnostiky představuje nutnost vyhnout se nespecifickým nálezům. Je nutné, aby lékař, který hodnotí fluorescenční preparáty, měl potřebné zkušenosti a správně mohl rozlišit specifickou a nespecifickou imunofluorescenci. Početnou skupinou nespecifických úkazů jsou reakce izohemaglutininů, nahodile přítomných ve vyšetřovaném séru, a jeho nejobvyklejším projevem je fluorescence cévní výstelky – endotelu (obr. 6). Nejde přitom o projev nějaké autoprotilátky zaměřené proti cévám, úkaz je reprodukovatelný vždy pouze na tkáních osoby s určitou krevní skupinou ze systému ABO a je zřejmě výrazem lokalizace krevně skupinových antigenů (aglutinogenů) v endoteliích. Proto se doporučuje užívat k imunofluorescenčním vyšetřením protilátek jen tkáňové řezy od osob s krevní skupinou 0 (168).

10. Oddíl B: Histologie a aspirační cytologie štítné žlázy versus výsledky nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (NIF)

V tomto oddílu jsme se zaměřili na porovnání morfologických nálezů (bioptických, cytologických) štítné žlázy proti imunofluorescenčním výsledkům detekce autoprotilátek proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze. Porovnání bylo provedeno u pacientů, u kterých diagnóza lymfocytární autoimunitní choroby štítné žlázy byla stanovena na našem ústavu v období 7 let, tj. od 1. 7. 1998 do 30. 6. 2005 na základě cytologického (FNAC), bioptického, nebo obou vyšetření a byla zároveň provedena detekce cirkulujících autoprotilátek proti koloidu a epitelu štítné žlázy pomocí metody NIF.

10.1. Materiál a metody

Za období od 1. 7. 1998 do 30. 6. 2005 tj. 7 let byla diagnóza autoimunitní lymfocytární choroby štítné žlázy na našem ústavu stanovena cytologicky u 361 pacientů; u 216 případů byla diagnóza potvrzena biopticky a u 2 zemřelých po provedené pitvě (celkový počet pacientů postižených autoimunitní lymfocytární chorobou štítné žlázy je 398). Z celkového počtu diagnostikovaných pacientů bylo u 246 z nich provedeno též vyšetření séra semikvantitativní nepřímou imunofluorescenční metodou (NIF) s cílem odhalit přítomnost antithyreoidních protilátek namířených proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze.

Tenkojehlová aspirace (FNAC) štítné žlázy byla prováděna školenými cytology, rentgenology, nebo chirurgy za použití sterilní techniky bez anestézie. Standardní aspirační technika zahrnuje použití jehly kalibru 21–23 s připojenou 20 ml plastovou stříkačkou. Aspirovaný materiál byl roztírán na podložní sklíčka, vysušen na vzduchu a pak bez další fixace barven May–Grünwald–Giemsa metodou (MGG). Cytologické diagnózy lézí štítné žlázy byly stanoveny na základě kritérií jež popsali četní autoři (46, 68, 97, 110, 113, 163, 173, 174, 192, 236).

Veškerý bioptický (eventuálně nekroptický) materiál určený k histologickému vyšetření byl fixován ve formalinu, zpracován standardní parafínovou technikou a obarven hematoxylinem-eozinem (135, 197, 257).

Metodický návod nepřímé imunofluorescenční techniky již byl popsán v předchozím oddílu A.

10.2. Výsledky

10.2.1. Hashimotova thyreoiditis

(porovnání morfologických a NIF výsledků)

Ve skupině pacientů, kterým byla v období mezi 1. 7. 1998 a 30. 6. 2005 stanovena diagnóza Hashimotovy thyreoiditidy morfologickými prostředky (aspirační cytologií, nebo biopticky a ve dvou případech po provedené pitvě) bylo 145 případů (výběr z celkem 398 osob postižených autoimunitní lymfocytární chorobou štítné žlázy), které splňovaly podmínku, že u nich bylo vedle již uvedených morfologických vyšetření, provedeno i vyšetření séra nepřímou imunofluorescencí (NIF) zaměřené na průkaz cirkulujících autoprotilátek proti koloidu (thyreoglobulinu) a epitelu (thyreoperoxidáze) štítné žlázy. Z uvedených 145 případů byla diagnóza Hashimotovy thyreoiditidy u 120 pacientů stanovena pouze cytologicky (C), u 14 pacientů pouze biopticky (B) a u 2 pacientů po provedené pitvě. U 9 pacientů byla diagnóza potvrzena jak cytologicky tak biopticky (C / B), jak je patrné z tabulky č.1. V tabulce č.2. jsou k případům HT, uvedeným v tabulce č.1. znázorněny výsledky týkající se výskytu autoprotilátek jak proti koloidu, tak i proti epitelu štítné žlázy za pomoci aplikované semikvantitativně hodnocené nepřímé imunofluorescence. Na první pohled je patrné, že z celkového počtu 145 případů se pouze u 6 pacientů nenašly autoprotilátky proti koloidu štítné žlázy a pokud jde o autoprotilátky proti epitelu štítné žlázy, tak u 10 vyšetřovaných chyběly. Největší podíl zaujímají pacienti se zjištěnou pozitivitou protilátek s vysokým stupněm intenzity (+++) a to 87 pacientů pro koloid štítné žlázy, a 96 pacientů pro epitel štítné žlázy. Dále 20 případů vykazovalo slabou (+) a dalších 32 pacientů střední pozitivitu (++) protilátek proti koloidu štítné žlázy. Podobný výsledek byl zaznamenán i u protilátek proti epitelu štítné žlázy, kde 12 pacientů jevílo slabý a 27 pacientů

Tab. 1.: Případy morfologicky diagnostikované jako Hashimotova thyreoiditida, porovnané s výsledky nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (autoprotilátek proti Tg a TPO)

Typ vyšetření		TgAb	TPOAb	Počet, %
Aspirační cytologie (C +)	–	6	10	120 (82,8)
	+	17	11	
	++	28	23	
	+++	69	76	
Bioptické vyšetření (B +)	–	0	0	14 (9,6)
	+	0	0	
	++	3	3	
	+++	11	11	
Pitva	–	0	0	2 (1,4)
	+	1	1	
	++	0	0	
	+++	1	1	
Aspirační cytologie (C +) Bioptické vyšetření (B +)	–	0	0	9 (6,2)
	+	2	0	
	++	1	1	
	+++	6	8	
Celkem		145	145	

TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze

Tab. 2.: Hashimotova thyreoiditida (morfologicky diagnostikovaná) – výskyt autoprotilátek proti Tg a TPO detegovaných metodou NIF

TgAb NIF	Počet	%	TPOAb NIF	Počet	%
–	6	4,1	–	10	6,9
+	20	13,8	+	12	8,3
++	32	22,1	++	27	18,6
+++	87	60,0	+++	96	66,2
Celkem	145		Celkem	145	

NIF = nepřímá imunofluorescence, TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze

střední stupeň intenzity positivity. Takže celkový podíl případů s pozitivními hodnotami protilátek proti koloidu štítné žlázy u Hashimotovy thyreoiditidy

dosahuje 95,9 % (139 případů tj. 145 minus 6 negativních), protilátky proti thyreoperoxidáze byly prokázány u 93,1 % (135 pacientů tj. 145 minus 10 negativních) (tab. 5).

10.2.2. Fokální lymfocytární thyreoiditida

(porovnání morfologických a NIF výsledků)

Stejným způsobem jako v předchozím odstavci bylo za již uvedené období od 1. 7. 1998 do 30. 6. 2005 zaznamenáno 101 případů fokální lymfocytární thyreoiditidy. Tato diagnóza byla stanovena buď cytologicky (C) nebo biopticky (B). Všechny 101 pacientů splňovalo podmínku, že u nich bylo provedeno také vyšetření séra nepřímou imunofluorescencí, zaměřené na průkaz autoprotiáték proti koloidu a epitelu štítné žlázy (tab. 3). Z tabulky č.3. je patrné, jak byla celá sestava 101 pacientů dále členěna. Většina (tj. 60 pacientů) měla provedenou pouze tenkojehlovou aspirační cytologii štítné žlázy a 21 pacientů podstoupilo pouze bioptické (histologické) vyšetření. U ostatních 20 vyšetřených pacientů byla provedena obě morfologická vyšetření s následujícím výsledkem: 3 pacienti měli cytologicky stanovenou diagnózu Hashimotovy thyreoiditidy a biopticky potvrzenou fokální lymfocytární thyreoiditidu (C HT / B FLT), dalších 5 pacientů mělo falešně negativní cytologii FLT (C - / B +), 7 pacientů mělo falešně pozitivní cytologii FLT (C + / B -) a pouze 5 pacientů mělo potvrzenou diagnózu fokální lymfocytární thyreoiditidy jak cytologicky, tak biopticky (C + / B +). Tabulka č.4. přehledňuje výsledky pátrání nepřímou imunofluorescencí po autoprotiátkách proti koloidu a epitelu štítné žlázy u cytohistologicky diagnostikovaných případů FLT. Negativních případů, pokud jde o autoprotiátku proti koloidu štítné žlázy, bylo 37, a 38 ve vztahu k protilátce proti epitelu štítné žlázy. Rozložení pacientů s autoprotiátkami proti koloidu štítné žlázy podle stupňů intenzity bylo následující: 22 pacientů mělo slabou, 17 pacientů střední a 25 pacientů vysokou hodnotu. Výsledky týkající se intenzity protilátek proti epitelu štítné žlázy byly téměř identické, a to následující: 16 případů slabě, 22 středně, a 25 silně pozitivních. Celkový počet pozitivních případů s autoprotiátkami proti koloidu štítné žlázy zahrnuje 64 pacientů (63,4 %), a 63 pacientů (62,4 %) ve vztahu k protilátce proti epitelu štítné žlázy (tab. 5).

Tab. 3.: Případy morfologicky diagnostikované jako FLT, porovnané s výsledky nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (TgAb a TPOAb)

Typ vyšetření		TgAb	TPOAb	Počet, %
Aspirační cytologie (C +)	–	24	25	60 (59,4)
	+	11	9	
	++	12	13	
	+++	13	13	
Bioptické vyšetření (B +)	–	5	5	21 (20,8)
	+	4	2	
	++	5	7	
	+++	7	7	
Aspirační cytologie (C HT) Bioptické vyšetření (B FLT)	–	0	1	3 (3,0)
	+	1	0	
	++	0	0	
	+++	2	2	
Aspirační cytologie (C –) Bioptické vyšetření (B +)	–	1	1	5 (4,9)
	+	2	1	
	++	0	1	
	+++	2	2	
Aspirační cytologie (C +) Bioptické vyšetření (B –)	–	4	4	7 (6,9)
	+	3	3	
	++	0	0	
	+++	0	0	
Aspirační cytologie (C +) Bioptické vyšetření (B +)	–	3	2	5 (4,9)
	+	1	1	
	++	0	1	
	+++	1	1	
Celkem		101	101	

HT = Hashimotova thyreoiditida, FLT = fokální lymfocytární thyreoiditida, TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze

Cytodiagnostická přesnost FNAC u FLT byla biopticky potvrzena u 25 % případů (5 případů C+ / B+ z 20 C / B) (tab. 6).

