

Received: 2015.09.21
Accepted: 2016.12.05
Published: 2016.12.31

Limfocyty regulatorowe w orbitopatii tarczycowej i autoimmunologicznych chorobach tarczycy

Regulatory lymphocytes in thyroid orbitopathy and autoimmune thyroid diseases

Marta Siomkajło¹, Jarosław Dybko², Jacek Daroszewski¹

¹Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami, Uniwersytet Medyczny, Wrocław

²Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny, Wrocław

Streszczenie

Orbitopatia tarczycowa (OT), jako swoista narządowa choroba autoimmunologiczna, jest skutkiem immunodysregulacji prowadzącej do utraty kontroli nad odpowiedzią zapalną skierowaną przeciwko własnym antygenom. Źródłem autoreaktywnych limfocytów są zaburzenia procesu tolerancji centralnej, a także ich indukcja na obwodzie przez zmodyfikowane bądź sekwestrowane antygeny. Aktywna supresja różnych subpopulacji limfocytów regulatorowych (Lreg) jest przeciwwagą dla czynników prozapalnych i ma za zadanie tłumić patologiczną reakcję. Tym samym, deficyty ilościowe bądź jakościowe Lreg pełnią fundamentalną rolę w rozwoju chorób z autoagresji. Ukierunkowanie terapii na Lreg i przywrócenie stanu dynamicznej równowagi wydaje się mieć podstawowe znaczenie, przede wszystkim w takich chorobach jak OT, gdzie kazuatywny autoantigen nie został jeszcze jednoznacznie zidentyfikowany.

Trudności techniczne związane z izolacją oraz oceną funkcji Lreg w warunkach *in vitro* oraz brak unifikacji protokołów badawczych powodują, że wyniki badań są często nieporównywalne, niejednoznaczne, a nawet sprzeczne. Brak swego rodzaju dla Treg (limfocytów T regulatorowych) zestawu markerów powierzchniowych czyni analizę metylacji regionu TSDR (Treg specific demethylated region) FOXP3 (forkhead box P3) *locus* najbardziej wiarygodną metodą oceny ich ilości. Mimo licznych rozbieżności między wynikami badań, większość wskazuje na istotną rolę Lreg w leżącej u podstawy OT i autoimmunologicznych chorób tarczycy (AITD) immunodysregulacji.

Słowa kluczowe:

limfocyty regulatorowe • orbitopatia, choroba Gravesa i Basedowa • autoimmunologiczne choroby tarczycy

Summary

Thyroid orbitopathy (OT), as an organ-specific autoimmune disease, is a result of immune dysregulation leading to loss of control over inflammation directed against self-antigens. The source of the autoreactive lymphocytes is the impairment of central tolerance as well as their induction on the periphery by modified or sequestered by that time antigens. Active suppression by the various subpopulations of regulatory lymphocytes (Lreg) acts as a counterbalance to the proinflammatory factors and is aimed at dampening pathological reaction. Thereby, qualitative or quantitative shortfalls of Lreg play a critical role in the development of autoimmune diseases. Giving direction to Lreg-based therapy and restoring the dynamic balance seem to be of crucial importance, especially in diseases such as OT, where the causative self-antigen is not yet unequivocally elucidated.

Technical difficulties with isolation and assessment of Lreg function *in vitro* as well as lack of unification of research protocols make the findings non-comparable, inconclusive and so-

	metimes even conflicting. Lack of a Tregs' (regulatory T cells) specific set of surface markers makes the demethylation status analysis of TSDR (Treg specific demethylated region) FOXP3 (forkhead box P3) locus the most reliable method of their quantification. Despite numerous discrepancies between research findings, most of them point to Treg's pivotal role in immune disturbances, which form the basis of OT and autoimmune thyroid diseases (AITD).
Keywords:	regulatory lymphocytes • orbitopathy • Graves' disease • autoimmune thyroid disease
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1227644
Word count:	4992
Tables:	–
Figures:	–
References:	67

Adres autorki: dr n. med. Marta Siomkajło, Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami UM, Wybrzeże L. Pasteura 4, 50-367 Wrocław; e-mail: m-s@10g.pl

Wykaz skrótów: **AITD** – autoimmunologiczne zapalenie tarczycy (Autoimmune Thyroid Disease); **APC** – komórka prezentująca antygen (Antigen Presenting Cell); **BCR** – receptor limfocytów B (B Cell Receptor); **Breg** – limfocyty B regulatorowe (regulatory B cells); **CTLA-4** – antygen 4 związany z limfocytym T cytotoksycznym (cytotoxic T lymphocyte antygen-4); **FOXP3** – czynnik transkrypcyjny forkhead box P3 (forkhead box P3 transcription factor); **GD** – choroba Gravesa i Basedowa (Graves-Basedow's Disease); **GITR** – indukowany przez glukokortykoidy receptor TNF – czynnika martwicy nowotworu (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor); **HT** – choroba Hashimoto (Hashimoto's Disease); **IGF1-R** – receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (insulin-like growth factor-I receptor); **IPEX** – sprzężony z chromosomem X zespół dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome); **iTreg** – indukowane Treg (inducible Treg cells); **Lreg** – limfocyty regulatorowe (regulatory lymphocytes); **MHC II** – cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy drugiej (major histocompatibility complex molecules class II); **nTreg** – naturalne Treg (natural Treg cells); **OT** – orbitopatia tarczycowa (thyroid orbitopathy); **PBMCs** – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells); **TCR** – receptor limfocytów T (T cell receptor); **Teff** – limfocyty efektorowe (effector T-cells); **TG** – tyreoglobulina (tyreoglobulin); **Thelp** – limfocyty pomocnicze (T helper cells); **Treg** – limfocyt T regulatorowe (regulatory T cells); **TSDR** – demetylowany region swoisty dla limfocytów T regulatorowych; **TSHR** – receptor TSHR (Treg specific demethylated region).

ORBITOPATIA TARCZYCOWA – DEFINICJA, PATOGENEZA

Orbitopatia tarczycowa jest autoimmunologicznym procesem zapalnym tkanek miękkich oczodołu o samoograniczającym się przebiegu. Najczęściej występuje jako pozatarczycowy objaw choroby Gravesa i Basedowa (GD) [52]. Prawie w 10% jest związana z chorobą Hashimoto (HT), znacznie rzadziej towarzyszy innym autoimmunologicznym zapaleniom tarczycy, a sporadycznie także rakowi tarczycy. Bezpośrednią przyczyną objawów i dolegliwości w fazie aktywnej zapalenia są zmiany naciekowo-obrzękowe, nagromadzenie glikozaminoglikanów, proliferacja fibrocytów i ich różnicowanie w kierunku adipocytów lub miocytów. Wobec szczególnego umiejscowienia procesu, w przestrzeni oczodołu ograniczonej kostnymi ścianami, wzrost objętości tkanek miękkich powoduje wzrost ciśnienia wewnątrzoczdolowego, zastój żylny i limfatyczny, obrzęk, zaburzenia ruchomości gałki ocznej i wytrzeszcz, a w skrajnych przypadkach prowadzi do

zagrożającej utratą wzroku neuropatii nerwu wzrokowego i keratopatii [58].

Patogeneza OT nie jest jeszcze wyjaśniona, uważa się, że u podłoża zapalenia leży autoimmunologiczna, krzyżowa reakcja między antygenami tarczycy i tkanek okołogałkowych. Większość obserwacji oraz model zwierzęcy OT wskazuje na receptor TSH (TSHR) jako główny autoantygen zapoczątkowujący reakcję zapalną [33,36,52]. Jednocześnie podkreśla się rolę innych antygenów tkanki łącznej, w tym IGF1-R (insulin-like growth factor-I receptor) [52,56,58]. Nadal pozostaje do wyjaśnienia występowanie orbitopatii u osób bez wykrywalnych przeciwciał anty-TSHR i AITD. Według hipotezy opierającej się na roli TSHR, źródłem toczącego się zapalenia jest tkanka łączna, a w niej fibrocyty – niejednorodna morfologicznie, pochodząca ze szpiku grupa komórek progenitorowych o cechach immunomodulujących, która wykazuje wysoką, porównywalną z komórkami tarczycy, ekspresję TSHR oraz innych białek wspólnych z tyreocytami.

