Tatjana Zaķe

**Vairogdziedzera autoimunitāte:
ar Th17-asociēto citokīnu un
patomorfoloģisko mehānismu
izpēte Hašimoto tireoidīta un
Greivsa slimības patogēnēzē**

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – klīniskā medicīna
Apakšnozare – internā medicīna

Rīga, 2021

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Tatjana Zaķe

ORCID 0000-0002-1188-4679

Vairogdziedzera autoimunitāte:
ar Th17-asociēto citokīnu un patomorfoloģisko
mehānismu izpēte Hašimoto tireoidīta
un Greivsa slimības patoģenēzē

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – internā medicīna

Rīga, 2021

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā un Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

Dr. habil. med. profesore **Valērija Groma**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. asociētā profesore **Ilze Konrāde**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. asociētais profesors **Vitolds Mackēvičs**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. profesors **Valdis Pīrāgs**,
Latvijas Universitāte

Dr. med. profesors **Andres Arend**,
Tartu Universitāte, Igaunija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Klīniskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē 2021. gada 2. decembrī plkst. 15.00 tiešsaistes platformā *Zoom*

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. asociētā profesore **Jūlija Voicehovska**

Satura rādītājs

Darbā lietotie saīsinājumi	5
Ievads	7
Pētījuma mērķis	9
Pētījuma zinātniskās hipotēzes	10
Pētījuma novitāte	10
Ētiskie aspekti	11
1. Materiāli un metodes	12
1.1. Pirmais pētījums. Vairogdziedzera folikulu integritātes izpēte, analizējot Tj – ZO-1 un klaudīna-1 proteīnu imūnekspresiju un korelējot iegūtos datus ar IL-17 un CD68 ekspresiju pacientiem ar AIVS	12
1.1.1. Pacientu raksturojums	12
1.1.2. Rutīnas histopatoloģija	13
1.1.3. Imūnhistoķīmiskās reakcijas	13
1.1.4. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu novērtēšana	14
1.1.5. Imūnfluorescences metode	15
1.1.6. Statistiskās metodes	15
1.1.7. Caurstarojošā elektronu mikroskopija	15
1.2. Otrais pētījums. Asociācijas izpēte starp IL-17 un patogēno Th17 šūnu veicinošajiem citokīniem pacientiem ar AIVS, analizējot IL-17, IL-23 un IL-1β imūnekspresiju vairogdziedzera audos	16
1.2.1. Pacientu raksturojums	16
1.2.2. Rutīnas histopatoloģija un imūnhistoķīmija	17
1.2.3. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu novērtēšana	17
1.2.4. Imūnfluorescences metode	18
1.2.5. Statistiskās metodes	18
1.2.6. Imūnelektronmikroskopija	18
1.3. Trešais pētījums. Ar Th17 saistīto citokīnu plazmas līmeņa un selēna statusa noteikšana pacientiem ar AIVS	19
1.3.1. Pacientu raksturojums	19
1.3.2. Asins paraugu ņemšana	20
1.3.3. Vairogdziedzera funkcijas un antivielu testi	20
1.3.4. Citokīnu noteikšana	21
1.3.5. Selēna statusa noteikšana	21
1.3.6. Statistiskās metodes	22
1.4. Ceturtais pētījums. AIVS imunoloģiskie mehānismi: tradicionālās Th1/Th2 paradigmas maiņa	22

2. Rezultāti	23
2.1. Pirmais pētījums. Vairogdziedzera folikulu integritātes izpēte, analizējot Tj – ZO-1 un klaudīna-1 proteīnu imūnekspressiju un korelējot iegūtos datus ar IL-17 un CD68 ekspressiju pacientiem ar AIVS	23
2.1.1. AIVS rutīnas histopatoloģiskais raksturojums	23
2.1.2. Imūnhistoķīmiski noteikto antigēnu ekspresijas analīze	23
2.1.3. Starpsūnu savienojumu ultrastrukturālā izpēte vairogdziedzera epitēlijā	30
2.1.4. Korelācijas analīze starp IL-17A un intrafolikulāro CD68 vai Tj ekspressiju AIVS pacientiem	31
2.2. Otrais pētījums. Asociācijas izpēte starp IL-17 un patogēno Th17 šūnu veicinošajiem citokīniem pacientiem ar AIVS, analizējot IL-17, IL-23 un IL-1β imūnekspressiju vairogdziedzera audos	31
2.2.1. Ar Th17 saistīto interleikīnu imūnhistoķīmiskā analīze pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu	31
2.2.2. Ar Th17 saistīto interleikīnu imūnelektronmikroskopija HT pacientiem	37
2.2.3. Korelācijas analīze starp IL-17 un Th17 veicinošajiem citokīniem IL-23 un IL-1β	37
2.3. Trešais pētījums. Ar Th17 saistīto citokīnu plazmas līmeņa un selēna statusa noteikšana pacientiem ar AIVS	39
2.3.1. Pētījuma dalībnieku demogrāfiskais un bioķīmiskais raksturojums	39
2.3.2. Th17 citokīnu plazmas līmenis AIVS un kontroles grupas pacientiem	40
2.3.3. Plazmas selēna līmenis AIVS un kontroles grupas pacientiem	48
3. Diskusija	51
3.1. IL-17 un blīvo šūnu savienojumu proteīnu ekspresijas heterogenitāte vairogdziedzera audos pacientiem ar AIVS (pirmais pētījums)	51
3.2. Th17 patogēno IL-23 un IL-1β ekspresijas pieaugums HT, bet ne GS pacientu vairogdziedzera audos (otrais pētījums)	55
3.3. Ar Th17 saistīto citokīnu līmenis plazmā un selēna statuss AIVS pacientiem (trešais pētījums)	59
Secinājumi	64
Publikācijas	66
Izmantotās literatūras saraksts	70
Pateicības	75

Darbā lietotie saīsinājumi

AIVS	autoimūnās vairogdziedzera slimības
ANA	antinukleārās antivielas
FT3	brīvais trijodtironīns (angl. <i>free triiodothyronine</i>)
FT4	brīvais tiroksīns (angl. <i>free thyroxine</i>)
GM-CSF	granulocītu-makrofāgu koloniju stimulējošais faktors (angl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GO	Greivsa orbitopātija
GPx	glutaciona peroksidāze
GS	Greivsa slimība
HT	Hašimoto tireoidīts
IFN	interferons
IL	interleikīns
ROR	retīnskābes receptoram radniecīgais bāreņreceptors (angl. <i>retinoic acid receptor-related orphan receptor</i>)
SELENO	selenoproteīns
TEM	caurstarojošā elektronu mikroskopija (angl. <i>transmission electron microscopy</i>)
Tg	tireoglobulīns
TGF	transformējošais augšanas faktors (angl. <i>transforming growth factor</i>)
Th	T līdzētājšūna (angl. <i>T helper</i>)
Tj	blīvie šūnu savienojumi (angl. <i>tight junctions</i>)
TNF	audzēja nekrozes faktors (angl. <i>tumour necrosis factor</i>)
TPO	tireoīdperoksidāze
Treg	regulatorā T šūna
TSH	vairogdziedzeri stimulējošais hormons (angl. <i>thyroid stimulating hormone</i>)

TSHR	vairogdziedzeri stimulējošā hormona receptors (angl. <i>thyroid stimulating hormone receptor</i>)
tTG-IgA	audu transglutamināzes IgA autoantivielas (angl. <i>tissue-transglutaminase IgA autoantibodies</i>)
ZO	slēgījūgles (lat. <i>zonula occludens</i>)

Ievads

Autoimūnās vairogdziedzera slimības (AIVS), kas galvenokārt izpaužas kā Greivsa slimība (GS) vai Hašimoto tireoidīts (HT), ir visbiežāk sastopamās autoimūnās slimības pasaulē, kuru izplatība un biežums pēdējās desmitgadēs palielinās. Abu slimību gadījumā sarežģītā mijiedarbība starp dažādiem vides un endogēnajiem faktoriem ģenētiski predisponējošiem indivīdiem ierosina vairogdziedzera autoimunitāti, izraisot paaugstinātu vairogdziedzera antigēnu prezentāciju un samazinātu imūno toleranci (Ruggeri, Giuffrida and Campenni, 2018). Tomēr AIVS patoģenēzes imunoloģiskie aspekti vēl nav pilnībā izziņāti.

Citokīniem, kurus ražo imūnās sistēmas un vairogdziedzera folikulārās šūnas, ir svarīga nozīme šūnu un humorālās imūnās atbildes ierosināšanā un modulēšanā. Lai gan abas slimības pieder AIVS, tām ir atšķirīgi patoģenētiskie mehānismi un dažādas imūnās sistēmas atbildes izpausmes. HT attīstība galvenokārt ir saistīta ar 1. tipa T līdzētājšūnu (Th1) imūno atbildi, kas ierosina šūnu imūnās atbildes reakcijas un vairogdziedzera šūnu apoptozi, kā arī sekmē hipotireozes attīstību, izraisot paaugstinātu interferona (IFN)- γ , interleikīna (IL)-1 β , IL-2 un audzēja nekrozes faktora (TNF)- α ekspresiju. GS gadījumā paaugstināta IL-4, IL-5, IL-6 un IL-13 ekspresija ir ar Th2 saistītās humorālās imūnās atbildes rezultāts, kas izraisa autoantivielu pret vairogdziedzeri stimulējošā hormona receptoru (anti-TSHR) sekrēciju un veicina vairogdziedzera šūnu hipertrofijas un hipertireozes attīstību (Ramos-Leví and Marazuela, 2016).

Līdz ar Th17 limfocītu atklāšanu ir mainījusies izpratne par Th1 un Th2 šūnu dihotomiju, kas ir būtiska autoimūno slimību attīstībā. Th17 limfocīti galvenokārt ražo IL-17 un IL-22. Turklāt IL-17 ir noteicošais proiekaisuma citokīns, kas veicina hronisku un autoimūnu iekaisumu, kā arī neitrofilo leukocītu rekrutēšanu. Pēdējo desmit gadu laikā ir iegūti apstiprinoši pierādījumi par Th17 šūnu un IL-17 iesaisti AIVS, īpaši HT patoģenēzē (Figuerola-Vega et al., 2010;

Peng et al., 2013; Konca Degertekin et al., 2016; Esfahanian et al., 2017). Ir izteikts pieņēmums, ka AIVS attīstās Th1/Th2 dihotomijas un Th17/T regulatoro (Treg) šūnu balansa traucējumu rezultātā (González-Amaro and Marazuela, 2016). Tomēr Th17 šūnu nozīme AIVS ierosināšanā un progresēšanā joprojām paliek neskaidra.

Transformējošais augšanas faktors (TGF)- β IL-6 un IL-21 klātbūtnē inducē sākotnējo Th17 šūnu attīstību no naivām Th šūnām, savukārt IL-23 un IL-1 β ir svarīgi gan Th17 limfocītu pilnai nobriešanai, gan patogēno Th17 šūnu attīstībai (Chung et al., 2009; Stadhoudersab, Lubberts and Hendriks, 2018). Zināšanas par to, ka Th17 šūnas ir heterogēnas un noteiktos apstākļos uzrāda dažādus Th17 šūnu fenotipus – patogēnus un nepatogēnus, ir parādījušās nesen. Tāpat HT un GS patogēnēzē nav rūpīgi pētīta patogēno Th17 šūnu diferenciāciju veicinošo interleikīnu loma.

Blīvie šūnu savienojumi (Tj) sastāv no sarežģīta, savstarpēji savienota membrānas proteīnu un glikoproteīnu tīkla. Tj nodrošina šūnu polaritāti un izveido barjeru, kas pilnīgi noslēdz paracelulāro telpu starp blakus esošajām vairogdziedzera folikulu šūnām. Vairogdziedzera epitēlija integritātes bojājumi, mainoties šūnu savienojumu proteīnu ekspresijas profilam un lokalizācijai, varētu būt nozīmīgi AIVS attīstībā. Virknē pētījumu konstatēts, ka interleikīni spēj modulēt Tj proteīnus, piemēram, slēgējūglu – *zonula occludens* (ZO)-1, okludīna un klaudīna proteīnus, samazinot šo molekulu ekspresiju (Huppert et al., 2010; Pérez et al., 2014), tomēr IL-17 loma Tj integritātes nodrošināšanā pacientiem ar AIVS līdz šim nav tikusi pētīta.

Tiek uzskatīts, ka vienlaicīgi ar ģenētisko noslieci un citiem ārējās vides ierosinātājfaktoriem arī selēna deficītam ir nozīme AIVS attīstībā. Aminoskābes selenocisteīna formā selēns ir atrodams specifiskos selenoproteīnos, no tiem 25 ir aprakstīti cilvēkiem. Selenoproteīni aizsargā pret oksidatīvo stresu, regulē aktīvā vairogdziedzera hormona sintēzi un imūnās sistēmas funkcijas (Rayman,

2012). Selēna deficīts var izraisīt CD4+ T šūnu diferenciācijas traucējumus, veicinot šūnu un humorālās imūnatbildes traucējumus. Turklāt selēns izraisa izmaiņas IL-6, TGF- β un IL-23 ekspresijas līmeņos, tādējādi vēl vairāk sekmējot Th17 šūnu diferenciācijas traucējumus (Nettleford and Prabhu, 2018). Iztrūkst informācijas par selēna daudzumu augsnē un selēna statusu pacientiem ar AIVS Latvijā. Saistība starp selēnu un ar Th17 saistītiem citokīniem līdz šim ir maz pētīta, galvenokārt eksperimentālos modeļos.

Pētījuma mērķis

Izpētīt Th17 šūnu nozīmi HT un GS patogēnēzē, lietojot dažādas morfoloģiskās diagnostikas metodes un xMAP tehnoloģiju, korelējot iegūtos datus ar selēna statusu pacientiem.

Pētījuma veikšanai tika izvirzīti **uzdevumi**:

1. Raksturot ar Th17 saistītu imūnatbildi AIVS ietvaros, nosakot ar Th17 un Treg saistīto citokīnu (IL-17, IL-22, IL-23, IL-6 un IL-10) līmeni plazmā Latvijas pacientiem ar pirmreizēji diagnosticētu, iepriekš neārstētu GS vai HT, salīdzinājumā ar atradni veselām personām bez autoimūnām slimībām.
2. Izvērtēt IL-17, IL-23 un IL-1 β imūnekspresijas izplatību un līmeni vairogdziedzera audos pacientiem ar HT un GS; salīdzināt šos datus ar kontroles grupu.
3. Novērtēt asociācijas starp IL-17 un patogēno Th17 šūnu veicinošajiem citokīniem pacientiem ar AIVS.
4. Izpētīt vairogdziedzera folikulu integritāti, analizējot Tj – ZO-1 un kladīna-1 proteīnu imūnekspresiju un korelējot iegūtos datus ar IL-17 un CD68 ekspresiju; salīdzināt atradni kontroles grupas un AIVS pacientiem.

5. Noteikt selēna statusu pacientiem ar pirmreizēji diagnosticētu, iepriekš neārstētu GS vai HT, salīdzinot ar atradni kontroles grupā.
6. Noteikt iespējamās korelācijas starp Th17 citokīnu un selēna līmeņiem pacientiem ar GS un HT.

Pētījuma zinātniskās hipotēzes

1. Th17 šūnām un to izdalītajiem citokīniem ir svarīga loma AIVS patoģenēzē, šīs zināšanas var mainīt tradicionālo Th1/Th2 dihotomijas paradigmu.
2. Citokīnu regulētais vairogdziedzera epitēlija Tj integritātes bojājums ļauj antigēnu prezentējošām šūnām virzīties uz folikula dobumu, kas ir būtiski vairogdziedzera autoimunitātes patoģenēzē.
3. Selēnam ir svarīga nozīme AIVS attīstībā; tā statuss ir samazināts AIVS pacientiem, salīdzinot ar veseliem indivīdiem.

Pētījuma novitāte

Šajā pētījumā pirmo reizi tika pētīta Th17 citokīnu loma HT un GS patoģenēzē kontekstā ar selēna statusu un vairogdziedzera folikulu integritātes novērtējumu/noteikšanu. Th17 citokīnu līmenis tika analizēts gan AIVS pacientu plazmā, gan vairogdziedzera audos, lietojot imūnhistoķīmijas, imūnfluorescences, imūnelektronmikroskopijas un xMAP metodes. Dažādu ar Th17 saistīto citokīnu vienlaicīga noteikšana sniedza jaunu informāciju par sarežģīto citokīnu modeli, kas raksturo AIVS. Jāatzīmē, ka IL-23 ekspresija GS pacientu vairogdziedzera audos līdz šim nav pētīta. Pētījumā iegūtas korelācijas starp ar Th17 saistīto citokīnu līmeni un hipertireozes smagumu GS pacientiem veido teorētisku pamatu turpmākajiem vairogdziedzera autoimunitātes pētījumiem. Lai gan Th2 paaugstinātā aktivitāte GS patoģenēzē uzskatāma par pierādītu, iegūtie dati liecina, ka ar Th17 saistītie citokīni arī var būt nozīmīgi

GS patogēnēzē. Jāatzīmē, ka selēna statusa noteikšana pacientiem ar AIVS Latvijā līdz šim nav veikta.