10.3. Diskuse

Ve výsledcích je upozorněno na zřetelný meziskupinový rozdíl v intenzitě autoimunitní humorální odpovědi, zachycený v tabulkách č. 2. a 4. Tato intenzita

Tab. 4.: Fokální lymfocytární thyreoiditida (případy morfologicky diagnostikované) – výskyt TgAb a TPOAb detegovaných metodou NIF

TgAb NIF	Počet	%	TPOAb NIF	Počet	%
–	37	36,6	–	38	37,6
+	22	21,8	+	16	15,8
++	17	16,8	++	22	21,8
+++	25	24,8	+++	25	24,8
Celkem	101		Celkem	101	

TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze, NIF = nepřímá imunofluorescence

procesu difúzního lymfocytárního typu jakým je Hashimotova thyreoiditida než u děje sice podstatou podobného, ale kvantitativně mnohem méně vyjádřeného morfologicky, omezujícího se pouze na drobnoložiskové nespojitě postižení parenchymu štítné žlázy jak tomu je u fokální lymfocytární thyreoiditidy. Není vyloučeno, že uvedený rozdíl by mohl být i projevem předurčené konstituční rozmanitosti v tom smyslu, že někteří jedinci mají brzdící imunologické mechanismy výkonnější a ty pak i při podnětu standardní velikosti vedou jen ke vzniku mitigované reakce typu fokální lymfocytární thyreoiditidy, zatímco u druhých je náchylnost k přestřelujícím reakcím tak velká, že při nezměněné

Tab. 5.: Souborný přehled sdružující tabulky 2. a 4. – procentuální zastoupení u protilátkově negativních a protilátkově pozitivních případů HT a FLT v metodě NIF

Tab. č. 2 a 4	NIF negativní HT (počet, %)	NIF negativní FLT (počet,%)	NIF pozitivní HT (počet, %)	NIF pozitivní FLT (počet,%)
TgAb	6 (4,1)	37 (36,6)	139 (95,9)	64 (63,4)
TPOAb	10 (6,9)	38 (37,6)	135 (93,1)	63 (62,4)

HT = Hashimotova thyreoiditida, FLT = fokální lymfocytární thyreoiditida, NIF = nepřímá imunofluorescence, TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze

Tab. 6.: Cytodiagnostická přesnost FNAC u fokální lymfocytární thyreoiditidy a procentuální zastoupení ostatních výsledků

	Počet	%
falešně pozitivní FLT (C + / B -)	5	35
falešně negativní FLT (C - / B +)	7	25
správně pozitivních FLT (C + / B +) – cytodiagnostická přesnost	5	25
C HT / B FLT	3	15
Celkem	20	

C = cytologie, B = biopsie, HT = Hashimotova thyreoiditida, FLT = fokální lymfocytární thyreoiditida

intenzitě podnětu reagují vždy mohutnou difúzní odpovědí typu Hashimotovy thyreoiditidy.

Z výsledků znázorněných v tabulce č.2. (případy s diagnózou Hashimotovy thyreoiditidy) a č.4. (případy s diagnózou fokální lymfocytární thyreoiditidy) byla vytvořena součtová tabulka č.5., ve které je vypočteno procentuální zastoupení všech negativních a souborně všech pozitivních případů (+ až +++) samostatně pro thyreoglobulin a samostatně pro thyreoperoxidázu u pacientů s fokální a difúzní lymfocytární thyreoiditidou. Z tabulky vyplývá, že procentuální vyjádření případů s pozitivními autoprotilátkami, tj. proti koloidu i epitelu štítné žlázy u pacientů s HT dosahuje přibližně 96 % a 93 %, zatímco u pacientů s FLT je nižší a pohybuje se kolem 63 % pro oba údaje. Z těchto výsledků je dále patrné že u HT procento pacientů s pozitivními autoprotilátkami proti koloidu štítné žlázy (96 %) nevýrazně dominuje nad případy s pozitivními autoprotilátkami proti epitelu štítné žlázy (93 %), tj. jen o tři procenta. U pacientů s FLT je procentuální zastoupení obou autoprotilátek podobně vyrovnané (thyroglobulin 37 %, thyreoperoxidáza 38 %) (tab. 5). Do této tabulky byly zahrnuty i 3 falešně cytologicky pozitivní případy FLT (C + / B -) z tabulky č.3., vykazující slabou pozitivitu pro thyreoglobulin (3x) a thyreoperoxidázu (3x), které však nijak podstatně neovlivňují konečný výsledek. Může se jednat o případy v počáteční fázi autoimunitní choroby, kde přítomnost autoprotilátek v séru ještě není doprovázena histopatologickými změnami štítné žlázy. Rovněž do této tabulky

byly zahrnuty i 4 falešně cytologicky pozitivní případy FLT (C + / B -), které rovněž mají negativní autoprotílátky (u těchto případů se jedná o cytodiagnostickou chybu FNAC potvrzenou biopticky, že se nejedná o FLT). Čtyři z 5 falešně cytologicky negativních případů FLT (C - / B +) má prokázané autoprotílátky proti koloidu a epitelu štítné žlázy. Zdrojem této cytodiagnostické chyby je špatné cílení, při kterém malá ložiska fokální lymfocytární thyreoiditidy byla minuta a tak vznikl klamný, cytologicky negativní nález.

Cytodiagnostická přesnost FNAC u FLT byla biopticky potvrzena u 25 % případů (5 případů C+ / B+ z 20 C / B). Jak vyplývá z tabulky č.6. dá se předpokládat, že u případů FLT diagnostikovaných pouze aspirační cytologií (C+) přibližně 35 % může být falešně pozitivních (21 případů z 60 vyšetřených pouze aspirační cytologií). Z tabulky č.3. vyplývá, že u 24 pacientů diagnostikovaných pouze aspirační cytologií chybějí autoprotílátky proti koloidu a u 25 proti epitelu štítné žlázy. Takže tito pacienti mohou být na základě nepřímé imunofluorescence zahrnuti do skupiny cytologicky falešně pozitivní FLT.

V našem pozorování se ukazuje, že porovnání morfologických nálezů a sérologických údajů činí z imunofluorescenční techniky užitečné vyšetření, které morfologicky předpokládanou imunologickou chorobu potvrzuje. Koriguje nespolehlivé cytologické nálezy štítné žlázy tam, kde cytologie sama selhává (zvláště v případě falešně negativních a falešně pozitivních výsledků) u pacientů s klinickou diagnózou autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy.

11. Oddíl C: Aspirační cytologie štítné žlázy versus histologie štítné žlázy

V tomto oddílu jsme se zaměřili na srovnání samotných morfologických nálezů (bioptických, cytologických) štítné žlázy. Porovnání bylo provedeno u pacientů, u kterých diagnóza lymfocytární choroby štítné žlázy byla stanovena na našem ústavu v období 7 let, tj. od 1. 7. 1998 do 30. 6. 2005 na základě obou vyšetření, cytologického (FNAC) a bioptického.

11.1. *Materiál a metody*

V studii byly využity výsledky elektronické archivace, šlo zhruba o 6 000 cytologických a 3 000 histologických vyšetření štítné žlázy. Po vzájemném porovnání byla nalezena mezi uvedenými počty vyšetření skupina 182 případů autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy, splňující výše zmíněnou podmínku obojího vyšetření štítné žlázy (cytologie a biopsie). U 72 pacientů byla stanovena diagnóza Hashimotovy thyreoiditidy buď tenkojehlovou aspirací štítné žlázy cytologicky (C), nebo biopticky (B), a u 110 případů byla diagnostikována fokální lymfocytární thyreoiditida. Z hlediska technologického zpracování cytologických případů bylo jednotně použito po předchozím sušení na vzduchu barvení metody May–Giemsa–Grünwald (MGG). Cytologická diagnostická kritéria byla převzata z prací zabývajících se podobnou tematikou (46, 68, 97, 110, 113, 163, 173, 174, 192, 236).

Veškerý bioptický materiál určený k histologickému vyšetření byl fixován v 10% formalinu, zpracován standardní parafinovou technikou a obarven hematoxylinem–eozinem. Pro histologické hodnocení lézí štítné žlázy byla použita standardní kritéria (135, 197, 257).

Na základě výsledků byl proveden výpočet cytodiagnostické přesnosti FNAC samostatně pro HT a samostatně pro FLT pomocí následujícího matematického vzorce:

$$\text{Cytodiagnostická přesnost FNAC v \%} = \frac{\text{celkový počet pozitivních případů vyšetřených cytologicky a bioticky (C + / B +)}}{\text{celkový počet všech případů vyšetřených cytologicky a bioticky (C a B)}} \times 100$$

11.2. Výsledky

11.2.1. Hashimotova thyreoiditida

(cytologicko-histologické porovnání)

Výše zmíněnou podmínku obojího vyšetření splňovalo 72 pacientů, u kterých byla stanovena diagnóza Hashimotovy thyreoiditidy buď tenkojehlovou aspirací štítné žlázy cytologicky (C), nebo bioticky (B). V 68 případech byla diagnóza HT potvrzena histologicky. U 54 pacientů byla diagnóza potvrzena jak cytologicky, tak bioticky (C + / B +). Čtyři cytologické případy vykazovaly falešně pozitivní výsledky (C + / B -) a 13 cytologických případů bylo falešně negativních (C - / B +). Jeden případ byl cytologicky hodnocen jako fokální lymfocytární thyreoiditida (tab. 7).

Úspěšnost cytologické diagnostiky FNAC u Hashimotovy thyreoiditidy byla 75 %.

Tab. 7.: Hashimotova thyreoiditida
(srovnání nálezů cytologických a biotických)

	Počet pacientů	%
C FLT / B +	1	1,4
C + / B -	4	5,6
C - / B +	13	18,0
C + / B +	54	75,0
Celkem	72	

C = cytologie, B = biopsie, FLT = fokální lymfocytární thyreoiditida

11.2.2. Fokální lymfocytární thyreoiditida (cytologicko-histologické porovnání)

Fokální lymfocytární thyreoiditida byla diagnostikována u 110 pacientů a to buď pomocí tenkojehlové aspirační cytologie (C) nebo biopticky (B). Biopticky byla diagnóza FLT potvrzena u 65 pacientů, přičemž pouze u 22 pacientů byla diagnóza stanovena jak aspirační cytologií tak i biopsií (C + / B +). 26 cytologických výsledků bylo falešně negativních (C – / B +) a 45 bylo falešně pozitivních (C + / B –). 14 případů bylo cytologicky hodnoceno jako Hashimotova thyreoiditida (C HT), a ve 3 případech bylo cytologicky diferenciatně diagnosticky rozvažováno mezi Hashimotovou thyreoiditidou, nebo fokální lymfocytární thyreoiditidou (C HT / FLT) (tab. 8).

Cyodiagnostická přesnost FNAC u fokální lymfocytární thyreoiditidy byla potvrzena biopticky jen ve 20 % případů.