Do oczodołów migrują tylko u osób z orbitopatią i dają początek szczególnemu typowi fibroblastów – o wyróżniającej je ekspresji powierzchniowych receptorów i cząsteczek kostymulujących oraz cechujących się nadreaktywnością na bodźce prozapalne. Jako niejednorodna morfologicznie i funkcjonalnie grupa wykazują zróżnicowanie na linię Thy(+), mogącej pod wpływem odpowiednich bodźców ulegać zróżnicowaniu do miofibroblastów oraz Thy(-), z potencjałem różnicowania się do adipocytów [58]. Pobudzenie TSHR na wykazujących nadmierną reaktywność zapalną fibrocytach i fibroblastach, przy niezbędnym współdziałaniu stymulacji IGF1-R powoduje uwolnienie cytokin prozapalnych i inicjację zapalenia [52]. Nadmierne wytwarzanie silnie hydrofilnych glikozaminoglikanów oraz intensywna adipogeneza odpowiadają za nawet kilkukrotny wzrost objętości tkanek oczodołu. Rozwój zapalenia doprowadza do migracji i infiltracji limfocytarnych o podobnym charakterze jak w lokalizacji tarczycowej. Większość doniesień dotyczących charakterystyki nacieków limfocytarnych w OT wskazuje na dominację limfocytów CD4+ i makrofagów, przy braku lub niewielkim współdziałaniu komórek CD8+ i nieobecności komórek CD20. Badaniu jednak poddawano pacjentów po przebytej steroidoterapii i/lub radioterapii [13,16,45,62]. Avunduk i wsp. natomiast, na podstawie analizy nacieków limfocytarnych pochodzących od czterech osób niepoddawanych wcześniej terapii glukokortykosteroidami ani też radioterapii, wykazali istotną rolę w rozwoju zapalenia zarówno limfocytów CD4 jak i CD8 [2]. Nie tylko leczenie, ale także czas trwania i etap choroby odgrywają istotną rolę. W początkowym stadium dominują komórki i cytokiny limfocytów Th1, a w miarę wyciszania procesu – zdrowienia dochodzi do przesunięcia równowagi w stronę limfocytów Th2. Dotychczas nie potwierdzono oczekiwanej obecności w naciekach komórek Th17, których ważna rola została dowiedziona w innych schorzeniach autoimmunologicznych. Donoszono natomiast o zwiększonej ich liczbie we krwi obwodowej pacjentów z OT [30] oraz tkance tarczycy i krwi obwodowej pacjentów z GD, HT [1,10,14,22,47,58].

ORBITOPATIA JAKO CHOROBA AUTOIMMUNOLOGICZNA

Orbitopatia tarczycowa, jako swoista narządowo choroba autoimmunologiczna, jest wynikiem utraty tolerancji wobec własnych antygenów. Autoreaktywne limfocyty mogą być wynikiem niedoskonałości procesu tolerancji centralnej lub powstać na obwodzie wobec:

- antygenów sekwestrowanych i nieobecnych w płodowej grasicy i krążeniu,
- antygenów ulegających nieznacznej modyfikacji np. w wyniku mutacji, infekcji wirusowej, procesu nowotworowego,
- pojawienia się nagle nadmiernej, przełamującej tolerancję ilości antygeny w krążeniu lub

- krzyżowej reakcji z antygenami bakteryjnymi czy wirusowymi.

W prawidłowych warunkach przed rozwojem chorób z autoagresji chronią złożone mechanizmy tolerancji obwodowej opierające się na: sekwestracji, delecji, anergii klonalnej oraz na aktywnej supresji – niezaburzonym działaniu swoistych antygenowo i nieswoistych limfocytów regulatorowych. Podobne procesy selekcji dotyczą również limfocytów B. Do ich proliferacji i różnicowania w dojrzałe komórki wytwarzające immunoglobuliny konieczne jest współdziałanie limfocytów T. W przypadku braku autoreaktywnych pomocniczych limfocytów T (Thelp), autoreaktywne komórki B pozostają w uśpieniu [59]. Istotna rola limfocytów Treg w chorobach autoimmunologicznych została dobrze udokumentowana na modelach zwierzęcych oraz poparta doniesieniami o ich deficytach funkcjonalnych i ilościowych w wielu autoimmunologicznych chorobach u ludzi, zarówno narządowych, jak i układowych [20,29,53].

W warunkach fizjologicznych układ immunologiczny cechuje się zachowaniem dynamicznej równowagi między procesami pro- i przeciwzapalnymi. Choroby autoimmunizacyjne natomiast charakteryzuje patologiczna i niekontrolowana odpowiedź zapalna. W związku z tym wydaje się, że fundamentalne znaczenie ma odtworzenie homeostazy przez poprawę funkcji lub zwiększenie ilości Treg w takim stopniu, aby były adekwatne do nasilenia procesu zapalnego i rozpatrywanie ich deficytów ilościowych w odniesieniu do liczności komórek zapalnych, a nie wartości bezwzględnych

Aktywowane Treg mogą hamować odpowiedź zapalną niezależnie od rodzaju autoantygeny. Biorąc pod uwagę wieloczynnikowe uwarunkowanie większości chorób autoimmunizacyjnych, poznanie i ukierunkowanie terapii na Treg wydaje się istotne, zwłaszcza w takich chorobach jak OT, gdzie swoisty autoantygen nie został jednoznacznie zidentyfikowany [29].

LIMFOCYTY REGULATOROWE

Limfocyty regulatorowe, nazywane niegdyś „limfocytami supresorowymi”, to niejednorodna pod względem fenotypowym i funkcjonalnym grupa limfocytów różnych linii rozwojowych, których wspólną cechą jest zdolność do tłumienia odpowiedzi immunologicznej. Działając w sposób bezpośredni lub za pomocą wydzielanych cytokin i metabolitów blokują interakcję komórek efektorowych (Teff) z komórkami prezentującymi antygen (APC). Hamują różnicowanie i proliferację limfocytów naiwnych (niepoddanych dotychczas stymulacji zewnętrznymi antygenami), proliferację zróżnicowanych limfocytów efektorowych oraz komórek NK, makrofagów, osteoklastów, APC, a także indukują w tych komórkach apoptozę lub niszczą je bezpośrednio. W prawidłowych warunkach zapobiegają w ten sposób chorobom autoimmunizacyjnym, alergiom oraz nadmiernemu uszkodzeniu tkanek przez procesy zapalne [25].

Opisano już wiele rodzajów limfocytów regulatorowych należących do populacji pomocniczych limfocytów CD4+, CD8+, B oraz komórek NK [8,9,20,26,66], jednak najliczniejszą i najlepiej poznaną grupą są grasicze pomocnicze limfocyty CD4+ Treg. Ich funkcję i stabilność determinuje przede wszystkim czynnik transkrypcyjny FOXP3 oraz status epigenetyczny locus FOXP3 – demetylacja regionu TSDR. Za typowe i mimo nieswoistości powszechnie używane do ich izolacji (ze względu na trudności w wykorzystaniu wewnątrzkomórkowego FOXP3) markery powierzchniowe uchodzą: wysoka ekspresja lekkiego łańcucha receptora dla IL-2 – IL-2R α (CD25), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), ektonukleazy: CD39 i CD73, GTR (glucocorticoid-induced tumor necrosis receptor) oraz niska ekspresja IL-7R α (CD127), która wykazuje odwrotną korelację z ich funkcją supresorową [21,43].

FOXP3 jest krytycznym dla rozwoju Treg białkiem, składającym się z kilku funkcjonalnych domen. Odpowiada za regulację transkrypcji genów kształtujących fenotyp i funkcje Treg przez supresję czynników transkrypcyjnych związanych z ekspresją cytokin prozapalnych (NF- κ B, NFAT) czy indukcją prozapalnych komórek (ROR γ t), a aktywację podstawowych czynników dla funkcji regulatorowych Treg, jak np. CTLA-4, GTR [4,7,8,20,44].

Główną rolę FOXP3 dla funkcji limfocytów supresorowych potwierdza występowanie ciężkich chorób autoimmunologicznych oraz letalnego zespołu immunodysregulacji, poliendokrynopatii i enteropatii – IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) w wyniku mutacji w obrębie domen FOXP3, a także możliwość nabycia przez komórki naiwne funkcji i fenotypu Treg po wprowadzeniu do nich mRNA FOXP3 [7]. Do niedawna uważano FOXP3 za główny marker umożliwiający identyfikację Treg. Okazało się jednak, że może również przejściowo ulegać ekspresji na pobudzonych komórkach efektorowych, a limfocyty regulatorowe mogą na jakiś czas utracić ekspresję FOXP3 przechodząc w stan latencji. Identyfikację prawdziwych Treg można przeprowadzić na podstawie oceny metylacji regionu TSDR locus FOXP3 będącej wyrazem modyfikacji epigenetycznej odpowiadającej za stabilność i funkcje Treg. Stabilne komórki Treg charakteryzuje całkowita demetylacja TSDR, natomiast częściowa bądź całkowita metylacja, zmniejszająca dostępność pewnych regionów DNA dla czynników transkrypcyjnych i innych wiążących się z DNA cząsteczek, występuje w komórkach efektorowych oraz niestabilnych indukowanych Treg. Całkowita demetylacja regionu TSDR pozostaje obecnie najbardziej swoistym z dotychczas znanych markerów stabilnych Treg, a analiza metylacji TSDR – najbardziej wiarygodną metodą identyfikacji stabilnych Treg we krwi obwodowej i tkankach miękkich, niezależną od oceny ekspresji FOXP3. Ponadto, stopień demetylacji koreluje z funkcją supresorową iTreg (indukowanych Treg) [21,35,37].