Ētiskie aspekti

Pētījums tika veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju, un pētījumu apstiprinājusi Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komiteja 2014. gada 25. jūnijā, atļauja Nr. E-9 (2). Visi pētījumā iekļautie pacienti un veselie brīvprātīgie parakstīja informētas piekrišanas veidlapu līdzdalībai pētījumā.

1. Materiāli un metodes

Prospektīvais pētījums tika veikts Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā. Vairogdziedzera audi parafrīna blokos no tireoīdektomijas paraugiem kopā ar histopatoloģijas slēdzieniem tika iegūti no Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas centra. Visi morfoloģiskie pētījumi tika veikti Anatomijas un antropoloģijas institūta Starpkatedru elektron-mikroskopijas laboratorijā. Citokīnu līmeņa noteikšana plazmā tika veikta Rīgas Stradiņa universitātes Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedrā, savukārt selēna koncentrācija tika noteikta Rīgas Stradiņa universitātes Bioķīmijas zinātniskajā laboratorijā.

1.1. Pirmais pētījums. Vairogdziedzera folikulu integritātes izpēte, analizējot Tj – ZO-1 un kladīna-1 proteīnu imūnekspresiju un korelējot iegūtos datus ar IL-17 un CD68 ekspresiju pacientiem ar AIVS

Pētījums ir aprakstīts Tatjanas Zaķes, Sandras Skujas, Ievas Kaleres, Ilzes Konrādes un Valērijas Gromas manuskriptā *Heterogeneity of tissue IL-17 and tight junction proteins expression demonstrated in patients with autoimmune thyroid diseases. Medicine (Baltimore).* 97(25): e11211, doi: 10.1097/MD.00000000000011211. PMID: 29924048.

1.1.1. Pacientu raksturojums

Šajā pētījumā tika iekļauti 25 pieaugušie AIVS pacienti – 18 ar HT un 7 ar GS, kuriem veikta tireoīdektomija Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā. Desmit vecumam un dzimumam atbilstoši veseli indivīdi, kuriem bija koloīda struma bez autoimūnā komponenta, tika rekrutēti pētījumam un iekļauti kontroles grupā. AIVS pacientu un kontroles grupas pacientu vidējais vecums

attiecīgi bija $49,68 \pm 11,01$ gads (diapazons 28–68 gadi; 23 sievietes) un $47,90 \pm 11,29$ gadi (diapazons 33–71 gads; 9 sievietes).

AIVS diagnozi apstiprināja HT un GS klīniskie un diagnostiskie kritēriji, kurus papildināja vairogdziedzera bioķīmijas, ultraskaņas attēldiagnostikas un histopatoloģijas rezultāti. Kontroles grupas pacienti ($n = 10$) ar koloīdu strumu bija eitireoīdi, un tiem bija negatīvas vairogdziedzera autoantivielas.

1.1.2. Rutīnas histopatoloģija

Vairogdziedzera audu bloki no 35 tireoīdektomijas paraugiem kopā ar histopatoloģijas slēdzieniem tika iegūti no Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas centra Latvijā laika posmā no 2013. gada janvāra līdz 2014. gada decembrim. AIVS un koloidāla kākšļa diagnoze tika apstiprināta, analizējot ar hematoksilīnu un eozīnu krāsotos audu griezumus gaismas mikroskopā.

1.1.3. Imūnhistoķīmiskās reakcijas

Vairogdziedzera audi tika fiksēti formalīnā un ieguldīti parafīna blokos; pēc tam no blokiem tika sagatavoti 4–5 μ m biezi audu griezumi, kas tika pārnesti uz priekšmetstikliņiem. Imūnhistoķīmiskās reakcijas tika veiktas manuāli, izmantojot deparafinizētos, dehidratētos un skalotos audu griezumus. Pētījumā tika izmantotas šādas primārās antivielas: poliklonālā truša anti-IL-17A (Biorbyt, Kembridža, AK, atšķaidījums 1:300); poliklonālā truša anti-ZO-1 (Biorbyt, Kembridža, AK, atšķaidījums 1:200) un poliklonālā truša anti-klaudīna-1 (Biorbyt, Kembridža, AK, atšķaidījums 1:100) antiviela. Makrofāgu vizualizācijai veikta imūnhistoķīmiskā reakcija ar monoklonālo peles anti-CD68 antivielu (DacoCytomation, Glostrupa, Dānija, klons PG-M1, atšķaidījums 1:100).

Imūnhistoķīmisko reakciju galaproduktu vizualizācijas nodrošināšanai tika lietota augsti jutīga HRP polimēru sistēma – HiDef Detection™ (CellMarque, Rocklin, CA, ASV). Antigēnu-antivielu kompleksa vizualizācija tika veikta, izmantojot 3,3'-diaminobenzidīna tetrahidrohlorīdu (DAB+Chromogen and DAB+Substrate buffer (CellMarque, Rocklin, CA, ASV)), savukārt šūnu kodoli tika krāsoti ar Meijera hematoksilīnu. Negatīvās imūnhistoķīmiskās kontroles tika iegūtas, izlaižot primāro antivielu vai aizstājot to ar buferšķīdumu. Audu griezumus tika analizēti Leica gaismas mikroskopā (Leitz DMRB, Vācija), kas aprīkots ar digitālo kameru DFC 450C, pēc nejaušības principa izvēloties 10 redzeslaukus no $\times 100$ līdz $\times 400$ palielinājumā.

1.1.4. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu novērtēšana

Par imūnpozitīvām tika uzskatītas vairogdziedzeru šūnas, kuru struktūras imūnhistoķīmiskajās reakcijās tika iezīmētas brūnā krāsā. IL-17, klauđīna-1 un ZO-1 pozitīvās struktūras uzrādīja citoplazmatisku vai membranozu reakciju. IL-17A un klauđīna-1 imūnekspreģija tika analizēta puskvantitatīvi, izmantojot šādu skalu: negatīva (0), vāja (1), vidēja (2) vai izteikta (3), kur attiecīgi – 0–5, 6–25, 26–50 vai > 50 % no redzeslauka aizņēma imūnpozitīvās šūnas; ZO-1 imūnekspreģijas intensitāte tika izvērtēta pēc sekojošas skalas – negatīva (0), ļoti vāja vai pārtraukta (1), vāja (2) un izteikta vai intakta (3) saskaņā ar Abd El Atti un Shash (2012) rekomendācijām. CD68 imūnpozitivitāte tika definēta kā CD68 pozitīvo vairogdziedzeru folikulu procentuālā daļa, saskaitot kopējo vairogdziedzeru folikulu skaitu ar CD68 pozitīvajām šūnām 15 reprezentatīvajos redzeslaukos $\times 400$ palielinājumā.

1.1.5. Imūnfluorescences metode

Precīzākai IL-17A vizualizācijai tika lietota imūnfluorescences metode, kā sekundāro antivielu izmantojot kazas izcelsmes anti-peles IgG-FITC: sc-2010 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV, atšķaidījums 1:300); audu griezumi tika krāsoti ar 4',6-diamidino-2-fenilindolu (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, AK, atšķaidījums 1:3000) un ieguldīti *Prolong Gold* ar DAPI (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, AK). Digitālie attēli tika uzņemti, izmantojot konfokālo mikroskopu *Eclipse Ti-E* (Nikon, Tokija, Japāna).

1.1.6. Statistiskās metodes

Imūnhistoķīmisko rezultātu izvērtēšanai tika noteikta mediāna un starpkvartīļu amplitūda. Manna–Vitnija tests izmantots, lai noteiktu atšķirības imūnreaktivitātes vērtībās starp divām grupām, savukārt, lai noteiktu atšķirības starp vairāk nekā divām pētījuma grupām, tika lietots Kraskela–Volisa H tests. Lai izvērtētu iespējamās korelācijas starp diviem mainīgajiem lielumiem, tika izmantots Spīrmena ranga korelācijas koeficients. Rezultātus uzskatīja par statistiski ticamiem, ja būtiskuma līmeņa (p) vērtība bija $< 0,05$. Datu statistiskā apstrāde tika veikta ar programmu SPSS (versija 20.0).

1.1.7. Caurstarojošā elektronu mikroskopija

Precīzai Tj ultrastrukturālai izvērtēšanai vairogdziedzera audu paraugi, kas tireoīdektomijas laikā iegūti no 5 HT pacientiem, tika fiksēti 2,5 % glutāraldehīda šķīdumā un tālāk apstrādāti analīzei caurstarojošā elektronu mikroskopā (TEM), kas ir zelta standarta metode starpšūnu savienojumu vizualizācijai. Pēc tam paraugi tika skaloti, fiksēti ar 1 % OsO₄, kontrastēti ar uranilacetātu, dehidrēti ar pieaugošas koncentrācijas spirtiem un ieguldīti

epoksīda sveķu maisījumā, kas pēc tam tika polimerizēti 24 stundas 62 °C temperatūrā. Tika izgatavoti 1 μm biezi audu pusplānie griezumī, kas krāsoti ar toluidīnzilo. Pēc tam 60 nm ultraplānie griezumī tika pagatavoti ar ultramikrotoma (LKB Ultratome V) palīdzību, novietoti uz vara sietiņiem un dubultkontrastēti ar 2 % uranilacetāta šķīdumu 70 % spirta šķīdumā 10 minūtes. Vairogdziedzera audu šūnas tika analizētas ×3000–×30000 palielinājumā. Preparātu attēli tika uzņemti ar JEM 1011 JEOL (Japāna) caurstarajošo elektronu mikroskopu.

1.2. Otrais pētījums. Asociācijas izpēte starp IL-17 un patogēno Th17 šūnu veicinošajiem citokīniem pacientiem ar AIVS, analizējot IL-17, IL-23 un IL-1β imūnepsesiju vairogdziedzera audos

Pētījums ir aprakstīts Tatjanas Zaķes, Sandras Skujas, Ievas Kaleres, Ilzes Konrādes un Valērijas Gromas manuskriptā *Upregulated tissue expression of T helper (Th) 17 pathogenic interleukin (IL)-23 and IL-1β in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease*. Endocrine Journal. 2019, 66(5): 423–430. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0396. PMID: 30814438.

1.2.1. Pacientu raksturojums

Šajā pētījumā tika iekļauti 29 pieaugušie pacienti, kuriem diagnosticēta AIVS (21 HT gadījums un 8 GS gadījumi), kuriem no 2014. gada janvāra līdz 2016. gada decembrim tika veikta tireoīdektomija Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā, Latvijā. Kontroles grupā tika iekļauti 18 vecumam un dzimumam atbilstošie pacienti ar koloīdu strumu un normālu vairogdziedzera hormonu un vairogdziedzera autoantivielu līmeni. AIVS un kontroles grupas pacientu vidējais vecums bija attiecīgi 49,52 gadi (diapazons 28–68 gadi; 27 sievietes) un 51,78 gadi (diapazons 33–72 gadi; 16 sievietes).

1.2.2. Rutīnas histopatoloģija un imūnhistoķīmija

47 parafīnā ieguldīti vairogdziedzera audu bloki no 47 pacientiem kopā ar histopatoloģijas atzinumiem tika iegūti no Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas centra. Diagnoze tika apstiprināta, analizējot ar hematoksilīnu un eozīnu krāsotos pārskata preparātus.

No parafīna blokiem pagatavoti audu griezumi tika deparafinizēti, tika bloķēta endogēnās peroksidāzes aktivitāte ar 0,1 % H₂O₂ saturošu metilspirta šķīdumu un veikta karstuma inducēta antigēnu apstrāde 10 mmol/l citrāta bufera šķīdumā, pH 6,0. Pēc tam audu paraugi uz nakti inkubēti 4 °C temperatūrā ar sekojošām primārajām antivielām: poliklonālā truša anti-IL-17A (Biorbyt, Kembridža, AK 1:300); poliklonālā truša anti-IL-23 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santakrusa, CA, ASV, 1:100) un poliklonālā truša anti-IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:50) antiwiela. Imūnhistoķīmijas reakciju rezultāti tika vizualizēti ar HRP HiDef *Polymer Detection*TM sistēmu (CellMarque, Rocklin, CA, ASV) un 3,3'-diaminobenzidīna tetrahidrochlorīdu (DAB + hromogēns un DAB + substrāta buferis (CellMarque, Rocklin, CA, ASV)). Pēc tam audu paraugi tika krāsoti ar hematoksilīnu, skaloti, dehidratēti un pārklāti ar ieslēģšanas vidi. Kā negatīvā kontrole tika izmantoti griezumi, kuros primārā antiwiela tika aizstāta ar bufera šķīdumu.

1.2.3. Imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu novērtēšana

Par imūnpozitīvām tika uzskatītas šūnas, kuru citoplazma uzrādīja brūnus reakcijas galaproduktus. Katras antiwielas imūnpozitivitāte tika izteikta puskvantitatīvā veidā un klasificēta pēc skalas – negatīva (0), vāja (1), vidēja (2) vai izteikta (3), kur attiecīgi 0–5, 6–25, 26–50 vai > 50 % no redzeslauka aizņēma imūnpozitīvās vairogdziedzera folikulārās šūnas.

1.2.4. Imūnfluorescences metode

Vairogdziedzera audu paraugi, kas iegūti no 5 HT pacientiem tireoīdektomijas laikā, tika fiksēti aldehīdā un tālāk sagatavoti imūnfluorescences reakcijai un konfokālajai mikroskopijai. IL-1 β , IL-17A un IL-23 antigēnu imūnfluorescentā iezīme tika veikta, izmantojot kazas izcelsmes anti-peles IgG-FITC: sc-2010 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, 1:300) kā sekundāro antivielu; paraugi tika krāsoti ar 4',6-diamidino-2-fenilindolu (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, AK, 1: 3000) un pēc tam ieguldīti *Prolong Gold* ar DAPI (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, AK). Digitālās fotogrāfijas tika uzņemtas, izmantojot konfokālo mikroskopu *Eclipse* Ti-E (Nikon, Tokija, Japāna).

1.2.5. Statistiskās metodes

Imūnhistoķīmisko reakciju rezultāti atspoguļoti kā mediāna un starpkvartīļu amplitūda. Tika izmantotas neparametriskās statistiskās metodes – Manna–Vitnija tests, lai novērtētu atšķirības starp divām neatkarīgām grupām, savukārt Spīrmena rangu korelācijas tests tika izmantots korelāciju analīzei. Rezultātus uzskatīja par statistiski ticamiem, ja būtiskuma līmeņa (p) vērtība bija $< 0,05$. Datu statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot IBM SPSS programmatūru, versija 23.

1.2.6. Imūnelektronmikroskopija

Precīzai IL-17, IL-23 un IL-1 β antigēnu lokalizācijas izpētei šūnu līmenī tika lietota imūnelektronmikroskopijas metode. Vairogdziedzera audu paraugi, kas iegūti tireoīdektomijas laikā no 5 HT pacientiem, tika fiksēti 1,5 % glutaraldehīdā un 4 % paraformaldehīdā, tālāk attiecīgi apstrādāti un ieguldīti epoksīda sveķu maisījumā. 60 nm ultraplānie griezumī tika pagatavoti ar

ultramikrotoma (LKB Ultratome V) palīdzību un novietoti uz niķeļa sietiņiem, tika ievietoti 0,01 M citrāta bufera šķīdumā sildīšanas kamerā (15 minūtes, 98 °C). Pēc tam tika veikta griezumu inkubēšana, izmantojot šādas primārās antivielas: poliklonālās truša izcelsmes anti-IL-17A (Biorbyt, Kembridža, AK 1: 300); poliklonālās truša izcelsmes anti-IL-23 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santakrusa, CA, ASV, 1: 100) un poliklonālās truša izcelsmes anti-IL-1β (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:50) antivielas (12 stundas 4 °C). Attiecīgo antigēnu iezīme ar 10 nm zelta daļiņām tika veikta, izmantojot kazas izcelsmes anti-truša IgG, konjugātu (1:100; Polysciences Europe GmbH, Vācija). Visbeidzot, paraugi tika kontrastēti ar 2 % uranilacetātu un attēli uzņemti ar JEM 1011 JEOL (Japāna) TEM ×15000–×50000 palielinājumā.

1.3. Trešais pētījums. Ar Th17 saistīto citokīnu plazmas līmeņa un selēna statusa noteikšana pacientiem ar AIVS

Pētījums aprakstīts Tatjanas Zaķes, Ievas Kaleres, Sabīnes Upmales-Engeles, Šimona Svirska, Gitas Gersones, Andreja Šķestera, Valērijas Gromas un Ilzes Konrādes manuskriptā *Plasma levels of Th17-associated cytokines and selenium status in autoimmune thyroid diseases. Immunity, Inflammation and Disease*, 2021;1–12. doi.org/10.1002/iid3.433.