Tab. 8.: Fokální lymfocytární thyreoiditida
(porovnání nálezů cytologických a bioptických)

	Počet pacientů	%
C + / B –	45	40,9
C – / B +	26	23,6
C + / B +	22	20,0
C HT / B +	14	12,7
C HT / FLT // B +	3	2,7
Celkem	110	

C = cytologie, B = biopsie, HT = Hashimotova thyreoiditida,
FLT = fokální lymfocytární thyreoiditida

11.3. *Diskuse*

Cyodiagnostická přesnost FNAC u HT ve sledovaném souboru je 75 %. Nguyen a spol. popsali 92 % cyodiagnostickou přesnost tenkojehlové aspirační cytologie, tj. ze 146 cytologických aspirátů štítné žlázy byla diagnóza Hashimotovy thyreoiditidy potvrzena i biopticky u 134 pacientů (164). Překvapivá cyodiagnostická nepřesnost (neshoda), v rámci diagnostiky FLT, ve srovnání se stupněm shody mezi cytologií a bioptickou histologií u Hashimotovy

thyreoiditidy může mít dvojí důvod. Jedním zdrojem neshody jsou problémy interpretační – malý shluk lymfocytů byl mylně pokládán za projev Hashimotovy thyreoiditidy. Na druhé straně je zdrojem chyb a omylů špatné cílení, při kterém se mohou minout malá ložiska fokální lymfocytární thyreoiditidy a tak imitovat cytologicky negativní nález. Při diagnostice autoimunitních lymfocytárních chorob štítné žlázy se u případů fokální lymfocytární thyreoiditidy jeví cytologické vyšetření jako postup s překvapivě nízkou schopností záchytu, ve srovnání s efektivitou vyšetření histologického. Jde o závažné a překvapující zjištění. Takže se vnucuje nejistota co do bezchybnosti metodických úvah. V souvislosti s použitým hodnotícím principem spočívajícím v porovnávání morfologických nálezů vzniká totiž otázka oprávněnosti zvoleného postupu. Mohlo by se stát, že budou porovnávány nahodilé atributy nemající vztah k podstatě zkoumaného chorobného dění. V dané situaci, tj. u lymfocytárních zánětů štítné žlázy není tato obava na místě, a to z toho důvodu, že zmíněné dvě afekce (Hashimotova thyreoiditida a fokální lymfocytární intersticiální thyreoiditida) jsou jako nosologická jednotka definovány právě histologicky. Zejména Hashimotova thyreoiditida byla již původně vymezena patologicko–anatomicky (a tedy i histologicky) jako chronická nespecifická (tj. netuberkulózní) nehnisavá (lymfoplasmocytární) thyreoiditida. Uvedená, trvale neměnná kompletní nosologická definice klasicky neobsahovala ani jeden biochemický, nebo imunologický, event. hormonálně účinkující faktor. Tyto byly přidány až později. Histologický nález není tedy pouhým morfologickým aspektem Hashimotovy thyreoiditidy, nýbrž je vyjádřením její podstaty čili identity, na jímž základě je vlastní nemoc definována (78).

Lze tedy využít ve srovnávací studii histologického nálezu jako zlatého standardu, který pokud je použit jako východisko, tak zaručuje logické definiční sepjetí s nepochybnou primární normou, a to normou histopatologickou. Podstatou okolnosti je volba morfologické metody, zejména rozhodnutí mezi cytologií a histologií. Neboť jen histologie operačních resekátů skýtá svým rozsahem vyšetřovaného řezu jistotou, pokud jde o záchytnost chorobných změn. Tato záchytnost je nepochybně mnohem větší u preparátů histologických o ploše několika desítek mm^2 , na rozdíl od cytologie zabírající jen buňky

v bezprostředním okolí hrotu jehly. Navíc lze z histologického preparátu získat přehled, zda jde o postižení souvislé, difúzní, příslušející Hashimotově thyreoiditidě, nebo jen ložiskové, příslušející fokální lymfocytární thyreoiditidě. Zjištěná překvapující slabina cytologického vyšetření je odrazem reality, nikoliv metodického pochybení.

12. Závěry práce

- 1) V literatuře deklarovanou a v našem materiálu zachycenou nespolehlivost imunofluorescenčního vyšetření ve srovnání s výsledky IRMA metody lze hodnotit ze dvou hledisek. Nejhorší výsledky (špatná shoda) jsou pozorovány u případů s nízkými pozitivitami na jeden (+) nebo na dva (++). Vynikající shoda je zjišťována u případů s negativními imunofluorescenčními výsledky (shoda 99,1 % pro thyreoglobulin a 99,3 % pro thyreoperoxidázu). Poměrně dobrá shoda je pozorována u druhé krajnosti, u nejvyšších hodnot imunofluorescenčního vyšetření na tři (+++) a to 83,3 % pro thyreoglobulin a 67,5 % pro thyreoperoxidázu.
- 2) U případů, kde imunofluorescenční screeningové vyšetření na průkaz antithyreoidních protilátek (TgAb a TPOAb) je hodnoceno na jeden (+) nebo na dva (++), je vhodné imunofluorescenční vyšetření zopakovat po určité době, nebo provést vyšetření kvantitativní metodou jako je IRMA.
- 3) Malými nároky na přístrojové vybavení je provozování imunofluorescenční detekce možné i na malém pracovišti. Všechny metody závislé na průmyslovém zpracování séra potřebují takové vybavení, že jsou vhodné jen pro velká pracoviště.
- 4) Cenným rysem imunofluorescenčního vyšetření je jeho flexibilita a operativnost – vyšetření je možno provést jako statimové – nevyžaduje kumulaci požadavků, aby se jako u jiných metodik muselo z hospodárných důvodů čekat na využití celé kapacity testační soupravy.
- 5) Kromě běžně uplatňovaných požadavků (každodenní zařazování negativní a pozitivní kontroly) je vhodné zajistit hodnocení imunofluorescenčních nálezů (zejména jejich semikvantitativního aspektu) jedním a týmž hodnotitelem.

- 6) Okolnost, že autoprotilátky neztrácejí vazebnou schopnost ani po týdnu přechovávání při pokojové teplotě, dovoluje řešit problematické případy (neshoda imunofluorescenčního vyšetření s klinickým stavem a ostatními nálezy) zasláním vzorků sér na centrální referenční pracoviště poštou.
- 7) Je třeba dodržovat podmínku, aby zdroj tkání pro detekci autoprotilátek měl krevní skupinovou příslušnost 0, jinak dochází k rušivé imunofluorescenci některých tkáňových struktur nesoucích také izohemaglutinogeny, jako je cévní výstelka – endotelie.
- 8) Vyšetřované sérum standardně ředit v poměru 1:10 fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem (PBS); obvykle stačí toto ředění nejen k pročištění pozadí, ale i k oslabení vazby nespecifických protilátek.
- 9) Procentuální zastoupení autoprotilátek proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze je u difúzní lymfocytární thyreoiditidy vyšší než u fokální lymfocytární thyreoiditidy a je proporcionální se stupněm poškození štítné žlázy.
- 10) Ukazuje se, že porovnání morfologických nálezů a sérologických údajů činí z imunofluorescenční techniky užitečné vyšetření, které morfologicky předpokládanou imunologickou chorobu potvrzuje. Koriguje nespolehlivé cytologické nálezy v rámci FLT tam, kde cytologie sama selhává (zvláště v případech falešně negativních a falešně pozitivních výsledků) u pacientů s klinickou diagnózou autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy.
- 11) Cytodiagnostická přesnost FNAC u Hashimotovy thyreoiditidy ve sledovaném souboru je 75 % a u fokální lymfocytární thyreoiditidy je 20 %. Překvapivá cytologická nepřesnost (neshoda) v rámci diagnostiky fokální lymfocytární thyreoiditidy může mít dvojí důvod. Jedním zdrojem neshody jsou problémy interpretační – malý shluk lymfocytů byl mylně pokládán za projev Hashimotovy thyreoiditidy. Na druhé straně je zdrojem chyb a

omylů špatné cílení, při kterém se mohou minout malá ložiska fokální lymfocytární thyreoiditidy a tak imitovat cytologicky negativní nález.

14. Literatura

1. **Adams DD, Purves HD.** Abnormal responses in the assay of thyrotropins. *Proc Univ Otago Med Sch.* 1956; 34: 11-12.
2. **Aggarwal S, Gurney AL.** IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* 2002; 71: 1-8.
3. **Albert LJ, Inman RD.** Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med.* 1999; 341: 2068-2074.
4. **Albrecht P.** Vizualizácia antigénov metódou fluorescentných protilátok. *Stát zdrav nakl, Praha,* 1963: 160.
5. **Allahabadia A, Gough SC.** The different approaches to the genetic analysis of autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol.* 1999; 163: 7-13.
6. **Altmann DG.** Practical statistics for medical research. Chapman & Hall, London, 1991: 403-409.
7. **Ameisen JC.** The origin of programmed cell death. *Science.* 1996; 272: 1278-1279.
8. **Amino N, Miyai K, Onishi T, Hashimoto T, Arai K.** Transient hypothyroidism after delivery in autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976; 42: 296-301.
9. **Amino N.** Relationship of spontaneous to postpartum silent thyroiditis. In: *Hamburger JI, Miller JM (eds.), Controversies in clinical thyroidology.* Springer-Verlag, New York, 1981: 35.
10. **Andrikoula M, Tsatsoulis A.** The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol.* 2001; 144: 561-568.
11. **Ansar Ahmed S, Young PR, Penhale WJ.** The effects of female sex steroids on the development of autoimmune thyroiditis in thymectomized and irradiated rats. *Clin Exp Immunol.* 1983; 54: 351-358.
12. **Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, Fernandez-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, Pujol-Borrell R.** Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol.* 2001; 159: 861-873.

13. **Arcscott PL, Knapp J, Rymaszewski M, Bartron JL, Bretz JD, Thompson NW, Baker JR Jr.** Fas (APO-1, CD95)-mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor. *Endocrinology*. 1997; 138: 5019-5027.
14. **Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL.** Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*. 1989; 84: 1045-1049.
15. **Bagchi N, Brown TR, Sundick RS.** Thyroid cell injury is an initial event in the induction of autoimmune thyroiditis by iodine in obese strain chickens. *Endocrinology*. 1995; 136: 5054-5060.
16. **Baker JR Jr.** Autoimmune endocrine disease. *J Am Med Ass*. 1997; 278: 1931-1937.
17. **Barbesino G, Tomer Y, Concepcion E, Davies TF, Greenberg DA.** Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease: 1. Selected immunoregulatory genes. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 1580-1584.
18. **Barinaga M.** Forging a path to cell death. *Science*. 1996; 273: 735-737.
19. **Bastenie PA, Bonnyns M, Nève P, Vanhaelst L, Chailly M.** Clinical and pathological significance of asymptomatic atrophic thyroiditis. A condition of latent hypothyroidism. *Lancet*. 1967; 1: 915-918.
20. **Belyavin G, Trotter WR.** Investigations of thyroid antigens reacting with Hashimoto sera; evidence for an antigen other than thyroglobulin. *Lancet*. 1959; 1: 648-652.
21. **Bernard O, Hozumi N, Tonegawa S.** Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell*. 1978; 15:1133-1144.
22. **Beutler BA.** The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl*. 1999; 57: 16-21.
23. **Beutner EH, Witebsky E, Rose NR, Gerbasi JR.** Localization of thyroid and spinal cord autoantibodies by fluorescent antibody technic. *Soc Exp Biol Med*. 1958; 97: 712-716.

24. **Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC.** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987; 329: 512-518.
25. **Blüher M, Krohn K, Wallaschofski H, Braverman LE, Paschke R.** Cytokine gene expression in autoimmune thyroiditis in BioBreeding/Worcester rats. *Thyroid*. 1999; 9: 1049-1055.
26. **Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M.** Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet*. 1983; 2: 1115-1119.
27. **Boyden SV.** The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J Exp Med*. 1951; 93: 107-120.
28. **Brack C, Hirama M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S.** A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*. 1978; 15: 1-14.
29. **Breitmeyer JB.** Lymphocyte activation. How T cells communicate. *Nature*. 1987; 329: 760-761.
30. **Brill S, Globerson A.** Autoimmunity and aging. *Isr J Med Sci*. 1988; 24: 732-734.
31. **Brix TH, Hansen PS, Kyvik KO, Hegedus L.** Aggregation of thyroid autoantibodies in first-degree relatives of patients with autoimmune thyroid disease is mainly due to genes: a twin study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004; 60: 329-334.
32. **Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P.** A new member of the immunoglobulin superfamily - CTLA-4. *Nature*. 1987; 328: 267-270.
33. **Burdette S, Schwartz RS.** Current concepts: immunology. Idiotypes and idiotypic networks. *N Engl J Med*. 1987; 317: 219-224.
34. **Burek CL, Rose NR.** Thyroglobulin autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y. (eds.), *Autoantibodies*, Elsevier Science, Amsterdam, 1996: 810-815.
35. **Burnet FM.** *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Cambridge University Press, 1959: 59.