Inną, ważną dla funkcji Treg cząsteczką jest CTLA-4, której blokada uchyla funkcję supresorową limfocytów, a jego niedobory wywołują śmiertelne choroby autoimmunizacyjne w modelach zwierzęcych [54].

Wśród limfocytów regulatorowych wszystkich linii rozwojowych istnieje duża różnorodność ukierunkowanych na ten sam cel profilów działania – zahamowanie funkcji i/lub eliminacja komórek efektorowych i APC oraz zakłócenie ich współdziałania. Limfocyty T CD4+, CD8+ i limfocyty B można próbować podzielić w sposób analogiczny, m.in. ze względu na: profil wydzielanych cytokin, ekspresję powierzchniowych receptorów, czynników transkrypcyjnych (w tym FOXP3), przejawianą aktywność (ekspresja Ki-67) i status – aktywne komórki pamięci (CD45RA⁽⁻⁾, CD45RO⁽⁺⁾)/komórki naiwne (CD45RA⁽⁺⁾) [9,20,49,66]. W związku z brakiem swoistości, a także niestabilnością ekspresji poszczególnych markerów powierzchniowych, zależną od stanu aktywacji komórki i charakteru otaczającego środowiska, nie jest możliwe określenie immunofenotypu poszczególnych subpopulacji Treg [60].

Podstawowy i najbardziej zaznaczony podział głównych limfocytów regulatorowych – CD4+Treg opiera się na ich pochodzeniu. Wyróżnia się naturalne – grasicze Treg (nTreg) oraz obwodowe, indukowane iTreg, różnice między nimi dotyczą głównie statusu epigenetycznego oraz ich stabilności [41].

Limfocyty nTreg (CD4+CD25+FOXP3+) powstają z tymocytów CD4+CD25+ w grasicy, przez selekcję negatywną w wyniku interakcji autoantygenów z kompleksem TCR/CD3 o dużym powinowactwie, prezentowanych w kontekście MHC klasy II (cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy drugiej) na komórkach rdzenia grasicy, przy współdziałaniu odpowiednich cytokin – głównie IL-2 lub IL-15, a w bardzo małym stopniu także innych. W zależności od intensywności i czasu stymulacji TCR (T Cell Receptor) oraz obecnych cytokin, dochodzi do powstania różnych populacji limfocytów. Odpowiednio silna stymulacja TCR indukuje ekspresję FOXP3. Niezależnie, wystarczająco długi czas stymulacji doprowadza do odpowiadającej za stabilność Treg, modyfikacji epigenetycznej – demetylacji regionu TSDR locus FOXP3. Tylko limfocyty FOXP3(+) z charakterystycznym epigenomem są aktywne i stabilną populacją Treg, niezależną od dalszej stymulacji TCR i prozapalnego charakteru środowiska. Populacja FOXP3(-) o zmodyfikowanym epigenomie stanowi pulę potencjalnych, nieaktywnych Treg, które w odpowiednich warunkach mogą nabyć ekspresję FOXP3 oraz pełnowartościową funkcję supresorową. Komórki wykazujące tylko ekspresję FOXP3, bez demetylacji TSDR, są niestabilne i w przypadku braku TGF- β czy odpowiedniej stymulacji, łatwo tracą swój fenotyp [8,41,43,66] (ryc. 1).

Drugą główną linią rozwojową CD4+Treg są iTreg powstające w obwodowych narządach limfatycznych z naiwnych limfocytów CD4(+) pod wpływem stymulacji

obcymi antygenami w niskich stężeniach, przy współudziale krytycznych dla indukcji FOXP3 cytokin: IL-2 i TGF- β . Obecność innych przeciwzapalnych cytokin wzmacnia działanie TGF- β , natomiast obecność cząsteczek prozapalnych, zwłaszcza IL-6, -1, -21, przeciwdziała indukowanej przez TGF- β ekspresji FOXP3, a w zamian promuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego ROR γ t i rozwój limfocytów Th17. Indukcję FOXP3 przez TGF- β wzmacniają także inne substancje, np. metabolity witaminy A (ATRA, all trans retinoic acid) czy inhibitor szlaku mTOR – rapamycyna [21,66].

Brak demetylacji TSDR stabilizującej funkcję iTreg, powoduje, że ich dalsze losy i zachowanie fenotypu w znacznym stopniu zależą od środowiska w jakim się znajdują. Do czynników stabilizujących i promujących rozwój populacji Treg należą m.in.: TGF- β i IL-2, -15, -33, ATRA, metabolity witaminy D, adenozyne, a także zależne od obecności komensalnych bakterii jelitowych: krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, polisacharyd A *Bacteroides fragilis*, czy inne elementy bakterii probiotycznych [21]. Jednak odpowiednio długa stymulacja TCR niestabilnych iTreg, w odpowiednich warunkach, prowadzi do stopniowej demetylacji TSDR [38].

Profil cytokin obecnych w środowisku, poprzez indukcję ekspresji czynników transkrypcyjnych typowych dla poszczególnych linii limfocytów efektorowych, powoduje wyspecjalizowanie się subpopulacji Treg ukierunkowanych na supresję odpowiadających im Teff i wykazujących ekspresję receptorów chemokin umożliwiających migrację do konkretnego kompartmentu, w którym toczy się zapalenie [43].

Liczne doniesienia wskazują na możliwość zachowania większej lub mniejszej plastyczności w obrębie wszystkich subpopulacji CD4+. Poszczególne typy limfocytów efektorowych i regulatorowych, w określonych warunkach, mogą ulegać wzajemnej konwersji, tracąc pierwotne funkcje, nabierając nowe, a także doprowadzając do powstania komórek o pośrednich, wspólnych dla obu linii komórkowych cechach. Donoszono o przekształcaniu się limfocytów regulatorowych w prozapalne komórki Th1 czy limfocyty Th17, o zachowanych bądź utraconych cechach przeciwzapalnych [18,26,41]. Prozapalne, wydzielające IFN- γ Th1 mogą nabyć zdolność wytwarzania IL-10, a tym samym, jako regulatorowe komórki Tr1 FOXP3(-), potencjału ograniczenia procesu zapalnego, na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Bardzo niestabilną i heterogenną grupą komórek są limfocyty Th17, których główną rolę potwierdzono w rozwoju wielu procesów autoimmunizacyjnych. Mogą się przekształcać w limfocyty Treg, Th1, Th2 oraz Tr1 – limfocyty regulatorowe FOXP3⁽⁺⁾ [3,18,41]. Mimo to, że pełnią przeciwstawne do Treg funkcje mają z nimi wspólną ścieżkę rozwojową. W wyniku stymulacji naiwnych limfocytów CD4 przez TGF- β powstają komórki wykazujące ekspresję zarówno krytycznego dla rozwoju Treg czynnika transkrypcyjnego FOXP3, jak i decydującego o powstaniu prozapalnych Th17 – ROR γ t. W przypadku

obecności prozapalnych interleukin: IL-6, -21 dochodzi do redukcji FOXP3, zwiększenia ekspresji ROR γ t i do powstania Th17. Brak prozapalnych cytokin umożliwia zahamowanie przez FOXP3 ekspresji ROR γ t i powstania Treg FOXP3+ [26,41].