1.3.1. Pacientu raksturojums

Šajā prospektīvajā pētījumā, kas norisinājās Rīgas Austrumu universitātes slimnīcas Endokrinoloģijas nodaļā laika posmā no 2020. gada janvāra līdz 2020. gada novembrim, tika iekļauti 11 pieaugušie hipertiroīdie pacienti ar pirmreizēji diagnosticētu, iepriekš neārstētu GS un 41 pacients ar iepriekš neārstētu, pirmreizēji diagnosticētu HT. Trīsdesmit trīs no 41 HT pacienta bija eitiroīdi (vidējais TSH – 1,90 (1,00–2,62) μIU/mL), un 8 no 41 pacienta bija viegla subklīniska hipotireoze (vidējais TSH – 5,90 (5,41–7,35) μIU/mL).

Vidējais pacientu vecums HT grupā bija 36 (27–50,5) gadi, GS grupā 41 (29–62) gads un kontroles grupā 30 (27–42,25) gadi ($p = 0,139$).

Kontroles grupā tika iekļauti 26 veseli vecumam un dzimumam atbilstoši indivīdi bez autoimūnām slimībām un ar normālu vairogdziedzera funkciju, kuriem bija negatīvas anti-tireoīdperoksidāzes (TPO), anti-tireoglobulīna (Tg), antinukleārās antivielas (ANA) un anti-audu transglutamināzes IgA (tTG-IgA) autoantivielas.

Izslēgšanas kritēriji pētāmajā un kontroles grupā: (1) grūtniecība; (2) ļaundabīgs audzējs, aktīva infekcija, hroniska iekaisuma vai cita autoimūna slimība; (3) selēnu saturošu uztura bagātinātāju lietošana; (4) veģetārs vai vegānisks diētas veids; (5) vairogdziedzera un imūno funkciju ietekmējošo medikamentu lietošana (amiodarons, kortikosteroīdi, nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi, antidepresanti vai pretkrampju līdzekļi); un (6) nozīmīgi nieru vai aknu darbības traucējumi.

1.3.2. Asins paraugu ņemšana

Agri no rīta tukšā dūšā (pirms tam nav ēsts vismaz 12 stundas) tika ievākti perifēro asiņu paraugi no visiem 78 pacientiem un veseliem indivīdiem. Pēc tam paraugi 10 minūtes tika centrifugēti ar ātrumu 1500 apgriezieni/minūtē un līdz analīžu veikšanai tika uzglabāti ledusskapī -80°C temperatūrā. Visi venozo asiņu paraugi no pacientiem ar hipertireozi vai hipotireozi tika ievākti pirms terapijas uzsākšanas ar metimazolu vai levotiroksīnu.

1.3.3. Vairogdziedzera funkcijas un antivielu testi

Brīvā tiroksīna (FT4), brīvā trijodtironīna (FT3) un TSH, kā arī anti-TPO un anti-Tg autoantivielu līmenis asins serumā tika noteikts ar ķīmijluminiscences imūnmetodi (Siemens, Malverna, PA, ASV), izmantojot Advia Centaur XP (Siemens) analizatoru. Analīžu references intervāli bija sekojoši: FT4,

0,7–1,48 ng/dL; FT3, 0,2–0,44 ng/dL; un TSH, 0,35–4,94 μ U/mL; anti-TPO, 0–5,61 SV/mL; anti-Tg, 0–40 U/mL. Anti-TSHR, ANA un tTG-IgA autoantivielu līmenis tika noteikts ar ELISA (Pharmacia Diagnostics Freiburg, Vācija) saskaņā ar ražotāja instrukcijām (references intervāls: anti-TSHR, 0–1,58 SV/L; ANA, references intervāls ir “negatīvs”; tTG-IgA, 0–10,0 U/mL).

1.3.4. Citokīnu noteikšana

Šajā pētījumā analizētie citokīnu modeļi ietvēra šādas grupas: ar Th17 saistītie citokīni (IL-17a un IL-22), Th17 veicinošie citokīni (IL-23 un IL-6) un ar Treg saistītie citokīni (IL-10). EDTA plazmas imunoloģiskie marķieri tika noteikti ar xMAP tehnoloģiju (Magpix sistēma; Luminex Corporation, ASV). Visas reakcijas tika veiktas saskaņā ar ražotāja instrukcijām (Cat#: HTH17MAG-14K; Kit Lot#: 3323752; Milliplex). Citokīnu noteikšanas apakšējā robeža bija sekojoša: IL-17a, 0,009 pg/mL; IL-22, 0,021 ng/mL; IL-23, 0,098 ng/mL; IL-6, 1,7 pg/mL; un IL-10, 0,3 pg/mL.

1.3.5. Selēna statusa noteikšana

Selēna koncentrācija plazmā tika noteikta fluorometriski, izmantojot fluorescences spektrofotometru *Cary Eclipse* (Varian, Inc., Nīderlande) (Alfthan, 1984). Seronorm™ Mikroelementu kontroles programmas ietvaros tika veikta Starplaboratoriju kvalitātes kontrole, izmantojot divus standartus – selēna AAS šķīdumu (Aldrich, ASV, Cat# 24, 792-8) un Seronorm TE Serum level I (Sero AS, Cat #201 405, Norvēģija). Ārējās kvalitātes novērtēšanas pakalpojumus sniedza *Labquality Oy* (Somija). Selēna noteikšanas apakšējā robeža bija 4 μ g/L.

1.3.6. Statistiskās metodes

Datu normālsadalījums tika pārbaudīts ar D'Agostino un Pīrsona, Andersona–Dārlinga un Šapiro–Vilka normalitātes testiem. Variāciju homogenitāte tika pārbaudīta, izmantojot Brauna–Forsaita un Bārtleta testus. Tā kā datu izlases izkļiede vairumā gadījumu neatbilda normālsadalījumam, dati tika analizēti ar neparametrisko Kraskela–Volisa H testu, sekojoši kā pēcanalīze (*post-hoc*) tika izmantota Bendžamina–Krīgera–Jekutieli divpakāpju procedūra un rezultāti atspoguļoti kā mediānas un starpkvartīļu diapazons. Atkarībā no datu sadalījuma tika veikta gan parametriskā Pīrsona analīze, gan neparametriskā Spīrmena korelāciju analīze pētāmo parametru sakarību noteikšanai. P vērtība $< 0,05$ tika uzskatīta par statistiski nozīmīgu visiem lietotajiem statistikas testiem. Visi grafiskie attēli un statistiskās analīzes veiktas, izmantojot GraphPad Prism 9.0 MacOS programmatūru (GraphPad Software, Sandjago, CA, ASV).

1.4. Ceturtais pētījums. AIVS imunoloģiskie mehānismi: tradicionālās Th1/Th2 paradigmas maiņa

Neskatoties uz ievērojamo progresu AIVS patoģenēzes izpētē pēdējā desmitgadē, precīzi imunoloģiskie mehānismi, kas ir atbildīgi par slimību attīstību, nav pilnībā izzināti. Ceturtais pētījums, kas izstrādāts kā pārskata raksts, apraksta AIVS etioloģiju un patoģenēzi un apkopo jaunākos datus par Th17 un Treg limfocītu lomu vairogdziedzera autoimunitātē. Turklāt dominējošo vides faktoru, kas ierosina vairogdziedzera autoimūnās reakcijas, nozīmi un mehānismi ir apskatīti pārskata rakstā (4. publikācija) un izklāstīti promocijas darba literatūras apskatā.

2. Rezultāti

2.1. Pirmais pētījums. Vairogdziedzera folikulu integritātes izpēte, analizējot Tj – ZO-1 un kļaudīna-1 proteīnu imūnekspressiju un korelējot iegūtos datus ar IL-17 un CD68 ekspresiju pacientiem ar AIVS

2.1.1. AIVS rutīnas histopatoloģiskais raksturojums

Analizējot vairogdziedzera audu griezumus gaismas mikroskopā pacientiem ar AIVS, stromā tika novērota difūzi izplatīta no vieglas līdz izteiktas pakāpes iekaisuma šūnu – limfocītu, makrofāgu – un plazmas šūnu infiltrācija. Tika konstatēti arī intraepiteliālie limfocīti. HT pacientiem visbiežāk tika novērota difūza un izteikta iekaisuma šūnu infiltrācija (n = 7; 39 %), limfātisko folikulu veidošanās (n = 6; 33 %) vai retāk vieglas pakāpes iekaisums bez limfātisko folikulu veidošanās (n = 5; 28 %). Limfoplazmocitāra infiltrācija interfolikulārā zonā, atdalot un deformējot vairogdziedzera folikulus, kā arī starpfolikulu fibroze un kolagēno šķiedru izgulsnēšanās tika konstatēta atsevišķiem HT pacientiem. Savukārt citiem HT pacientiem novērota plaša vairogdziedzera parenhīmas destrukcija ar atsevišķiem reziduālajiem folikuliem. Visos audu preparātos tika atrastas Hertle (*Hurthle*) šūnas – lielas folikulāras šūnas ar graudainu eozinofilu citoplazmu.

Pacientiem ar GS vairogdziedzera audi bija veidoti no dažāda izmēra hiperplastiskiem folikuliem ar samazinātu koloīda daudzumu un ar augstu cilindrisku sieniņas hiperplastisku epitēliju. Stromā tika novēroti atsevišķi iekaisuma šūnu infiltrāti.

2.1.2. Imūnhistoķīmiski noteikto antigēnu ekspresijas analīze

Rezultāti, kas raksturo analizēto antigēnu imūnhistoķīmisko ekspresiju pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu, ir apkopoti 2.1. tabulā.

**Analizēto antigēnu imūnhistoķīmiskās ekspresijas rezultāti pacientiem
ar AIVS un koloīdu strumu**

	IL-17A mediāna (IQR)	ZO-1 mediāna (IQR)	Klaudīns-1 mediāna (IQR)	CD68 mediāna (IQR)
Hašimoto tireoidīts	2,4 (1,8; 2,8)	0,5 (0,5; 1)	1,5 (1; 2,2)	23,5 (8,9; 38,3)
Greivsa slimība	1,4 (1; 2,4)	2 (1,5; 2)	1,2 (1; 1,4)	10,8 (5,4; 13,2)
Koloīda struma	0,8 (0,6; 1)	2 (1,5; 2,5)	1,6 (1,2; 2,0)	5,6 (3,1; 8,7)

* Dati atspoguļoti kā mediāna un starpkvartiļu diapazons. Saīsinājumi: IL, interleikīns; ZO, *zonula occludens*; IQR, starpkvartiļu amplitūda.

HT pacientiem IL-17A ekspresija tika novērota gan iekaisuma limfocitārajos infiltrātos, gan vairogdziedzerā folikulārājās šūnās un apstiprināta ar imūnhistoķīmijas un imūnfluorescences metodēm (sk. 2.1. attēlu).

2.1. attēls. IL-17A imūnpozitivitāte vairogdziedzerā folikulu atliekās un limfātiskajos folikulos, kā arī dažās iekaisuma šūnās pacientam ar HT, ×200. Konfokālā mikroskopija, IL-17A pozitīvu tireocītu un limfocītu reprezentatīvie attēli augšējā labajā stūrī: zaļā krāsa atspoguļo IL-17A specifisko krāsojumu, zilā krāsa – šūnu kodolus, ×1000

Jāatzīmē, ka vairogdziedzerā epitēlija šūnām, kuras atradās tuvu limfocītiem vai kuras ielencā iekaisuma šūnas, bija raksturīga ļoti izteikta IL-17A imūnpozitivitāte. Turklāt šie IL-17A pozitīvie vairogdziedzerā folikuli uzrādīja atrofiskas izmaiņas ar epitēlija šūnu destrukciju un kodolu

polimorfismu. Augstākais IL-17A ekspresijas līmenis folikulu epitēlija šūnās tika novērots HT pacientiem; 11 no 18 audu paraugiem novērotā ekspresija variēja no vidējas (2) līdz izteiktai (3).

Turpretī vairogdziedzera audos, kas tika iegūti no pacientiem ar koloīdu strumu un GS, galvenokārt tika novērota vāja vai gandrīz negatīva IL-17A ekspresija. Tikai vienā GS audu paraugā un vienā koloidālā kākšļa paraugā IL-17A imūnpozitivitātes rādītāji bija attiecīgi ≥ 3 un ≥ 2 .

HT un GS pacientiem IL-17A ekspresijas līmenis bija statistiski ticami augstāks, salīdzinot ar pacientiem ar koloīdu strumu (attiecīgi $p < 0,001$; $p = 0,007$) (sk. 2.2. attēlu).

2.2. attēls. **Imūnhistoķīmisko rezultātu salīdzinājums starp pacientiem ar HT, GS un koloīdu strumu**

* Stabiņu diagramma atspoguļo IL-17A ekspresijas līmeņus vairogdziedzera audu paraugos pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu. Salīdzinājums tika veikts, izmantojot Manna–Vitnija U testu. Dati atspoguļoti kā mediāna (starpkvartīļu amplitūda);

* $p < 0,05$.

Analizējot Tj olbaltumvielu, konkrēti, klādīna-1 klātbūtni un lokalizāciju, lietojot imūnhistoķīmiju, tas uzrādīja apļveida formas un membranozu ekspresiju vairogdziedzera epitēlija šūnās (sk. 2.3. attēlu).

**2.3. attēls. Mērena apļveida membranoza kladīna-1 ekspresija
vairogdziedzera audu paraugā pacientam ar GS, ×400**

Klaudīna-1 ekspresija bija ļoti atšķirīga un variēja no gandrīz imūnnegatīvas (0) 1/3 no HT gadījumiem ($n = 6$; 33 %) līdz izteiktai ekspresijai (3) citos HT gadījumos ($n = 5$; 28 %). Starp pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu netika konstatētas statistiski nozīmīgas kladīna-1 ekspresijas līmeņa atšķirības (sk. 2.4. attēlu). Tomēr kladīna-1 pozitīvo vairogdziedzera folikulu skaits HT pacientiem bija statistiski ticami lielāks nekā pacientiem ar koloīdu strumu ($p = 0,03$).

Pārsvarā negatīva un ļoti vāja vai pārtraukta ZO-1 ekspresija tika novērota audu paraugos no HT pacientiem. Desmit HT gadījumos (56 %) ZO-1 ekspresija tika novērtēta kā negatīva vai ≤ 1 , savukārt GS grupā tikai viens paraugs (14 %) uzrādīja tik zemu ekspresijas skalas rādītāju.

2.4. attēls. **Imūnhistoķīmisko rezultātu salīdzinājums starp pacientiem ar HT, GS un koloīdu strumu**

* Stabiņu diagramma atspoguļo klaudīna-1 ekspresijas līmeņus vairogdziedzera audu paraugos pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu. Salīdzinājums tika veikts, izmantojot Manna–Vitnija U testu. Dati atspoguļoti kā mediāna (starpkvartīļu amplitūda).

Statistiski ticams ZO-1 ekspresijas līmeņa samazinājums folikulārajās epitēlijā šūnās tika konstatēts HT pacientu paraugos, salīdzinot ar pacientiem ar koloīdu strumu (sk. 2.5. attēlu) vai GS ($p < 0,001$ abās grupās, sk. 2.6. attēlu). ZO-1 imūnpozitivitāte statistiski nozīmīgi neatšķīrās šīm divām pēdējām pacientu grupām ($p = 0,47$).

Visos vairogdziedzera audu paraugos tika konstatēta gan ekstrapolikulāra, gan intrafolikulāra CD68 pozitīvo makrofāgu lokalizācija. Makrofāgi bija neregulāras formas ar vakuolizētu citoplazmu, tie bija organizēti grupās (sk. 2.7. attēlu) vai individuāli izkļiedēti folikulu dobumos.

Lielas intrafolikulāru CD68 pozitīvo šūnu grupas tika konstatētas tikai HT pacientiem, savukārt retas CD68 pozitīvas šūnas tika atrastas paraugos, kas iegūti no pacientiem ar GS un koloīdu strumu. Folikulu dobumos kopā ar makrofāgiem tika novēroti arī limfocīti. Folikuli ar makrofāgiem dobumā visbiežāk bija bez koloīda vai ar tā atliekām.

2.5. attēls. Vāja līdz mērena un mērena ZO-1 ekspresija attiecīgi tireocītos un asinsvadu endotēlijā vairogdziedzera audu paraugā pacientam ar koloīdu strumu, $\times 250$

2.6. attēls. Imūnhistoķīmisko rezultātu salīdzinājums starp pacientiem ar HT, GS un koloīdu strumu

* Stabiņu diagramma atspoguļo ZO-1 ekspresijas līmeņus vairogdziedzera audu paraugos pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu. Salīdzinājums tika veikts, izmantojot Manna–Vitnija U testu. Dati atspoguļoti kā mediāna (starpkvartīļu amplitūda);

* $p < 0,05$.

HT pacientiem tika konstatēts statistiski ticami lielāks vairogdziedzera folikulu skaits ar CD68 pozitīvām šūnām, salīdzinot pacientus ar GS vai koloīdu strumu ($p = 0,05$ un $p = 0,001$, attiecīgi) (sk. 2.8. attēlu). CD68 imūnpozitivitāte,

kas novērota GS pacientiem, bija augstāka salīdzinājumā ar koloīdu strumu, taču atšķirība nebija statistiski nozīmīga ($p = 0,06$).