36. **Carpenter CC, Solomon N, Silverberg SG, Bledsoe T, Northcutt RC, Klinenberg JR, Bennett IL Jr, Harvey AM.** Schmidt's syndrome (thyroid and adrenal insufficiency). A review of the literature and a report of fifteen new cases including ten instance of coexistent diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)*. 1964; 43: 153-180.
37. **Carter LL, Dutton RW.** Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 1996 ; 8: 336-342.
38. **Cartolano GL, Dubel L, Ocwieja T, Fareau B, Johanet C.** Anticorps antithyroïde au cours des thyroïdites autoimmunes: comparaison technique. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1997; 55: 614-618.
39. **Casali P, Burastero SE, Nakamura M, Inghirami G, Notkins AL.** Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science*. 1987; 236: 77-81.
40. **Claman HN.** The biology of the immune response. *JAMA*. 1987; 258: 2834-2840.
41. **Clark OH, Gerend PL, Davis M, Goretzki PE, Hoffman PG Jr.** Estrogen and thyroid-stimulating hormone (TSH) receptors in neoplastic and nonneoplastic human thyroid tissue. *J Surg Res*. 1985; 38: 89-96.
42. **Clutterbuck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ.** Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood*. 1989; 73: 1504-1512.
43. **Coons AH, Kaplan MH.** Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med*. 1950; 91: 1-13.
44. **Corapcioglu D, Tonyukuk V, Kiyani M, Yilmaz AE, Emral R, Kamel N, Erdogan G.** Relationship between thyroid autoimmunity and *Yersinia enterocolitica* antibodies. *Thyroid*. 2002; 12: 613-617.
45. **Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Carayon P, Lissitzky S.** Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett*. 1985; 190: 147-152.

46. **Čáp J, Ryška A.** Záněty štítné žlázy. In: *Aspirační cytologie štítné žlázy*. Nucleus HK, Hradec Králové, 2003: 52-64.
47. **Daniele RP, Dauber JH, Rossman MD.** Immunologic abnormalities in sarcoidosis. *Ann Intern Med.* 1980; 92: 406-416.
48. **Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP.** Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol.* 1988; 18: 1901-1905.
49. **Dausset J, Degos L, Hors J.** The association of the HL-A antigens with diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 1974; 3: 127-149.
50. **Dayan CM, Daniels GH.** Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med.* 1996; 335: 99-107.
51. **Degroot LJ, Niepomniszcze H.** Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism.* 1997; 26: 665-718.
52. **Del Prete GF, Vercelli D, Tiri A, Maggi E, Mariotti S, Pinchera A, Ricci M, Romagnani S.** In vivo activated cytotoxic T cells in the thyroid infiltrate of patients with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol.* 1986; 65: 140-147.
53. **De Maria R, Testi R.** Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. *Immunol Today.* 1998; 19: 121-125.
54. **Dinarello CA, Mier JW.** Interleukins. *Annu Rev Med.* 1986; 37: 173-178.
55. **Dinarello CA.** Interleukin-18. *Methods.* 1999; 19: 121-132.
56. **Doniach D, Bottazzo GF.** Polyendocrine autoimmunity. In: Franklin EC. (ed), *Clinical immunology update*, Elsevier, New York, 1981: 95-121.
57. **Doniach D, Cudworth AG, Khoury EL, Bottazzo GF.** Autoimmunity and the HLA-system in endocrine diseases. In: O'Riordan JLH. (ed.), *Recent advances in Endocrinology and Metabolism*, No. 2., Churchill Livingstone, London. 1982: 99-132.
58. **Dreyer WJ, Bennett JC.** The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1965; 54: 864-869.

59. **Dugan JM, Atkinson BF, Avitabile A, Schimmel M, LiVolsi VA.** Psammoma bodies in fine needle aspirate of the thyroid in lymphocytic thyroiditis. *Acta Cytol.* 1987; 31: 330-334.
60. **Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ.** Interleukin 1: an immunological perspective. *Annu Rev Immunol.* 1985; 3: 263-287.
61. **Du X, Williams DA.** Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood.* 1997; 89: 3897-3908.
62. **Ehrlich P, Morgenroth J.** On haemolysins: fifth communication. In Himmelweit F, Marquardt M, Dale H. (eds.), *The collected papers of Paul Ehrlich*, Pergamon, London, 1956: 205-212.
63. **Engler H, Staub JJ, Althaus B, Ryff-deLeche A, Gerber H.** Assessment of antithyroglobulin and antimicrosomal autoantibodies in patients with autoimmune thyroid disease: comparison of haemagglutination assay, enzyme-linked immunoassay and radioligand assay. *Clin Chim Acta.* 1989; 179: 251-263.
64. **Farrar JJ, Benjamin WR, Hilfiker ML, Howard M, Farrar WL, Fuller-Farrar J.** The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol Rev.* 1982; 63: 129-166.
65. **Fingerland A, Vortel V, Endrys J.** Oesophagitis herpetica. *Cas Lek Cesk.* 1952; 91:473-475.
66. **Flavell RA, Allen H, Burkly LC, Sherman DH, Waneck GL, Widera G.** Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. *Science.* 1986; 233: 437-443.
67. **French LE, Tschopp J.** Thyroiditis and hepatitis: Fas on the road to disease. *Nat Med.* 1997; 3: 387-388.
68. **Friedman M, Shimaoka K, Rao U, Tsukada Y, Gavigan M, Tamura K.** Diagnosis of chronic lymphocytic thyroiditis (nodular presentation) by needle aspiration. *Acta Cytol.* 1981; 25: 513-522.
69. **Fromm GA, Lascano EF, Bur GE, Escalenta D.** Tiroiditis cronica inespecifica. *Rev Assoc Med Arg.* 1953; 67: 162-170.

70. **Fry TJ, Mackall CL.** Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol.* 2001; 22: 564-571.
71. **Fukata S, Kuma K, Sugawara M.** Relationship between cigarette smoking and hypothyroidism in patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest.* 1996; 19: 607-612.
72. **Fulthorpe AJ, Roitt IM, Doniach D, Couchman K.** A stable sheep cell preparation for detecting thyroglobulin auto-antibodies and its clinical applications. *J Clin Pathol.* 1961; 14: 654-660.
73. **Gearhart PJ, Bogenhagen DF.** Clusters of point mutations are found exclusively around rearranged antibody variable genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80: 3439-3443.
74. **Gharavi AE, Chu JL, Elkon KB.** Autoantibodies to intracellular proteins in human systemic lupus erythematosus are not due to random polyclonal B cell activation. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 1337-1345.
75. **Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A.** Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science.* 1997; 275: 960-963.
76. **Gonzalez JL, Wang HH, Ducatman BS.** Fine-needle aspiration of Hurthle cell lesions. A cytomorphologic approach to diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 1993; 100: 231-235.
77. **Graves RJ.** A newly observed affection of the thyroid gland in females. *Med Surg J.* 1835; 7: 516-517. Reprinted in *Medical Classics.* 1940; 5: 33-36.
78. **Greenspan FS.** Štítná žláza. In: Greenspan FS, Baxter JD. (eds.), *Základní a klinická endokrinologie*, 4 vydání (1. české vydání), Nakladatelství H&H Vyšehradská, Praha, 2003: 174-245.
79. **Halberg P, Simonsen J, Christensen HE, Pedersen H, Wanstrup J, Werdelin O.** Focal and diffuse thyroiditis and thyroid antibodies. Immunopathological correlations. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1968; 73: 49-59.
80. **Hall R.** Pregnancy and autoimmune endocrine disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1995; 9: 137-155.

81. **Halpern R, Davidson A, Lazo A, Solomon G, Lahita R, Diamond B.** Familial systemic lupus erythematosus. Presence of a cross-reactive idiotype in healthy family members. *J Clin Invest.* 1965; 76: 731-736.
82. **Hamada N, Grimm C, Mori H, DeGroot LJ.** Identification of a thyroid microsomal antigen by Western blot and immunoprecipitation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985; 61: 120-128.
83. **Hardy RR, Hayakawa K, Shimizu M, Yamasaki K, Kishimoto T.** Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. *Science.* 1987; 236: 81-83.
84. **Hashimoto H.** Zur Kenntnis der lymphomatösen Schilddrüse (Struma lymphomatosa). *Arch Klein Chir.* 1912; 97: 219-248.
85. **Hintze, J.** NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical Systems and Power Analysis Statistical Systems. Kaysville, Utah, 2001.
86. **Hay ID.** Thyroiditis: a clinical update. *Mayo Clin Proc.* 1985; 60: 836-843.
87. **Hawkins BR, Cheah PS, Dawkins RL, Whittingham S, Burger HG, Patel Y, Mackay IR, Welborn TA.** Diagnostic significance of thyroid microsomal antibodies in randomly selected population. *Lancet.* 1980; 2: 1057-1059.
88. **Heinrich G, Traunecker A, Tonegawa S.** Somatic mutation creates diversity in the major group of mouse immunoglobulin kappa light chains. *J Exp Med.* 1984; 159: 417-435.
89. **Heward J, Gough SC.** Genetic susceptibility to the development of autoimmune disease. *Clin Sci (Lond.).* 1997; 93: 479-491.
90. **Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T.** Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 1990; 11: 443-449.
91. **Holborow EJ, Brown PC, Roitt IM, Doniach D.** Cytoplasmic localization of "complement-fixing" auto-antigen in human thyroid epithelium. *Br J Exp Pathol.* 1959; 40: 583-588.
92. **Hood L, Kronenberg M, Hunkapiller T.** T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell.* 1985; 40: 225-229.
93. **Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD.** Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas moleküle. *Science.* 1994; 263: 1759-1762.

94. **Chistiakov DA, Turakulov RI.** CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol.* 2003; 31: 21-36.
95. **Isaacs A, Lindenmann J.** Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957; 147: 258-267.
96. **Ishii N, Nagy ZA, Klein J.** In vitro correlate for a clonal deletion mechanism of immune response gene-controlled nonresponsiveness. *J Exp Med.* 1983; 157: 998-1005.
97. **Jayaram G, Marwaha RK, Gupta RK, Sharma SK.** Cytomorphologic aspects of thyroiditis. A study of 51 cases with functional, immunologic and ultrasonographic data. *Acta Cytol.* 1987; 31: 687-693.
98. **Jerne NK.** Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris).* 1974; 125 C: 373-389.
99. **Jerne NK.** Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev.* 1984; 79: 5-24.
100. **Kaplan DS, Picciolo GL.** Characterization of instrumentation and calibrators for quantitative microfluorometry for immunofluorescence tests. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 442-447.
101. **Kaplan DS, Picciolo GL.** Application of quantitative immunofluorescence to clinical serology: antibody levels of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2008-2013.
102. **Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Aoyagi T, Nagataki S.** Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology.* 1996; 137: 3163-3169.
103. **Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Urayama S, Kawabe Y, Tahara K, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S.** Modulation of Fas-mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves' disease (GD) and idiopathic myxoedema. *Clin Exp Immunol.* 1997; 110: 434-439.
104. **Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H.** Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med.* 1995; 182: 1777-1783.

