

Justyna Joanna Luty

**Wpływ selenu na funkcjonowanie układu  
odpornościowego u pacjentów z autoimmunizacyjnym  
zapaleniem tarczycy**

Rozprawa doktorska

Zakład Patologii i Reumatologii Doświadczalnej

Gdański Uniwersytet Medyczny

Promotor

Prof. dr hab. n. med. Ewa Bryl

Promotor pomocniczy

Dr n. med. Agnieszka Dąca

Gdańsk 2022

*Z całego serca pragnę podziękować wszystkim osobom, dzięki którym powstanie niniejszej pracy stało się możliwe.*

*Ogrom podziękowań kieruję do mojej Promotor, Profesor Ewy Bryl za przyjęcie mnie pod swoje skrzydła oraz za opiekę merytoryczną i wsparcie w tym jakże trudnym procesie naukowym.*

*Z serdecznymi podziękowaniami i wdzięcznością zwracam się do Doktor Agnieszki Dacy, za przeprowadzenie mnie przez zawile aspekty pracy laboratoryjnej oraz ogrom wsparcia merytorycznego, ale również za tworzenie wspaniałej atmosfery pracy.*

*Dziękuję również wszystkim przyjaciołom, rodzinie oraz Hubertowi za nieustawanie w dopingowaniu mnie i dodawaniu otuchy przez cały czas.*

*Niniejszą pracę dedykuję wszystkim bliskim mojemu sercu kobietom*

# Spis treści

Wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w pracy.....	6
1. Wstęp .....	8
<b>1.1 Autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Epidemiologia .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Etiopatogeneza.....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Czynniki genetyczne.....	10
1.3.2 Czynniki środowiskowe.....	11
<b>1.3.2.1 Cięża.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2.2 Infekcje .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2.3 Leki.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.2.4 Nadmiar jodu.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2.5 Niedobór selenu .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Rola wybranych elementów układu immunologicznego w patofizjologii     autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Komórki CD4 <sup>+</sup> i CD8 <sup>+</sup> .....	17
1.4.2 Limfocyty Th1/ Th2 .....	17
1.4.3 Limfocyty Th17.....	18
1.4.4 Związek między komórkami Th17 i Treg.....	19
1.4.5 Limfocyty Treg .....	19
<b>1.5 Patogeneza AITD .....</b>	<b>21</b>
<b>1.6 Selen.....</b>	<b>24</b>
1.6.1 Fizjologiczna rola selenu w organizmie ludzkim .....	25
1.6.2 Selen w diecie .....	26
1.6.3 Normy spożycia selenu .....	28
1.6.4 Rola selenu w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania tarczycy .....	29
1.6.5 Wpływ selenu na układ odpornościowy człowieka .....	31
1.6.6 Rola selenu w AITD .....	33
2. Cele pracy .....	35
3. Materiał i Metodyka.....	36
<b>3.1 Pacjentki .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Schemat badania .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Placebo .....</b>	<b>38</b>

3.4	<b>Suplement selenu</b> .....	38
3.5	<b>Analiza subpopulacji limfocytów w krwi pełnej</b> .....	39
3.6	<b>Odczyt cytometryczny</b> .....	42
3.7	<b>Zastosowane metody analizy statystycznej danych</b> .....	45
4.	<b>Wyniki</b> .....	46
4.1	<b>Charakterystyka badanych grup pacjentek</b> .....	46
4.2	<b>Porównanie wyników badań laboratoryjnych z krwi</b> .....	47
4.2.1	Porównanie stężenia selenu, przed i po suplementacji oraz pomiędzy grupą z selenem a grupą z placebo .....	50
4.2.2	Porównanie wpływu selenu na poziom markerów uszkodzenia i niedoczynności tarczycy, przed i po suplementacji oraz pomiędzy grupą z selenem a grupą z placebo .....	51
4.2.3	Porównanie wpływu selenu na pozostałe parametry metaboliczne .....	51
4.3	<b>Cytometryczna ocena składu procentowego subpopulacji limfocytów</b> .....	51
4.3.1	Cytometryczna ocena składu procentowego limfocytów T i pomocniczych w grupie pacjentek z AITD przyjmujących suplement selenu oraz w grupie z placebo .....	52
4.3.2	Cytometryczna ocena składu procentowego limfocytów T regulatorowych w grupie pacjentek z AITD przyjmujących suplement selenu oraz w grupie z placebo .....	53
4.4	<b>Charakterystyka grupy badanej po włączeniu suplementacji selenem</b> .....	56
4.5	<b>Podsumowanie wyników</b> .....	62
5.	<b>Dyskusja</b> .....	64
6.	<b>Wnioski</b> .....	76
7.	<b>Bibliografia</b> .....	77
8.	<b>Streszczenie</b> .....	102
9.	<b>Abstract</b> .....	104
10.	<b>Załącznik nr 1 Informacja dla pacjenta i Zgoda pacjenta</b> .....	106
11.	<b>Załącznik nr 2 Parametry referencyjne wyników laboratoryjnych</b> .....	107

## Wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w pracy

- AAS (lub ASA) – atomowa spektrometria absorpcyjna (ang. *atomic absorption spectrometry*)
- ADCC – cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ang. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*)
- anty-TG – przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie (ang. AbTG, *anti-thyroglobulin*)
- anty-TPO - przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej (ang. AbTPO, *anti-thyroid peroxidase*)
- APC - komórka prezentująca antygen (ang. *antigen-presenting cell*)
- APS1 - autoimmunologiczny zespół niedoczynności wielogruzołowej typu 1 (ang. *autoimmune polyendocrine syndrome type 1*)
- CD - antygeny różnicowania (ang. *cluster of differentiation*)
- CDC – cytotoksyczność zależna od dopełniacza (ang. *complement-dependent cytotoxicity*)
- CTLA-4 - antygen-4-cytotoksycznych limfocytów T (ang. *cytotoxic T cell antigen 4*)
- DC - komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cell*)
- DIO - dejodynaza jodotyroninowa (ang. *iodothyronine deiodinase*)
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EFSA - Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. *European Food Safety Authority*)
- Fas - receptor błonowy indukujący apoptozę (ang. *apoptosis-inducing receptor*)
- FasL - ligand indukujący apoptozę (ang. *apoptosis-inducing ligand*)
- Fc $\gamma$  – receptor Fc  $\gamma$  (ang. *Fc receptor  $\gamma$* )
- FDA - Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)
- FNB - Amerykańska Rada ds. Żywności i Żywienia (ang. *Food and Nutrition Board*)
- FOXP3 – czynnik transkrypcyjny dla limfocytów T regulatorowych (ang. *forkhead box P3*)
- ft3 – wolna trójiodotyronina (ang. *free triiodothyronine*)
- ft4 - wolna tyroksyna (ang. *free thyroxine*)
- FSC – parametr w cytometrii przepływowej opisujący wielkość komórki (ang. *forward scatter*)
- GPx - peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*)
- GSH – glutation (ang. *glutathione*)
- HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*)
- HIV – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*)
- HLA - ludzki układ zgodności tkankowej (ang. *human leukocyte antigen*)
- ICAM-1 – molekula adhezyjna (ang. *intercellular adhesion molecule 1*)

IFN- $\gamma$  – interferon gamma (ang. *interferon gamma*)  
IL - interleukina (ang. *interleukin*)  
iTregs - indukowane limfocyty Treg (ang. *induced regulatory T cells*)  
MHC – główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*)  
NAS - Amerykańska Narodowa Akademia Nauk (ang. *National Academy of Sciences*)  
NK – komórki typu “naturalni zabójcy” (ang. *natural killers cells*)  
NKT – komórki T typu “naturalni zabójcy” (ang. *natural killers T cells*)  
nTregs - naturalne limfocyty Treg (ang. *natural regulatory T cells*)  
PBS – stabilizowana buforem fosforanowym sól fizjologiczna (ang. *phosphate sodium buffer*)  
PTPN 22 - białko fosfatazy tyrozynowej-22 (ang. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*)  
PZT – poporodowe zapalenie tarczycy (ang. *PPT, postpartum thyroiditis*)  
RDA – zalecane spożycie (ang. *recommended dietary allowance*)  
ROR $\gamma$ t/ RORc2 (myszy/ludzie) – (ang. *retinoic acid related-orphan receptor gamma splice variant 1*)  
ROS - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)  
Sec – selenocysteina (ang. *selenocysteine*)  
SeMet – selenometionina (ang. *selenomethionine*)  
SSC – parametr w cytometrii przepływowej opisujący ziarnistość komórki (ang. *side scatter*)  
T3 – trójiodotyronina (ang. *triiodothyronine*)  
T4 – tyroksyna (ang. *thyroxine*)  
TCR - receptor limfocyty T, receptor komórki T ( ang. *T-cell receptor*)  
Teff – limfocyty efektorowe (ang. *effector T-cells*)  
Th - limfocyt pomocniczy (ang. *T-helper*)  
TG – tyreoglobulina (ang. *thyroglobulin*)  
TGF- $\beta$  - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor  $\beta$* )  
TPO - peroksydaza tarczycowa (ang. *thyroid peroxidase*)  
Treg – limfocyty T regulatorowe (ang. *regulatory T cells*)  
TrxR - reduktaza tioredoksyny (ang. *thioredoxin reductase*)  
TSH - hormon tyreotropowy (ang. *thyroid-stimulating hormone*)  
UL – tolerowany poziom spożycia (ang. *upper level intake*)  
VCAM-1 - białko adhezyjne komórek naczyńniczych 1 (ang. *vascular cell adhesion protein 1*)

## 1. Wstęp

Autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy jest najczęściej występującą chorobą o podłożu autoimmunizacyjnym, znacznie częściej dotykającą kobiety (5-15%) niż mężczyzn (1-5%)<sup>1</sup>. Wśród czynników, które mogą mieć wpływ na etiopatogenezę omawianej choroby wymienia się niedobory selenu<sup>2</sup>. U chorych obserwuje się znaczne zróżnicowanie stężenia selenu. W eksperymentalnych badaniach niedostateczna ilość selenu wiązała się z negatywnym wpływem na wszystkie składniki układu immunologicznego<sup>3</sup>. Natomiast zbyt wysokie dawki selenu tłumyły odpowiedź immunologiczną<sup>4</sup> oraz przyczyniały się do rozwoju cukrzycy typu 2<sup>5</sup>. W przeciwieństwie do wielu innych pierwiastków zakres korzystnego działania selenu na ludzki organizm jest wąski<sup>6,7</sup>.