2.7. attēls. **Vairogdziedzera folikula dobums ar CD68 pozitīvu makrofāgu sakopojumu pacientam ar HT, $\times 400$**

2.8. attēls. **Imūnhistoķīmisko rezultātu salīdzinājums starp pacientiem ar HT, GS un koloīdu strumu**

* Stabiņu diagramma atspoguļo CD68 pozitīvu vairogdziedzera folikulu skaitu pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu. Salīdzinājums tika veikts, izmantojot Manna–Vitnija U testu. Dati atspoguļoti kā mediāna (starpkvartīļu amplitūda);
* $p < 0,05$.

2.1.3. Starpšūnu savienojumu ultrastrukturālā izpēte vairogdziedzera epitēlijā

Nozīmīgas starpšūnu savienojumu, it īpaši Tj, izmaiņas tika novērotas HT pacientu audu paraugos, izmeklējot tos elektronmikroskopiski. Turklāt ultrastrukturālās izpētes dati sakrīta ar imūnhistoķīmiski atklātajām izmaiņām. Tika novērotas tireocītu bojājuma pazīmes. Šūnu plazmatiskās membrānas integritāte bija bojāta; starpšūnu savienojumi, tostarp Tj, kas bija lokalizēti sānu virsmas apikālajā daļā, bija izmainīti. Tireocītos tika novērota gan kondensēta, gan elektronoptiski gaiša citoplazma (sk. 2.9. attēlu). Bieži novērojām citoplazmas organelļu skaita samazināšanos un tauku ieslēgumu parādīšanos. Limfocitāra infiltrācija pakāpeniski izraisījusi tireocītu bojāeju, par ko liecina ultrastrukturālie dati.

2.9. attēls. Tireocītu bojājuma elektronmikrogrāfija

* Tipiskas šūnu apoptozes pazīmes: (A) – ir redzama hromatīna kondensācija un marginācija vairogdziedzera epitēlija šūnu kodolos; (B) – elektronoptiski gaiša šūnu citoplazma ar samazinātu organoīdu daudzumu. Mēroga joslas: A – 1 mkm; B – 500 nm.

2.1.4. Korelācijas analīze starp IL-17A un intrafolikulāro CD68 vai Tj ekspresiju AIVS pacientiem

Pacientiem ar HT IL-17A ekspresija vairogdziedzera epitēlija šūnās pozitīvi korelēja ar intrafolikulāro CD68 makrofāgu imūnpozitivitāti ($r = 0,631$, $p = 0,005$). Analizējot savstarpējas asociācijas starp IL-17A un Tj proteīnu ekspresiju, HT pacientiem netika konstatētas statistiski nozīmīgas korelācijas starp IL-17A un ZO-1 vai kludīnu-1 ($r = 0,267$, $p = 0,28$ un $r = 0,194$, $p = 0,44$, attiecīgi). GS pacientiem netika konstatētas statistiski ticamas korelācijas starp IL-17A un Tj – ZO-1 vai kludīnu-1 ($r = -0,199$, $p = 0,67$ un $r = 0,734$, $p = 0,06$, attiecīgi) vai CD68 ($r = 0,631$, $p = 0,13$).

2.2. Otrais pētījums. Asociācijas izpēte starp IL-17 un patogēno Th17 šūnu veicinošajiem citokīniem pacientiem ar AIVS, analizējot IL-17, IL-23 un IL-1 β imūnexpresiju vairogdziedzera audos

2.2.1. Ar Th17 saistīto interleikīnu imūnhistokīmiskā analīze pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu

Pacientiem ar HT IL-17 imūnpozitivitāte tika novērota vairogdziedzera epitēlija šūnās un iekaisuma infiltrātos (sk. 2.10. attēlu). IL-17 imūnexpresijas līmenis visbiežāk tika novērtēts kā mērens (13/21 paraugs uzrādīja ekspresiju ≥ 2). Turklāt pacientiem ar HT IL-17 pozitīvos vairogdziedzera folikulos bieži tika konstatēts folikulāro šūnu integritātes zudums un destrukcija.

Atšķirībā no HT galvenokārt vāja un negatīva IL-17 ekspresija tika novērota attiecīgi pacientiem ar GS un koloīdu strumu. IL-17 ekspresijas līmenis tireocītos bija statistiski ticami augstāks HT un GS pacientiem nekā pacientiem ar koloīdu strumu ($p < 0,001$ abās grupās) (sk. 2.11. attēlu). Turklāt, salīdzinot ar GS, HT pacientiem bija augstāka IL-17 imūnreaktivitāte vairogdziedzera audos, taču atšķirība nebija statistiski nozīmīga ($p = 0,069$).

2.10. attēls. **IL-17 pozitīvi vairogdziedzerā folikuli un iekaisuma šūnas vairogdziedzerā audu paraugā pacientam ar HT, ×400**

2.11. attēls. **Imūnhistoķīmisko rezultātu salīdzinājums starp pacientiem ar HT, GS un koloīdu strumu**

* Stabiņu diagramma atspoguļo IL-17 ekspresijas līmeņus vairogdziedzerā audu paraugos pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu. Salīdzinājums tika veikts, izmantojot Manna–Vitnija U testu. Dati atspoguļoti kā mediāna (starpkvartīļu amplitūda);

* $p < 0,05$.

IL-23 (sk. 2.12. un 2.13. attēlu) un IL-1 β (sk. 2.14. attēlu) ekspresija tika apstiprināta HT raksturīgajos iekaisuma infiltrātos un vairogdziedzerā šūnās, izmantojot imūnhistoķīmijas un imūnfluorescences metodes.

2.12. attēls. Vairogdziedzera folikulu destrukcija. Limfocīti, kas infiltrējušies apkārtējos saistaudos; Hertle (*Hurthle*) šūnas. IL-23 pozitīvas šūnas ir redzamas iekaisuma infiltrātā pacientam ar HT, $\times 400$

2.13. attēls. IL-23 imūnpozitivitāte vairogdziedzera folikulu epitēlija šūnās pacientam ar HT, $\times 200$. Konfokālā mikroskopija, reprezentatīvs IL-23 pozitīvo tireocītu attēls apakšējā kreisajā stūrī: zaļā krāsa atspoguļo IL-23 specifisko krāsojumu, zilā krāsa – šūnu kodolus, $\times 1000$

Atšķirībā no HT audos, kas iegūti no GS pacientiem, tika novērota pārsvarā vāja IL-23 (sk. 2.15. attēlu) un IL-1 β (sk. 2.16. attēlu) ekspresija vairogdziedzera šūnās.

Tāpat kā GS grupā, lielākajai daļai pacientu ar koloīdu strumu bija raksturīga vāja vai negatīva IL-23 un IL-1 β ekspresija vairogdziedzera audu paraugos.

2.14. attēls. Izteikta IL-1 β citoplazmas ekspresija HT pacienta tireocītos, $\times 400$. Konfokālā mikroskopija, reprezentatīvs IL-1 β pozitīvo tirocītu attēls apakšējā kreisajā stūrī: IL-1 β specifisks krāsojums (zaļā krāsa), šūnu kodoli (zilā krāsa), $\times 1000$

2.15. attēls. Vāja IL-23 imūnreaktivitāte GS pacienta vairogdziedzera audu paraugā, $\times 250$

2.16. attēls. **Vāja IL-1β imūnpozitivitāte GS pacienta tircocitos, ×400**

HT pacientiem IL-23 ekspresija bija statistiski ticami augstāka, salīdzinot gan ar GS, gan ar koloidālā kākšļa pacientiem ($p = 0,043$ un $p < 0,001$, attiecīgi) (sk. 2.17. attēlu). Statistiski ticama IL-23 ekspresijas līmeņa atšķirība starp pacientiem ar GS un koloīdu strumu netika atrasta ($p = 0,324$).

2.17. attēls. **Imūnhistoķīmisko rezultātu salīdzinājums starp pacientiem ar HT, GS un koloīdu strumu**

* Stabiņu diagramma atspoguļo IL-23 ekspresijas līmeņus vairogdziedzera audu paraugos pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu. Salīdzinājums tika veikts, izmantojot Manna–Vitnija U testu. Dati atspoguļoti kā mediāna (starpkvartīļu amplitūda);

* $p < 0,05$.

Visaugstākā IL-1 β imūnpozitivitāte tika novērota HT pacientu audu paraugos – IL-1 β imūnpozitivitāte bija statistiski ticami augstāka nekā koloidālā kākšļa un GS pacientiem ($p < 0,001$, abās grupās) (sk. 2.18. attēlu). Līdzīgi IL-23 ekspresijai IL-1 β ekspresijas līmenis statistiski ticami neatšķīrās pacientiem ar GS un koloīdu strumu ($p = 0,144$).

2.18. attēls. **Imūnhistoķīmisko rezultātu salīdzinājums starp pacientiem ar HT, GS un koloīdu strumu**

* Stabiņu diagramma atspoguļo IL-1 β ekspresijas līmeņus vairogdziedzera audu paraugos pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu. Salīdzinājums tika veikts, izmantojot Manna–Vitnija U testu. Dati atspoguļoti kā mediāna (starpkvartīļu amplitūda);
* $p < 0,05$.

IL-23 un IL-1 β ekspresija tika novērota ne tikai tireocītos un vairogdziedzera audus infitrējošajos limfocītos, bet arī S100 pozitīvajās dendrītiskajās šūnās. Iekaisuma infitrātos tika konstatētas neregulāras formas S100 pozitīvās šūnas, kas uzrādīja brūnās krāsas granulāru citoplazmatisku ekspresiju.

Puskvantitatīvie dati, kas raksturo šajā pētījumā analizēto interleikīnu imūn ekspresiju, ir apkopoti 2.2. tabulā.

Analizēto interleikīnu imūnhistoķīmiskās ekspresijas rezultāti pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu

	IL-17 mediāna (IQR)	IL-23 mediāna (IQR)	IL-1β mediāna (IQR)
Hašimoto tireoidīts	2,2 (1,6; 2,8)	0,29 (0,14; 0,57)	0,71 (0,57; 1,42)
Greivsa slimība	1,3 (1; 2,3)	0,14 (0,04; 0,25)	0,22 (0,04; 0,29)
Koloīda struma	0,6 (0,6; 1)	0,14 (0,0; 0,14)	0,07 (0,0; 0,14)

* Dati atspoguļoti kā mediāna un starpkvartiļu amplitūda. Saīsinājumi: IL, interleikīns; IQR, starpkvartiļu diapazons.

2.2.2. Ar Th17 saistīto interleikīnu imūnelektronmikroskopija HT pacientiem

Precīza IL-23, IL-1β un IL-17 intracelulāra lokalizācija tika noteikta, izmantojot imūnelektronmikroskopijas metodi un attiecīgo antigēnu iezīmi ar 10 nm zelta daļiņām. Ultrastrukturāli zelta daļiņu klātbūtne tika apstiprināta vairogdziedzera folikulāro šūnu citoplazmā HT pacientiem (sk. 2.19. attēlu). Zelta daļiņas tika atrastas kodola apvalka, uzbriedušu mitohondriju un graudainā endoplazmatiskā tīkla tuvumā.

2.2.3. Korelācijas analīze starp IL-17 un Th17 veicinošajiem citokīniem IL-23 un IL-1β

Statistiski ticama vidēja pozitīva korelācija starp IL-17 un abu IL-23 un IL-1β ekspresiju tika konstatēta HT pacientiem ($r = 0,574$, $p = 0,007$ un $r = 0,461$, $p = 0,036$, attiecīgi). HT pacientiem tika atrasta arī vidēja pozitīva korelācija starp IL-23 un IL-1β imūnpozitivitāti ($r = 0,545$, $p = 0,011$).

GS grupā IL-17 ekspresija uzrādīja ļoti ciešu pozitīvu korelāciju ar IL-1β imūnpozitivitāti ($r = 0,817$, $p = 0,013$). Tomēr šajā pacientu grupā netika atrasta statistiski nozīmīga korelācija starp IL-17 un IL-23 ($r = 0,680$, $p = 0,063$) vai IL-23 un IL-1β imūnreaktivitāti ($r = 0,662$, $p = 0,074$).

2.19. attēls. TEM. Ar zelta daļiņām iezīmēti IL-17, $\times 60000$ (A), IL-23, $\times 50000$ (B) un IL-1 β , $\times 40000$ (C) tika konstatēti vairogdziedzera folikulāro šūnu citoplazmā HT pacientam

* Bultiņas norāda uz zelta nanodaļiņām. Mēroga joslas:
A un B – 100 nm; C – 200 nm.

2.3. Trešais pētījums. Ar Th17 saistīto citokīnu plazmas līmeņa un selēna statusa noteikšana pacientiem ar AIVS

2.3.1. Pētījuma dalībnieku demogrāfiskais un bioķīmiskais raksturojums

Dalībnieku demogrāfiskais un bioķīmiskais raksturojums ir attēlots 2.3. tabulā. HT pacienti tika stratificēti divās grupās pēc seruma TSH līmeņa: eitiroīdi ($0,354 \leq \text{TSH} \leq 4,94 \mu\text{IU/mL}$; $n = 33$) un hipotireoīdi ($4,94 < \text{TSH} < 10 \mu\text{IU/mL}$; $n = 8$) pacienti.

2.3. tabula

Dalībnieku demogrāfiskais un bioķīmiskais raksturojums

	HT pacienti (n = 41)	GS pacienti (n = 11)	Kontroles grupa (n = 26)	P
Dzimums (sieviete/vīrietis)	39/2	9/2	21/5	0,152
Vecums (gadi)	36 (27–50,5)	41 (29–62)	30 (27–42,25)	0,139
TSH ($\mu\text{IU/mL}$)	2,16 (1,42–3,77)	0,0003 (0,0000–0,0004)	1,11 (0,96–1,67)	< 0,001
FT4 (ng/dL)	0,91 (0,85–0,98)	1,97 (1,76–2,55)	0,94 (0,91–1,07)	< 0,001
FT3 (ng/dL)	0,32 (0,29–0,35)	1,21 (1,04–2,47)	0,32 (0,30–0,35)	< 0,001
Anti-TPO (IU/mL)	202,99 (75,80–421,40)	121,04 (3,74–929,28)	0,46 (0,25–0,78)	< 0,001
Anti-Tg (U/mL)	0,00 (0,00–51,02)	5,96 (0,00–43,46)	< 20	–
Anti-TSHR (IU/L)	< 1,58	9,18 (4,05–19,68)	< 1,58	–

* Dati tiek atspoguļoti kā mediāna (starpkvartiļu amplitūda). Kraskela–Volisa tests tika izmantots, lai aprēķinātu p vērtību un salīdzinātu trīs grupu datus, kas neatbilda normālsadalījumam. Saīsinājumi: FT3, brīvais trijodtironīns; FT4, brīvais tiroksīns; GS, Greivsa slimība; HT, Hašimoto tireoidīts; Tg, tireoglobulīns; TPO, tireoīdperoksidāze; TSH, vairogdziedzeri stimulējošais hormons; TSHR, vairogdziedzeri stimulējošā hormona receptors. $P < 0,05$: statistiski nozīmīgs.

2.3.2. Th17 citokīnu plazmas līmenis AIVS un kontroles grupas pacientiem

Statistiski ticamas IL-17a, IL-22, IL-23, IL-6 vai IL-10 plazmas līmeņa atšķirības starp pacientiem ar HT, pacientiem ar GS un kontroles grupu (visiem $p > 0,05$) netika konstatētas (sk. 2.20. attēlu). Interleikīnu līmeņi statistiski ticami neatšķīrās arī pacientiem ar eitireozi vai hipotireozi (visiem $p > 0,05$).

2.20. attēls. **Plazmas IL-17a, IL-22, IL-23, IL-6 un IL-10 līmeņu salīdzinājums pacientiem ar HET (n = 33), HHT (n = 8) vai GS (n = 11) un veseliem indivīdiem (n = 26)**

* Punktu diagrammas atspoguļo kvantitatīvos datus par IL-17a (A), IL-22 (B), IL-23 (C), IL-6 (D) un IL-10 (D) līmeni plazmā. (A-E) Katrs punkts apzīmē vienu datu punktu. Apzīmējumi: ns, statistiski nenozīmīgs; GD, Greivsa slimība; HET, Hašimoto tireoidīts, eitireoze; HHT, Hašimoto tireoidīts, hipotireoze.

Citokīnu līmeņi plazmā ir attēloti 2.4. tabulā.