105. **Kennedy MK, Park LS.** Characterization of interleukin-15 (IL-15) and the IL-15 receptor complex. *J Clin Immunol.* 1996; 16: 134-143.
106. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-257.
107. **Khardori R, Eagleton LE, Soler NG, McConnachie PR.** Lymphocytic interstitial pneumonitis in autoimmune thyroid disease. *Am J Med.* 1991; 90: 649-652.
108. **Khoury EL, Bottazzo GF, Roitt IM.** The thyroid „microsomal" antibody revisited. Its paradoxical binding in vivo to the apical surface of the follicular epithelium. *J Exp Med.* 1984; 159: 577-591.
109. **Kini SR, Miller JM, Hamburger JI.** Cytopathology of Hurthle cell lesions of the thyroid gland by fine needle aspiration. *Acta Cytol.* 1981; 25: 647-652.
110. **Kini SR.** Guides to clinical aspiration biopsy. In: Kline S. (ed.), *Thyroid*, 2nd ed., Igaku-Shoin, New York, 1996: 176-188.
111. **Knoops L, Renaud JC.** IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis. *Growth Factors.* 2004; 22: 207-215.
112. **Kohno Y, Yamaguchi F, Saito K, Niimi H., Nishikawa T, Hosoya T.** Anti-thyroid peroxidase antibodies in sera from healthy subjects and from patients with chronic thyroiditis: differences in the ability to inhibit thyroid peroxidase activities. *Clin Exp Immunol.* 1991; 85: 459-463.
113. **Koss LG, Woyke S, Olszewski W.** *Aspiration Biopsy: Cytologic interpretation and histologic bases.* 2nd ed., Igaku-Shoin, New York, 1992.
114. **Kotsa K, Watson PF, Weetman AP.** A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997; 46: 551-554.
115. **Krammer PH.** CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol.* 1999; 71: 163-210.
116. **Kriss JP, Pleshakov V, Chien JR.** Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and

- circumscribed pretibial myxedema. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964; 24: 1005-1028.
117. **Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N.** The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol.* 1986; 4: 529-591.
118. **Krueger GRF.** *Klinische Immunpathologie.* Kohlhammer, Stuttgart, 1985: 497.
119. **Kucharz EJ, Goodwin JS.** Serum inhibitors of interleukin-2. *Life Sci.* 1988; 42: 1485-1491.
120. **Kuijpers JL, Pop VJ, Vader HL, Drexhage HA, Wiersinga WM.** Prediction of post partum thyroid dysfunction: can it be improved? *Eur J Endocrinol.* 1998; 139: 36-43.
121. **Kuiper HM, Brouwer M, Linsley PS, van Lier RA.** Activated T cells can induce high levels of CTLA-4 expression on B cells. *J Immunol.* 1995; 155: 1776-1783.
122. **Kung AW.** Life events, daily stresses and coping in patients with Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1995; 42: 303-308.
123. **Kurosawa Y, Tonegawa S.** Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J Exp Med.* 1982; 155: 201-218.
124. **Larsen PR.** The thyroid. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC. (eds.), *Cecil Textbook of Medicine, Vol. 2, 19th ed.* W.B. Saunders, Philadelphia, 1992: 1248-1271.
125. **Lazarus JH, Othman S.** Thyroid disease in relation to pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1991; 34: 91-98.
126. **Lazarus JH, Ammari F, Oretti R, Parkes AB, Richards CJ, Harris B.** Clinical aspects of recurrent postpartum thyroiditis. *Br J Gen Pract.* 1997; 47: 305-308.
127. **Lazarus JH.** Prediction of postpartum thyroiditis. *Eur J Endocrinol.* 1998; 139: 12-13.

128. **Lefvert AK, Holm G, Sunden H, Pirskanen R.** Cellular production of antibodies related to the acetylcholine receptor in myasthenia gravis: correlation with clinical stage. *Scand J Immunol.* 1987; 25: 265-273.
129. **Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Moller P.** Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest.* 1993; 69: 415-429.
130. **Leng SX, Elias JA.** Interleukin-11. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29: 1059-1062.
131. **Le Meur M, Gerlinger P, Benoist C, Mathis D.** Correcting an immune-response deficiency by creating E alpha gene transgenic mice. *Nature.* 1985; 316: 38-42.
132. **Levine SN.** Current concepts of thyroiditis. *Arch Intern Med.* 1983; 143: 1952-1956.
133. **Libert F, Ruel J, Ludgate M, Swillens S, Alexander N, Vassart G, Dinsart C.** Complete nucleotide sequence of the human thyroperoxidase-microsomal antigen cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15: 6735.
134. **Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO.** Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today.* 1995; 16: 34-38.
135. **Lloyd RV, Douglas BR, Young WF Jr.** Thyroid gland. In: Atlas of nontumor pathology, Endocrine disease, first series, fascicle 1, American registry of pathology and AFIP, Washington, 2002: 91-169.
136. **Lomský R, Jirkalová Z, Nožička Z, Příbyšová J, Čáp J, Bakešová L.** Imunocytochemie versus imunoradiometrická analýza autoprotilátek proti thyreoglobulinu (Tg) a proti tyreoidální peroxidáze (TPO) v diagnostice autoimunních tyreopatií. *DMEV Suppl.* 1999; 1: 33-34.
137. **Londei M, Lamb JR, Bottazzo GF, Feldmann M.** Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells. *Nature.* 1984; 312: 639-641.

138. **Londei M, Bottazzo GF, Feldmann M.** Human T-cell clones from autoimmune thyroid glands: specific recognition of autologous thyroid cells. *Science*. 1985; 228: 85-89.
139. **Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA.** Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med*. 1988; 167: 219-224.
140. **Maalej A, Makni H, Ayadi F, Bellassoued M, Jouida J, Bouguacha N, Abid M, Ayadi H.** A full genome screening in a large Tunisian family affected with thyroid autoimmune disorders. *Genes Immun*. 2001; 2: 71-75.
141. **Malthiery Y, Lissitzky S.** Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur J Biochem*. 1987; 165: 491-498.
142. **Mariotti S, Anelli S, Ruf J, Bechi R, Czarnocka B, Lombardi A, Carayon P, Pinchera A.** Comparison of serum thyroid microsomal and thyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 65: 987-993.
143. **Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A.** Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990; 71: 661-669.
144. **Marqusee E, Hill JA, Mandel SJ.** Thyroiditis after pregnancy loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 2455-2457.
145. **Marrack P, Kappler J.** The T cell receptor. *Science*. 1987; 238: 1073-1079.
146. **Matalon ST, Blank M, Ornoy A, Shoenfeld Y.** The association between anti-thyroid antibodies and pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 45: 72-77.
147. **Matos-Santos A, Nobre EL, Costa JG, Nogueira PJ, Macedo A, Galvao-Teles A, de Castro JJ.** Relationship between the number and impact of stressful life events and the onset of Graves' disease and toxic nodular goitre. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001; 55: 15-19.
148. **McDevitt HO, Benacerraf B.** Genetic control of specific immune responses. *Adv Immunol*. 1969; 11: 31-74.

149. **McDougall LR.** Thyroiditis. In: Thyroid disease in clinical practice. Oxford University Press, New York, 1992: 257-281.
150. **McLachlan SM, Pegg CA, Atherton MC, Middleton SL, Dickinson A, Clark F, Proctor SJ, Proud G, Rees Smith B.** Subpopulations of thyroid autoantibody secreting lymphocytes in Graves' and Hashimoto thyroid glands. *Clin Exp Immunol.* 1986; 65: 319-328.
151. **Miller JF, Watson JD.** Intracellular recognition events eliminate self-reactive T cells. *Scand J Immunol.* 1988; 28: 389-395.
152. **Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Tsokos M.** Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 2199-2203.
153. **Mizukami Y, Michigishi T, Hashimoto T, Tonami N, Hisada K, Matsubara F, Takazakura E.** Silent thyroiditis: a histologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 1988; 19: 423-431.
154. **Mizukami Y, Michigishi T, Nonomura A, Hashimoto T, Nakamura S, Tonami N, Takazakura E.** Postpartum thyroiditis. A clinical, histologic, and immunopathologic study of 15 cases. *Am J Clin Pathol.* 1993; 100: 200-205.
155. **Mollnes TE, Lachmann PJ.** Regulation of complement. *Scand J Immunol.* 1988; 27: 127-142.
156. **Mooij P, de Wit HJ, Drexhage HA.** An excess of dietary iodine accelerates the development of a thyroid-associated lymphoid tissue in autoimmune prone BB rats. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993; 69: 189-198.
157. **Mosmann TR, Sad S.** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996; 17: 138-146.
158. **Muller AF, Drexhage HA, Berghout A.** Postpartum thyroiditis and autoimmune thyroiditis in women of childbearing age: recent insights and consequences for antenatal and postnatal care. *Endocr Rev.* 2001; 22: 605-630.
159. **Nabholz M, MacDonald HR.** Cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1983; 1: 273-306.

160. **Nagata S.** Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet.* 1999; 33: 29-55.
161. **Nakamura RM, Binder WL.** Current concepts and diagnostic evaluation of autoimmune disease. *Arch Pathol Lab Med.* 1988; 112: 869-877. 275
162. **Neufeld M, Maclaren N, Blizzard R.** Autoimmune polyglandular syndromes. *Pediatr Ann.* 1980; 9: 154-162.
163. **Nguyen GK, Ginsberg J, Crockford PM.** Fine-needle aspiration biopsy cytology of the thyroid. Its value and limitations in the diagnosis and management of solitary thyroid nodules. *Pathol Annu.* 1991; 26: 63-91.
164. **Nguyen GK, Ginsberg J, Crockford PM, Villanueva RR.** Hashimoto's thyroiditis: cytodiagnostic accuracy and pitfalls. *Diagn Cytopathol.* 1997; 16: 531-536.
165. **Nikolai TF, Coombs GJ, McKenzie AK.** Lymphocytic thyroiditis with spontaneously resolving hyperthyroidism and subacute thyroiditis. Long-term follow-up. *Arch Intern Med.* 1981; 141: 1455-1458.
166. **Nikolai TF.** What is the cause? In: *Controversies in clinical thyroidology.* Hamburger JI, Miller JM, ed. Springer-Verlag, New York, 1981: 48-49.
167. **Nordyke RA, Gilbert FI Jr, Miyamoto LA, Fleury KA.** The superiority of antimicrosomal over antithyroglobulin antibodies for detecting Hashimoto's thyroiditis. *Arch Intern Med.* 1993; 153: 862-865.
168. **Nožička Z, Hejna K.** Examination of antiorgan antibodies using indirect immunofluorescence. (Influence of serum isohaemagglutinins on the results). *Sb Ved Pr Lek Fak UK Hradci Kralove.* 1976; 19: 399-413.
169. **Nožička Z.** Patologicko-anatomický příspěvek k protilátkové diagnostice imunopatologických onemocnění. *Sb Ved Pr Lek Fak UK (Hradec Králové).* 1991; 33: 1-169.
170. **Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Postingl H, Krammer PH.** Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem.* 1992; 267: 10709-10715.