Szereg badań przeprowadzonych z udziałem ludzi dowodzi, iż w przebiegu autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy liczba limfocytów T regulatorowych i/ lub ekspresja czynnika transkrypcyjnego FOXP3, który determinuje prawidłowe funkcjonowanie tych limfocytów, była obniżona<sup>8-10</sup>. Komórki T regulatorowe posiadają właściwości immunosupresyjne niezbędne w zapobieganiu rozwojowi autoimmunizacji. W mysim modelu autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy, zwierzętom podawano selen, co wywołało spadek poziomu przeciwciał anti-TG, wzrost liczby limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> oraz zwiększoną ekspresję czynnika FOXP3 w porównaniu do myszy kontrolnych<sup>11</sup>.

### 1.1 Autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

Hakaru Hashimoto, japoński chirurg w czasie odbywania stażu w Berlinie w 1912 roku, opisał jako pierwszy wystąpienie autoimmunizacyjnej choroby tarczycy (AITD, *Autoimmune Thyroid Disease*) u czwórki swoich pacjentów, wtedy nazywając tą nieznaną przypadłość wolem limfatycznym (*struma lymphomatosa*)<sup>12</sup>. Jak określono w późniejszych badaniach, choroba ta wynika z zaburzeń funkcjonowania układu immunologicznego, które prowadzą do śmierci komórek własnego organizmu - w tym przypadku celem są tyreocyty. Niszczenie komórek tarczycy następuje w wyniku produkcji autoreaktywnych limfocytów T<sup>13</sup>. Ponadto w przebiegu tej choroby produkowane są autoprzeciwciała przeciwko głównym enzymom biorącym udział w syntezie hormonów tarczycy, czyli peroksydazie tarczycowej (przeciwciała anti-TPO) i



tyreoglobulinie (przeciwciała anti-TG). Uważana jest za najczęstszą przyczynę występowania niedoczynności tarczycy<sup>14</sup>.

Obecnie obowiązującymi kryteriami diagnostycznymi autoimmunizacyjnej choroby tarczycy są: obecność hipoechogenicznego miąższu w gruczole tarczowym w ultrasonograficznym badaniu tarczycy, podwyższone miano przeciwciał anti-TPO i/ lub anti-TG oraz w większości przypadków podwyższony poziom hormonu tyreotropowego (TSH); wysokie stężenia anti-TPO w surowicy występują u 90% pacjentów, a wysokie anti-TG w surowicy stwierdza się u 50 – 90% tych pacjentów<sup>15</sup>. W niektórych przypadkach na początku choroby obserwuje się łagodną lub umiarkowaną nadczynność tarczycy, wynikającą z uwolnienia nadmiernej ilości hormonów z uszkodzonych przez limfocyty tyreocytów<sup>16</sup>. Jednakże w większości przypadków głównym objawem AITD jest obniżenie wolnej tyroksyny (fT4), a także niekiedy wolnej trójiodotyroniny (fT3) oraz podwyższenie poziomu TSH, co skutkuje rozwinięciem pełnej niedoczynności gruczołu tarczowego. Badania potwierdzające obecność przeciwciał anti-TPO i anti-TG mają wysoką czułość, ale niską swoistość. Co oznacza, że podwyższone miano przeciwciał rzeczywiście potwierdza rozpoznanie, jednakże jego brak nie wyklucza choroby, ponieważ 10 – 15% pacjentów z AITD nie posiada krążących przeciwciał<sup>17</sup>. Osoby cierpiące na tę chorobę nierzadko skarżą się na niską tolerancję wysiłku fizycznego, nadmierne gromadzenie tkanki tłuszczowej, zaparcia, obrzęk, suchość skóry, wypadanie włosów i łamliwość paznokci. Wyżej wymienione oraz wiele innych objawów są konsekwencją obniżenia poziomu hormonów tarczycy, regulujących przemiany energetyczne, gospodarkę wodno-elektrolitową, metabolizm białek, tłuszczów oraz węglowodanów, jak i funkcjonowanie układu nerwowego i sercowo-naczyniowego<sup>15</sup>.

## 1.2 Epidemiologia

Zachorowalność na autoimmunizacyjną chorobę tarczycy na świecie dotyczy około 5% populacji<sup>18,19</sup>, chociaż szacuje się, że częstość występowania subklinicznej formy tego schorzenia (tj. obecności przeciwciał przeciwtarczycowych u osób w stanie eutyreozy) jest dużo wyższa, niektóre źródła podają, że jest to nawet około 7-12%<sup>18</sup>. To właśnie kobiety, jak wynika z mnogiej liczby badań, chorują na AITD dużo częściej niż mężczyźni. Dostępne dane różnią się między sobą w kontekście proporcji kobiet do mężczyzn cierpiących na AITD, najczęściej jednak mówi się, że w 85% przypadkach to kobiety<sup>19</sup>, inne źródło podaje proporcję 4–10/1, kobiety/mężczyźni<sup>20</sup>. Szczyt zachorowań

wypada między 30 a 50 rokiem życia<sup>20</sup>. Ponadto położenie geograficzne, rasa, jak i podaż jodu (niska zawartość jodu w diecie koreluje z niższą zachorowalnością) mają znamienny wpływ na wskaźnik zachorowalności w danej populacji<sup>21-23</sup>.

### 1.3 Etiopatogeneza

#### 1.3.1 Czynniki genetyczne

Biorąc pod uwagę, że w 70%-80% podatność na autoimmunizacyjną chorobę tarczycy ma podłoże genetyczne, a doniesienia naukowe realizowane z udziałem bliźniąt jedno- i dwujajowych tylko potwierdzają nadrzędny wpływ aspektu genetycznego na rozwój AITD, to opracowanie dokładnego modelu genetycznej predyspozycji w tej chorobie przysparza naukowcom wiele trudności ze względu na bliskie pokrewieństwo innej autoimmunizacyjnej choroby tarczycy – choroby Gravesa-Basedowa<sup>24</sup>. We włoskim badaniu kohortowym mającym na celu określenie znaczenia genetycznego podłoża w autoimmunizacyjnej chorobie tarczycy, przebadano ponad 800 osób będących krewnymi pierwszego i drugiego stopnia pacjentek z AITD. Wyniki tej pracy jasno wskazują na częstsze występowanie autoimmunizacyjnej choroby tarczycy rodzinie zarówno na poziomie jawnym i subklicznym<sup>25</sup>. Spośród czynników genetycznych do tej pory opisanych, jako istotne w patogenezie AITD, wymienia się między innymi mutacje w genach specyficznych dla tarczycy (tyreoglobulina - *TG*) oraz szereg genów immunoregulacyjnych (*HLA-DR*, *CTLA-4*, *PTPN-22*, oraz geny kodujące specyficzne cytokiny)<sup>14</sup>.

*TG* to główny specyficzny antygen tarczycowy, przede wszystkim służy jako matryca dla produkcji hormonów tarczycy T3 i T4, przez to że obecny jest w krwioobiegu, może być łatwym celem odpowiedzi autoimmunologicznej. Gen dla *TG* zlokalizowany jest na chromosomie 8q24, a sprzężenie tego regionu z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy zostało po raz pierwszy zidentyfikowane w amerykańskich i japońskich badaniach całego genomu<sup>26,27</sup>. Kolejne bardziej dokładne mapowanie tego regionu wskazało na gen kodujący tyreoglobulinę jako jeden z głównych swoistych miejsc powiązanych z predyspozycją do wystąpienia AITD<sup>28</sup>. Wiele opublikowanych wyników badań wskazuje na znamieną rolę polimorfizmów w głównym układzie zgodności tkankowej (*HLA*, ang. *human leukocyte antigen*) w powstawaniu choroby Gravesa-Basedowa, jednakże ich rola w postawaniu AITD

pozostaje dotąd niejednoznaczna<sup>29</sup>. Wśród głównych czynników mających udowodniony i znaczący wpływ na rozwój autoimmunizacyjnej choroby tarczycy wymienia się przede wszystkim geny *CTLA-4* i *PTPN2*, oba związane z regulacją aktywacji limfocytów T. Mutacje w pierwszym mogą zmniejszyć ekspresję lub funkcję antygeny *CTLA-4*, a to z kolei może przyczyniać się do mniej efektywnego hamowania proliferacji limfocytów T, w konsekwencji zwiększając podatność na odpowiedź autoimmunologiczną - aktywować autoreaktywne komórki<sup>30,31</sup>. Występowanie polimorfizmów w genie *PTPN22*, który koduje regulator aktywacji limfocytów T, powiązano zarówno z AITD i innymi chorobami autoimmunizacyjnymi. Dokładny mechanizm odpowiadający za wytworzenie autoimmunizacji pozostaje nadal niejasny<sup>32</sup>. Wykazano, iż polimorfizmy w genach kodujących takie cytokiny jak: IFN- $\gamma$  (interferon-gamma) oraz IL-6 (interleukina 6), okazały się być silnymi czynnikami predykcyjnymi rozwoju AITD<sup>27,33</sup>.

W tabeli numer 1 zestawiono wymienione w pracy czynniki ryzyka środowiskowe oraz genetyczne dotyczące autoimmunizacyjnej choroby tarczycy.

Tabela 1. Czynniki ryzyka w AITD.