Plazmas interleikīnu līmenis pētījuma grupās

	HT pacienti (n = 41)		GS pacienti (n = 11)	Kontroles grupa (n = 26)	p
	Eitireoīdi HT (n = 33)	Hipotireoīdi HT (n = 8)			
IL-17a (pg/mL)	14,83 (10,37–19,75)		13,53 (10,33–16,72)	16,43 (9,14–19,75)	0,906
	12,95 (10,18–19,18)	15,99 (12,38–39,37)			0,606
IL-22 (ng/mL)	0,08 (0,00–0,47)		0,13 (0,00–0,25)	0,25 (0,00–0,54)	0,393
	0,026 (0,000–0,351)	0,421 (0,054–1,138)			0,180
IL-23 (ng/mL)	2,45 (1,35–4,49)		2,31 (1,70–3,36)	3,23 (1,86–4,64)	0,653
	2,37 (1,30–3,76)	3,42 (2,06–8,18)			0,408
IL-6 (pg/mL)	5,88 (0,00–36,24)		6,92 (0,00–24,90)	11,61 (0,00–59,50)	0,682
	1,90 (0,00–14,93)	68,62 (8,67–148,25)			0,059
IL-10 (pg/mL)	9,70 (6,35–15,21)		9,50 (6,54–11,11)	11,62 (6,70–17,04)	0,658
	9,70 (5,96–13,47)	9,83 (7,03–26,90)			0,585

* Dati tiek atspoguļoti kā mediāna (starpkvartiļu amplitūda). Kraskela–Volisa tests tika izmantots, lai aprēķinātu p vērtību un salīdzinātu trīs grupu datus, kas neatbilda normālsadalījumam. Saīsinājumi: GS, Greivsa slimība; HT, Hašimoto tireoidīts. $p < 0,05$: statistiski nozīmīgs.

Pacientiem ar HT plazmas IL-17a līmenis statistiski ticami korelēja ar IL-22, IL-23, IL-6, kā arī ar IL-10 līmeni (sk. 2.21A attēlu). IL-22 līmenis uzrādīja pozitīvu korelāciju ar IL-6, IL-23 un IL-10 līmeni plazmā (sk. 2.21B attēlu).

Līdzīgi HT grupai GS pacientiem tika konstatētas statistiski ticamas pozitīvas korelācijas starp IL-17a un IL-22, IL-23 un IL-10 līmeni; tomēr IL-17a nekorelēja ar IL-6 (sk. 2.22A attēlu). Arī pacientiem ar GS tika novērotas pozitīvas korelācijas starp IL-22 un IL-23, IL-6, kā arī IL-10 līmeni (sk. 2.22B attēlu).

A

B

2.21. attēls. Izkliedes diagrammas, kas demonstrē sakarības starp IL- 17a (A) vai IL-22 (B) un pētītajiem biomarķieriem HT pacientu grupā

A

B

2.22. attēls. Izkliedes diagrammas, kas demonstrē sakarības starp IL-17a (A) vai IL-22 (B) un pētītajiem biomarķieriem GS pacientu grupā

Līdzīgas pozitīvas korelācijas starp dažādiem plazmas interleikīniem tika konstatētas gan kontroles grupā, gan eitiroīdiem HT un hipotiroīdiem HT pacientiem. Variāciju-kovariāciju matricas kopā ar Spīrmena rangu korelācijas koeficientiem un p vērtībām, kas atspoguļo sakarību līmeni starp pētītajiem citokīniem pacientu grupās, ir apkopotas 2.23. attēlā.

2.23. attēls. Variāciju-kovariāciju matricas ar Spīrmena rangu korelācijas koeficientiem (vērtības mazajos kvadrātos) atspoguļo asociāciju līmeni (*strenght*) starp pētītajiem citokīniem pacientu grupās

* Apzīmējumi: GD, Greivsa slimība; HET, Hašimoto tiroidīts, eitireoze;
HHT, Hašimoto tiroidīts, hipotireoze. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$;
, $p < 0,001$; *, $p < 0,0001$.

2.24. attēls. ft3 (A) vai ft4 (B) sakarības ar pētītajiem biomarkieriem GS pacientu grupā

* Saīsinājumi: ft3, brīvais trijodtironīns; ft4, brīvais tiroksīns; GS, Greivsa slimība; TSHR, vairogdziedzeri stimulējošā hormona receptors. ns, statistiski nenozīmīgs;

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

HT pacientiem statistiski nozīmīgas korelācijas starp interleikīniem un vairogdziedzeru autoantivielām, TSH, FT3 vai FT4 līmeni netika atrastas (visiem $p > 0,05$). Turpretī pirmreizēji diagnosticētiem GS pacientiem FT3 līmenis pozitīvi korelē ar IL-17, IL-23 un IL-10 (sk. 2.24A attēlu), savukārt FT4 pozitīvi korelē ar IL-17 un IL-10 līmeni (sk. 2.24B attēlu). Turklāt anti-TSHR autoantivielu titri neuzrādīja korelācijas ar interleikīnu līmeni GS grupā (visiem $p > 0,05$).

2.3.3. Plazmas selēna līmenis AIVS un kontroles grupas pacientiem

Vidējais selēna līmenis plazmā bija 85,03 (60,09–116,60) $\mu\text{g/L}$ HT pacientiem, 71,33 (59,05–104,42) $\mu\text{g/L}$ GS pacientiem un 80,35 (67,15–113,67) $\mu\text{g/L}$ kontroles grupas dalībniekiem (sk. 2.5. tabulu).

2.5. tabula

Plazmas selēna līmenis pētījuma grupās

	HT pacienti (n = 40)		GS pacienti (n = 11)	Kontroles grupa (n = 21)	p
	Eitireoīdi HT (n = 32)	Hipotireoīdi HT (n = 8)			
Se ($\mu\text{g/L}$)	85,03 (60,09–116,60)		71,33 (59,05–104,42)	80,35 (67,15–113,67)	0,763
	85,03 (60,09–116,56)	94,78 (47,46–117,02)			0,886

* Dati tiek atspoguļoti kā mediāna (starpkvartīļu amplitūda).

Plazmas selēna līmeņa sadalījums pacientu grupās ir norādīts 2.25A attēlā. Starp AIVS un kontroles grupas pacientiem netika atklātas statistiski nozīmīgas plazmas selēna līmeņa atšķirības (sk. 2.25B attēlu).

Interesanti, ka pacientiem ar HT tika konstatēta negatīva korelācija starp selēna līmeni plazmā un anti-TPO autoantivielu titru ($r = -0,376$, $p = 0,02$) (sk. 2.26. attēlu). Turklāt HT pacientiem ar augstāku anti-TPO līmeni ($\geq 400 \text{ SV/ml}$) tika novērots statistiski ticami zemāks selēna līmenis nekā

pacienti ar zemāku autoantivielu titru (< 400 SV/ml) 72,75 (52,10–88,43) vs 89,04 (65,53–117,51) $\mu\text{g/L}$, attiecīgi; $p = 0,05$).

2.25. attēls. Histogrammas atspoguļo plazmas selēna (A) biežuma sadalījumu un selēna līmeņa (B) salīdzinājumu pacientu grupās

* (B) Katrs punkts apzīmē vienu datu punktu. GD, Greivsa slimība; HET, Hašimoto tireoidīts, eitireoze; HHT, Hašimoto tireoidīts, hipotireoze; ns, statistiski nenozīmīgs.

2.26. attēls. Izkliedes diagramma, kas demonstrē pozitīvu korelāciju starp selēna un anti-TPO autoantivielu līmeni HT pacientiem

* Selēna līmenis plazmā < 80 µg/L tika noteikts kā zems, 80–95 µg/L kā normāls un līmenis > 95 µg/L kā optimāls. Saīsinājumi: HT, Hašimoto tireoidīts; TPO, tireoīdperoksidāze.

Analizējot sakarības starp selēna un citokīnu līmeņiem visās pētījuma grupās, statistiski nozīmīgas korelācijas starp selēna līmeni un IL-17a, IL-22, IL-23, IL-6 un IL-10 līmeni plazmā netika atrastas (visas $p > 0,05$). Plazmas selēna līmenis nekorelēja arī ar citiem parametriem, kā vecums, anti-Tg un anti-TSHR titri, TSH, FT3 un FT4 (visi $p > 0,05$).

3. Diskusija

3.1. IL-17 un blīvo šūnu savienojumu proteīnu ekspresijas heterogenitāte vairogdziedzera audos pacientiem ar AIVS (pirmais pētījums)

Zināms, ka citokīnu regulēto vairogdziedzera epitēlija Tj integritātes bojājumu uzskata par nozīmīgu vairāku autoimūno slimību ierosināšanā un/vai attīstībā. Tomēr IL-17 loma Tj integritātes nodrošināšanā pacientiem ar AIVS līdz šim nav pētīta. Šī pētījuma mērķis bija izpētīt vairogdziedzera folikulu integritāti, analizējot šūnu Tj – ZO-1 un kladīna-1 proteīnu imūnekspressiju un, korelējot iegūtos datus ar IL-17A un CD68 ekspresiju, salīdzināt atradni kontroles grupas un AIVS pacientiem.

Lai gan ar Th1 saistītā autoimūnā atbilde jau sen tiek uzskatīta par dominējošo HT attīstībā, jaunāko pētījumu rezultāti liecina arī par iespējamu Th17 šūnu līdzdalību AIVS, īpaši HT, patoģenēzē. Šajā pētījumā HT un GS pacientu vairogdziedzera audu paraugos tika konstatēts augstāks IL-17A imūnekspressijas līmenis nekā pacientiem ar koloīdu strumu. Līdzīgi *Li et al.* (2013) savā pētījumā konstatēja paaugstinātu vairogdziedzera audus infiltrējošo Th17 šūnu līmeni, kā arī palielinātu IL-17 līmeni serumā HT pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu un pacientiem ar citām vairogdziedzera patoloģijām. Papildus tam pacientiem ar HT tika novērota pozitīva korelācija starp IL-17 imūnekspressiju un fibrozi vairogdziedzera stromā (*Li et al.*, 2013). Citi autori ir noteikuši paaugstinātu IL-22 un IL-17 līmeni vairogdziedzera audos un perifērajās asinīs, kā arī augstāku Th17 šūnu diferenciāciju veicinošo citokīnu, tādu kā IL-6, IL-15 un IL-23, līmeni HT pacientiem (*Figuerola-Vega et al.*, 2010). Savukārt *Konca Degertekin et al.* (2016) pētījumā ir atrasts, ka HT pacientiem ar normālu vairogdziedzera funkciju ir statistiski ticami augstāks cirkulējošo IL-17 un IL-23 līmenis, salīdzinot ar hipotireoīdiem HT pacientiem, kas liek domāt, ka hipotireozei var būt inhibējoša ietekme uz citokīnu produkciju.

Kopumā šīs atradnes sniedz pirmo informāciju par Th17 šūnu iesaisti HT patogēnēzē.

Th17 limfocītu un to izdalīto citokīnu līdzdalība GS patogēnēzē līdz šim ir mazāk izziņāta. *Peng et al.* (2013) pētījumā noteikts ievērojami paaugstināts gan Th22 un Th17 šūnu līmenis perifērajās asinīs, gan IL-22 un IL-17 koncentrācijas līmenis plazmā, kas novērots Ķīnas pacientiem ar pirmreizēji diagnosticētu GS, salīdzinot ar kontroles grupas pacientiem. Mūsu pētījumā ir konstatētas audu IL-17A imūnekspresijas atšķirības starp pacientiem ar GS un koloīdu strumu. Tomēr asociācija starp Th17 limfocītiem un GS attīstību ir mazāka nekā HT gadījumā.

Šajā pētījumā IL-17A pozitīvās šūnas tika konstatētas vairogdziedzera audu iekaisuma šūnu infiltrātos, turklāt ļoti izteikta IL-17 ekspresija tika novērota vairogdziedzera folikulārajās šūnās, kuras ielencā limfocīti. Ir noteikti vairāki šūnu veidi, tostarp epitēlija šūnas, miocīti, Paneta šūnas, neitrofile leikocīti, tuklās šūnas, dabiskās galējās šūnas, kā arī Yδ un $\alpha\beta$ T limfocīti, kas ekspresē IL-17 no IL-17A līdz IL-17F (*Singh et al.*, 2014). Literatūrā tiek aprakstīts, ka vairogdziedzera folikulārās šūnas, kas ekspresē MHC II klases molekulas un kas ir lokalizētas kopā ar B7.1 antigēniem un mijiedarbojas ar CD4⁺ T šūnām, var funkcionēt kā antigēnu prezentējošās šūnas, ierosinot un/vai uzturot autoimūno procesu (*Weetman*, 1994). Līdz ar to pašiem tireocītiem var būt daudz lielāka nozīme AIVS patogēnēzē, nekā sākotnēji tika uzskatīts.

Šajā pētījumā tika konstatēta gan ekstrapolikulāra, gan intrafolikulāra CD68 pozitīvo makrofāgu lokalizācija. Visvairāk intrafolikulāro CD68 pozitīvo šūnu tika novērots pacientiem ar HT, tādējādi norādot uz makrofāgu transportu uz vairogdziedzera folikula dobumu, kad folikulārā epitēlija barjera jau ir bojāta. Turklāt cieša pozitīva korelācija starp CD68 un IL-17A imūnpozitivitāti tika konstatēta HT pacientiem. Lai gan mēs neatradām statistiski nozīmīgu korelāciju starp IL-17 un Tj proteīnu ekspresiju, makrofāgu klātbūtni folikulu dobumā var

interpretēt kā vairogdziedzera epitēlija integritātes bojājumu. Ir aprakstīts, ka anti-TPO autoantivielas var izraisīt kultivēto vairogdziedzera šūnu bojāeju, saistoties ar TPO uz apikālās šūnu membrānas un iesaistot no antivielām atkarīgu šūnu citotoksicitāti (ADCC) un/vai komplementatkarīgu citotoksicitāti (Rebuffat et al., 2008). Jautājums par to, kādas efektoršūnas ir spējīgas izraisīt šādu citotoksisku iedarbību un kāda ir anti-TPO antivielu patogēna loma ADCC mehānismā un tireocītu destrūkcijā, joprojām ir atklāta. Anti-TPO antivielu funkcionālā aktivitāte tiek izvērtēta pēc to piesaistes efektoršūnām, izmantojot Fc-gamma receptorus. Monocīti tiek uzskatīti par potenciālām efektoršūnām anti-TPO antivielu saistītajā ADCC mehānismā (Rebuffat et al., 2013). Tomēr intrafolikulāro makrofāgu lomas izpētei HT patoģenēzē ir nepieciešami turpmāki pētījumi.

Ir zināms, ka TPO ekspresējas uz tireocīta plazmolemmas apikālā domēna, kas ir vērsts gan pret folikula dobumu, gan šūnas citoplazmu (Nilsson et al., 1998). Taču TPO prezentācijas mehānisms imūnajai sistēmai, tāpat kā jautājums, kādā veidā antigēnus prezentējošās šūnas nonāk kontaktā ar autoantigēniem, lokalizētiem uz tireocītu plazmatiskās membrānas apikālās daļas vai folikula dobumā, paliek neskaidrs. Tāpēc ir pamats domāt, ka anti-TPO antivielas neuzsāk vairogdziedzera audu bojājumus, tomēr var veicināt to destrūkciju, kad folikulārā epitēlija barjera jau ir bojāta. Viena no hipotēzēm balstās uz vairogdziedzera epitēlija integritātes bojājumu, kas, mainoties šūnu savienojuma proteīnu ekspresijas profilam un lokalizācijai, ļauj imūnkompetentām šūnām virzīties uz folikula dobumu (Rebuffat et al., 2013). Otrkārt, epiteliālās barjeras slēgējūglu bojājuma gadījumā TPO, pateicoties laterālai difūzijai, varētu tikt pārnesta uz tireocītu bazolaterālo virsmu, kur to spēj atpazīt intersticiālie makrofāgi un dendrītiskās šūnas (Kuliawat, Lisanti and Arvan, 1995).

Šajā pētījumā mēs izvērtējām Tj – ZO-1 un kladīna-1 proteīnu imūnreaktivitāti vairogdziedzera audos, kas iegūti no pacientiem ar AIVS un koloīdu strumu. Statistiski ticams ZO-1 ekspresijas līmeņa samazinājums, kas konstatēts HT pacientu audu paraugos, salīdzinot ar pacientiem ar koloīdu strumu vai GS, atspoguļo vairogdziedzera epitēlija integritātes traucējumus HT gadījumā. Pretēji – HT grupā tika novērots statistiski ticami lielāks kladīna-1 pozitīvo vairogdziedzera folikulu skaits, salīdzinot ar koloīdu strumu. Kladīna-1 un ZO-1 ekspresijas atšķirības, kas novērotas HT pacientiem, ir saskaņā ar rezultātiem, kas iegūti *Rebuffat et al.* (2013) pētījumā, kurā aprakstīta samazināta ZO-1, bet paaugstināta kladīna-1 ekspresija HT pacientu vairogdziedzera audos. Mēs domājam, ka paaugstināta kladīna-1 imūnreaktivitāte HT grupā var tikt interpretēta kā iespējams šūnu izdzīvošanas un/vai kompensators mehānisms.

Zināms, ka vairāki parakrīnie faktori, ieskaitot citokīnus un augšanas faktorus, ietekmē Tj un regulē epitēlija barjeras funkcijas (Steed, Balda and Matter, 2010). Ir noteikts, ka IL-17A samazina okludīna ekspresiju, tādējādi izraisot hematoencefāliskās un sēklinieku barjeras traucējumus (Huppert et al., 2010; Pérez et al., 2014). Tomēr nav zināms, vai paaugstināts IL-17 līmenis HT gadījumā ietekmē Tj integritāti, tādējādi mainot vairogdziedzera folikulāro šūnu barjeras funkcijas. Ievērojami negatīva IL-1 α ietekme uz Tj un epitēlija šūnu integritātes zudumu ir novērota kultivētajās vairogdziedzera šūnās (Nilsson et al., 1998).