Głównie ze względu na bardzo małą liczebność populacji CD8(+)-Treg, stanowiących około 0,4% populacji limfocytów T krwi obwodowej zdrowych ludzi, geneza i funkcja CD8 Treg są bardzo słabo poznane [9]. Nie jest pewne czy reprezentują jedynie indukowaną w odpowiednich warunkach grupę komórek supresorowych, czy – analogicznie do CD4 Treg – istnieją również grasicze naturalne CD8 Treg, a ich rozwój przebiega jednocześnie z CD4+Treg. Za drugą teorią przemawiają doniesienia o wyizolowaniu z ludzkiej grasicy komórek CD25+CD8+ oraz CD25+CD4+CD8+ o zbliżonym do Treg fenotypie i stabilnej funkcji supresorowej wobec Teff [31,39,48]. Podobnie, jak w populacji regulatorowych komórek CD4, w obrębie CD8 Treg można wyróżnić subpopulacje różniące się profilem działania i fenotypem [40].

Prozapalne i przeciwzapalne komórki pozostają w warunkach prawidłowych w dynamicznej równowadze zapewniając zachowanie autotolerancji oraz ochronę przed destrukcją tkanek przez nadmiernie rozwijający się proces zapalny. Jej zachwianie, czy to przez czynniki wewnątrzkomórkowe czy humoralne, może doprowadzić do rozwoju chorób z autoagresji. Ponadto, istotną rolę w procesie autoimmunizacji może pełnić nabranie funkcji prozapalnych przez swoiste dla autoantygenów Treg [26].

Pomimo różnic w genezie i profilu działania Treg, podstawowe mechanizmy supresji odpowiedzi immunologicznej są wspólne i opierają się na:

- modulacji funkcji i procesu dojrzewania komórek prezentujących antygen,
- eliminacji komórek efektorowych i prezentujących antygen,
- przerwaniu szlaków metabolicznych oraz
- wytwarzaniu cytokin przeciwzapalnych [20].

Treg ograniczają zdolność APC do inicjacji odpowiedzi immunologicznej zmniejszając ekspresję obecnych na nich, łączących się z CD28 i niezbędnych w procesie prezentacji antygeny – koreceptorów CD80 i CD86. Działanie to wywierają pośrednio – przez redukcję ich mRNA spowodowaną oddziaływaniem CTLA-4 oraz bezpośrednio – fizyczne usunięcie z powierzchni komórek przez transendocytozę i degradację. Wytwarzane przez Treg granzymy A i B wnika do komórek docelowych, dzięki wydzielanym przez nie perforynom, uruchamiają szlak kaspaz prowadzący do apoptozy. Zahamowanie proliferacji i aktywności limfocytów efektorowych jest również możliwe przez dostarczenie

nie negatywnego sygnału do komórek – aktywację cAMP. Obecność na Treg ektonukleotydyazy – CD39 oraz CD73 umożliwia rozkład ATP do adenozyliny wykazującej liczne przeciwzapalne cechy: tłumienie aktywacji i proliferacji komórek T efektorowych oraz promowanie powstawania Treg. Para- i autokrynnie działanie Treg jest możliwe dzięki wydzielanym przez nie interleukinom: IL-10, TGF- β , IL-35 [8,20].

REGULATOROWE LIMFOCYTY B

Dwoistość funkcji limfocytów B wyrażającą się możliwością pełnienia funkcji zarówno komórek prozapalnych jak i supresorowych, w tej samej chorobie zaobserwowano po raz pierwszy około 40 lat temu. Od tego czasu zebrano wiele doniesień o przypadkach zaostrzenia objawów chorób autoimmunologicznych i alergicznych na skutek utraty regulatorowych limfocytów B (Breg), a ich funkcje supresorowe scharakteryzowano na wielu zwierzęcych modelach zapalenia, autoimmunizacji i nowotworów [42]. Okazało się również, że ukierunkowanie terapii na redukcję limfocytów B (Rituximab) w chorobach autoimmunizacyjnych, w której pokładano wielkie nadzieje, nie zawsze wywołuje oczekiwany skutek terapeutyczny. W niektórych procesach autoimmunizacyjnych (np. Th1-zależne: łuszczyca, *colitis ulcerosa*, neurologiczne choroby autoimmunologiczne) zastosowanie terapii Rituximabem nasila objawy choroby. Do zaostrzenia może prowadzić również wprowadzenie leczenia na niewłaściwym – zbyt późnym etapie choroby [61]. Mimo skutecznej redukcji limfocytów B w GD, skutek kliniczny jest bardzo niezadawalający – zdrowieje tylko około 40% pacjentów. Powyższe obserwacje wskazują na istotną rolę Breg w regulacji procesów zapalnych zależnych od limfocytów T [65].

Regulatorowe limfocyty B są heterogenną populacją, wśród której opisano wiele podtypów wykorzystujących odmienne mechanizmy działania. Wszystkie mają wspólne z innymi subpopulacjami limfocytów B markery powierzchniowe. Nie ustalono dotychczas swoistych dla Breg markerów powierzchniowych ani czynnika transkrypcyjnego. Pod wpływem stymulacji w odpowiednim kontekście i czasie mogą być wytworzone ze wszystkich komórek B, co wskazuje na fundamentalną rolę mikrośrodowiska dla indukcji Breg [63]. Odkrycie autoreaktywnego charakteru BCR (B Cell Receptor) regulatorowych limfocytów B sugeruje immunizację autoantygenami, jako jeden z etapów rozwoju Breg i tym samym ich rolę w utrzymaniu autotolerancji [23].

Lee i Noh wprowadzili systematyczne nazewnictwo regulatorowych limfocytów B analogicznie do subpopulacji limfocytów T. Najbardziej poznane, wykazujące funkcje supresorowe głównie za pośrednictwem IL-10 limfocyty B10, nazwano Br1 (podobnie jak wydzielające IL-10 regulatorowe limfocyty T-Tr1). Jako Br3 (analogicznie do Th3) określono odgrywające główną rolę w indukcji tolerancji w alergiach pokarmowych regulatorowe limfocyty wydzielające TGF- β . CD19⁺C5⁺FOXP3⁺ komórki B oznaczono, jako Breg [42].

Podobnie jak Treg, Breg działają zarówno przez mechanizmy bezpośrednie jak i pośrednie, takie jak: wydzielanie supresorowych cytokin (IL-10, TGF- β), immunoglobulin (IgG4, sialowane IgG), grzymów, czy bezpośredni kontakt międzykomórkowy – indukcja apoptozy za pomocą ligandów, takich jak FasL, PD-L1, PD-L2 oraz synergistyczne z IL oddziaływanie cząsteczek kostymulujących (CD80, CD86). W wyniku oddziaływania: a) hamują proliferację, różnicowanie i wydzielanie prozapalnych cytokin przez komórki Th1, Th17 oraz indukują ich konwersję w limfocyty regulatorowe (odpowiednio Tr1 i FOXP3⁺ Treg), b) indukują apoptozę w komórkach efektorowych i autoreaktywnych, c) tłumią aktywację prezentujących antygeny komórek dendrytycznych i makrofagów, d) aktywują regulatorowe komórki NK. W następstwie dochodzi do przesunięcia równowagi Th1/Th2 na korzyść Th2, ekspansji Treg kosztem T_H1, a także wytworzenia tolerancyjnych komórek prezentujących antygen. Wydaje się, że regulatorowe komórki B odgrywają główną rolę w plastyczności komórek T [63]. Działanie komórek supresorowych B i T jest ukierunkowane na supresję procesu zapalnego, jednak ich funkcje w chorobach autoimmunizacyjnych są różne, zależne od umiejscowienia ich działania w czasie. Limfocyty B działają wcześniej, inicjują reakcje supresorowe, ułatwiają rekrutację Treg, a następnie zanikają, gdy te rozwiną pełne działanie. Komórki T są głównie aktywne w późniejszej fazie przedłużającego się procesu autoimmunizacyjnego i progresji choroby [42].

Badania dotyczące określenia liczebności komórek B10 w różnych chorobach autoimmunizacyjnych wskazują na ich zwiększoną liczbę w porównaniu z osobami zdrowymi, a także na większe, spontaniczne wytwarzanie IL-10 przez komórki chorych z procesami autoimmunizacyjnymi (RZS, SLE, twardzina układowa), niepoddawanych żadnemu leczeniu w porównaniu do grup kontrolnych. Wyniki badań dotyczące ewentualnego istnienia upośledzenia funkcjonalnego B10 pozostają na razie niejednoznaczne [23].