Czynniki ryzyka w autoimmunizacyjnej chorobie tarczycy	
Środowiskowe	Genetyczne
Ciąża	<i>TG</i>
Infekcje	<i>HLA-DR</i>
Leki	<i>CTLA-4</i>
Nadmiar jodu	<i>PTPN22</i>
Niedobór selenu	

### 1.3.2 Czynniki środowiskowe

Mimo, iż wielu badaczy od lat pracuje na identyfikacją środowiskowych przyczyn powstawania autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, nie mamy jednoznacznej pewności co do całokształtu listy czynników zwiększających ryzyko rozwinięcia choroby. Do tej pory posiadamy silne dowody potwierdzające, iż ryzyko AITD, związane jest między innymi z: ciążą, infekcjami, stosowaniem niektórych leków, terapią cytokinami, ponadto

z nadmiarem jodu oraz niedoborem selenu, co zostało szerzej rozwinięte w dalszej części tej pracy.

### 1.3.2.1 Cięża

Poporodowe zapalenie tarczycy (PZT) to zespół przemijającej lub trwałej dysfunkcji tarczycy występującej w pierwszym roku po porodzie lub aborcji, przy czym większość kobiet powraca do stanu eutyreozy. Częstość występowania PZT waha się od 5 do 9%. U kobiet chorujących na cukrzycę typu 1 występuje trzykrotny wzrost częstości występowania PZT<sup>34</sup>. Poporodowe zapalenie tarczycy jest chorobą autoimmunizacyjną, która jest przejściową postacią AITD, występującą po porodzie jako konsekwencja zaostrzenia immunologicznego po immunosupresji w ciąży. Około 25% kobiet z historią PZT rozwinię trwałą niedoczynność tarczycy w ciągu następnych 10 lat<sup>35</sup>. Nie znamy dokładnego mechanizmu, według którego cięża zwiększa ryzyko rozwinięcia AITD, natomiast istnieje hipoteza, że ma to swoje podłoże w mikrochimeryzmie płodowym. W jednym z badań znaleziono komórki płodowe w obrębie tarczycy matek z AITD. Komórki te mogą inicjować reakcję nazwaną „przeszczep przeciwko gospodarzowi” i spowodować nacieki limfocytów T w tarczycy<sup>36</sup>.

### 1.3.2.2 Infekcje

Rozpoznane czynniki zakaźne związane z patogenezą AITD obejmują: *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, wirus *Coxsackie B* oraz retrowirusy<sup>37</sup>. Nowe skupiska subklinicznego zapalenia tarczycy były zgłaszane w trakcie wybuchów sezonowych infekcji wirusowych<sup>38</sup>. Spośród przebadanych dotąd infekcyjnych czynników ryzyka AITD, wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) wykazuje najsilniejszy związek z wystąpieniem choroby. Wykazano, iż przewlekłe zakażenie HCV ma związek ze zwiększoną częstością występowania klinicznego i subklinicznego autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy. Uznano, że mechanizmy odpowiedzialne za immunopatologiczne działanie wirusa zapalenia wątroby typu C na rozwój AITD to: mimikra molekularna, upośledzenie funkcji limfocytów T regulatorowych (Treg) i aktywacja limfocytów B<sup>39</sup>. Jedną z metod leczenia przewlekłego zakażenia HCV jest terapia IFN- $\gamma$ , jak donosi wiele publikacji metoda ta obarczona jest ryzykiem wystąpienia

subklinicznego lub klinicznego zapalenia tarczycy nawet w 40% przypadków, które może mieć zarówno autoimmunologiczne i nieautoimmunologiczne podłoże<sup>40</sup>. Dokładny mechanizm nie został jeszcze poznany, natomiast wskazuje się na rolę IFN- $\gamma$  jako aktywatora wielu szlaków metabolicznych, wzmacniacza ekspresji między innymi genów głównego układu zgodności tkankowej (MHC) (nadmierna jego aktywacja skutkuje utworzeniem cytotoksycznych komórek T) oraz efektorowych komórek układu odpornościowego, takich jak limfocyty T, makrofagi czy komórki NK, z drugiej zaś strony, działa on jako inhibitor komórek supresorowych. Wszystkie te zjawiska uznaje się za element etiopatogenezy AITD<sup>41</sup>.

### 1.3.2.3 Leki

Podobnie jak leczenie HCV przy pomocy IFN- $\gamma$ , opisano szereg innych interwencji farmakologicznych, których stosowanie może posiadać niekorzystny wpływ na funkcjonowanie tarczycy. Wiele z tych leków to powszechnie stosowane preparaty, począwszy od suplementów dostępnych bez recepty po zaawansowaną terapię medyczną obejmującą środki przeciwwarymyczne, przeciwnowotworowe oraz stabilizujące nastrój<sup>42</sup>. Stosowanie celowanej terapii przeciwnowotworowej wykorzystującej kinazy tyrozynowe lub inhibitory multikinaz, powiązano ze zwiększonym ryzykiem zapalenia tarczycy. Najczęściej zgłaszane zaburzenia występują u pacjentów otrzymujących sunitynib (organiczny inhibitor kinazy białkowej) z powodu przerzutowego raka nerkowokomórkowego lub nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego. W trzech dużych badaniach klinicznych niedoczynność tarczycy wystąpiło u od 14 do 25% pacjentów leczonych sunitynibem<sup>43-46</sup>.

Lit (sole litu) stosowany jest w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej, zmniejsza nasilenie myśli samobójczych oraz łagodzi przebieg okresów manii u tych pacjentów<sup>47</sup>. Stosowanie litu wpływa w różny sposób na fizjologię tarczycy, między innymi prowadzi do wytworzenia wola i niedoczynności tarczycy, ponieważ lit może być magazynowany w tyreocytach, co skutkuje hamowaniem uwalniania hormonów tarczycy. Przeprowadzono badanie, z udziałem pacjentów cierpiących na depresję maniackalną; w badaniu USG wykryto wole u 50% tych którzy byli leczeni litem i jedynie u 16% pacjentów nieotrzymujących litu<sup>48</sup>. Częstość występowania niedoczynności tarczycy u pacjentów stosujących lit wynosi około 17,6%<sup>49</sup>. Lit wywołuje tak zwane ciche zapalenie tarczycy u 1-3 na 1000 pacjentów. W zaburzeniu tym obserwuje się obecność

przeciwciał przeciwtarczycowych i w związku z tym, podobnie jak w przypadku PZT, uznawane jest ono za chorobę o podłożu autoimmunizacyjnym<sup>50</sup>. Wykazano, że przeciwciała przeciwtarczycowe występują u 20% pacjentów z zaburzeniami afektywnymi leczonymi litem, podczas gdy tylko u 7,5% osób nieprzyjmujących litu oraz u 0% osób stanowiących zdrową kontrolę<sup>51</sup>.

Osobną kwestią pozostają leki zawierające jod, bądź modyfikujące gospodarkę jodem – zagadnienie to zostało opisane poniżej.

#### **1.3.2.4 Nadmiar jodu**

Wiele doniesień naukowych wskazuje, iż nadmiar jodu w diecie jest najważniejszym czynnikiem żywieniowym, przyczyniającym się do rozwoju autoimmunizacyjnej choroby tarczycy<sup>52</sup>. Jod jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania tarczycy. Powszechnie wiadomo, że niedobór jodu związany jest ze zmniejszoną produkcją hormonów tarczycy, powstawaniem wola oraz niedoczynności tarczycy. W przeszłości, aby zapobiec rozwinięciu się na szeroką skalę skutków niedoboru jodu, zaczęto wprowadzać w wielu krajach na świecie zalecenia dotyczące obowiązkowego jodowania soli kuchennej<sup>53</sup>. Obecnie dysponujemy wynikami badań prowadzonych w różnych zakątkach globu, potwierdzających że suplementacja jodu w populacjach pierwotnie zagrożonych niedoborem jodu powoduje wzrost autoprzeciwciał tarczycy, a w niektórych przypadkach rozwinięcie AITD.

Duńskie badania wykazały, że występowanie podwyższonego miana przeciwciał anti-TPO przed i po obowiązkowym jodowaniu soli, wynosiło odpowiednio 14,3% i 23,8%<sup>54</sup>, a częstość jawnej niedoczynności tarczycy wzrosła z 38,3/100 000 do 47,2/100 000 osób rocznie w okresie od 5 do 7 lat po wprowadzeniu przepisów dotyczących wzbogacenia jodem soli kuchennej<sup>55</sup>. Podobne wnioski zauważamy w doniesieniach z Włoch, gdzie przez 15 lat badano wpływ dobrowolnego jodowania soli. Tutaj również zanotowano zwiększoną częstość występowania podwyższonego miana przeciwciał anti-TPO (12,6% wobec 19,5%) i niedoczynności tarczycy (2,8% wobec 5,0%)<sup>56</sup>. Okazuje się, że wraz ze spadkiem spożycia jodu następowało zmniejszenie częstości występowania autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy<sup>57</sup>.

Jak dotąd pozostaje niejasne w jaki sposób dochodzi do indukcji AITD u osób długotrwale spożywających zwiększoną ilość jodu. Zaproponowano kilka potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój choroby, w których między innymi jod

może: wywołać immunogenność TG, zwiększać zdolność tyreocytów i komórek dendrytycznych do prezentowania autoantygenów, upośledzać tolerancję obwodową poprzez hamowanie limfocytów Treg, przyczyniać się do zwiększenia stresu oksydacyjnego prowadzącego do uszkodzenia tarczycy, czy w końcu powodować aktywację autoreaktywnych limfocytów T, które stymulując wydzielanie cytokin aktywują szlaki sygnałowe apoptozy, prowadzące do zniszczenia tarczycy<sup>58,59</sup>.