Pētījumi rāda, ka Tj proteīnu – ZO-1, kladīna-1 un JAM-A organizāciju un lokalizāciju vairogdziedzera audos pacientiem ar AIVS izmaina proiekaisuma citokīns IL-1 β , tā ietekmējot vairogdziedzera epitēlija integritāti (Rebuffat et al., 2013). *Zhang* un kolēģi (2016) ir pētījuši dažādus signālceļus siekalu dziedzeru šūnu kultūrā, kas apvieno IL-17 un Tj, un konstatējuši, ka IL-17 varētu tieši modulēt Tj olbaltumvielu ekspresiju un izplatību caur NF- κ B signālceļa

aktivēšanu. Mūsu pētījumā tika analizēta saistība starp IL-17 un Tj izmaiņām, taču statistiski nozīmīga asociācija netika atrasta.

Interpretējot pētījuma rezultātus, jāņem vērā daži ierobežojumi: relatīvi nelielais vairogdziedzera audu paraugu skaits, imūnēkspresijas puskvantitatīvais novērtējums un datu trūkums par Treg citokīnu ekspresiju, jo mūsdienās abi – Th17 un Treg – šūnu tipi būtu jāpēta kā nozīmīgi faktori AIVS patoģenēzē. Šis pētījums bija retrospektīvs un balstījās uz arhivēto audu parafīna bloku analīzi. Nepieciešami turpmāki prospektīvi pētījumi ar lielāku dalībnieku un metožu skaitu, kas varētu izvērtēt cēloņsakarības starp IL-17 un Tj traucējumiem.

3.2. Th17 patoģēno IL-23 un IL-1β ekspresijas pieaugums HT, bet ne GS pacientu vairogdziedzera audos (otrais pētījums)

Kaut gan pēdējā desmitgadē Th17 šūnas bieži tiek saistītas ar autoimūno iekaisumu, kas izraisa noteiktas slimības, izpratne par to, ka Th17 šūnas ir heteroģēnas un noteiktos apstākļos uzrāda atšķirīgus Th17 šūnu fenotipus, patoģēnus un nepatoģēnus, ir radusies tikai nesen (Stadhouders, Lubberts and Hendriks, 2018). Šie patoģēnie limfocīti var sekretēt gan standarta, gan patoģenās molekulas, piemēram, IL-17A/F, IL-21, IL-22, IL-26, IFN- γ , TNF- α un GM-CSF, sekmējot autoimūnā iekaisuma attīstību. IL-17 veicina neitrofilo leukocītu rekrutēšanu un aktivēšanu. Iedarbojoties uz imūnajām un neimūnajām šūnām, piemēram, fibroblastiem, epitēlija un endotēlija šūnām, IL-17 sekmē citokīnu, hemokīnu un iekaisuma mediatoru sekrēciju (Park et al., 2005). Iepriekš veiktie pētījumi ir snieguši apstiprinošus pierādījumus par Th17 šūnu un IL-17 iesaisti HT patoģenēzē (Li et al., 2013; Esfahanian et al., 2017), savukārt to loma GS attīstībā joprojām nav skaidra. *Bossowski* un kolēģu (2012) pētījumā konstatēts paaugstināts CD4+IL-17+ limfocītu skaits perifērajās asinīs bērniem ar neārstētu HT, bet ne GS, savukārt *Qin* un kolēģu (2012) pētījumā GS pacientiem netika atrastas IL-17 līmeņa atšķirības perifērajās asinīs un

vairogdziedzera audos, salīdzinot ar kontroles grupu. Mūsu pētījumā IL-17 ekspresija tireocītos gan HT, gan GS pacientiem bija statistiski ticami augstāka nekā pacientiem ar koloīdu strumu, norādot uz Th17 iespējamo lomu AIVS patoģenēzē.

Turpmākie pētījumi par faktoriem, kas nepieciešami Th17 šūnu diferenciācijai, ir izraisījuši lielu interesi. Ir noteikts, ka CD4⁺ T limfocīti, kas ekspresē refīnskābes receptoram radniecīgā bāreņreceptora (ROR)γt transkripcijas faktoru, ko kodē *Rorc* gēns, ir saistīti ar autoimūno slimību attīstību (Capone and Volpe, 2020). Turklāt nesen ir pierādīts, ka RORC ir galvenā loma Th17 fenotipu virzībā un Th22 šūnu polarizācijas modulēšanā (Peng et al., 2021). Šajā kontekstā faktoru atpazīšana, kas regulē *Il17a* vai *Rorc* transkripciju, mijiedarbojoties ar RORγt vai saistoties to DNS specifiskajos reģionos, var sniegt skaidrību šajā jautājumā.

IL-23, ko sintezē makrofāgi un dendrītiskās šūnas, ir vēl viens svarīgs ar Th17 saistīts citokīns, kas regulē Th17 šūnu diferenciāciju, nomācot IL-10 sekrēciju un veicinot IL-22 un GM-CSF produkciju; tas pieder IL-12 ģimenei, kas ir iesaistīta dažādu autoimūno un iekaisuma slimību izcelsmē (Codarri et al., 2011). Konstatēts, ka IL-23 ir arī nozīmīgs Th17 limfocītu izdzīvošanas faktors (Langowski et al., 2006). Turklāt Th0 šūnas IL-23, IL-1β un IL-6 klātbūtnē var ģenerēt augsti patoģēnos Th17 limfocītus (Chung et al., 2009; Ghoreschi et al., 2010).

Interesanti, ka *Ruggeri et al.* (2014a) pētījumā ir aprakstīts paaugstināts seruma IL-23 līmenis neārstētiem un eitiroīdiem HT pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, tā atspoguļojot agrīnus HT raksturīgos patoģenētiskos notikumus. Turklāt HT pacientiem ir novērots paaugstināts IL-37 līmenis, kas nodrošina aizsarglomu pret oksidatīvo stresu un iekaisumu, kavējot ar Th1/Th17 saistītās atbildes efektus (Ruggeri et al., 2018). Nesen veiktajā pētījumā augstāka IL-23 ekspresija vairogdziedzera audos ir konstatēta pacientiem ar HT, salīdzinot

ar kontroles grupu (Zheng et al., 2018). Turklāt šī pētījuma autori aprakstījuši reaktīvo skābekļa radikāļu uzkrāšanos un autofāģijas inhibīciju tireocītos, ko izraisījis paaugstināts IL-23 līmenis (Zheng et al., 2018). Šajā pētījumā mēs konstatējām, ka IL-23 imūnēkspresijas līmenis HT pacientu vairogdziedzera folikulārajās šūnās bija ievērojami augstāks nekā pacientiem ar GS un koloīdu strumu, kas savukārt var vēl vairāk palielināt patogēno Th17 limfocītu ģenerēšanu un IL-17 produkciju. Turklāt HT pacientiem tika novērota pozitīva korelācija starp IL-17 un IL-23, kā arī IL-17 un IL-1β imūnēkspresiju, norādot uz Th17 šūnu nozīmi HT attīstībā.

Jāatzīmē, ka IL-23 ekspresija GS pacientu vairogdziedzera audos līdz šim nav pētīta. Tikai divos pētījumos tika analizēts IL-23 līmenis asins serumā GS pacientiem (Figuerola-Vega et al., 2010; Jia et al., 2015). *Jia et al.* (2015) pētījumā tika novērots paaugstināts IL-23 līmenis asins serumā, savukārt *Figuerola-Vega et al.* (2010) pētījumā nozīmīgas IL-23 līmeņa atšķirības GS pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, netika konstatētas. Šajā pētījumā atšķirība starp IL-23 imūnpozitivitāti vairogdziedzera audos pacientiem ar GS un koloīdu strumu netika atrasta, tādēļ jādomā, ka patogēno Th17 veicinošie citokīni varētu būt mazāk iesaistīti GS patoģenēzē. Tomēr ir nepieciešami turpmāki pētījumi ar lielāku vairogdziedzera audu paraugu skaitu un atbilstošām metodēm šo rezultātu apstiprināšanai. Lai arī GS pacientiem netika novērota nozīmīga saistība starp IL-17 un IL-23 ekspresiju, IL-23 uzrādīja tendenci uz pozitīvu korelāciju ar IL-17 imūnpozitivitāti ($p = 0,063$). Pētījuma rezultāti, kā arī secinājumi par Th17 šūnu lomu GS patoģenēzē jāinterpretē piesardzīgi, jo rekrutēto un analizēto GS pacientu skaits ir relatīvi neliels.

Interesanti, ka *Zheng et al.* (2018) savā pētījumā aprakstījis IL-17 un RORγt mRNS ekspresijas pieaugumu ar IL-23 kultivētajās šūnās, kas tika iegūtas no GS pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupas šūnām un GS pacientu šūnu kultūrām bez IL-23 stimulācijas. Līdzīgi rezultāti ir ziņoti par pacientiem ar

eitireoīdu GS, norādot uz vairogdziedzera hormonu līmeņa neatkarīgu efektu (Zheng, Ye and Liu, 2013). Taču paaugstināts IL-23 līmenis vairogdziedzera audos pacientiem ar GD literatūrā nav aprakstīts. Daži pētījumi ir vērsti uz IL-23 receptora lomas izpēti šiem pacientiem, jo ir zināms, ka IL-23 receptoru gēnu polimorfismi ir cieši saistīti ar GS, īpaši ar Greivsa orbitopātijas (GO) attīstību (Huber et al., 2008).

IL-1 β , ko galvenokārt ražo makrofāgi un dendrītiskās šūnas, piemīt dažādas imūnmodulējošas un proiekaisuma funkcijas. AIVS gadījumā IL-1 β vājinā vairogdziedzera folikulāro šūnu barjeras funkciju, veicinot IL-6 produkciju un izmainot Tj ekspresiju (Rebuffat et al., 2013). Ir pierādīts, ka IL-1 β inducē Fas ekspresiju, sekmējot arī vairogdziedzera šūnu nāvi (Paolieri et al., 1999). Šajā pētījumā mēs noteicām ticami augstāku IL-1 β ekspresijas līmeni vairogdziedzera audos pacientiem ar HT, salīdzinot ar pacientiem, kam ir koloīdu struma un GS. Līdzīgi IL-23 gadījumam IL-1 β ekspresija būtiski neatšķīrās, salīdzinot pacientus ar GS un koloīdu strumu; tomēr GS grupā IL-17 ekspresija bija statistiski ticami augstāka. Ņemot vērā, ka IL-17 ir abu šūnu fenotipu sekretēta Th17 molekula un ka IL-23/IL-1 β stimulē patogēnā Th17 fenotipa diferenciāciju (Stadhoudersab, Lubberts and Hendriks, 2018), mūsu pētījuma rezultāti netieši liecina par mazāku patogēno Th17 šūnu lomu GS attīstībā, salīdzinot ar HT. Šajā kontekstā iegūtie dati saskan ar *Vitales-Noyola et al.* (2017) pētījuma rezultātiem, kur tika novērots Th17 patogēno šūnu pieaugums GS pacientu perifērajās asinīs (īpaši tiem, kuriem ir GO), bet ne HT. Tomēr, analizējot patogēno šūnu absolūto skaitu, būtiskas atšķirības starp HT, GS un kontroles grupu netika konstatētas.

Līdzīgi pirmajam pētījumam arī otrajam pētījumam ir daži metodiskie ierobežojumi. Pirmkārt, tika pētīti tikai arhivēti vairogdziedzera audu bloki. Otrkārt, ierobežotās pieejamības dēļ tika analizēts relatīvi neliels GS pacientu vairogdziedzera audu paraugu skaits. Tāpēc GS grupas analīžu rezultāti

jāinterpretē piesardzīgi. Ir nepieciešami turpmāki prospektīvi pētījumi, papildus iekļaujot arī pacientus ar biežāku GS komplikāciju – GO, lai pētītu Th17 lomu šajā pacientu grupā. Lai arī mūsu mērķis nebija analizēt citu interleikīnu ekspresijas līmeni, būtu svarīgi turpmāk pētīt dažādu Th17/Treg fenotipu un ar to saistīto citokīnu profilu nozīmi vairogdziedzera autoimunitātē.

3.3. Ar Th17 saistīto citokīnu līmenis plazmā un selēna statuss AIVS pacientiem (trešais pētījums)

Citokīni kopā ar T šūnu receptoriem, transkripcijas faktoriem un zarnu mikrobiotu ir svarīgi Th17/Treg šūnu līdzsvaru regulējošie faktori. Th17 šūnas ir iesaistītas autoimunitātes attīstībā, savukārt Treg šūnas, kas ražo IL-10, IL-35 un TGF- β , nodrošina paštoleranci un aizsargā pret vairogdziedzera autoimunitāti. Turklāt IL-10 ir noteicošais pretiekaisuma citokīns, kas inhibē ar Th17 šūnu saistīto iekaisumu (Chaudhry et al., 2011). Pašreizējie pierādījumi liecina, ka Th17 šūnu līnija ir plastiska un heterogēna (González-Amaro and Marazuela, 2016). IL-23 ir vēl viens proiekaisuma citokīns, kas sekmē vairogdziedzera autoimunitātes attīstību. IL-23, ko ražo antigēnu prezentējošās šūnas – makrofāgi un dendrītiskās šūnas, ir izšķiroša nozīme patogēno Th17 limfocītu diferenciācijā (Lee et al., 2017). Turklāt ir konstatēts, ka tas stimulē augsti patogēno Th17 šūnu izdzīvošanu.

Šajā pētījumā mēs neatradām nozīmīgas atšķirības IL-17a vai IL-23 plazmas līmenī starp eitireoīdiem un hipotireoīdiem pacientiem ar HT, GS un kontroles grupu, lai gan abi interleikīni pozitīvi korelēja savā starpā HT un GS grupās. Iztrūkst informācijas par IL-23 un IL-22 līmeni serumā AIVS pacientiem. *Shi et al.* (2010) pētījumā norādīts uz paaugstinātu IL-17 un ar Th17 saistīto transkripcijas faktora ROR γ t mRNS ekspresiju perifēro asiņu mononukleārajās šūnās paralēli ar paaugstinātu plazmas IL-17 un IL-23 līmeni pirmreizēji diagnosticētiem HT pacientiem. *Jia et al.* (2015) pētījumā ir

konstatēts paaugstināts IL-23 līmenis serumā GS pacientiem, turpretī *Figueroa-Vega et al.* (2010) pētījumā nav atrastas būtiskas atšķirības IL-23 līmenī starp GS pacientiem un veseliem cilvēkiem. Iepriekš mēs noteicām paaugstinātu IL-23 ekspresiju tireocītos HT pacientiem, bet atšķirība starp GS un koloīdu strumu netika konstatēta, kas liek domāt, ka IL-23 var būt mazāk iesaistīts GS patoģenēzē (Zake et al., 2019).

Th17 šūnu producēto IL-22 var sekretēt arī cita jaunā Th šūnu apakškopa – CCR⁺IL-17⁺IL-22⁺ (Th22) šūnas. Mums neizdevās atrast IL-22 līmeņa atšķirības plazmā starp trim šajā pētījumā iesaistīto indivīdu grupām. Tomēr *Ruggeri* un līdzautori (2014b) konstatējuši paaugstinātu IL-22 līmeni serumā neārstētiem eitireoīdiem HT pacientiem, salīdzinot ar pacientiem ar nodulāro strumu vai veseliem indivīdiem. Citā pētījumā iepriekš neārstētiem HT pacientiem ar klīnisku vai subklīnisku hipotireozi noteikts paaugstināts IL-17 līmenis serumā, bet atšķirības IL-22 vai IL-23 līmeņos starp HT pacientiem un veseliem indivīdiem nav konstatētas (Esfahanian et al., 2017). *Song et al.* (2014) pētījumā aprakstīts, ka GS pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, perifēro asiņu Th22 šūnu līmenis, seruma IL-22 līmenis, kā arī IL-22 mRNS ekspresija ir statistiski augstāka, liecinot par IL-22 iespējamu iesaisti GS patoģenēzē. Līdzīgi šim pētījumam starp HT pacientiem un kontroles grupu IL-22 atšķirības netika konstatētas. Paaugstināts Th17 un Th22 šūnu līmenis perifērajās asinīs, kā arī paaugstināts IL-17 un IL-22 līmenis plazmā tika novērots Ķīnas pacientiem ar pirmreizēji diagnosticētu GS *Peng et al.* (2013) pētījumā. Turklāt iepriekš minētās šūnas un citokīni uzrādīja pozitīvu korelāciju ar anti-TSHR autoantivielu līmeni plazmā.