Kristensen i wsp. [27] oceniali zdolność limfocytów B osób z AITD (GD, HT) oraz zdrowych do różnicowania się w wytwarzające IL-10 B10, po stymulacji powszechnie stosowanymi, nieswoistymi odczynnikami (PMA/ionomycyna, CpG), a także naturalnym autoantygenem – tyreoglobuliną (TG). Próbowano określić również zdolność potraktowanych TG komórek B do indukcji wydzielających IL-10 komórek CD4⁺ i profil cytokinowy PBMCs (komórek jednojądrzastych krwi obwodowej) wszystkich grup w warunkach podstawowych oraz po stymulacji poliklonalnej i autoantygenem. Na podstawie wyników badania wyciągnięto wnioski, iż w AITD różnicowanie komórek B w B10 jest niezaburzone. Po poliklonalnej stymulacji nie stwierdzono istotnych różnic w ilości B10 między grupami. Ponadto, u pacjentów z GD indukowane TG B10 wypromowały powstanie komórek CD4⁺ wydzielających IL-10. Stężenie przeciwzapalnej IL-10 zarówno w warunkach podstawowych, jak i po stymulacji było znacznie wyższe w obu grupach chorych niż w osób

zdrowych. Nie wyklucza to jednak defektu funkcjonalnego regulatorowych komórek B związanego z innymi mechanizmami immunoregulacji, a także upośledzenia ich czynności lokalnie – w gruczole tarczowym. Warto zaznaczyć, że większość dobranych do badania pacjentów było jednocześnie poddawanych farmakoterapii (lewatyroksyna, tiamazol).

Do odmiennych wniosków doszli natomiast Zha i wsp. [65] przypisując, na podstawie wcześniejszych obserwacji, komórkom B10 fenotyp CD19+CD24hiCD27+, wykazali ich istotnie mniejszą liczebność u pacjentów ze świeżo rozpoznaną i niepoddawaną leczeniu GD w porównaniu do osób zdrowych oraz pacjentów z co najmniej 12-miesięczną remisją choroby. Funkcja supresorowa, określana jako zdolność do hamowania proliferacji komórek CD4+ oraz wytwarzania przez nie cytokin prozapalnych, pozostawała upośledzona zarówno u chorych jak i osób po przebytej GD.

OCENA ILOŚCI I FUNKCJI LIMFOCYTÓW REGULATOROWYCH – PROBLEMY DIAGNOSTYCZNE

Badania dotyczące zaburzeń Treg w chorobach autoimmunizacyjnych u ludzi, w tym AITD i OT napotykać na wiele trudności, a ich wyniki bywają niespójne a nawet sprzeczne. Wynika to najprawdopodobniej z braku standaryzacji i unifikacji protokołów badawczych między różnymi ośrodkami, a także różnic w charakterystyce dobranej grupy badawczej, nieuwzględniania niektórych czynników (np. uprzednia steroido-/radioterapia, aktywność choroby, oporność komórek efektorowych), a przede wszystkim trudności technicznych związanych z wyizolowaniem i oceną funkcji Treg.

W związku z tym, iż nie poznano dotychczas jednego, swoistego dla Treg markera powierzchniowego, a niektóre z typowo występujących na ich powierzchni cząsteczek są również obecne na aktywowanych komórkach efektorowych, selekcję Treg przeprowadza się na podstawie ustalonej konfiguracji kilku z nich oraz braku/niskiej ekspresji innych. Niestety nie ma ujednoczonego wzoru markerów, który charakteryzowałby homogeniczną grupę Treg. Ośrodki badawcze stosują różne protokoły w zależności od własnego doświadczenia. W związku z tym ocenie poddawane są różne populacje limfocytów regulatorowych, a także próbki o różnym stopniu kontaminacji limfocytami efektorowymi z przejściową ekspresją markerów typowych dla Treg. W związku z tym wyniki są nieporównywalne i na ich podstawie nie można wnioskować o ilości i funkcji całej populacji Treg. Niespójność doniesień pochodzących z badań charakteryzujących Treg według różnych kryteriów mogą również odzwierciedlać zaburzenie tylko konkretnych podgrup Treg, przy prawidłowej funkcji innych [20]. W ostatnim czasie podkreśla się rolę analizy metylacji TSDR, jako jedynej wiarygodnej metody oznaczania ilości Treg [35,37].

Najczęściej ocenę funkcji Treg opiera się o ich zdolność do hamowania proliferacji komórek efektorowych

w warunkach *in vitro*. Do najważniejszych ograniczeń tej metody należą trudności w odtworzeniu cech zapalenia oraz nieuwzględnienie możliwości występowania oporności komórek efektorowych na działanie Treg. Środowisko, w jakim się znajdują komórki regulatorowe, bardzo istotnie wpływa na ich funkcję, a działanie interleukin jest niezmiernie złożone – zależne od kombinacji i proporcji, w jakich występują [21]. Sytuacja byłaby jeszcze bardziej skomplikowana gdyby uwzględnić doniesienia o szeroko zachowanej plastyczności linii komórkowych, która w szczególnych warunkach umożliwiałaby wzajemną konwersję komórek supresorowych i efektorowych [20].

Badania dotyczące Treg, wykonywane na komórkach pobranych z krwi obwodowej, nie uwzględniają możliwości wystąpienia ich defektu tylko regionalnie – w okolicy zajętego zapaleniem narządu [20].

Aktywność Treg zależy od stopnia pobudzenia komórek efektorowych. Glick i wsp. [18] badając rolę Treg w autoimmunologicznych zapaleniach tarczycy zauważyli, że wynik oceny ich funkcji supresorowej zależy od użytych stymulantów. Jeśli jako kostymulant, oprócz przeciwciała anty-CD3 i anty-CD28, użyte były auto-PBMCs (auto logiczne PBMCs), obserwowano upośledzenie funkcji supresorowej Treg osób z GD i HT, w porównaniu do osób zdrowych. Natomiast, jeśli zamiast auto-PBMCs użyto allo-PBMCs (allogeniczne PBMCs) lub allo-PBMCs, jako jedynego stymulanta, nie stwierdzono różnic między badanymi grupami. Otrzymany wynik skłonił do zweryfikowania spostrzeżeń w chorobie, w której upośledzenie funkcji Treg jest powszechnie uznawane – cukrzyca typu 1. Wyniki były podobne – w przypadku użycia jako stymulanta allo-PBMCs, w grupie zdrowych i chorych na cukrzycę typu 1 nie stwierdzano różnic w supresji proliferacji zależnej od Treg.

Tylko nieliczne badania uwzględniają możliwość zafałszowania wyniku przez występowanie oporności Teff i hodują Treg badanych również z Teff ludzi zdrowych [20].

Inny, bardzo ważny aspekt badań nad Treg dotyczy doboru grupy badawczej, gdyż poziom Treg zależy od stopnia zaawansowania choroby, a także przebytego leczenia. Wykazano, iż pacjenci podczas aktywnej/wczesnej fazy: tocznia układowego (SLE), stwardnienia rozsianego (SM), reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS), łuszczycy, nieswoistego zapalenia jelit (IBD) wykazywali niższy poziom Treg niż ci z nieaktywną/przewlekłą fazą choroby. Odpowiedź kliniczna na zastosowanie przeciwciała anty-TNF- α (infliximab) w RZS i IBD oraz GKS w SM, a fotochemioterapii w łuszczycy koreluje ze wzrostem populacji Treg [20]. To samo dotyczy terapii tiamazolem w GD [25].

Mimo tylu nieścisłości i aspektów badań nad Treg dostarczają informacji, które wskazują na ważną rolę limfocytów regulatorowych w przełamaniu tolerancji w chorobach autoimmunizacyjnych [20].

LIMFOCYTY REGULATOROWE A ORBITOPATIA

Pawłowski i wsp. [46], badając tkankę łączną usuniętą podczas zabiegu dekompresji oczodołów u 27 pacjentów z OT o różnym stopniu nasilenia, wykazali zwiększoną ekspresję mRNA dla FOXP3 w stosunku do grupy kontrolnej – osób zdrowych oraz dodatnią korelację między poziomem mRNA FOXP3 a nasileniem/aktywnością zapalenia (ocenianą odpowiednio według skal: NOSPECS i CAS) oraz CD3 i CRP. Jednocześnie, tkanka oczodołowa pacjentów z ciężką orbitopatią (NOSPECS \geq 5) i aktywnym zapaleniem (CAS \geq 4) cechowała się niższym poziomem ekspresji, determinującego funkcję Treg – CTLA-4, niż u osób z łagodną orbitopatią (NOSPECS $<$ 5) i prawie nieaktywnym zapaleniem (CAS $<$ 4), mimo że poziom ekspresji liganda dla CTLA-4 – CD86 wykazywał dodatnią korelację z obecnością i stopniem nasilenia zapalenia. Poziom mRNA FOXP3 we krwi obwodowej nie różnił się natomiast między pacjentami z OT i grupą kontrolną [46]. Uwzględniając dodatnią korelację poziomu mRNA FOXP3 z nasileniem zapalenia przy jednoczesnym zmniejszeniu stężenia CTLA-4 mRNA, badacze wysunęli wniosek o upośledzonej funkcji Treg w ciężkiej OT. W badaniu nie uwzględniono obecności mRNA FOXP3 pochodzącego od aktywowanych komórek efektorowych (opierając się o mRNA FOXP3 nie można wnioskować o ilości/aktywności Treg), natomiast ujemna korelacja mRNA CTLA-4 z nasileniem zapalenia, szczególnie przy zachowanej dodatniej korelacji jego ligandu – CD86, sugeruje nieadekwatną i upośledzoną funkcję Treg.