Grupa farmaceutyków zawierających wysokie dawki jodu również nie pozostaje bez wpływu na ryzyko rozwoju niedoczynności tarczycy. Obejmuje ona jodowane środki kontrastowe, amiodaron oraz preparaty i suplementy dostępne bez recepty. Amiodaron, lek przeciwaritmiczny, zawiera 37,3% jodu w masie. Z 200 mg tabletki uwalnia się około 7 mg jodków, co daje 45-krotność zalecanego dziennego spożycia jodu (150 µg dla mężczyzn i kobiet niebędących w ciąży). Oprócz wywoływania niedoczynności tarczycy u podatnych pacjentów, jod z amiodaronu powoduje u niektórych pacjentów nadczynność tarczycy, zaburzenie znane jako tyreotoksykoza typu 1 wywołana amiodaronem. Ponadto u od 5 do 10% pacjentów amiodaron wywołuje zapalenie tarczycy, nazywane tyreotoksykozą typu 2 indukowaną amiodaronem. Uważa się, że to zaburzenie wynika z bezpośredniego cytotoksycznego wpływu amiodaronu na tyreocyty<sup>60</sup>.

### 1.3.2.5 Niedobór selenu

Niskie stężenie selenu w ustroju skutkuje osłabieniem funkcji odpornościowych. Postawiono więc hipotezę, że łagodny niedobór selenu może sprzyjać autoimmunizacji tarczycy. W badaniach niedobór selenu został powiązany z dysfunkcjami lub chorobami gruczołu tarczowego, w tym: niedoczynnością tarczycy, subkliniczną niedoczynnością tarczycy, autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy<sup>61</sup>, ponadto zaobserwowano wystąpienie powiększenia tarczycy<sup>62,63</sup>, raka tarczycy<sup>64,65</sup>, oraz chorobę Gravesa-Basedowa<sup>66</sup>.

Aby oszacować jak silny wpływ posiada niedobór selenu na rozwój chorób tarczycy, przeprowadzono bardzo duże badanie (n=6152) w dwóch populacjach zamieszkujących różne prowincje w Chinach. Obie grupy charakteryzowały się wysoką predyspozycją genetyczną i środowiskową, podobieństwem stylu życia oraz porównywalnym poziomem spożycia jodu, ale różniły się poziomem spożycia selenu; jak również jego stężeniem we krwi: 103,6 [79,7–135,9] wobec 57,4 [39,4–82,1] µg/l; (p =0,001). Występowanie zaburzeń w funkcjonowaniu tarczycy w tym badaniu było istotnie niższe w grupie

posiadającej prawidłowe stężenie selenu (18,0% wobec 30,5%;  $p < 0,001$ ). Spożycie jodu w tych prowincjach było wyższe niż zakłada norma, co w pewnym stopniu może mieć wpływ na wysoki poziom częstości występowania chorób tarczycy<sup>59</sup>.

Stężenie selenu w surowicy krwi zależy od spożycia tego pierwiastka, na które z kolei wpływ ma jego zawartość w glebie w zamieszkiwanym regionie świata<sup>7</sup>. Polskie badanie przeprowadzone w Białymstoku z udziałem pacjentek z AITD dowodzi, iż rodzaj spożywanych produktów posiada realny wpływ na stężenie selenu we krwi. Zaobserwowano, iż osoby częściej spożywające jaja, wędliny oraz nasiona roślin strączkowych, posiadały wyższe stężenie tego pierwiastka niż pacjentki, które w dużej mierze stosowały w swojej diecie margarynę i ryby<sup>67</sup>.

#### **1.4 Rola wybranych elementów układu immunologicznego w patofizjologii autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy**

Dojrzewanie limfocytów T następuje w grasicy pod wpływem ekspozycji na specyficzne antygeny i cytokiny. U zdrowej osoby, aktywacja i proliferacja komórek T reagujących na własne antygeny są błyskawicznie wykrywane przez mechanizmy centralnej tolerancji immunologicznej. Jednak u niektórych osób autoreaktywne limfocyty T wymykają się spod kontroli owych mechanizmów regulacyjnych, w konsekwencji dochodzi do aktywacji, proliferacji i różnicowania autoreaktywnych limfocytów T, prowadząc do rozwoju odpowiedzi autoimmunizacyjnej. AITD związane jest właśnie z takim załamaniem tolerancji immunologicznej, a jej konsekwencją jest obecność autoreaktywnych limfocytów naciekających gruczoł tarczowy, co prowadzi do postępującej destrukcji, manifestującej się niedoczynnością tego narządu. W AITD komórkami tworzącymi wspomniany naciek są limfocyty T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, komórki B, makrofagi i komórki plazmatyczne. Autoreaktywne limfocyty B są głównym źródłem autoprzeciwciał przeciwko tyreoglobulinie (TG) i peroksydazie tarczycowej (TPO), ponadto mogą być źródłem cytokin, przyczyniających się do progresji reakcji zapalnej. Limfocyty B mogą również pełnić funkcję komórki prezentującej antygen (APC). W wyniku czego zdolne są do aktywacji dziewiczych autoreaktywnych limfocytów T CD4<sup>+</sup>, prezentując im autoantygeny tarczycy<sup>68</sup>.



### 1.4.1 Komórki CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>

Limfocyty T tworzą dwie kategorie w oparciu o ich główną rolę w układzie immunologicznym: limfocyty cytotoksyczne (Tc) oraz limfocyty pomocnicze (Th). Limfocyty T pomocnicze, według obecnie panującej wiedzy, można podzielić na pięć subpopulacji: Th1, Th2, Th17, Th22 i Treg, w zależności od cytokin jakie wytwarzają. Komórki Tc infiltrują tarczycę i mogą pośredniczyć w apoptozie i niszczeniu tyreocytów poprzez aktywację receptora błonowego CD95 (Fas-FasL). Z drugiej strony limfocyty T pomocnicze oddziałują z innymi komórkami, w tym z limfocytami B i APC, i wywierają swoje działanie poprzez syntezę specyficznych cytokin regulatorowych. Podczas gdy większość limfocytów Tc to komórki CD8<sup>+</sup>, większość limfocytów Th posiada marker CD4<sup>+</sup> na swojej powierzchni<sup>69</sup>.

### 1.4.2 Limfocyty Th1/ Th2

Stymulacja dziewiczych komórek T CD4<sup>+</sup> przy pomocy IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 oraz czynnika transkrypcyjnego T-bet indukuje ich różnicowanie do komórek Th1<sup>70</sup>. Subpopulacja limfocytów Th1 produkuje głównie IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  i TGF- $\beta$  poprzez aktywację receptorów CCR5 i CXCR3; reguluje ona komórkową odpowiedź immunologiczną, głównie poprzez współpracę z makrofagami i innymi limfocytami T<sup>71</sup>. Obecność IL-4 hamuje różnicowanie dziewiczych limfocytów T CD4<sup>+</sup> w kierunku subpopulacji Th1 i sprzyja powstawaniu limfocytów Th2. Komórki Th2, które zaangażowane są w tak zwaną odpowiedź humoralną, wydzielają głównie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 oraz IL-13<sup>72,73</sup>. Ponadto niektóre limfocyty T CD4<sup>+</sup> wytwarzają zarówno cytokiny specyficzne dla Th1 i Th2, zostały one określone jako Th0<sup>74</sup>. Mimo, że u podłoża zachodzącego procesu chorobowego w AITD dominuje subpopulacja Th1<sup>75</sup>, to dane eksperymentalne i kliniczne sugerują, że również limfocyty CD8<sup>+</sup> odgrywają ważną rolę w rozwoju autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy<sup>76-78</sup>. Zarówno badania kliniczne i eksperymentalne dostarczają dowodów na to, że zaburzona proporcja komórek CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> odgrywa ważną rolę w rozwoju AITD. Spadek liczby komórek supresorowych CD8<sup>+</sup> powoduje niemożliwą do zatrzymania progresję choroby autoimmunizacyjnej<sup>79</sup>. W jednym z badań odsetek limfocytów CD8<sup>+</sup> był niższy u pacjentów z ciężkim przebiegiem AITD w porównaniu z pacjentami z łagodniejszą jej postacią<sup>80</sup>.

### 1.4.3 Limfocyty Th17

Różnicowanie komórek Th17 jest indukowane głównie przez współdziałanie cytokin TGF- $\beta$ , IL-6 i IL-23, wraz z ekspresją czynników transkrypcyjnych RORc, STAT3, BATF oraz IRF4)<sup>81-83</sup>. RORc pozwala odróżnić subpopulacje komórek Th1 i Th2 od Th17<sup>84</sup> i jest ludzkim odpowiednikiem mysiego ROR $\gamma$ t<sup>85</sup>. Badania nad ludzkim układem immunologicznym wykazały, że cytokiny IL-1 $\beta$  i IL-23 odgrywają ważną rolę w indukcji ludzkich limfocytów Th17 z komórek pamięci, podczas gdy TGF- $\beta$  i IL-21 indukują dziewicze komórki CD4<sup>+</sup> do różnicowania w kierunku Th17<sup>86-88</sup>. Cytokina IL-23 ma również kluczowe znaczenie dla potencjału zapalnego komórek Th17<sup>89,90</sup> i jest najważniejszym czynnikiem warunkującym przeżycie limfocytów Th17<sup>91</sup>. Nazwę limfocytom Th17 nadano ze względu na ich zdolność do wytwarzania cytokiny IL-17A i IL-17F<sup>92,93</sup>. Komórki te wytwarzają również inne cytokiny, między innymi: IL-21, IL-22 i IL-26<sup>94</sup>. Uważa się, że IL-17 jest cytokiną prozapalną, która jest zdolna do wywoływania miejscowego zapalenia poprzez stymulację produkcji IL-6, a także wzmacnianie miejscowego zapalenia poprzez synergię z innymi cytokinami prozapalnymi, takimi jak IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ <sup>95</sup>. Cytokiny wytwarzane przez komórki Th17 mają wpływ na liczne komórki funkcjonujące w obrębie układu odpornościowego i poza nim, np.: komórki nabłonkowe, komórki NK, komórki B, makrofagi i neutrofile'. Komórki Th17 stanowią około 1% limfocytów CD4<sup>+</sup> w surowicy krwi, a podstawową ich funkcją jest zapewnienie ochrony gospodarzowi przed infekcjami bakteryjnymi oraz grzybowymi. Nadmiernie aktywne limfocyty Th17 są uznawane za czynnik chorobotwórczy w rozwoju wielu różnych schorzeń, spośród których wymienia się autoimmunizacyjne choroby takie jak łuszczyca, stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, nieswoiste zapalne choroby jelit, ponadto: nowotwory, alergie oraz odrzucenie przeszczepu<sup>96</sup>. Do tej pory powstało wiele badań wskazujących na istotny wpływ komórek Th17 na patogenezę AITD<sup>97-99</sup>. W jednym z badań zaobserwowano istotnie wyższe stężenie IL-17 u pacjentów z AITD w porównaniu do osób chorujących na raka tarczycy lub wole guzkowe. Dalsze badania przeprowadzone przez tych samych naukowców wykazały pozytywny związek między poziomem IL-17 a stadiem niedoczynności tarczycy wśród pacjentów z chorobą autoimmunizacyjną tarczycy. Badania histopatologiczne wykazały silne powiązanie między stężeniem IL-17, a włóknieniem gruczołu tarczowego, co wskazuje na fakt, że obecność tej cytokiny nasila miejscowy stan zapalny i prowadzi do atrofii tyreocytów<sup>100</sup>.