171. **Okayasu I, Kong YM, Rose NR.** Effect of castration and sex hormones on experimental autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1981; 20: 240-245.
172. **Oppenheim Y, Ban Y, Tomer Y.** Interferon induced autoimmune thyroid disease (AITD): a model for human autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2004; 3: 388-393.
173. **Orell SR, Sterrett GF, Walters MN-I, Whitaker D.** The thyroid gland. In: *Manual and Atlas of Fine Needle Aspiration Cytology.* 3th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999: 109-144.
174. **Orell SR, Sterrett GF, Whitaker D.** The thyroid gland. In: *Fine needle aspiration cytology.* 4th ed., Churchill Livingstone, London, 2005:125-164.
175. **Pabst R.** The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat Embryol (Berl).* 1987; 176: 135-144.
176. **Paul WE.** Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood.* 1991; 77: 1859-1870.
177. **Pearce J, Dagradi A.** Acute ulceration of the esophagus with associated intranuclear inclusion bodies. *Arch Pathol.* 1943; 35: 889-897.
178. **Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE.** Thyroiditis. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2646-2655.
179. **Peoc'h K, Dubel L, Chazouilleres O, Ocwieja T, Duron F, Poupon R, Johanet C.** Polyspecificity of antimicrobial thyroid antibodies in hepatitis C virus-related infection. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 2978-2983.
180. **Perkins D, Wang Z, Donovan C, He H, Mark D, Guan G, Wang Y, Walunas T, Bluestone J, Listman J, Finn PW.** Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J Immunol.* 1996; 156: 4154-4159.
181. **Persson PS.** Cytodiagnosis of thyroiditis. A comparative study of cytological, histological, immunological and clinical findings in thyroiditis, particularly in diffuse lymphoid thyroiditis. *Acta Med Scand Suppl.* 1968; 483: 7-100.
182. **Picciolo GL, Kaplan DS.** Application of quantitative immunofluorescence to clinical serology: antibody levels of *Treponema pallidum*. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1294-1296.

183. **Pinkoski MJ, Green DR.** Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 1174-1181.
184. **Pop VJ, de Rooy HA, Vader HL, van der Heide D, van Son MM, Komproe IH.** Microsomal antibodies during gestation in relation to postpartum thyroid dysfunction and depression. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1993; 129: 26-30.
185. **Poropatich C, Marcus D, Oertel YC.** Hashimoto's thyroiditis: fine-needle aspirations of 50 asymptomatic cases. *Diagn Cytopathol.* 1994; 11:141-5.
186. **Prummel MF, Strieder T, Wiersinga WM.** The environment and autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol.* 2004; 150: 605-618.
187. **Prummel MF, Wiersinga WM.** Thyroid autoimmunity and miscarriage. *Eur J Endocrinol.* 2004; 150: 751-755.
188. **Pulvertaft RJ, Doniach D, Roitt IM, Hudson RV.** Cytotoxic effects of Hashimoto serum on human thyroid cells in tissue culture. *Lancet.* 1959; 2: 214-216.
189. **Rapoport B, McLachlan SM.** Thyroid peroxidase autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y. (eds.), *Antibodies*, B.V. Elsevier Science, Amsterdam, 1996: 816-821.
190. **Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM.** The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* 1998; 19: 673-716.
191. **Rasooly L, Burek CL, Rose NR.** Iodine-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H-2h4 mice. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996; 81: 287-292.
192. **Ravinsky E, Safneck JR.** Differentiation of Hashimoto's thyroiditis from thyroid neoplasms in fine needle aspirates. *Acta Cytol.* 1988; 32: 854-861.
193. **Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J.** Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr Rev.* 1988; 9: 106-121.
194. **Rico MJ, Hall RP.** Idiotypes, anti-idiotypes, and autoimmunity. *J Am Acad Dermatol.* 1988; 19: 579-585.
195. **Roberton HEW.** Lassitude, coldness and hair changes following pregnancy and their response to treatment with thyroid extract. *Br Med J.* 1948; 93: 2275-2276.

196. **Roitt I, Doniach D, Campbell RN, Hudson RV.** Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid flitre). *Lancet.* 1956; 271: 820-821.
197. **Rosai J.** Thyroid gland. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Vol.1, 8th ed., Mosby, Edinburgh, 2004: 493-567.
198. **Rose NR, Saboori AM, Rasooly L, Burek CL.** The role of iodine in autoimmune thyroiditis. *Crit Rev Immunol.* 1997; 17: 511-517.
199. **Rose NR, Bonita R, Burek CL.** Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev.* 2002; 1: 97-103.
200. **Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ.** The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med.* 1984; 311: 235-242.
201. **Roura-Mir C, Catalfamo M, Sospedra M, Alcalde L, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D.** Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur J Immunol.* 1997; 27: 3290-3302.
202. **Ruddle NH.** Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development. *Immunol Res.* 1999; 19: 119-125.
203. **Ruwhof C, Drexhage HA.** Iodine and thyroid autoimmune disease in animal models. *Thyroid.* 2001; 11: 427-436.
204. **Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR.** Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 1991; 254: 279-282.
205. **Seidman JG, Max EE, Leder P.** A kappa-immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. *Nature.* 1979; 280: 370-375.
206. **Sen S.** Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1992; 67: 287-319.
207. **Seto P, Hirayu H, Magnusson RP, Gestautas J, Portmann L, DeGroot LJ, Rapoport B.** Isolation of a complementary DNA clone for thyroid microsomal antigen. Homology with the gene for thyroid peroxidase. *J Clin Invest.* 1987; 80: 1205-1208.
208. **Shoenfeld Y.** Autoimmune diseases: multiple factors involved in the etiology. *Isr J Med Sci.* 1999; 24: 351-352.

209. **Scherbaum WA, Schumm F, Maisch B, Muller C, Fateh-Moghadam A, Fluchter SH, Seif FJ, Bottazzo GF, Berg PA.** Myasthenia gravis: overlap with "polyendocrine" autoimmunity. *Klin Wochenschr.* 1983; 61: 509-515.
210. **Schrader JW.** The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin-3). *Annu Rev Immunol.* 1986; 4: 205-230.
211. **Singer PA.** Thyroiditis. Acute, subacute, and chronic. *Med Clin North Am.* 1991; 75: 61-77.
212. **Smith KA.** Interleukin-2. *Curr Opin Immunol.* 1992; 4: 271-276.
213. **Snodgrass HR, Kisielow P, Kiefer M, Steinmetz M, von Boehmer H.** Ontogeny of the T-cell antigen receptor within the thymus. *Nature.* 1985; 313: 592-595.
214. **Sospedra M, Obiols G, Babi LF, Tolosa E, Vargas F, Roura-Mir C, Lucas-Martin A, Ercilla G, Pujol-Borrell R.** Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Graves' disease. A primary defect? *J Immunol.* 1995; 154: 4213-4222.
215. **Stagnaro-Green A, Roman SH, Cobin RH, el-Harazy E, Wallenstein S, Davies TF.** A prospective study of lymphocyte-initiated immunosuppression in normal pregnancy: evidence of a T-cell etiology for postpartum thyroid dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74: 645-653
216. **Stagnaro-Green A.** Postpartum thyroiditis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004; 18: 303-316.
217. **Stagnaro-Green A, Glinoeer D.** Thyroid autoimmunity and the risk of miscarriage. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004; 18: 167-181.
218. **Stassi G, Todaro M, Bucchieri F, Stoppacciaro A, Farina F, Zummo G, Testi R, De Maria R.** Fas/Fas ligand-driven T cell apoptosis as a consequence of ineffective thyroid immunoprivilege in Hashimoto's thyroiditis. *J Immunol.* 1999; 162: 263-267
219. **Stassi G, Di Liberto D, Todaro M, Zeuner A, Ricci-Vitiani L, Stoppacciaro A, Ruco L, Farina F, Zummo G, De Maria R.** Control of

- target cell survival in thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. *Nat Immunol.* 2000; 1: 483-488.
220. **Stassi G, Zeuner A, Di Liberto D, Todaro M, Ricci-Vitiani L, De Maria R.** Fas-FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Immunol.* 2001; 21: 19-23.
221. **Steffen C.** Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunopathologie, sowie ihre klinische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968.
222. **Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC.** Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med.* 1993; 21: 447-43.
223. **Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S.** Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* 1993; 75: 1169-1178.
224. **Sultan Y, Rossi F, Kazatchkine MD.** Recovery from anti-VIII:C (antihemophilic factor) autoimmune disease is dependent on generation of anti-idiotypes against anti-VIII:C autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 828-831.
225. **Svejgaard A, Platz P, Ryder LP.** HLA and disease 1982 - a survey. *Immunol Rev.* 1983; 70: 193-218.
226. **Tani E, Skoog L.** Fine needle aspiration cytology and immunocytochemistry in the diagnosis of lymphoid lesions of the thyroid gland. *Acta Cytol.* 1989; 33: 48-52.
227. **Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H, Hayakawa N, Ota Z.** Apoptosis in thyroid diseases: a histochemical study. *Endocr J.* 1995; 42: 193-201.
228. **Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267: 1456-1462.
229. **Todd I, Pujol-Borrell R, Hammond LJ, Bottazzo GF, Feldmann M.** Interferon-gamma induces HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin Exp Immunol.* 1985; 61: 265-273.
230. **Tomer Y, Davies TF.** Infection, thyroid disease, and autoimmunity. *Endocr Rev.* 1993; 14: 107-120.

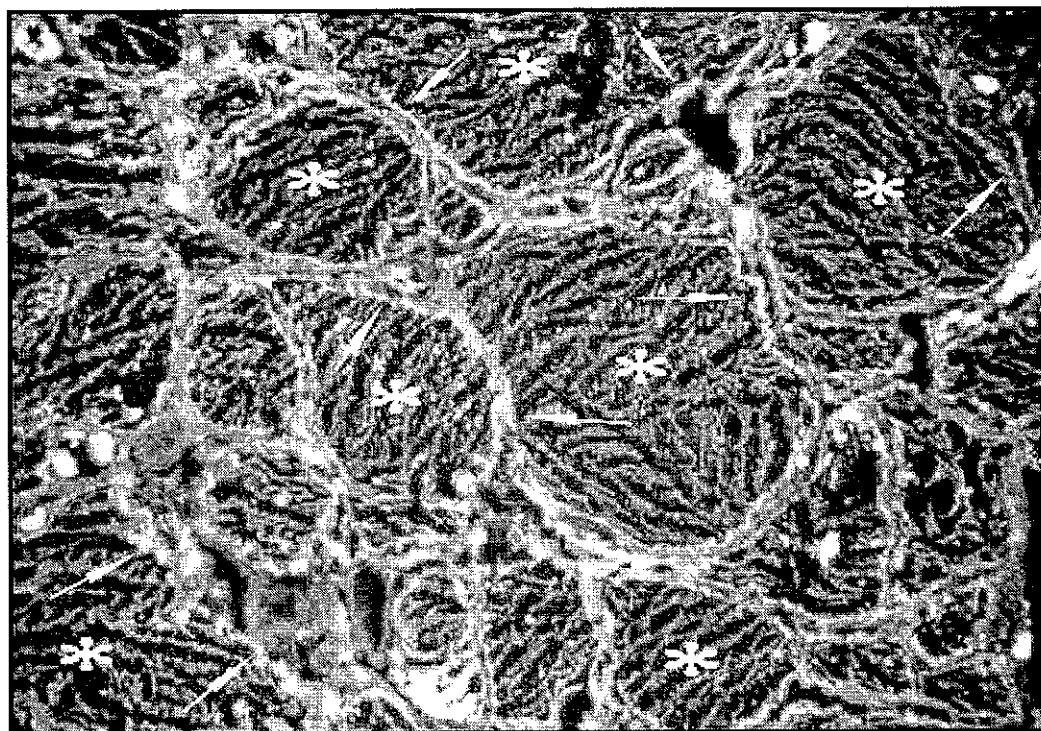
231. **Tonegawa S.** Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983; 302: 575-581.
232. **Toy JL.** The interferons. *Clin Exp Immunol*. 1983; 54: 1-13.
233. **Trinchieri G.** Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today*. 1993; 14: 335-338.
234. **Trip MD, Wiersinga W, Plomp TA.** Incidence, predictability, and pathogenesis of amiodarone-induced thyrotoxicosis and hypothyroidism. *Am J Med*. 1991; 91: 507-511.
235. **Tsatsoulis A.** The role of apoptosis in thyroid disease. *Minerva Med*. 2002; 93: 169-180.
236. **Tseleni-Balafouta S, Kyroudi-Voulgari A, Paizi-Biza P, Papacharalampous NX.** Lymphocytic thyroiditis in fine-needle aspirates: differential diagnostic aspects. *Diagn Cytopathol*. 1989; 5: 362-365.
237. **Tsuboi K, Yuasa R, Tanaka Y, Ueshiba H, Takeda S, Ito K.** Incidence of thyroid atrophy in patients with Hashimoto thyroiditis. In: Nagataki S, Mori T, Torizuka K. (eds.), *80 Years of Hashimoto disease*, Elsevier Science, Amsterdam, 1993: 69-72.
238. **Unanue ER.** Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol*. 1984; 2: 395-428.
239. **Unanue ER, Allen PM.** The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*. 1987; 236: 551-557.
240. **Van Parijs L, Peterson DA, Abbas AK.** Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J Immunol*. 1998; 160: 2065-2071.
241. **van Rooijen N.** The "in situ" immune response in lymph nodes: a review. *Anat Rec*. 1987; 218: 359-364.
242. **Vestergaard P, Rejnmark L, Weeke J, Hoeck HC, Nielsen HK, Rungby J, Laurberg P, Mosekilde L.** Smoking as a risk factor for Graves' disease, toxic nodular goiter, and autoimmune hypothyroidism. *Thyroid*. 2002; 12: 69-75.
243. **Volpé R.** Immunology of human thyroid disease. In: *Autoimmunity in endocrine diseases*. Volpe R. ed. Boca Raton, CRC Press. 1990: 73-98.