Za istotną rolę Treg w rozwoju OT przemawiają pośrednio wielokrotne doniesienia o rozwoju orbitopatii zapalnej przypominającej orbitopatię Gravesa u osób poddawanych terapii ipilimumabem – monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko CTLA-4, stosowanym w terapii przerzutującego czerniaka i innych guzów litych. Wyindukowanej orbitopatii u pacjentów bez wcześniejszego wywiadu w kierunku chorób tarczycy towarzyszyło pojawienie się przeciwciał anty-TPO i anty-TG, a w niektórych przypadkach dochodziło do rozwoju zapalenia tarczycy i zaburzenia jej funkcji [5,6,15,28,32,34]. W opisanym przez Le Mina i wsp. [34] przypadku, remisję orbitopatii oraz zmniejszenie miana przeciwciał przeciw-tarczycowych uzyskano po odstawieniu ipilimumabu i zastosowaniu wielotygodniowego leczenia metyloprednisolonem. Przeciwciała anty-TSHR nie były oznaczone na początku choroby, jednak ich nieznacznie podwyższone miano po zakończeniu leczenia i spadku stężenia anty-TPO i anty-TG sugeruje, iż w aktywnej fazie choroby mogły być istotnie podwyższone.

Terapia ipilimumabem opiera się na zahamowaniu supresorowej funkcji Treg, przez co promuje skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym odpowiedź zapalną. Zachwianie równowagi między komórkami zapalnymi i supresorowymi może jednak doprowadzić do indukcji różnorodnych zaburzeń autoimmunologicznych. Najczęściej jest to: niedoczynność przysadki (17%),

zapalenie tarczycy (GD, HT, czy przejściowe – ciche, bezbolesne zapalenie tarczycy), niedoczynność kory nadnerczy, zapalenie spojówek [15,34].

Dlaczego u części pacjentów dochodzi do indukcji chorób autoimmunizacyjnych a u innych nie? Odpowiedzią na to pytanie, a zarazem doskonałą ilustracją oddającą wieloczynnikowe uwarunkowanie procesów autoimmunologicznych może być polimorfizm genu CTLA-4. Sanderson i wsp. [50] w małym badaniu dotyczącym wywołanej podawaniem przeciwciał anty-CTLA-4 autoimmunizacji, przeprowadził analizę polimorfizmu CTLA-4 stwierdzając, że polimorfizm Jo33, związany z niższą ekspresją CTLA-4 na limfocytach, koreluje z ryzykiem rozwoju chorób autoimmunizacyjnych w przebiegu leczenia przeciwciałami anty-CTLA-4. O istocie polimorfizmu genu CTLA-4 dla rozwoju i przebiegu orbitopatii świadczą również doniesienia pochodzące z naszego ośrodka [11,17].

Do tej pory przeprowadzono wiele badań mających na celu ustalenie zależności poszczególnych polimorfizmów genu z podatnością na różne choroby autoimmunologiczne. Opublikowane w ostatnim czasie metaanalizy potwierdzają związek polimorfizmu CTLA-4 zarówno z ryzykiem wystąpienia AITD [38,51], jak i OT [12,57].

ZABURZENIA LIMFOCYTÓW REGULATORYCH WSPÓLNYM MIANOWNIKIEM ORBITOPATII I ZAPALENIA TARCZYCY?

Orbitopatia nie jest traktowana jako powikłanie choroby Gravesa i Basedowa, ale jako najczęstszy pozatarczycowy objaw tego samego procesu autoimmunologicznego [33]. Drugą najczęściej związaną z OT chorobą jest przewlekłe zapalenie tarczycy typu Hashimoto. Choć łagodne i dyskretne zmiany oczne w jego przebiegu występują dość często, to ciężkie postaci zapalenia należą do rzadkości [48,64]. Wiele wspólnych cech łączących GD i HT: możliwość konwersji jednej choroby w drugą, podobna predyspozycja do rozwoju innych chorób z autoagresji oraz częste rodzinne współwystępowanie obu chorób może sugerować istnienie łączącego je defektu immunoregulacyjnego [19].

W związku z brakiem ujednoczenia protokołów badawczych, wyniki dotyczące zaburzeń ilości Treg w chorobach autoimmunologicznych tarczycy są niejednoznaczne [19,61]. Uwzględniając przedstawione wyżej trudności techniczne oraz znaczne wątpliwości co do wiarygodności oceny ich funkcji supresorowej *in vitro*, należy zachować dużą czujność podczas interpretacji wyników badań. Niemniej jednak, większość doniesień wskazuje na istnienie defektu Treg, jako jednego z podstawowych elementów utraty autotolerancji.

Glick i wsp. [19] wykazali w grupie pacjentów z AITD – GD oraz HT, którzy od minimum pół roku nie przyjmowali glukokortykosteroidów, upośledzoną funkcję supresorową Treg pochodzących z krwi obwodowej, a także znacząco obniżone wytwarzanie IL-10. Wyniki pozostawały bez związku z czasem trwania choroby.

Xue i wsp. [61] porównali nie tylko liczbę Treg u osób zdrowych i osób z AITD – HT, ale zbadali również dynamikę zmian ilości Treg we krwi obwodowej w poszczególnych stadiach choroby względem prozapalnych Th17. Wykazano, że zarówno odsetek Treg, ilość mRNA FOXP3 i TGF- β oraz stosunek Treg/Th17 były istotnie niższe, a odsetek Th17 i poziom ROR γ t mRNA, IL-17 były znacznie wyższe u osób z HT. Ponadto stosunek Treg/Th17 był istotnie związany ze stadium choroby, wykazując negatywną korelację z poziomem przeciwciał przeciwtarczycowych oraz TSH, co wskazuje na istotną rolę zaburzenia równowagi między supresorowymi Treg a prozapalnymi Th17 w progresji zapalenia i destrukcji tarczycy. Podobne wnioski wyciągnęli Grywalska i wsp. [24] porównując liczbę Treg i Th17, jako wartość bezwzględną oraz odsetek, u chorych z GD i osób zdrowych. Pacjenci z GD cechowali się mniejszą liczbą Treg i większą Th17 niż osoby zdrowe. Po osiągnięciu remisji w przebiegu leczenia metamizolem, nie stwierdzono już różnic między obiema grupami badanymi. W innym badaniu wykazano zwiększoną liczbę krążących na obwodzie Th17 w GD oraz ich dodatnią korelację z poziomem przeciwciał anty-TSHR [47]. Podobnie w modelu zwierzęcym GD stwierdzono zaburzoną proporcję Treg/Th17, wynikającą jednak z niższego stężenia Treg (poziom Th17 pozostał bez istotnych różnic w porównaniu do myszy bez zapalenia tarczycy) [67].

Ocena i porównanie liczby Treg i Th17 oraz wydzielanych przez nie cytokin, a więc pośrednio ich funkcji, we krwi obwodowej osób z nieleczoną wcześniej OT aktywną i nieaktywną, pacjentów z chorobą GD bez orbitopatii oraz osób zdrowych, wykazała znacznie zwiększoną ilość Th17, ich czynnika transkrypcyjnego – ROR γ t oraz wydzielanych przez nie cytokin (IL-17A, -23, -6) u osób z orbitopatią oraz GD bez OT w porównaniu do osób zdrowych. Wartości korelowały z aktywnością OT. W zakresie odsetka Treg i ilości FOXP3 odnotowano mniejsze wartości niż u osób zdrowych oraz niewielkie, aczkolwiek wykazujące tendencję malejącą w stosunku do wzrostu aktywności OT, różnice. Skutkiem był istotny spadek stosunku Treg/Th17 i FOXP3/ROR γ t u osób z GD i OT w stosunku do zdrowych oraz pogłębianie się

zaburzenia równowagi w miarę nasilenia się aktywności zapalenia oczodołu. Ponadto, poziom wydzielanych przez Treg IL – TGF- β i IL-35 był znacznie zmniejszony u osób z GD i OT w porównaniu do grupy kontrolnej oraz ujemnie skorelowany z aktywnością zapalenia, co mogłoby sugerować zaburzenie funkcji Treg. Niespodziewaną obserwacją natomiast był znacznie wyższy poziom IL-10 u chorych (GD i OT) niż u zdrowych [30].