Šajā pētījumā tika konstatētas pozitīvas korelācijas starp IL-22, IL-17a, IL-23 un perifēro vairogdziedzera hormonu līmeni – fT3 un fT4 – pirmreizēji diagnosticētiem GS pacientiem. Tomēr korelācija starp interleikīnu un specifisko vairogdziedzera autoantivielu līmeni netika atrasta. Šie rezultāti liecina, ka Th17

citokīniem var būt stimulējoša ietekme uz hipertireozes smagumu neatkarīgi no autoantivielu līmeņa. Līdzīga asociācija HT grupā netika atrasta, jo lielākā daļa rekrutēto HT pacientu bija eitireoīdi. Saistībā ar grūtībām rekrutēt hipertireoīdus GD pacientus, kuri vēl nav uzsākuši specifisku tireostātisko terapiju, pētījumā tika iekļauts tikai neliels GS pacientu skaits. Tādēļ, interpretējot GS grupas analīžu rezultātus, jāņem vērā pētījuma ierobežojumi.

Starp neģenētiskajiem faktoriem, kas saistīti ar vairogdziedzera autoimunitātes patoģenēzi, vissvarīgākie ir palielināts uzņemtā joda daudzums un pazemināts selēna statuss. Daudzi pētījumi pierāda selēna un selenoproteīnu imūnmodulējošo un aizsardzības lomu. Ir aprakstīts, ka selēna deficīts izraisa selenoproteīnu inhibīciju un izmainītu IL-10, IL-12p40 un IFN- γ sekrēciju, kas savukārt rezultējas Th1/Th2 balansa traucējumos, novirzot līdzsvaru Th1 virzienā (Sun et al., 2018). Turklāt Th limfocīti, kas neekspresē GPx1, vērsti uz attīstību Th1 virzienā un vājina Th šūnu diferenciāciju Th17 virzienā (Won et al., 2010). Citā pētījumā selēna papildterapija uzrādīja aizsargājošu iedarbību pret oksidatīvo stresu un peroksīda izraisītajiem šūnu bojājumiem cilvēka vairogdziedzera šūnās un fibroblastos (Ruggeri et al., 2020). Tomēr, lai izprastu saistību starp selēna papildterapiju un imūnatbildes reakciju, nepieciešams iegūt vairāk klīnisko pētījumu datu.

Pētījumos ir analizētas imunoloģiskās izmaiņas HT pacientiem pēc selēna papildterapijas. Tomēr nozīmīgas atšķirības ar Th1 vai Th2 saistīto citokīnu (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 un IL-13) produkcijā pirms un trīs mēnešus pēc 200 μ g nātrija selenīta ordinācijas nav konstatētas (Karanikas et al., 2008). Šajā pētījumā mēs neatradām korelācijas starp selēna un interleikīnu līmeni plazmā pacientu grupās, norādot, ka adekvāta selēna uzņemšana neveicina CD4+ T šūnu diferenciāciju Th1 vai Th2 virzienā un ka Th1/Th2 diferenciāciju galvenokārt nosaka sekretētie citokīni, transkripcijas faktori un citi vides signāli.

Mūsu pētījumā starp AIVS pacientiem un kontroles grupu statistiski nozīmīgas selēna līmeņa atšķirības plazmā netika atrastas. Dāņu pētījumā *Bülow Pedersen et al.* (2013) ir analizēts seruma selēna līmenis pacientiem ar pirmo reizi diagnosticētu AIVS. Autori ir noteikuši statistiski ticami zemāku selēna līmeni pacientiem ar GS nekā kontroles grupā; tomēr selēna līmeņa atšķirības starp HT pacientiem un veselīem indivīdiem nav novērotas. Savukārt citi autori ir konstatējuši zemāku selēna līmeni serumā GS pacientiem ar vidēji smagu vai smagu GO un ar pietiekamu selēna uzņemšanu nekā GS pacientiem bez GO, kas liecina par to, ka selēna deficīts var būt neatkarīgs GO riska faktors (Khong et al., 2014).

Vienotais šķērsgriezuma pētījums ar mērķi novērtēt selēna statusu celirodiem pacientiem ar un bez autoimūnām vairogdziedzera slimībām tika veikts 2014. gadā Austrijā, Grieķijā, Rumānijā un Itālijā (Krassas et al., 2014). Pētījums apstiprināja ciešas pozitīvas korelācijas starp selēna un SELENOP līmeni plazmā, norādot uz neoptimālu selēna statusu šajās Eiropas valstīs. Turklāt pacientiem ar GS un HT tika konstatēts ievērojami zemāks selēna līmenis plazmā nekā pacientiem ar neautoimūnām vairogdziedzera slimībām (attiecīgi $75,1 \pm 27,2$, $84,6 \pm 42,2$ un $95,9 \pm 34,7$ $\mu\text{g/l}$; $p < 0,001$ un $p < 0,05$) norādot, ka selēna papildterapija varētu sniegt ieguvumus vairogdziedzera autoimunitātes gadījumā. *Federige et al.* (2017) pētījumā arī pētīts selēna un SELENOP seruma līmenis AIVS pacientiem. Līdzīgi mūsu pētījumam selēna līmenis neatšķīrās starp HT pacientiem, HT+LT4 pacientiem, GS pacientiem ar vai bez GO un veselīem indivīdiem, lai gan SELENOP līmenis GO un HT pacientiem bija statistiski zemāks nekā kontroles grupā.

Lai atspoguļotu selēna statusu pietiekamību, vairāki autori ir ieteikuši dažādas plazmas vai pilnasiņu selēna robežvērtības (*cut-offs*). GPx3 aktivitāte cilvēka serumā tiek izmantota kā selēna pietiekamības marķieris. Ir pierādīts, ka plazmas selēna līmenis, kas nepieciešams trombocītu GPx aktivitātes

optimizēšanai, ir attiecīgi 100–115 µg/L vai 95 µg/L saskaņā ar Alfthan et al. (1991) vai Thomson et al. (1993) pētījumu rezultātiem, savukārt selēna diapazons plazmā 88–142 µg/L ir asociēts ar maksimālo SELENOP koncentrāciju (Hurst et al., 2013). Selēna koncentrācija, kas ir zemāka par 80 µg/L, liecina par nepietiekamu selēna līmeni (Neve et al., 1991; van Dael and Deelstra, 1993). Izmantojot iepriekš minētās robežvērtības, 35 % pētījumā iesaistīto HT pacientu un 36,4 % GS pacientu selēna līmenis, kas nepieciešams GPx piesātināšanai, bija pietiekams, savukārt 47,5 % HT pacientu un 63,3 % GS pacientu selēna statuss nebija optimāls, bet 47,6 % pacientu kontroles grupā bija selēna deficīts.

Interpretējot iegūtos datus, jāņem vērā daži pētījuma ierobežojumi. Lai gan dažādu ar Th17 saistīto citokīnu vienlaicīga noteikšana sniedza jaunu informāciju par sarežģīto citokīnu modeli, kas raksturo AIVS, relatīvi neliels iesaistīto AIVS pacientu skaits var izraisīt iespējamu statistiskās nozīmības zudumu. Tā kā pētījumā trūkst datu par citu Treg citokīnu līmeni, nepieciešami turpmāki pētījumi par Th17 un Treg šūnām kā svarīgiem AIVS patoģenēzes faktoriem.

Secinājumi

1. Vairogdziedzera autoimunitātes patogēnēze un IL-17/IL-23 ass iesaiste autoimūno slimību attīstībā joprojām nav pilnībā izpētīta. Mūsu pētījumā starp AIVS un kontroles grupas pacientiem statistiski ticamas ar Th17 saistīto citokīnu plazmas līmeņa atšķirības netika konstatētas. Tomēr tika noteikta statistiski nozīmīga pozitīva korelācija starp ar Th17 saistīto citokīnu līmeni plazmā un hipertireozes smaguma pakāpi, kas bija neatkarīga no autoantivielu līmeņa, norādot uz to iespējamo lomu GS patogēnēzē.
2. Analizējot ar Th17 saistīto citokīnu imūnekspresiju vairogdziedzera audos, IL-17 ekspresijas līmenis tireocītos bija nozīmīgi augstāks pacientiem ar HT un GS nekā pacientiem ar koloīdu strumu, vienlaikus korelējot ar IL-23 un IL-1β imūnpozitivitāti HT grupā. Turklāt HT grupā tika novērota paaugstināta IL-23 un IL-1β imūnekspresija, tādējādi norādot, ka patogēno Th17 šūnu diferenciāciju veicinošajiem citokīniem var būt nozīme HT patogēnēzē.
3. Pozitīvās korelācijas, kas tika konstatētas starp ar Th17 saistīto citokīnu koncentrācijām plazmā HT un GS pacientiem, nav pietiekami ciešas, lai norādītu uz šo interleikīnu iespējamo lomu AIVS patogēnēzē; tās galvenokārt atspoguļo to iesaisti Th17 šūnu diferenciācijā. Nepieciešami turpmāki eksperimentāli pētījumi, lai precīzāk izpētītu Th17 šūnu nozīmi AIVS patogēnēzē.
4. Paaugstinātā IL-17A ekspresija, kas tika novērota vairogdziedzera epitēlija šūnās, ir saistīta ar intrafolikulāro CD68 pozitīvo šūnu klātbūtni pacientiem ar HT, norādot, ka skarto tireocītu un antigēnu prezentējošo šūnu loma vairogdziedzera autoimunitātē var būt daudz nozīmīgāka, nekā sākotnēji uzskatīts. HT pacientu vairogdziedzera audos tika novērotas tireocītu slēgējūglu molekulārās pārmaiņas, uzsverot vairogdziedzera folikulu integritātes bojājumu, taču to saistība ar IL-17 netika konstatēta.

5. Lai arī selēna statuss plazmā pirmreizēji diagnosticētiem GS un HT pacientiem Latvijā nav optimāls, starp AIVS pacientiem un kontroles grupu statistiski nozīmīgas atšķirības plazmas selēna līmenī netika noteiktas. Tikai vienai trešdaļai pētījumā iesaistīto HT un GS pacientu bija pietiekams selēna līmenis plazmā glutationala peroksidāzes piesātināšanai, savukārt 47,5 % HT un 63,3 % GS pacientu nebija optimāls selēna līmenis.
6. HT pacientiem selēna līmenis plazmā negatīvi korelēja ar anti-TPO autoantivielu titriem, liecinot par selēna imūnmodulējošo lomu AIVS patoģenēzē. Turklāt HT pacientiem ar augstāku autoantivielu līmeni pret TPO tika novērots zemāks selēna līmenis, kas liek domāt, ka selēna papildterapija šiem pacientiem var sniegt ieguvumus.

Publikācijas

Zinātniskās publikācijas izdevumos, kas iekļauti starptautiskās datubāzēs

1. **Zake, T.**, Kalere, I., Upmale-Engela, S., Svirskis, S., Gersone, G., Skesters, A., Groma, V., Konrade, I. 2021. Plasma levels of Th17-associated cytokines and selenium status in autoimmune thyroid diseases. *Immunity, Inflammation and Disease*. doi: 10.1002/iid3.433. Epub ahead of print. PMID: 33943012.
2. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., Groma, V. 2019. Upregulated tissue expression of Th17 pathogenic IL-23 and IL-1 β in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. *Endocrine Journal*. 66(5): 423–430. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0396. PMID: 30814438.
3. **Zake, T.**, Skuja, S., Lejnicks, A., Groma, V., Konrāde, I. 2019. Immunological mechanisms of autoimmune thyroid diseases: a shift in the traditional Th1/Th2 paradigm. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. 73(2), 67–77. doi: 10.2478/prolas-2019-0012.
4. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., Groma, V. 2018. Heterogeneity of tissue IL-17 and tight junction proteins expression demonstrated in patients with autoimmune thyroid diseases. *Medicine (Baltimore)*. 97(25): e11211. doi:10.1097/MD.00000000000011211. PMID: 29924048.

Zinātniski raksti Latvijā izdotos recenzējamās izdevumos

1. **Zake, T.**, Groma, V., Konrāde, I., Skuja, S. Vairogdziedzera folikulocītu blīvo savienojumu proteīna klauđina-1 imūnēkspresijas atšķirības pacientiem ar Hasimoto tireoidītu un Greivsa slimību. *Zinātniskie raksti: 2015. gada medicīnas nozares pētnieciskā darba publikācijas: Medicīnas bāzes zinātnes.* / Rīgas Stradiņa universitāte. – Rīga: Rīgas Stradiņa universitāte, 2016. – 273.–281. lpp.

Tēzes vai prezentācijas starptautiskās zinātniskās konferencēs

1. **Zake, T.**, Kalere I., Upmale-Engela, S., Gersone, G., Skesters, A., Groma, V., Konrade, I. The pathogenic role of Th17 cell pathway in autoimmune thyroid diseases. *Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences "Knowledge for Use in Practice"*, 24–26 March, 2021: Abstracts. Rīga: RSU, i-xl p., 175 p. (Mutiska prezentācija).
2. Kalere, I., **Zake, T.**, Upmale-Engela, S., Strele, I., Skesters, A., Konrade, I. Plasma selenium status in newly diagnosed Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis patients: case-control study. *Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences "Knowledge for Use in Practice"*, 24–26 March, 2021: Abstracts. Rīga: RSU, i-xl p., 168 p. (Stenda referāts).

3. Kalere, I., **Zake, T.**, Upmale-Engela, S., Cgojeva-Uzulniece, F., Skesters, A., Konrade, I. Analysis of selenium intake score and its affecting factors in young adults. *Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences "Knowledge for Use in Practice"*, 24–26 March, 2021: Abstracts. Rīga: RSU, i-xl p., 158 p. (Stenda referāts).
4. **Zake, T.**, Upmale-Engela, S., Kalere, I., Skesters, A., Konrade, I. Selenium status in Latvian patients with autoimmune thyroid diseases. *The 3rd International Conference "Nutrition and Health"*, Rīga, Latvia, December 9–11, 2020, *Book of Abstracts*. University of Latvia Press, 2020, 92 p. (Stenda referāts).
5. Kalere, I., **Zake, T.**, Upmale-Engela, S., Cgojeva-Uzulniece, F., Skesters, A., Konrade, I. Selenium intake score in thyroid patients. *The 3rd International Conference "Nutrition and Health"*, Rīga, Latvia, December 9–11, 2020, *Book of Abstracts*. University of Latvia Press, 2020, 94 p. (Stenda referāts).
6. **Zake, T.**, Kalere, I., Upmale-Engela, S., Gersone, G., Konrade, I. Plasma levels of Th17 associated cytokines in patients with autoimmune thyroid disease. 22nd European Congress of Endocrinology, Online, September 5–9, 2020. *Endocrine Abstracts (2020) 70 AEP909* DOI: 10.1530/endoabs.70.AEP909. (Stenda referāts).
7. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., Groma, V. Th17 cells and impairment of the thyroid follicle integrity in the pathogenesis of thyroid autoimmunity: Morphological assessment. Rīga Stradiņš University. (2019). *International Conference on Medical and Health Care Sciences Knowledge for Use in Practice* (Rīga, 1–3 April 2019): Abstracts. Rīga: RSU, XLVII p., 580 p. (Mutiska prezentācija).
8. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., Groma, V. Increased tissue expression of Th17-related cytokines in Hashimoto's thyroiditis: A shift in the traditional Th1/Th2 paradigm. *Rīga Stradiņš University. (2019). International Conference on Medical and Health Care Sciences Knowledge for Use in Practice* (Rīga, 1–3 April 2019): Abstracts. Rīga: RSU, XLVII p., 487 p. (Mutiska prezentācija).
9. Kalere, I., Konrade, I., **Zake, T.**, Strele, I. Selenium-rich food consumption in Latvia from 2000 to 2016. *Rīga Stradiņš University. (2019). International Conference on Medical and Health Care Sciences Knowledge for Use in Practice* (Rīga, 1–3 April 2019): Abstracts. Rīga: RSU, XLVII p., 495 p. (Stenda referāts).
10. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., Groma, V. Association between IL-17 and Th17-related cytokine, and tight junction protein immunoexpression in patients with autoimmune thyroid disease. *42nd Annual Meeting of the European Thyroid Association*, Eur Thyroid J 2019;8(suppl 1):1–127 Budapest, Hungary September 7–10, 2019, page 93, (Stenda referāts).
11. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., Groma, V. The increased immunohistochemical expression of IL-23 in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease patients. *19th European Congress of Endocrinology*, Lisbon, Portugal, May 20–23, 2017. *Endocrine Abstracts (2017) 49 GP209* DOI:10.1530/endoabs.49.GP209. (Stenda referāts).

12. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., Groma, V. Comparison of immunohistochemical expression of IL-1 β and IL-23 in autoimmune thyroid disease. *40th Annual Meeting of the European Thyroid Association*, Belgrade, Serbia, September 9–12, 2017. *Eur Thyroid J* 2017;6(suppl 1):78 p. P2-01-59. (Stenda referāts).
13. Konrade, I., **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Groma, V. Relationship between immunexpression of IL17A, CD68 positivity and lymphocyte infiltration degree in Hashimoto's thyroiditis patients. *18th European Congress of Endocrinology*, Munich, Germany, May 28–31, 2016. *Endocrine Abstracts* (2016) 41 GP218 DOI:10.1530/endoabs.41.GP218. (Stenda referāts).
14. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I., Groma, V. Underexpression of ZO-1 in Hashimoto's thyroiditis patients leading to tight junction disruption. *8th Baltic Congress of Endocrinology & 8th ESE Clinical Update*, April 14–15, 2016, Tallinn, Estonia. Abstract book, 23 p. (Stenda referāts).
15. **Zake, T.**, Skuja, S., Konrade, I., Groma, V. Immunexpression of type IV collagen and claudin-1 in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease patients. *3rd EYES MEETING 2015*, 24–26 September, Modena, Italy. Abstract book, 93 p. (Mutiska prezentācija).
16. **Zake, T.**, Skuja, S., Pekarska, K., Groma, V., Konrade, I., Kleina, R. Immunohistochemical expression of claudin-1 in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease patients. *17th European Congress of Endocrinology 2015*: Endocrine Abstracts (2015) 37 EP967 DOI: 10.1530/endoabs.37.EP967. (Stenda referāts).
17. **Zake, T.**, Skuja, S., Konrade, I., Groma, V. Examination of Th17-specific cytokine immunexpression in autoimmune thyroid diseases. *The 8th Baltic Morphology scientific conference*, 12–14 November 2015, Vilnius, Lithuania. Abstract book. – Vilnius: Vilnius University, 2015. – 132 p. (Mutiska prezentācija).
18. Skuja, S., **Zake, T.**, Groma, V., Kleina, R., Cunsakis, E., Sultanova, A., Murovska, M. Immunexpression of Parvovirus B19 VP1/VP2, CD8+ and CD68+ cells in Hashimoto's thyroiditis patients. *17th Annual Meeting of ESCV (European Society for Clinical Virology)* (Sept. 28–Oct. 1, 2014): Book of Abstracts. – Prague, 2014. – 183 p. (Stenda referāts).
19. **Zake, T.**, Groma, V., Skuja, S., Kleina, R. Morphologic peculiarities in the thyroid gland of patients with Hashimoto's thyroiditis. *Baltic Morphology VII Scientific Conference "Morphological sciences in the experimental and clinical medicine"* (Rīga, Latvia, Nov. 7–9, 2013): Abstract Book / Rīga Stradiņš University. – Rīga, 2013. – 65 p. (Stenda referāts).

Tēzes vai prezentācijas vietējas nozīmes zinātniskās konferencēs

1. **Zaķe, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrāde, I., Groma, V. Ar Th17 diferenciāciju saistīta citokīna IL-23 imūnēkspresijas atšķirības pacientiem ar autoimūnām vairogdziedzera slimībām. *Rīgas Stradiņa universitātes 2017. gada zinātniskā konference*: Tēzes. – Rīga: RSU, 2017. – 197. lpp. (Stenda referāts).
2. **Zaķe, T.**, Skuja, S., Konrāde, I., Groma, V. Th17-specifiskā citokīna IL-17A imūnēkspresijas atšķirības un to nozīme pacientiem ar autoimūnām vairogdziedzera slimībām. *Rīgas Stradiņa universitātes 2016. gada zinātniskā konference*: Tēzes. – Rīga: RSU, 2016. – 81. lpp. (Stenda referāts).
3. **Zaķe, T.**, Groma, V., Konrāde, I., Pekarska, K., Skuja, S., Čapkēviča, S., Kleina, R. Bļīvo savienojumu proteīna klauđīna-1 atšķirīga imūnēkspresija vairogdziedzera audos pacientiem ar Hašimoto tireoidītu un Greivsa slimību. *Rīgas Stradiņa universitātes 2015. gada zinātniskā konference*: Tēzes. – Rīga: RSU, 2015. – 129. lpp. (Stenda referāts).
4. **Zaķe, T.**, Groma, V., Skuja, S., Kleina, R. Intrafolikulāro makrofāgu īpatnību izpēte pacientiem ar Hašimoto tireoidītu. *Rīgas Stradiņa universitātes 2014. gada zinātniskā konference*: Tēzes. – Rīga: RSU, 2014. – 54. lpp. (Mutiska prezentācija).

Izmantotās literatūras saraksts

1. Abd El Atti, R. M. and Shash, L. S. 2012. Potential diagnostic utility of CD56 and claudin-1 in papillary thyroid carcinoma and solitary follicular thyroid nodules. *J Egypt Natl Canc Inst.* 24, 175–184.
2. Alfthan, A. 1984. A micromethod for the determination of selenium in tissues and biological fluids by single-test-tube fluorimetry. *Anal Chem Acta.* 165, 187–194.
3. Alfthan, G., Aro, A., Arvilommi, H. and Huttunen, J. K. 1991. Selenium metabolism and platelet glutathione peroxidase activity in healthy Finnish men: effects of selenium yeast, selenite, and selenate. *Am J Clin Nutr.* 53(1), 120–125.
4. Bossowski, A., Moniuszko, M., Idżkowska, E., Dąbrowska, M., Jeznach, M. et al. 2012. Evaluation of CD4+CD161+CD196+ and CD4+IL-17+ Th17 cells in the peripheral blood of young patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 18, 89–95 (In Polish).
5. Brorson, S. H. 2004. A method for measurements of the efficiency of immunogold labelling of epoxy-embedded proteins subjected to different retrieval techniques. *Micron.* 35(7), 619–621.
6. Bülow Pedersen, I., Knudsen, N., Carlé, A., Schomburg, L., Köhrle, J. et al. 2013. Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: a population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 79(4), 584–590.
7. Capone, A. and Volpe, E. 2020. Transcriptional Regulators of T Helper 17 Cell Differentiation in Health and Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 11, 348.
8. Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C. et al. 2011. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity.* 34, 566–578.
9. Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R. et al. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* 30, 576–587.
10. Codarri, L., Gyölvészii, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., et al. 2011. RORγ3t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol.* 12, 560–567.
11. Esfahanian, F., Ghelich, R., Rashidian, H. and Jadali, Z. 2017. Increased levels of serum interleukin-17 in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Indian J Endocrinol Metab.* 21(4), 551–554.
12. Federige, M. A. F., Romaldini, J. H., Miklos, A. B. P. P., Koike, M. K., Takei, K. et al. 2017. Serum selenium and selenoprotein-P levels in autoimmune thyroid diseases patients in a select center: a transversal study. *Arch Endocrinol Metab.* 61(6), 600–607.

13. Figueroa-Vega, N., Alfonso-Pérez, M., Benedicto, I., Sánchez-Madrid, F., González-Amaro, R. et al. 2010. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(2), 953–962.
14. Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X. P., Tato, C. M., McGeachy, M. J. et al. 2010). Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β 2 signalling. *Nature.* 467, 967–971.
15. González-Amaro, R. and Marazuela, M. 2016. T regulatory (Treg) and T helper 17 (Th17) lymphocytes in thyroid autoimmunity. *Endocrine.* 52(1), 30–38.
16. Huber, A. K., Jacobson, E. M., Jazdzewski, K., Concepcion, E. S. and Tomer, Y. 2008. Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: The IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 1077–1081.
17. Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P. et al. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* 24, 1023–1034.
18. Hurst, R., Collings, R., Harvey, L. J., King, M., Hooper, L. et al. 2013. EURRECA-Estimating selenium requirements for deriving dietary reference values. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53(10), 1077–1096.
19. Jia, H., Tao, F., Liu, C., Guo, T., Zhu, W. et al. 2015. Both interleukin-23A polymorphism and serum interleukin-23 expression are associated with Graves' disease risk. *Cell Immunol.* 294, 39–43.
20. Kandere-Grzybowska, K., Letourneau, R., Kempuraj, D., Donelan, J., Poplawski, S. et al. 2003. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *J Immunol.* 171(9), 4830–4836.
21. Karanikas, G., Schuetz, M., Kontur, S., Duan, H., Kommata, S. et al. 2008. No immunological benefit of selenium in consecutive patients with autoimmune thyroiditis. *Thyroid.* 18(1), 7–12.
22. Khong, J. J., Goldstein, R. F., Sanders, K. M., Schneider, H., Pope, J. et al. 2014. Serum selenium status in Graves' disease with and without orbitopathy: A case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 80(6), 905–910.
23. Konca Degertekin, C., Aktas Yilmaz, B., Balos Toruner, F., Kalkanci, A., Turhan Iyidir, O. et al. 2016) Circulating Th17 cytokine levels are altered in Hashimoto's thyroiditis. *Cytokine.* 80, 13–17.
24. Krassas, G. E., Pontikides, N., Tziomalos, K., Tzotzas, T., Zosin, I. et al. 2014. Selenium status in patients with autoimmune and non-autoimmune thyroid diseases from four European countries. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 9(6), 685–692.
25. Kuliawat, R., Lisanti, M. P. and Arvan, P. 1995. Polarized distribution and delivery of plasma membrane proteins in thyroid follicular epithelial cells. *J Biol Chem.* 270, 2478–2482.

26. Langowski, J. L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J. D., Chen, T. et al. 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 442, 461–465.
27. Lee, P. W., Smith, A. J., Yang, Y., Selhorst, A. J., Liu, Y. et al. 2017. IL-23R-activated STAT3/STAT4 is essential for Th1/Th17-mediated CNS autoimmunity. *JCI Insight*. 2(17), e91663.
28. Li, D., Cai, W., Gu, R., Zhang, Y., Zhang, H. et al. 2013. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. *Clin Immunol*. 149, 411–420.
29. Nettleford, S. K. and Prabhu, K. S. 2018. Selenium and Selenoproteins in Gut Inflammation – A Review. *Antioxidants (Basel)*. 7(3), 36.
30. Nève, J. 1991. Methods in determination of selenium states. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*. 5(1), 1–17.
31. Nilsson, M., Husmark, J., Björkman, U. and Ericson, L. E. 1998. Cytokines and thyroid epithelial integrity: Interleukin-1 α induces dissociation of the junctional complex and paracellular leakage in filter- cultured human thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 83, 945–952.
32. Paolieri, F., Salmaso, C., Battifora, M., Montagna, P., Pesce, G. et al. 1999. Possible pathogenetic relevance of interleukin-1 beta in “destructive” organ-specific autoimmune disease (Hashimoto's thyroiditis). *Ann N Y Acad Sci*. 876, 221–228.
33. Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R. et al. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 6, 1133–1141.
34. Peng, D., Xu, B., Wang, Y., Guo, H. and Jiang, Y. 2013. A high frequency of circulating Th22 and Th17 cells in patients with new onset Graves' disease. *PLoS One*. 8(7), e68446.
35. Peng, Z., Hu, Y., Ren, J., Yu, N., Li, Z. et al. 2021. Circulating Th22 cells, as well as Th17 cells, are elevated in patients with renal cell carcinoma. *Int J Med Sci*. 18(1), 99–108.
36. Pérez, C. V., Pellizzari, E. H., Cigorraga, S. B., Galardo, M. N., Naito, M. et al. 2014. IL17A impairs blood–testis barrier integrity and induces testicular inflammation. *Cell Tissue Res*. 358, 885–898.
37. Qin, Q., Liu, P., Liu, L., Wang, R., Yan, N. et al. 2012. The increased but non-predominant expression of Th17- and Th1-specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. *Braz J Med Biol Res*. 45, 1202–1208.
38. Ramos-Leví, A. M. and Marazuela, M. 2016. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms. *Endocrinol Nutr*. 63, 421–429.
39. Rayman, M. P. 2012. Selenium and human health. *Lancet*. 379, 1256–1268.
40. Rebuffat, S. A., Kammoun-Krichen, M., Charfeddine, I., Ayadi, H., Bougacha-Elleuch, N. et al. 2013. IL-1beta and TSH disturb thyroid epithelium integrity in autoimmune thyroid diseases. *Immunobiology*. 218, 285–291.

41. Rebuffat, S. A., Nguyen, B., Robert, B., Castex, F. and Peraldi-Roux, S. 2008. Antithyroperoxidase antibody-dependent cytotoxicity in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 929–934.
42. Ruggeri, R. M., Giuffrida, G. and Campenni, A. 2018. Autoimmune endocrine diseases. *Minerva Endocrinol.* 43(3), 305–322.
43. Ruggeri, R. M., Saitta, S., Cristani, M., Giovinnazzo, S., Tigano, V. et al. 2014a. Serum interleukin-23 (IL-23) is increased in Hashimoto's thyroiditis. *Endocr J.* 61(4), 359–363.
44. Ruggeri, R. M., Minciullo, P., Saitta, S., Giovinnazzo, S., Certo, R. et al. 2014b. Serum interleukin-22 (IL-22) is increased in the early stage of Hashimoto's thyroiditis compared to non-autoimmune thyroid disease and healthy controls. *Hormones (Athens).* 13(3), 338–344.
45. Shi, Y., Wang, H., Su, Z., Chen, J., Xue, Y. et al. 2010. Differentiation imbalance of Th1/Th17 in peripheral blood mononuclear cells might contribute to pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Scand J Immunol.* 72, 250–255.
46. Song, R. H., Yu, Z. Y., Qin, Q., Wang, X., Muhali, F. S. et al. 2014. Different levels of circulating Th22 cell and its related molecules in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(7), 4024–4031.
47. Stadhouders, R., Lubberts, E. and Hendriks, R. W. 2018. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun.* 87, 1–15.
48. Steed, E., Balda, M. S. and Matter, K. 2010. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.* 20, 142–149.
49. Sun, Z., Xu, Z., Wang, D., Yao, H. and Li, S. 2018. Selenium deficiency inhibits differentiation and immune function and imbalances the Th1/Th2 of dendritic cells. *Metallomics.* 10(5), 759–767.
50. Thomson, C. D., Robinson, M. F., Butler, J. A. and Whanger, P. D. 1993. Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in blood components of New Zealand women. *Br J Nutr.* 69(2), 577–588.
51. Van Dael, P. and Deelstra, H. 1993. Selenium. *Int J Vitam Nutr Res.* 63(4), 312–316.
52. Vitales-Noyola, M., Ramos-Levi, A. M., Martinez-Hernandez, R., Serrano-Somavilla, A., Sampedro-Nunez, M. et al. 2017. Pathogenic Th17 and Th22 cells are increased in patients with autoimmune thyroid disorders. *Endocrine.* 57, 409–417.
53. Weetman, A. 1994. The potential immunological role of the thyroid cell in autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 4, 493–499.
54. Won, H. Y., Sohn, J. H., Min, H. J., Lee, K., Woo, H. A. et al. 2010. Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates allergen-induced airway inflammation by suppressing Th2 and Th17 cell development. *Antioxid Redox Signal.* 13(5), 575–587.

55. **Zake, T.**, Skuja, S., Kalere, I., Konrade, I. and Groma, V. 2019. Upregulated tissue expression of T helper (Th) 17 pathogenic interleukin (IL)-23 and IL-1 β in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. *Endocr J.* 66(5), 423–430.
56. Zhang, L. W., Cong, X., Zhang, Y., Wei, T., Su, Y. C. et al. 2016. Interleukin-17 impairs salivary tight junction integrity in Sjögren's syndrome. *J Dent Res.* 95, 784–792.
57. Zheng, L., Ye, P. and Liu, C. 2013. The role of the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of Graves' disease. *Endocr J.* 60, 591–597.
58. Zheng, T., Xu, C., Mao, C., Mou, X., Wu, F. et al. 2018. Increased interleukin-23 in Hashimoto's thyroiditis disease induces autophagy suppression and reactive oxygen species accumulation. *Front Immunol.* 9, 96.

Pateicības

Vēlos izteikt dziļu un sirsnīgu pateicību savām lieliskajām promocijas darba vadītājām. Profesorei **Valērijai Gromai** par veltīto laiku un rūpēm, nenovērtējamo atbalstu, profesionālo uzraudzību un vērtīgiem ieteikumiem darba tapšanas laikā. Viņas vadība man palīdzēja visa promocijas darba izstrādes un rakstīšanas laikā. Paldies asociētajai profesorei **Ilzei Konrādei** par viņas entuziasmu, pieredzi, uzticību, vērtīgajiem padomiem un milzīgu atbalstu šajā doktorantūras studiju ceļojumā.

Īpašu paldies vēlos teikt manai draudzenei un kolēģei docentei **Sandrai Skujai** par profesionālajiem padomiem, pozitīvo enerģiju, atbalstu, veltīto laiku un palīdzību morfoloģisko pētījumu un mikrofotogrāfiju sagatavošanā.

Sirsnīgs paldies manai draudzenei dr. **Ievai Kalerei** par atbalstu, lielisko humora izjūtu un palīdzību statistisko datu apstrādē.

Vēlos izteikt lielu pateicību asociētajam profesoram **Andrejam Šķesteram** no Bioķīmijas zinātniskās laboratorijas un docentei **Gitai Gersonei** no Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedras par sadarbību.

Īpaši pateicos savai ģimenei un draugiem, kuri vienmēr ir snieguši lielu atbalstu. Vislielākā pateicība manai mammai **Gaiņai** par viņas rūpēm un atbalstu un manam vīram **Iljam** par pacietību, milzīgu atbalstu un mīlestību, ko viņš man ir veltījis visā darba tapšanas laikā.