244. **Volpé R.** Thyrotropin receptor autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y. (eds.), *Autoantibodies*, Elsevier Science, Amsterdam, 1996: 822-829.
245. **Volpé R.** B-lymphocytes in autoimmune thyroid diseases (AITD). *Rev Endocr Metab Disord.* 2000; 1: 79-86.
246. **von Basedow KA.** Exophthalmus durch Hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle. *Wochenschrift für die gesamte Heilkunde*, Berlin 1840: In: Major RH. (ed.), *Classic Descriptions of Disease*, 3rd ed., Springfield, Thomas CC, Illinois, 1945.
247. **Voorby HA, Kabel PJ, de Haan M, Jeucken PH, van der Gaag RD, de Baets MH, Drexhage HA.** Dendritic cells and class II MHC expression on thyrocytes during the autoimmune thyroid disease of the BB rat. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990; 55: 9-22.
248. **Weetman AP.** Autoimmune thyroiditis: predisposition and pathogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1992; 36: 307-323.
249. **Weetman AP.** Prediction of post-partum thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994; 41: 7-8.
250. **Weetman AP.** Determinants of autoimmune thyroid disease. *Nat Immunol.* 2001; 2: 769-770.
251. **Weetman AP, Black CM, Cohen SB, Tomlinson R, Banga JP, Reimer CB.** Affinity purification of IgG subclasses and the distribution of thyroid auto-antibody reactivity in Hashimoto's thyroiditis. *Scand J Immunol.* 1989; 30: 73-82.
252. **Weetman AP, Byfield PG, Black C, Reimer CB.** IgG heavy-chain subclass restriction of thyrotropin-binding inhibitory immunoglobulins in Graves' disease. *Eur J Clin Invest.* 1990; 20: 406-410.
253. **Weetman AP, Yateman ME, Ealey PA, Black CM, Reimer CB, Williams RC Jr, Shine B, Marshall NJ.** Thyroid-stimulating antibody activity between different immunoglobulin G subclasses. *J Clin Invest.* 1990; 86: 723-727.
254. **Weetman AP, McGregor AM.** Autoimmune thyroid disease: developments in our understanding. *Endocr Rev.* 1984; 5: 309-355.

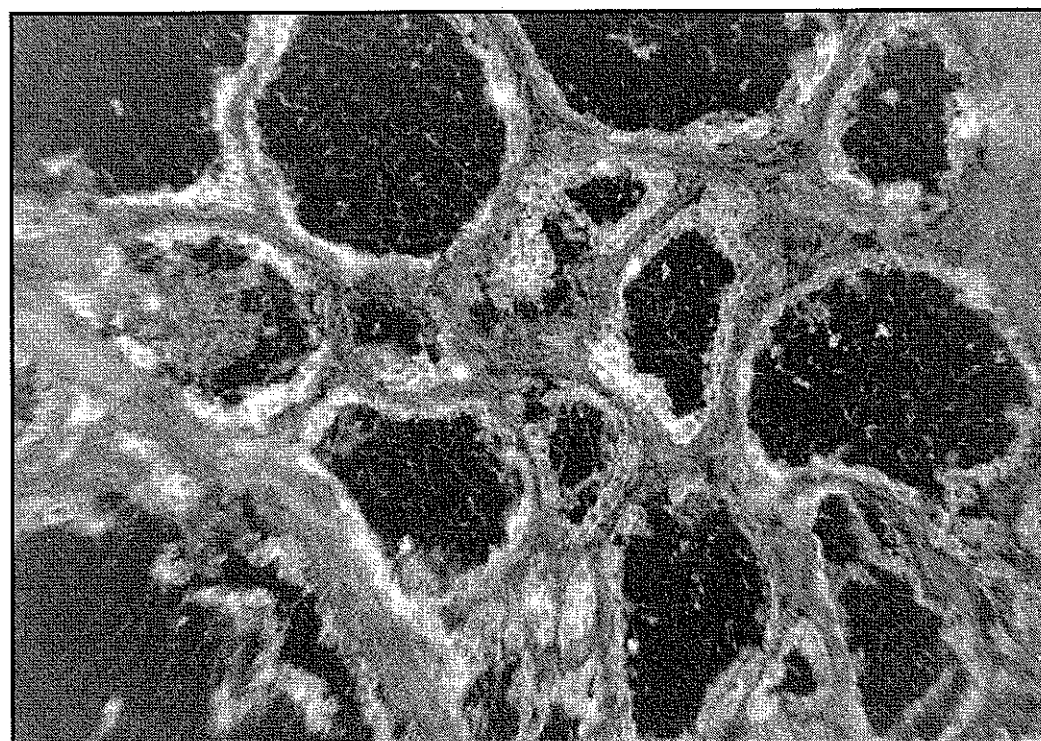
255. **Weetman AP, McGregor AM.** Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev.* 1994; 15: 788-830.
256. **Weigert MG, Cesari IM, Yonkovich SJ, Cohn M.** Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature.* 1970; 228: 1045-1047.
257. **Wenig BM, Heffess CS, Adair CF.** Autoimmune thyroiditis. In. *Atlas of endocrine pathology*, WB Saunders, Philadelphia, 1997: 62-72.
258. **Werdelin O, Witebsky E.** Experimental allergic rat adrenalitis. A study on its elicitation and lymphokinetics. *Lab Invest.* 1970; 23: 136-143.
259. **White RG.** An immunological investigation of Hashimoto's disease. *Proc R Soc Med* 1957; 50: 953-954.
260. **Willims RC Jr, Kunkel HG, Capra JD.** Antigenic specificities related to the cold agglutinin activity of gamma M globulins. *Science.* 1968; 161: 379-381.
261. **Witebsky E, Rose NR.** Studies on organ specificity. IV. Production of rabbit thyroid antibodies in the rabbit. *J Immunol.* 1956; 76: 408-416.
262. **Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW.** Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc.* 1957; 164: 1439-1447.
263. **Wollman SH, Spicer SS, Burstone MS.** Localization of esterase and acid phosphatase in granules and colloid droplets in rat thyroid epithelium. *J Cell Biol.* 1964; 21: 191-201.
264. **Woolner LB, McConahey WM, Beahrs OH.** Struma lymphomatosa (Hashimoto's thyroiditis) and related thyroidal disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 1959; 19: 53-83.
265. **Zakarija M.** Immunochemical characterization of the thyroid-stimulating antibody (TSAb) of Graves' disease: evidence for restricted heterogeneity. *J Clin Lab Immunol.* 1983; 10: 77-85.
266. **Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A.** Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure.* 1995; 3: 591-601.

267. **Zemanová D, Kovařík J.** Interferon a zhoubné nádory. Prakt lek. 1987; 67: 361-365.
268. **Zurawski G., deVries JE.** Interleukin-13, an interleukin-4 like cytokine that acts on monocytes and B cells but not T-cells. Immunol Today. 1994; 15 (1): 19-26.