WNIOSKI

Orbitopatia tarczycowa (OT) jako swoista narządowo choroba autoimmunologiczna jest wynikiem utraty kontroli limfocytów regulatorowych nad skierowaną przeciwko własnym tkankom reakcją zapalną. Niedomoga Treg wynikać może z upośledzenia ich funkcji, migracji bądź deficytów ilościowych. W związku z tym, że przyczyną choroby jest zachwianie układu dynamicznej równowagi, liczebność i funkcje Treg należałoby rozpatrywać tylko w kontekście tego układu i komórek zapalnych. Interpretacji wyników badań należy dokonywać z dużą rozwagą, ponieważ zarówno izolacja Treg, jak i ocena ich funkcji *in vitro* są bardzo trudne i w razie braku zastosowania odpowiedniego protokołu badawczego – mogą być obciążone dużym błędem. Brak ujednolicenia metod badawczych oraz nieobecność umożliwiającego identyfikację Treg swoistego zestawu markerów, często uniemożliwia porównanie wyników badań pochodzących z różnych ośrodków. Jednak dotychczasowe obserwacje wskazują na występowanie zaburzeń funkcji i ilości Treg w tkankach oczodołu oraz krwi obwodowej osób z OT korelujące z aktywnością zapalenia, a także – choć o mniejszym nasileniu – we krwi obwodowej pacjentów z AITD bez OT.

Poznanie mechanizmów i przyczyn niedomogi populacji Treg jako jednego z podstawowych elementów wieloczynnikowego podłoża OT, otworzyłyby nowe możliwości leczenia i zapobiegania nieodwracalnej utracie wzroku, co wydaje się szczególnie istotne z powodu nieznaności inicjującego zapalenie antygenu i ograniczenia dotychczasowej terapii do immunosupresji systemowej.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aniszewski J.P., Valyasevi R.W., Bahn R.S.: Relationship between disease duration and predominant orbital T cell subset in Graves' ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000; 85: 776-780
- [2] Avunduk A.M., Avunduk M.C., Pazarli H., Oguz V., Varnell E.D., Kaufman H.E., Aksay F.: Immunohistochemical analysis of orbital connective tissue specimens of patients with active Graves ophthalmopathy. *Curr. Eye Res.*, 2005; 30: 631-638
- [3] Bedoya S.K., Lam B., Lau K., Larkin J.3rd: Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013; 2013: 986789
- [4] Bettelli E., Dastrange M., Oukka M.: Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 5138-5143
- [5] Borodic G.E., Hinkle D.: Ipilimumab-induced orbital inflammation resembling Graves disease with subsequent development of systemic hyperthyroidism from CTLA-4 receptor suppression. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.*, 2014; 30: 83
- [6] Borodic G., Hinkle D.M., Cia Y.: Drug-induced Graves disease from CTLA-4 receptor suppression. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.*, 2011; 27: e87-e88
- [7] Boryczka K., Kuna P., Pietruczuk M.: Rola czynnika transkrypcyjnego FOXP3 w rozwoju i funkcjonowaniu regulatorowych limfocytów T. *J. Lab. Diagn.*, 2011; 47: 335-340
- [8] Boryczka K., Kuna P., Pietruczuk M.: Limfocyty regulatorowe w tolerancji immunologicznej. *J. Lab. Diagn.*, 2012; 48: 71-76

- [9] Churlaud G., Pitoiset F., Jebbawi F., Lorenzon R., Bellier B., Rosenzweig M., Klatzman D.: Human and mouse CD8+CD25+FOXP3+ regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy. *Front. Immunol.*, 2015; 6: 171
- [10] Cogni G., Chiovato L.: An overview of the pathogenesis of thyroid autoimmunity. *Hormones*, 2013; 12: 19-29
- [11] Daroszewski J., Pawlak E., Karabon L., Frydecka I., Jonkisz A., Slowik M., Bolanowski M.: Soluble CTLA-4 receptor an immunological marker of Graves' disease and severity of ophthalmopathy is associated with CTLA-4 J α 31 and CT60 gene polymorphisms. *Eur. J. Endocrinol.*, 2009; 161: 787-793
- [12] Du P., Ma X., Wang C.: Associations of CTLA4 gene polymorphisms with Graves' ophthalmopathy: a meta-analysis. *Int. J. Genomics*, 2014; 2014: 537969
- [13] Eckstein A.K., Quadbeck B., Tews S., Mann K., Krüger C., Mohr C.H., Steuhl K.P., Esser J., Gieseler R.K.: Thyroid associated ophthalmopathy: evidence for CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells; de novo differentiation of RFD7⁺ macrophages, but not of RFD1⁺ dendritic cells; and loss of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cell receptor expression. *Br. J. Ophthalmol.*, 2004; 88: 803-808
- [14] Figueroa-Vega N., Alfonso-Pérez M., Benedicto I., Sánchez-Madrid F., González-Amaro R., Marazuela M.: Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2010; 95: 953-962
- [15] Fischli S., Allelein S., Zander T., Henzen C.: Endocrinologic side effects of oncologic treatment with anti-CTLA-4-antibodies. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 2014; 139: 996-1000
- [16] Förster G., Otto E., Hansen C., Ochs K., Kahaly G.: Analysis of orbital T cells in thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998; 112: 427-434
- [17] Frydecka I., Daroszewski J., Suwalska K., Zołedziowska M., Tutał A., Slowik M., Potoczek S., Dobosz T.: CTLA-4 (CD152) gene polymorphism at position 49 in exon 1 in Graves' disease in a Polish population of the Lower Silesian region. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2004; 52: 369-374
- [18] Geginat J., Paroni M., Maglie S., Alfen J.S., Kastir I., Gruarin P., De Simone M., Pagani M., Abrignani S.: Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol.*, 2014; 5: 630
- [19] Glick A.B., Wodzinski A., Fu P., Levine A.D., Wald D.N.: Impairment of regulatory T-cell function in autoimmune thyroid disease. *Thyroid*, 2013; 23: 871-878
- [20] Grant C.R., Liberal R., Mieli-Vergani G., Vergani D., Longhi M.S.: Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and yet-unanswered questions. *Autoimmun. Rev.*, 2015; 14: 105-116
- [21] Hoeppli R.E., Wu D., Cook L., Levings M.K.: The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. *Front. Immunol.*, 2015; 6: 61
- [22] Kahaly G.J., Shimony O., Gellman Y.N., Lytton S.D., Eshkar-Seban L., Rosenblum N., Rafaei E., Kassem S., Ilany J., Naor D.: Regulatory T-cells in Graves' orbitopathy: baseline findings and immunomodulation by anti-T lymphocyte globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011; 96: 422-429
- [23] Kalampokis I., Yoshizaki A., Tedder T.F.: IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res. Ther.*, 2013; 15: S1
- [24] Klatka M., Grywalska E., Partyka M., Charytanowicz M., Kiszczak-Bochynska E., Rolinski J.: Th17 and Treg cells in adolescents with Graves' disease. Impact of treatment with methimazole on these cell subsets. *Autoimmunity*, 2014; 47: 201-211
- [25] Klatka M., Kaszubowska L., Grywalska E., Wasiak M., Szewczyk L., Foerster J., Cyman M., Rolinski J.: Treatment of Graves' disease with methimazole in children alters the proliferation of Treg cells and CD3⁺ T lymphocytes. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2014; 52: 69-77
- [26] Kleinewietfeld M., Hafler D.A.: The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin. Immunol.*, 2013; 25: 305-312
- [27] Kristensen B., Hegedüs L., Lundy S.K., Brimnes M.K., Smith T.J., Nielsen C.H.: Characterization of regulatory B cells in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *PLoS One*, 2015; 10: e0127949
- [28] Lecouflet M., Verschoore M., Giard C., Gohier P., Le Corre Y., Milea D., Martin L.: Orbital myositis associated with Ipilimumab. *Ann. Dermatol. Venereol.*, 2013; 140: 448-451
- [29] Lewkowicz P., Lewkowicz N., Tchórzewski H.: Limfocyty regulatorowe CD4⁺CD25⁺ w patofizjologii i terapii chorób o podłożu immunologicznym. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 371-376
- [30] Lv M., Shen J., Li Z., Zhao D., Chen Z., Wan H., Hao B.: Role of Treg/Th17 cells and related cytokines in Graves' ophthalmopathy. *South. Med. J.*, 2014; 34: 1809-1813
- [31] Maggi E., Cosmi L., Liotta F., Romagnani P., Romagnani S., Annunziato F.: Thymic regulatory T cells. *Autoimmun. Rev.*, 2005; 4: 579-586
- [32] McElnea E., NíMhéalóid A., Moran S., Kelly R., Fulcher T.: Thyroid-like ophthalmopathy in a euthyroid patient receiving Ipilimumab. *Orbit*, 2014; 33: 424-427
- [33] Melcescu E., Horton W.B., Kim D., Vijayakumar V., Corbett J.J., Crowder K.W., Pitman K.T., Uwaifo G.I., Koch C.A.: Graves orbitopathy: update on diagnosis and therapy. *South. Med. J.*, 2014; 107: 34-43
- [34] Min L., Vaidya A., Becker C.: Thyroid autoimmunity and ophthalmopathy related to melanoma biological therapy. *Eur. J. Endocrinol.*, 2011; 164: 303-307
- [35] Miyao T., Floescu S., Setoguchi R., Luche H., Fehling H.J., Waldmann H., Huehn J., Hori S.: Plasticity of Foxp3⁺ T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity*, 2012; 36: 262-275
- [36] Moshkelgosha S., So P.W., Deasy N., Diaz-Cano S., Banga J.P.: Cutting edge: Retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinology*, 2013; 154: 3008-3015
- [37] Ngalamika O., Liang G., Zhao M., Yu X., Yang Y., Yin H., Liu Y., Yung S., Chan T.M., Lu Q.: Peripheral whole blood FOXP3 TSDR methylation: a potential marker in severity assessment of autoimmune diseases and chronic infections. *Immunol. Invest.*, 2015; 44: 126-136
- [38] Ni J., Qiu L.J., Zhang M., Wen P.F., Ye X.R., Liang Y., Pan H.F., Ye D.Q.: CTLA-4 CT60 (rs3087243) polymorphism and autoimmune thyroid diseases susceptibility: a comprehensive meta-analysis. *Endocr. Res.*, 2014; 39: 180-188
- [39] Niederkorn J.Y.: Emerging concepts in CD8⁺ T regulatory cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008; 20: 327-331
- [40] Niedzwiedzka-Rystwej P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Charakterystyka subpopulacji limfocytów T. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 371-379
- [41] Noack M., Miossec P.: Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory disease. *Autoimmun. Rev.*, 2014; 13: 668-677
- [42] Noh G., Lee J.H.: Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2011; 3: 168-177
- [43] Ohkura N., Kitagawa Y., Sakaguchi S.: Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, 2013; 38: 414-423
- [44] Ono M., Yaguchi H., Ohkura N., Kitabayashi I., Nagamura Y., Nomura T., Miyachi Y., Tsukada T., Sakaguchi S.: Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*, 2007; 446: 685-689
- [45] Pawlowski P., Reszec J., Eckstein A., Johnson K., Grzybowski A., Chyczewski L., Mysliwiec J.: Markers of inflammation and fibrosis in the orbital fat/connective tissue of patients with Graves' orbitopa-