#### **1.4.4 Związek między komórkami Th17 i Treg**

Do niedawna TGF- $\beta$  wiązano jedynie z limfocytami T regulatorowymi, jednak kilka grup badaczy odkryło, że TGF- $\beta$  ma również kluczowe znaczenie dla różnicowania komórek Th17<sup>88,101,102</sup>. Wykazano, że połączenie TGF- $\beta$  z IL-6 lub IL-21 powodowało indukcję limfocytów Th17 i zahamowanie różnicowania Treg. Na tej podstawie ta sama grupa badaczy uznała, iż IL-6 indukowane podczas ostrej reakcji zapalnej, hamuje funkcję nTregs oraz zapobiega generowaniu iTregs, a zamiast tego indukuje komórki Th17. Według nich IL-6 odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu równowagi pomiędzy komórkami Treg i Th17<sup>91</sup>. Ponadto na równowagę między różnicowaniem Th17 i Treg może wpływać kwas retinowy. W obecności metabolitu witaminy A preferencyjnie indukowane są Tregs, ponieważ kwas retinowy, kluczowy regulator odpowiedzi immunologicznych zależnych od TGF- $\beta$ , zdolny jest do hamowania wywołanej przez IL-6 indukcji komórek Th17 i promowania komórek Treg<sup>103</sup>. W badaniu przeprowadzonym z udziałem pacjentów cierpiących na AITD wykazano, iż ekspresja zarówno mRNA dla IL-17 i ROR- $\gamma$ t była podwyższona w tarczycy tych osób. W tym samym badaniu poziomy IL-6 i IL-23, które jak wspomniano wyżej, odgrywają ważną rolę w różnicowaniu Th17, były podwyższone u tych pacjentów. W dodatku odsetek komórek Treg oraz ekspresja czynnika transkrypcyjnego FOXP3 były obniżone. Te dane potwierdzają znamienne rolę komórek Th17 i Treg w patogenezie AITD. Na dodatek stosunek Th17/Treg był istotnie wyższy u chorych, co wskazuje na fakt, iż zachwianie równowagi Th17/Treg u pacjentów z AITD może mieć ważny wkład w rozwój tej choroby<sup>104</sup>.

#### **1.4.5 Limfocyty Treg**

Limfocyty T regulatorowe są niezbędne do utrzymania tolerancji immunologicznej (czyli tolerancji na własne antygeny) w ustroju, a ich dysfunkcja (np. z powodu mutacji w genie FOXP3) jest przyczyną występowania chorób autoimmunizacyjnych, patologii immunologicznych oraz alergii<sup>105</sup>. Odkryte w 1995 roku, Treg są produkowane zarówno w grasicy – nTreg (naturalne limfocyty T regulatorowe) i na obwodzie z indukowalnych dziewiczych limfocytów T – iTreg (indukowane limfocyty T regulatorowe). Do tej pory odkryto i opisano kilka subpopulacji Treg, każdy o odrębnym fenotypie, profilu produkowanych cytokin oraz innym

mechanizmie odpowiedzialnym za tłumienie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej. Funkcje regulatorowe pełnią zarówno komórki CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup><sup>79</sup>.

Limfocyty te mogą poprzez mechanizmy, takie jak: kontakt komórka-komórka czy wytwarzanie immunosupresyjnych cytokin (TGF- $\beta$  i IL-10)<sup>106</sup> hamować funkcje aktywacyjne, proliferacyjne i efektorowe różnych komórek układu odpornościowego, w tym: limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, komórek NK (tzw. naturalni zabójcy), komórek NKT (komórki T typu naturalnych zabójców), komórek B oraz komórek prezentujących antygen zarówno w środowisku *in vitro* i *in vivo*<sup>79</sup>. FOXP3 jest główną cząsteczką transkrypcyjną i funkcjonalnym regulatorem Treg, który odgrywa kluczową rolę w nadawaniu funkcji supresorowych komórkom Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> poprzez wzmacnianie ekspresji genów charakterystycznych dla komórek Treg, takich jak *IL2RA* (dla CD25), *IL10* i *CTLA4*<sup>107</sup>. Populację komórek Treg FOXP3<sup>+</sup>, stanowią w większości limfocyty T CD4<sup>+</sup>, które posiadają na swej powierzchni receptor dla IL-2 (łańcuch alfa receptora dla interleukiny 2 – IL-2R $\alpha$ ; czyli wspomniany wyżej CD25). Chociaż same nie są w stanie wytworzyć IL-2, to sygnalizacja z IL-2 jest konieczna tej grupie komórek do zachowania funkcji supresorowych i do przeżycia. Ponadto IL-2 indukuje czynnik STAT5, który jest niezbędny do regulacji FOXP3 pobudzającego różnicowanie komórek Treg w grasicy<sup>108,109</sup>. TGF- $\beta$  cechuje szerokie działanie hamujące na cały układ odpornościowy. Ponadto indukuje on czynnik transkrypcyjny FOXP3, który niezbędny jest do pobudzenia i podtrzymania przy życiu indukowanych komórek Treg (iTreg) na obwodzie<sup>110</sup>.

Helios jest czynnikiem transkrypcyjnym należącym do rodziny Ikaros, który, jak wykazano, odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu limfocytów Treg<sup>111</sup>. Wykazano istnienie dwóch subpopulacji Treg FOXP3<sup>+</sup>, o przeciwstawnej ekspresji Helios: nTregs (FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>) oraz iTreg indukowanych obwodowo (FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>)<sup>112</sup>.

Neuropilina 1 (Nrp1, CD304), to kolejny czynnik transkrypcyjny, którego wzmożona ekspresja występuje na większości nTreg. Z tego też powodu uznano, iż zarówno Helios i CD304 mogą być wykorzystywane do rozróżnienia wspomnianych wyżej dwóch subpopulacji Treg<sup>113,114</sup>.

Komórki Treg stanowią 5–10% limfocytów T pomocniczych. Zaburzone funkcjonowanie Treg wiąże się z występowaniem wielu chorób autoimmunizacyjnych, takich jak: cukrzyca typu 1, stwardnienie rozsiane, toczeń rumieniowaty układowy czy reumatoidalne zapalenie stawów<sup>115–117</sup>. W niektórych doniesieniach dotyczących chorób autoimmunizacyjnych wykazano zmniejszenie liczby Treg u pacjentów w porównaniu ze zdrowymi osobami. W innych natomiast poziomy Treg pozostawały na takich samych

poziomach jak u osób zdrowych. Ponadto wspomniane wyniki dotyczące występowania Treg nie zawsze są spójne w różnych badaniach, co sugeruje istnienie różnych fenotypów tych komórek w badanych tkankach<sup>118,119</sup>. Sugeruje się również, że nawet jeśli funkcja Treg jest prawidłowa, to możliwe że komórki efektorowe mogą opierać się hamującemu działaniu Tregs w chorobach autoimmunologicznych<sup>120</sup>. Dlatego same Tregs mogą nie posiadać wystarczających zdolności by powstrzymać aktywację autoreaktywnych komórek T i B<sup>121,122</sup>. Przykładowo, zauważono, że liczba Treg była zwiększona w błonie maziowej pacjentów z RZS, a mimo to były one znacznie zdominowane przez efektorowe komórki T<sup>123</sup>. W rezultacie równowaga między Tregs a efektorowymi limfocytami T zaburza się. Podobne obserwacje opisano w przypadku zaburzonej równowagi między limfocytami Treg a Th17, co zostało przedstawione w poprzednim podrozdziale.

Mimo, iż prawie wszystkie eksperymenty przeprowadzone z udziałem zwierząt<sup>124-127</sup> ujawniły, że inaktywacja lub obniżony poziom Tregs może skutkować spontanicznym wywołaniem autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy, to wyniki badań dotyczące Treg u pacjentów z AITD nie są tak jednoznaczne. Niektóre dowody kliniczne potwierdzają hipotezę dotyczącą zmniejszonego odsetka krążących Tregs u ludzi z AITD<sup>128-130</sup>, ale pojawiło się też kilka sprzecznych doniesień<sup>131,132</sup>. Z drugiej jednak strony, w jednym z badań wykazano, iż TGF- $\beta$ 1, który poprzez stymulację Treg utrzymuje tolerancję immunologiczną był niższy u pacjentów z AITD, niż w grupie kontrolnej<sup>133</sup>. Metaanaliza, w której wzięto pod uwagę 14 badań, w których mierzono odsetek krążących Tregs wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> u nieleczonych oraz leczonych pacjentów z AITD, wykazała że jest on obniżony w obu grupach pacjentów<sup>134</sup>.