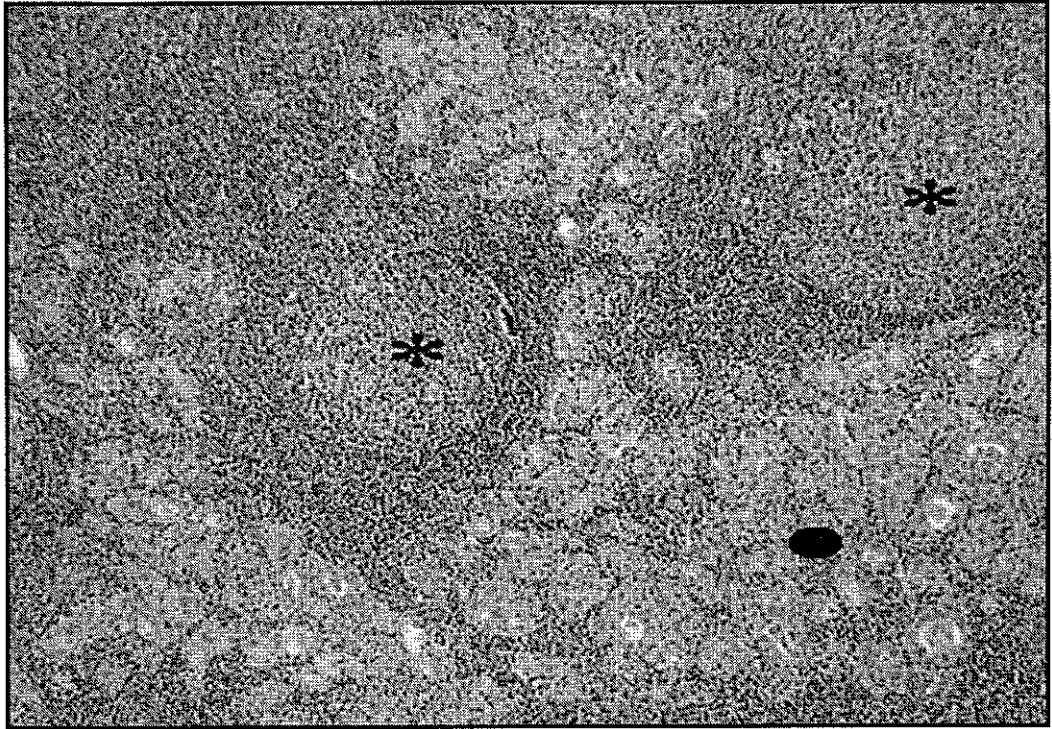
14. Fotodokumentace



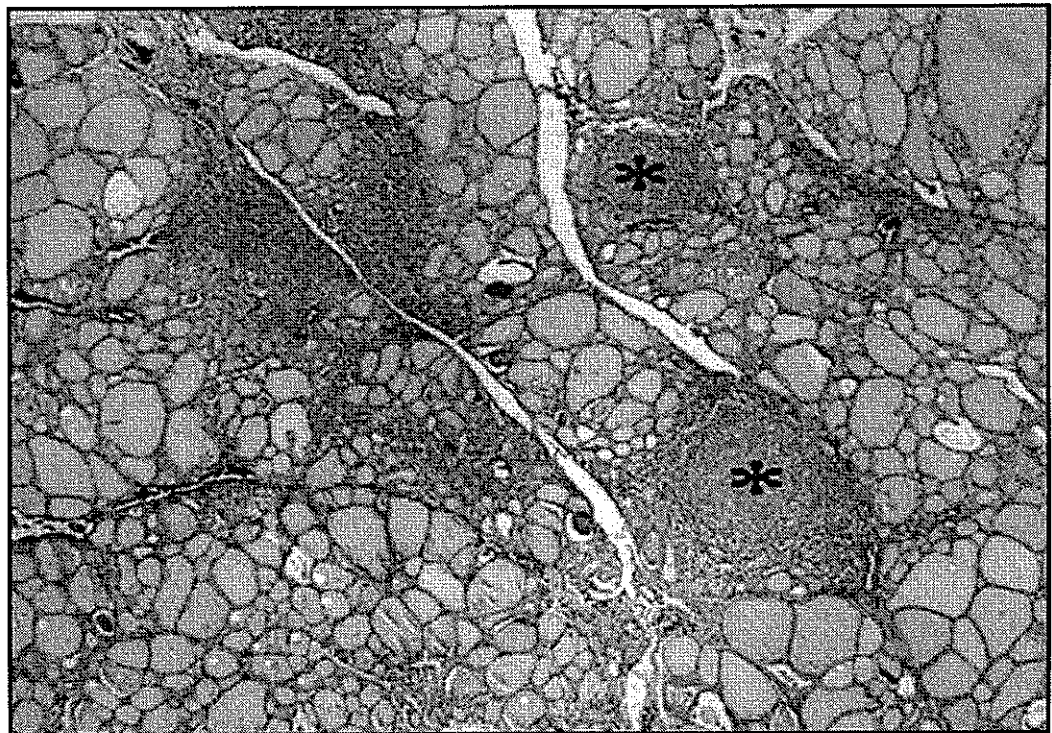
Obr. 1: Průkaz protilátky proti koloidu štítné žlázy (TgAb) za pomoci konjugátu SwAHu/FITC řasnatě září obsah foliklů (hvězdičky), zároveň je přítomna slabá fluorescence epitelu (šipky) (NIF, zvětš. 100 x)



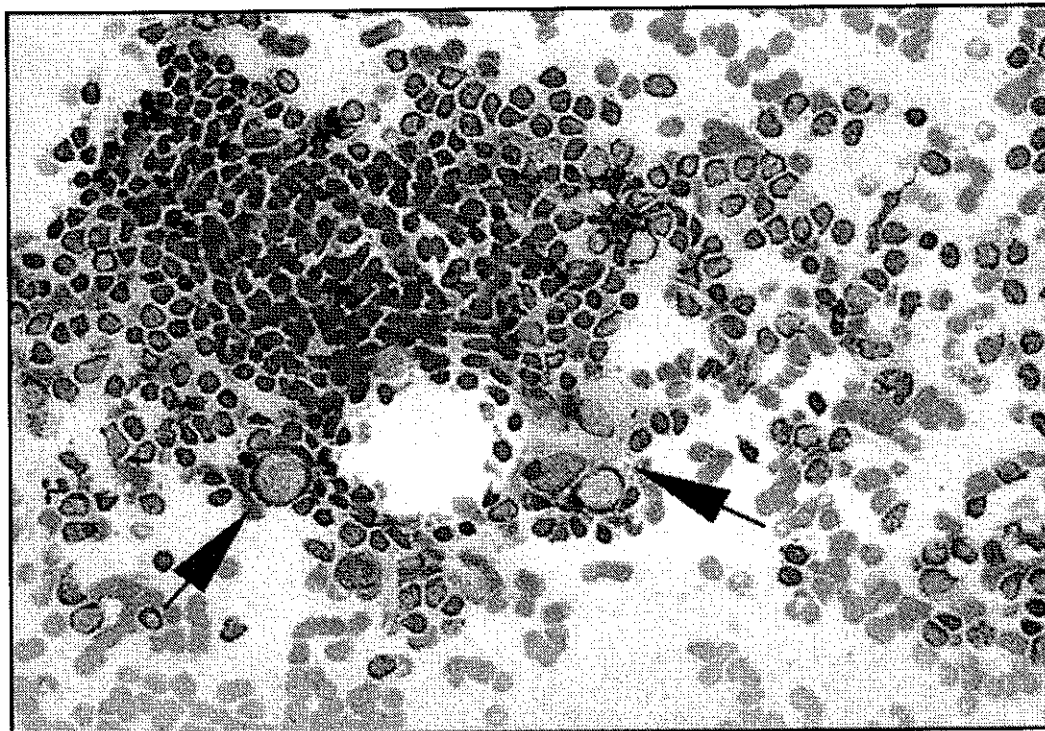
Obr. 2: Průkaz protilátky proti epitelu štítné žlázy nepřímou imunofluorescencí za pomoci konjugátu SwAHu/FITC. Září jen cytoplazma thyrocytů, v lumen foliklů není patrna fluorescence koloidu (NIF, zvětš. 100 x)



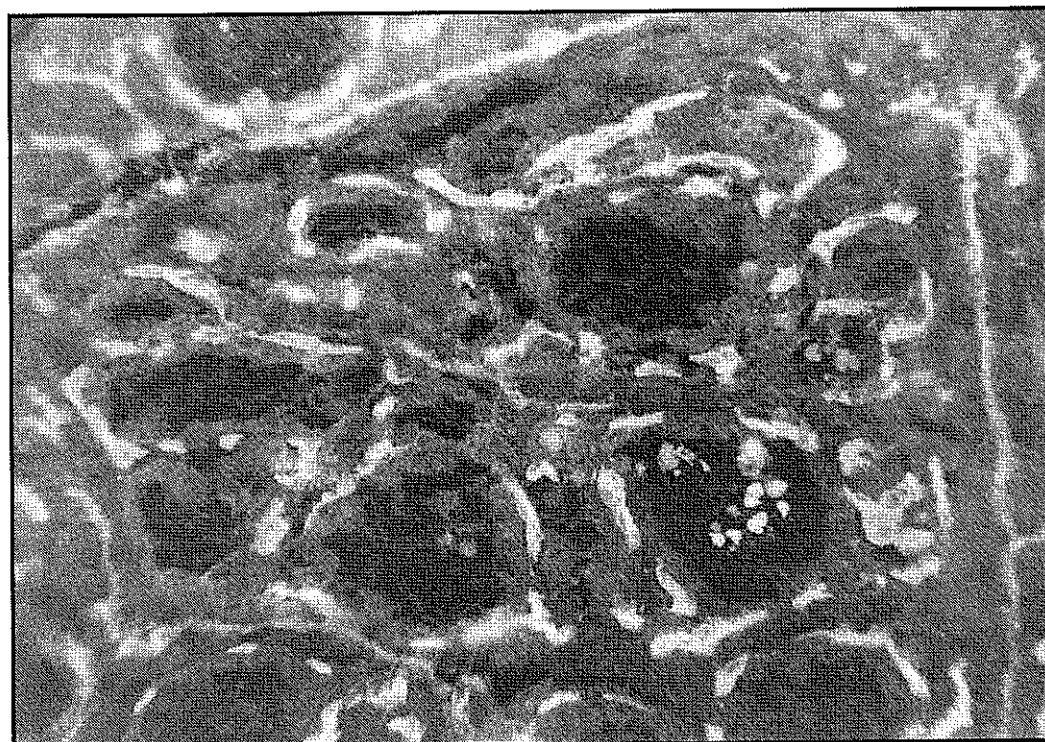
Obr. 3: Difúzní lymfocytární thyreoiditida - Hashimotova thyreoiditida. Četné Hürthleho buňky (tečka), lymfatické folikly se zárodečnými centry (hvězdičky) (HE, zvětš. 60x)



Obr. 4: Fokální lymfocytární thyreoiditida. Ojediné lymfatické folikly se zárodečnými centry (hvězdičky) (HE, zvětš. 40x)



Obr. 5: Cytologický nátěr Hashimotovy tyreoiditidy. Oxyfilní buňky (šipky) obklopené masivním lymfocytárním infiltrátem a krví (MGG, zvětš. 160x)



Obr. 6: Fluorescence kapilár v septech mezi folikly štítné žlázy na tkáňovém řezu od jedince s krevní skupinou A: sérum s izohemaglutininem anti A1 (NIF, zvětš. 160 x)

13. Poděkování

Rád bych poděkoval co nejupřímněji všem, kteří mi pomohli při práci.

V první řadě svému školiteli prof. MUDr. Zdeňku Nožičkovi DrSc., který mne zasvětil do imunofluorescenční techniky. Svým trvalým zájmem a nezměrnou trpělivostí se zasloužil o to, že jsem tuto disertační práci dokončil.

Dále pak přednostovi našeho ústavu prof. MUDr. Ivo Šteinerovi, CSc. a primáři MUDr. Františku Langrovi za výborné pracovní zázemí a přístrojové vybavení, bez něhož bych tento výzkum nemohl uskutečnit.

Poděkování patří také kolegyním a kolegům, kteří se podíleli na hodnocení cytologických nálezů.

Moje úcta a ocenění patří i všem laborantkám imunofluorescenční laboratoře na našem ústavu, jejichž zodpovědný přístup a pracovitost mi usnadňuje každodenní práci.

Děkuji svým nejbližším, své manželce za trpělivost a pochopení, mým rodičům a dětem Terezce a Filípkovi, že chápou mé časově náročné povolání.

15. Seznam použitých zkratek

ABBA	anti-brush border antibody
ABO	blood group system
AITD	autoimmune thyroid disease
APC	antigen presenting cells
B	biopsy
BALT	bronchus associated lymphatic tissue
BSA	bovine serum albumin
BSF-2	B-cell stimulatory factor-2
BWR	Bordet-Wassermann reaction
C	cytology
cANCA	classic anti-neutrophilic cytoplasmic antibody
CD	cluster designation
CREST	calcinosis cutis, Raynaud phenomenon, esophageal dysmobility, sclerodactyly, telangiectasia
CSIF	cytokine synthesis inhibitory factor
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated-4
DNK	deoxyribonukleová kyselina
DR	death receptor
EB	Epstein-Barr
EDF	eosinophil differentiation factor
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent assay
Fab	fragment antigen binding
FasL	ligand for Fas
Fc	fragment crystalisable
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLT	focal lymphocytic thyroiditis
FNAC	fine needle aspiration cytology
GALT	gut associated lymphatic tissue
GD	Graves' disease – Gravesova-Basedowova choroba
HLA	Human Leukocyte Antigen

HT	Hashimoto's thyroiditis
IFN	interferon
IL	interleukin
Ir	immune response
IRMA	imunoradiometrická analýza – immunoradiometric assay
kDa	kilo Dalton
LATS	long-acting thyroid stimulator
linkage	genetic linkage analysis – analýza genetické vazby
LKM1	liver kidney microsomal antibody type 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MGG	May-Grünwald-Giemsa
NIF	indirect immunofluorescence – nepřímá imunofluorescence
NK	natural killer
pANCA	perinuclear anti-neutrophilic cytoplasmic antibody
PBS	phosphate buffered saline
PCD	programmed cell death
PPT	postpartum thyroiditis
PIF	direct immunofluorescence – přímá imunofluorescence
RIA	radioimunoanalýzy – radioimmuno assay
SwAHu/FITC	swine antihuman immunoglobulin labeled by fluoresceinisothiocyanate
T3	triiodothyronine
T4	thyroxine, tetraiodothyronine
Th	T helper
TgAb	thyroglobulin autoantibody
TNF	tumor necrosis factor
TPOAb	thyroid peroxidase antibody
TRCA	tanned red cell assay
TSH	thyroid stimulating hormone
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor
TSHR-Ab	thyroid stimulating hormone receptor antibody
U/ml	units/millilitre