thy: clinical implications. *Mediators Inflamm.*, 2014; 2014: 412158

[46] Pawlowski P., Wawrusiewicz-Kurylonek N., Eckstein A., Reszec J., Luczynski W., Johnson K., Kretowski A., Bakunowicz-Lazarczyk A., Gorska M., Szamatowicz J., Chyczewski L., Mysliwiec J.: Disturbances of modulating molecules (FOXP3, CTLA-4/CD28/B7, and CD40/CD40L) mRNA expressions in the orbital tissue from patients with severe Graves' ophthalmopathy. *Mediators Inflamm.*, 2015; 2015: 340934

[47] Peng D., Xu B., Wang Y., Guo H., Jiang Y.: A high frequency of circulating th22 and th17 cells in patients with new onset graves' disease. *PLoS One*, 2013; 8: e68446

[48] Povolieri G.A., Scotta C., Nova-Lamperti E.A., John S., Lombardi G., Afzali B.: Thymic versus induced regulatory T cells – who regulates the regulators? *Front. Immunol.*, 2013; 4: 169

[49] Raphael I., Nalawade S., Eagar T.N., Forsthuber T.G.: T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 2015; 74: 5-17

[50] Sanderson K., Scotland R., Lee P., Liu D., Groshen S., Snively J., Sian S., Nichol G., Davis T., Keler T., Yellin M., Weber J.: Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 741-750

[51] Si X., Zhang X., Tang W., Luo Y., Tang W.: Association between the CTLA-4 +49A/G polymorphism and Graves' disease: a meta-analysis. *Exp. Ther. Med.*, 2012; 4: 538-544

[52] Smith T.J.: TSH-receptor-expressing fibrocytes and thyroid-associated ophthalmopathy. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2015; 11: 171-181

[53] Szymrka-Kaczmarek M., Kosmaczewska A., Ciszak L., Szteblich A., Wiland P.: Zaburzenia równowagi między komórkami Th17 i Treg we krwi obwodowej chorych na toczeń rumieniowaty układowy z niską aktywnością choroby. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 893-898

[54] Tai X., Van Laethem F., Pobeziński L., Guinter T., Sharrow S.O., Adams A., Granger L., Kruhlik M., Lindsten T., Thompson C.B., Feigenbaum L., Singer A.: Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4⁺ T cells. *Blood*, 2012; 119: 5155-5163

[55] Tjiang H., Lahooti H., McCorquodale T., Parmar K.R., Wall J.R.: Eye and eyelid abnormalities are common in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid*, 2010; 20: 287-290

[56] Wall J.R., Lahooti H.: Pathogenesis of thyroid eye disease – does autoimmunity against the TSH receptor explain all cases. *Endokrynol. Pol.*, 2010; 61: 222-227

[57] Wang H., Zhu L.S., Cheng J.W., Cai J.P., Li Y., Ma X.Y., Wei R.L.: Meta-analysis of association between the +49A/G polymorphism of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 and thyroid associated ophthalmopathy. *Curr. Eye Res.*, 2015; 40: 1195-1203

[58] Wang Y., Smith T.J.: Current concepts in the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2014; 55: 1735-1748

[59] Weetman A., De Groot L.J.: Autoimmunity of the thyroid gland. *Thyroid Dis. Manag.* [http://www.thyroidmanager.org/chapter/autoimmunity-to-the-thyroid-gland/\(17.05.2015\)](http://www.thyroidmanager.org/chapter/autoimmunity-to-the-thyroid-gland/(17.05.2015))

[60] Whiteside T.L., Schuler P., Schilling B.: Induced and natural regulatory T cells in human cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2012; 12: 1383-1397

[61] Xue H., Yu X., Ma L., Song S., Li Y., Zhang L., Yang T., Liu H.: The possible role of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺/CD4⁺IL-17A⁺ cell imbalance in the autoimmunity of patients with Hashimoto thyroiditis. *Endocrine*, 2015; 50: 665-673

[62] Yang D., Hiromatsu Y., Hoshino T., Inoue Y., Itoh K., Nonaka K.: Dominant infiltration of T_H1-type CD4⁺ T cells at the retrobulbar space of patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid*, 1999; 9: 305-310

[63] Yang M., Rui K., Wang S., Lu L.: Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2013; 10: 122-132

[64] Yoshihara A., Yoshimura Noh J., Nakachi A., Ohye H., Sato S., Sekiya K., Kosuga Y., Suzuki M., Matsumoto M., Kuni Y., Watanabe N., Mukasa K., Inoue Y., Ito K., Ito K.: Severe thyroid-associated orbitopathy in Hashimoto's thyroiditis. Report of 2 cases. *Endocr. J.*, 2011; 58: 343-348

[65] Zha B., Wang L., Liu X., Liu J., Chen Z., Xu J., Sheng L., Li Y., Chu Y.: Decrease in proportion of CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease. *PLoS One*, 2012; 7: e49835

[66] Zhang H., Kong H., Zeng X., Guo L., Sun X., He S.: Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J. Transl. Med.*, 2014; 12: 125

[67] Zhou J., Bi M., Fan C., Song X., Yang R., Zhao S., Li L., Li Y., Teng W., Shan Z.: Regulatory T cells but not T helper 17 cells are modulated in an animal model of Graves' hyperthyroidism. *Clin. Exp. Med.*, 2012; 12: 39-46

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.