## 1.5 Patogeneza AITD

Rozwój autoimmunizacyjnej choroby tarczycy jest procesem wieloetapowym, wymagającym współistnienia kilku genetycznych i środowiskowych czynników, do rozwoju pełnej manifestacji choroby. Autoimmunizacja tarczycy jest związana głównie z naciekiem limfocytów spowodowanym utratą tolerancji immunologicznej na autoantygeny oraz reaktywnością tarczycy. W dodatku limfocyty T w tej chorobie indukują apoptozę w komórkach pęcherzykowych tarczycy, prowadząc do zniszczenia gruczołu. Na początku choroby, w tarczycy, pojawiają się komórki posiadające na swojej powierzchni białka głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II), czyli tak zwane komórki prezentujące antygen (APC), głównie są to komórki dendrytyczne oraz

różne podklasy makrofagów<sup>135,136</sup>. APC prezentują dziewiczym limfocytom T specyficzne dla tarczycy autoantygeny, prowadząc do ich aktywacji i proliferacji. Zatem w początkowym etapie choroby następuje faza ekspansji klonalnej i dojrzewania autoreaktywnych limfocytów T CD4<sup>+</sup> oraz cytotoksycznych limfocytów T CD8<sup>+</sup>. Napływ komórek dendrytycznych i makrofagów do tarczycy może nastąpić w odpowiedzi na rozwijający się stan zapalny w gruczole. Wczesna nieswoista martwica tyreocytów związana z toksynami (np. nadmiarem jodu itp.), infekcje wirusowe lub bakteryjne mogą przyciągnąć wspomniane komórki do tarczycy. Ponadto, owe komórki odpornościowe występują fizjologicznie w tarczycy, odpowiadając za regulację wzrostu i funkcji tyreocytów przez produkcję IL-1 i IL-6<sup>137</sup>.

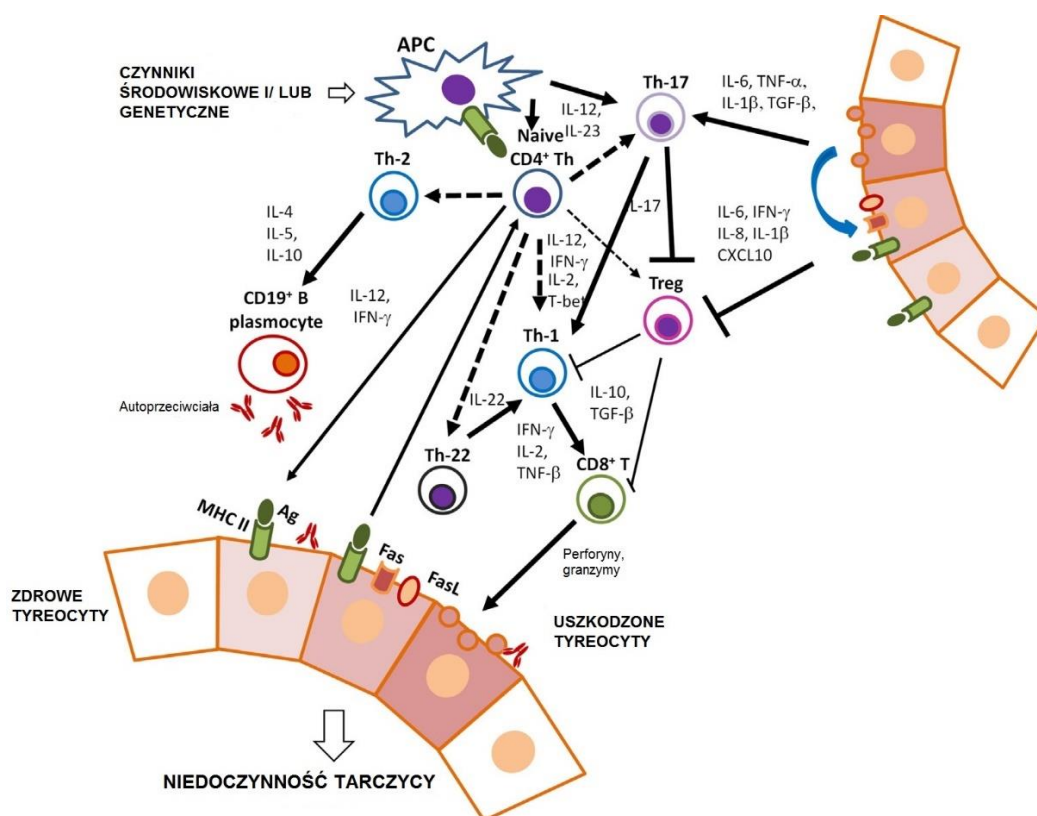
Aktywacja limfocytów T przez APC wymaga dwóch odrębnych sygnałów. Pierwszy sygnał jest generowany przez receptor komórek T (TCR), który wiąże się z cząsteczką MHC II. Drugi jest dostarczany przez inne cząsteczki obecne na powierzchni APC, m.in. cząsteczkę B7 (CD80-CD86). Wykazano, iż u pacjentów z AITD, w przeciwieństwie do zdrowych ludzi, cząsteczki MHC klasy II mogą również występować na tyreocytach. Zatem same komórki tarczycy, które wykazują ekspresję MHC II (działając jak APC), są zdolne do prezentacji zarówno autoantygenów i obcych antygenów limfocytom T CD4<sup>+</sup>, tym samym aktywując je. Aktywowane uprzednio limfocyty T mogą być również restymulowane przez cząsteczki MHC II obecne na tyreocytach, co prowadzi do wzmocnienia reakcji autoimmunizacyjnej. Warto tutaj wspomnieć, iż limfocyty Treg mogą zmniejszyć ekspresję cząsteczki MHC II za pośrednictwem produkowanej przez nie IL-10. Migracja limfocytów do tarczycy jest stymulowana przez zwiększoną ekspresję białek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1) w komórkach aktywowanego śródbłonna, czyli selektyn (P-selektyna) i integryn (Beta-1 integryna)<sup>138</sup>.

Ponadto same tyreocyty wydzielają cytokiny i chemokiny, które kontrolują migrację limfocytów poprzez aktywację CCR5 i CXCR3. Naciekające komórki T charakteryzują się zwiększonym wytwarzaniem IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , co z kolei stymuluje wydzielanie chemokin w tyreocytach<sup>69</sup>. W AITD dochodzi do niekontrolowanej proliferacji autoreaktywnych limfocytów T CD4<sup>+</sup>, które indukują wytwarzanie cytotoksycznych komórek T CD8<sup>+</sup> poprzez IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\beta$ . Z kolei limfocyty CD8<sup>+</sup> wydzielają niszczące tarczycę cząsteczki: perforynę i granzymy (np. granzym B)<sup>139,140</sup>.

Apoptoza mediowana cząsteczką Fas wydaje się być głównym mechanizmem niszczenia komórek w AITD. Prawidłowe tyreocyty, posiadają na swej powierzchni cząsteczkę FasL, dzięki której są w stanie indukować apoptozę w infiltrujących autoreaktywnych limfocytach T. Natomiast zwiększona apoptoza obserwowana w tarczycy pacjentów z AITD jest konsekwencją jednoczesnej obecności cząsteczek Fas i FasL (ligandu indukującego apoptozę) na tyreocytach, co skutkuje samobójstwem lub zabójstwem sąsiadujących komórek. Ponadto udowodniono, iż w AITD komórki tarczycy wytwarzają prozapalne cytokiny IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$ , które mogą dodatkowo nasilać ekspresję Fas w nich samych<sup>141</sup>.

Autoprzeciwciała, zwłaszcza anty-TPO, niszczą tyreocyty na zasadzie indukowania cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC), podczas gdy cytotoksyczność zależna od dopełniacza (CDC) wywiera tutaj mniejszy efekt. Mechanizm ADCC zależny jest od interakcji między komórką docelową, przeciwciałem oraz komórką efektorową. Monocyty, które dzięki receptorom Fc $\gamma$ RI są komórkami efektorowymi aktywowanymi przez anty-TPO, mogą wpływać na limfocyty T, prowadząc do zniszczenia komórek tarczycy. Zniszczone tyreocyty uwalniają cytokiny, takie jak IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, które dodatkowo inicjują stan zapalny poprzez przyciąganie większej liczby limfocytów do tarczycy<sup>69</sup>.

Rycina numer 1 przedstawia złożony system interakcji pomiędzy tyreocytami a cytokinami w autoimmunizacyjnej chorobie tarczycy.



Rycina 1. Interakcje pomiędzy tyreocytami a cytokinami w autoimmunizacyjnej chorobie<sup>142</sup>.

## 1.6 Selen

Selen (Se) został po raz pierwszy zidentyfikowany w 1817 roku, jako produkt pośredni przy produkcji kwasu siarkowego, przez szwedzkiego chemika Jönsa Jacoba Berzeliusa. Nazwał on odkryty przez siebie pierwiastek imieniem greckiej bogini księżycy. Przez wiele lat selen uznawany był za środowiskową toksynę dla zwierząt gospodarskich, również potencjalnie szkodliwą dla ludzi<sup>143</sup>. W 1957 roku pionierska praca Schwarza i jego współpracowników, wykazała, że można zapobiegać martwicy wątroby u szczurów dzięki suplementacji niskimi stężeniami Se, co rzuciło nowe światło na funkcje tego mikroelementu, prowadząc do identyfikacji selenu jako niezbędnego mikroskładnika<sup>144</sup>. W 1973 r. odkryto, iż selen jest integralnym składnikiem peroksydazy glutationowej (GPx), enzymu, który odgrywa główną rolę w ochronie przed stresem oksydacyjnym<sup>145</sup>. Pomimo niewielkiej wiedzy na temat dokładnej biochemii selenu w ludzkim ciele, w przeciągu ostatnich dwóch dekad przeprowadzono bardzo dużą liczbę badań wykazujących, że niewystarczające stężenie selenu jest związane z występowaniem nowotworów, cukrzycy, chorób układu sercowo-naczyniowego, czy



zaburzeń w funkcjonowaniu systemu odpornościowego. Z kolei niekontrolowane przyjmowanie preparatów zawierających selen może prowadzić do efektów toksycznych, nawet subtoksyczne dawki, mogą mieć negatywny wpływ na organizm ludzki, co zostanie opisane w dalszej części pracy.

### **1.6.1 Fizjologiczna rola selenu w organizmie ludzkim**

Selen jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w tkankach ludzkiego organizmu pod postacią selenoprotein. Wpływa na wiele procesów fizjologicznych, a jego zbyt niskie lub zbyt wysokie stężenie może prowadzić do poważnych konsekwencji zdrowotnych, na przykład cukrzycy typu 2 czy zaburzeń w funkcjonowaniu nerek<sup>146–148</sup>. Wśród funkcji jakie pełni on w organizmach żywych wymienia się, takie jak: obrona antyoksydacyjna, tworzenie hormonów tarczycy, synteza DNA, wpływ na płodność i reprodukcję<sup>149</sup>. Selen może być w organizmie przekształcany w różne metabolity. Niektóre z nich, jak metyloselenol, odgrywają rolę w zapobieganiu nowotworom. Selen obok witaminy E odgrywa również rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania mięśni, poprzez poprawę wytrzymałości i regeneracji oraz spowolnienie procesu starzenia<sup>150</sup>. Niskie stężenie Se w osoczu we wczesnym okresie ciąży okazał się być wiarygodnym predyktorem niskiej masy urodzeniowej noworodków<sup>151</sup>. Selen okazał się również ważny dla fizjologii mózgu, nieprawidłowe (za równo za duże i za małe) stężenia tego pierwiastka stwierdzono w osoczu pacjentów z różnymi zaburzeniami funkcji poznawczych i neurologicznych<sup>152</sup>. Ponadto, istnieją doniesienia dotyczące wpływu niedoboru selenu na zaburzenia funkcji mięśni szkieletowych i sercowego, charakteryzujące się zmianami we włóknach mięśniowych, które prowadzą do upośledzenia skurczu oraz zaniku mięśni<sup>153</sup>. Badania epidemiologiczne przeprowadzone w ciągu ostatnich dziesięcioleci, wskazują że niskie stężenie Se koreluje ze zwiększoną częstością kilku schorzeń. Na przykład wykazano odwrotną asocjację między stężeniem selenu, a częstością występowania choroby wieńcowej oraz niektórych rodzajów nowotworów<sup>154–157</sup>. Kilka projektów badawczych skupiło się na potencjalnym działaniu przeciwwirusowym selenu. Zaobserwowano w nich, że niedobór tego pierwiastka wiązał się z wyższą śmiertelnością wśród pacjentów zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV). Doniesiono również, że u dorosłych zakażonych wirusem HIV suplementacja Se znacznie zmniejszyła liczbę hospitalizacji z powodu infekcji<sup>158</sup>. Ciężki niedobór selenu, obserwowany w niektórych regionach geograficznych, związany z

bardzo niską zawartością selenu w glebie, objawia się rozwojem endemicznej kardiomiopatii (choroba Keshan) oraz endemicznej osteoartropatii (choroba Kaszina-Beka)<sup>159</sup>.

### 1.6.2 Selen w diecie

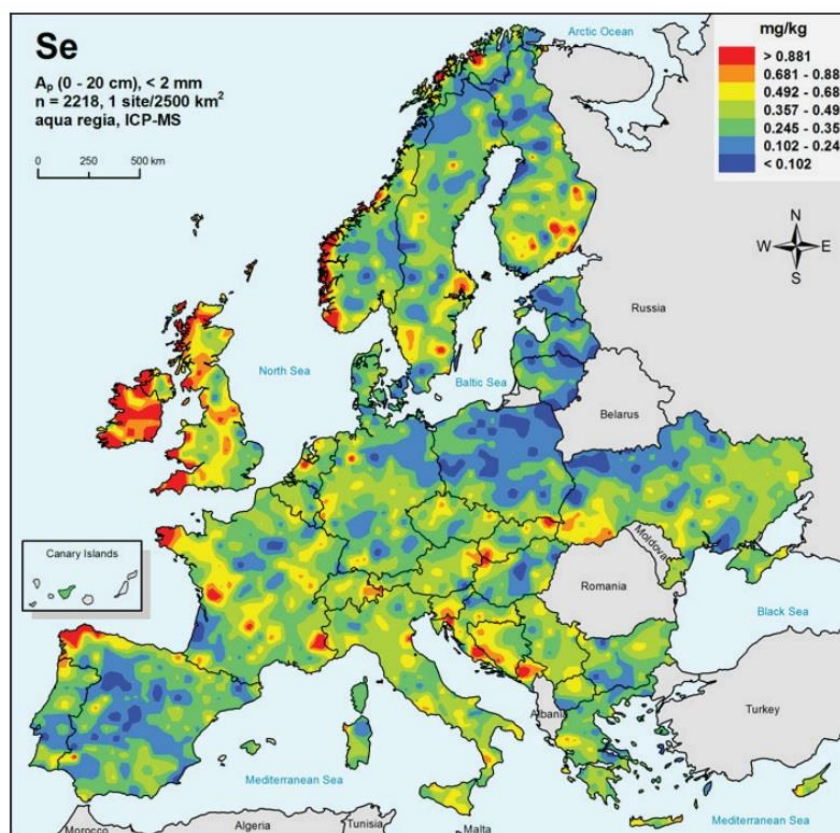
Głównym źródłem selenu dla człowieka jest pożywienie, woda dostarcza tego pierwiastka w znikomym stopniu. Ilość Se w żywności zależy od wielu geologicznych, geograficznych oraz innych czynników. Stężenie selenu w glebie jest przede wszystkim zależne od jej struktury, natomiast biodostępność tego pierwiastka dla roślin zależy od: pH, ilości materii organicznej w glebie, konkurujących jonów takich jak siarczany, aktywności mikrobiologicznej, tekstury, temperatury, poziomu opadów w okresie wegetacji, nawadniania itd.<sup>160</sup>. Powstawanie konkretnych form selenu w glebie ma również wpływ na biodostępność tego pierwiastka: selenian jest lepiej rozpuszczalny i gorzej absorbowany niż selenit. Alkaliczne warunki sprzyjają tworzeniu selenianu poprawiając biodostępność selenu, jednocześnie warunki bardziej kwasowe sprzyjają powstawaniu selenitu o niższej biodostępności. Istotnym jest to, że gleby, które zawierają odpowiednie lub wysokie stężenia Se, mogą cechować się niskim stężeniem selenu w uprawianych roślinach, jeśli nie jest on w formie umożliwiającej pobieranie go przez rośliny. Dobrze ilustrują to dane z regionu występowania choroby Keshan, z Prowincji Hebei, w Chinach, która charakteryzuje się wysoką zawartością selenu w glebie, przy jednoczesnej jego bardzo niskiej biodostępności, ze względu na wysoką zawartość materii organicznej i niższe pH niż inne gleby w regionie<sup>160</sup>.

Stężenie selenu w naturalnych źródłach żywności jest bardzo zmienne. Stężenie w granicach 10–550 µg/kg odnotowano w zbożach. Warzywa, takie jak te z rodziny amarylkowatych, w tym czosnek i cebula, mogą gromadzić znaczne ilości selenu, osiągając jego stężenia odpowiednio do 68 i 96 µg/g. Duże ilości selenu mogą zawierać również grzyby i brokuły. Orzechy brazylijskie są najbogatszym źródłem selenu, ale jego zawartość jest bardzo zmienna, waha się od 0,2 do 512 µg/g świeżej masy<sup>161</sup>. W produktach pochodzenia zwierzęcego stężenie selenu odzwierciedla jego dodatek w stosowanych paszach dla bydła. W mięsie, jajach, rybach, które są bogate w białko, zawartość Se jest stosunkowo wysoka, w zakresie ~49–739 µg/kg (świeża masa). Dodatkowo podroby, takie jak wątroba i nerki, mogą zawierać szczególnie wysokie stężenie selenu, nawet do 1500 µg/kg<sup>160</sup>.

Techniki kulinarne i obróbka termiczna produktów posiadają znaczący wpływ na zawartość selenu w żywności. Gotowanie obniża zawartość Se w większości produktów spożywczych, a badania wykazały, że warzywa, które są naturalnie bogate w ten pierwiastek, takie jak szparagi i grzyby tracą go nawet do 40% podczas gotowania, poprzez wypłukiwanie z wodą<sup>162</sup>. Inni badacze oszacowali, że 50% zawartości selenu ulega utracie z warzyw i produktów mlecznych podczas gotowania, zwłaszcza jeśli w trakcie dodaje się sól i składniki o niskim pH, takie jak ocet, natomiast smażenie powoduje znacznie mniejsze straty tego pierwiastka<sup>163</sup>.

Spożycie selenu różni się znacznie w zależności od kraju i regionu świata, w dużej mierze ze względu na zmienność zawartości tego pierwiastka w pokarmach roślinnych (a tym samym w paszach dla zwierząt). Powszechnie uznaje się, że spożycie Se w całej Europie jest stosunkowo niskie, co wynika z nieodpowiednio niskiego stężenia tego pierwiastka w glebie, zwłaszcza w Europie Środkowo-Wschodniej<sup>164</sup>.

Rycina numer 2 obrazuje stężenie selenu w glebie w Europie.



Rycina 2. Stężenie selenu w glebie, Europa<sup>165</sup>.

Ze względu na wyjątkowo niskie spożycie selenu w Finlandii w latach 70., wynoszące około 0,025 mg/dzień, w 1984 roku podjęto oficjalną decyzję o fortyfikacji nawozów wieloskładnikowych selenem w postaci selenianu sodu. Prawie wszystkie nawozy używane w Finlandii od 1985 zawierały Se. Obecnie wszystkie nawozy roślinne zawierają 15 mg/kg selenu. Do tej pory Finlandia jest jedynym krajem, który stosuje tego typu obligatoryjne zalecenie. W trakcie tego programu stężenie selenu w zbożach wzrosło średnio 15-krotnie w porównaniu z poziomem przed nawożeniem. Średni wzrost stężenia Se w wołowinie, wieprzowinie i mleku był odpowiednio 6-, 2- i 3-krotny. Mleko od krów żywionych ekologicznie zawiera o 50% mniej Se niż zwykłe mleko. Średnie spożycie przez ludzi w diecie wzrosło z 0,04 mg Se/dzień w 1985 roku do poziomu 0,08 mg Se/dzień, co znacznie przekracza obecne zalecenia żywieniowe. Żywność pochodzenia zwierzęcego pokrywa ponad 70% całkowitego dziennego spożycia Se. Średnie stężenie Se w ludzkim osoczu wzrosło z 0,89  $\mu\text{mol/l}$  do 1,40  $\mu\text{mol/l}$ , co należy uznać za stan optymalny<sup>166</sup>.

W jednym z polskich badań dotyczących zawartości selenu w produktach spożywczych, oszacowano, iż Polacy spożywają go średnio około  $30 \pm 11 \mu\text{g/dzień}$ . Natomiast średnia zawartość Se była najwyższa w próbkach pobranych z posiłków dla członków służby wojskowej ( $59 \pm 30 \mu\text{g}$ ), w kampusach akademickich ( $51 \pm 16 \mu\text{g}$ ) i ośrodka opieki dla seniorów ( $45 \pm 16 \mu\text{g}$ )<sup>167</sup>.

### 1.6.3 Normy spożycia selenu

Aktualne referencje dotyczące spożycia selenu różnią się między sobą w Europie i na świecie, wynoszą od 25  $\mu\text{g/dzień}$  dla dorosłych kobiet w Japonii do  $\geq 100 \mu\text{g/dzień}$  w Holandii i Macedonii<sup>168</sup>. Zalecane dzienne spożycie (RDA) selenu dla dorosłych w Polsce wynosi 55  $\mu\text{g/dobę}$ <sup>169</sup>. Amerykańska Rada ds. Żywności i Żywienia (FNB) również zaleca spożycie tego pierwiastka na poziomie 55  $\mu\text{g/dobę}$ <sup>170</sup>, natomiast Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) niedawno ustalił odpowiednie dzienne spożycie selenu dla dorosłych na poziomie 70  $\mu\text{g/dobę}$ <sup>171</sup>. Spożycie selenu na poziomie 20  $\mu\text{g/dobę}$  zostało powszechnie uznane za minimum potrzebne do zachowania dobrego zdrowia<sup>172</sup>. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) ustaliła, że stężenie Se w pełnej krwi wynoszące 1000 ng/ml stanowi granicę dla braku szkodliwego działania i odpowiada ono spożyciu tego pierwiastka na poziomie 853  $\mu\text{g/dzień}$  przez dorosłego mężczyznę<sup>173</sup>. Amerykańska Narodowa Akademia Nauk (NAS) w 2000 roku ustanowiła

tolerowany poziom (UL) spożycia selenu dla dorosłych na poziomie 400 µg/dzień<sup>170</sup>, ale wartość ta została obniżona w 2006 r. przez EFSA do 300 µg/dzień<sup>174</sup>.

Ocena zapotrzebowania na selen została oparta o spożycie maksymalizujące aktywność selenoenzymu GPx w osoczu lub erytrocytach. Wciąż jednak toczy się debata, czy jest to konieczne dla osiągnięcia optymalnego funkcjonowania tego enzymu i czy zwiększone spożycie zapewni ochronę między innymi przed rozwinięciem chorób. Selen w osoczu lub w surowicy odzwierciedla krótkoterminowe stężenie tego pierwiastka, a z kolei selen w erytrocytach, ze względu na jego inkorporację w białka podczas tworzenia tych komórek odzwierciedla stan długoterminowy. Nie istnieją jednak akceptowane zakresy referencyjne stężenia selenu ze względu na różnice w jego średnim poziomie w zależności od kraju. Zawartość selenu we włosach jest powiązany z długoterminowym spożyciem tego pierwiastka, jednakże szampony zawierające selen mogą ograniczać przydatność próbek włosów. Codzienne wydalanie Se z moczem jest ściśle związane ze stężeniem tego pierwiastka w osoczu oraz spożyciem w populacjach o niskiej jego podaży. Badania pokazują, że selen usuwany wraz z moczem stanowi 50–60% całkowitej wydalanej jego ilości, a zatem całkowite spożycie może być szacowane jako dwukrotność dziennego wydalania z moczem<sup>175</sup>. Stąd badanie ilości wydalanego selenu z moczem, może odzwierciedlać krótkoterminową podaż tego pierwiastka z dietą.

Ponadto często trudność w porównaniu wyników z różnych laboratoriów powodują różnice w metodologii. GPx służy również do oceny efektywności suplementacji różnymi formami selenu, ale jak już wyżej wspomniano, reaguje on tylko u osób z niskim stężeniem selenu. Co więcej, zakres odpowiedzi zależy od początkowego poziomu jego aktywności. Dla przykładu, w jednym z badań interwencyjnych z udziałem chińskich mężczyzn, w którym zastosowano suplementację 30 µg Se/dzień w postaci selenometioniny oraz zwyczajowe spożycie tego pierwiastka z dietą na poziomie 11 µg/dobę i okazało się ono wystarczające do maksymalizacji aktywności cytoplazmatycznego GPx<sup>175</sup>.

#### **1.6.4 Rola selenu w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania tarczycy**

Wśród wszystkich narządów ciała, tarczyca cechuje się najwyższym stężeniem selenu, fakt ten odzwierciedla znaczenie tego pierwiastka w metabolizmie gruczołu<sup>176</sup>. Biorąc pod uwagę funkcjonowanie gruczołu tarczowego Se jest istotny z dwóch powodów. Po pierwsze, znajduje się w miejscu katalitycznym enzymu selenocysteiny,

zapewniając ochronę antyoksydacyjną tarczycy przed wolnymi rodnikami oraz stresem oksydacyjnym. Detoksykację aktywują różne utleniacze, które służą jako ogólne mediatory stanu zapalnego, takie jak nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), tlen singletowy [forma tlenu cząsteczkowego ( $O_2$ ) na najniższym stanie wzbudzonym] i kwas nadtlenoazotawy. Najważniejszym z nich jest  $H_2O_2$  powstający w warunkach fizjologicznych podczas produkcji hormonów<sup>177,178</sup>. Po drugie, Se jest kluczowym elementem dejodynazy jodotyroninowej (DIO), która jest zaangażowana w aktywację i inaktywację hormonów tarczycy<sup>179</sup>. Ludzka tarczyca cechuje się najwyższym stężeniem selenu, występującego pod postacią selenobiałek. Ze względu na zdolność gruczołu tarczowego do gromadzenia tego pierwiastka, trudno jest interpretować natychmiastowy efekt jego suplementacji na enzymy zawierające selen<sup>180</sup>.

Najważniejsze grupy selenoprotein funkcjonujących w obrębie tarczycy to GPx i TrxR, ściśle związane z ochroną przed wolnymi rodnikami oraz DIO typu I, II i III, które oprócz pozatarczycowego działania, odpowiadają za syntezę hormonów tarczycy (typ I i II), lub ich inaktywację (typy I i III), za pośrednictwem konwersji tyroksyny do trijodotyroniny<sup>181</sup>. DIO typu I i II są obecne w tyreocytach, podobnie jak GPx 3, które są selenoenzymami znajdującymi się w koloidzie tkanki - w celu zapewnienia potencjału redoks chroniąc przed zmianami stanu oksydacyjnego w trakcie syntezy hormonów<sup>182</sup>. Selen jest niezbędny na każdym etapie rozwoju zarodkowego tarczycy, a także postnatalnie - we wzroście poporodowym i dojrzewaniu tego gruczołu. Wpływ Se na czynność tarczycy jest ściśle skorelowany ze stężeniem jodu, ponieważ niedobór tego pierwiastka może pogłębić anomalie wywołane niedoborem jodu w dowolnym momencie życia<sup>183</sup>. Pierwsze kliniczne dowody potwierdzające, że poważny niedobór Se w połączeniu z innymi czynnikami środowiskowymi jest szkodliwy dla tarczycy znaleziono w Afryce Środkowej. Tutaj sama suplementacja jodem okazała się nieskuteczna w przywróceniu normalnych funkcji tarczycy, ponadto u dzieci z rejonów endemicznego niedoboru jodu i/lub selenu rozwinął się obrzęk śluzowaty<sup>184,185</sup>. Zmniejszone spożycie Se jest bezpośrednio związane z obniżoną zdolnością GPx do ochrony przed utlenianiem. W konsekwencji takiego stanu może dojść do zniszczenia tkanek, niedoczynności tarczycy, wytworzenia wola, tworzenia się guzków, a nawet złośliwej transformacji nowotworowej<sup>186</sup>. Podobnie zmniejszona aktywność DIO upośledza czynność tarczycy i dodatkowo zwiększa ryzyko rozwoju przewlekłej autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, a nawet nowotworów złośliwych<sup>181</sup>.

Początkowo zakładano, że informacje o poziomie selenu w surowicy, osoczu lub pełnej krwi odzwierciedlają jego zawartość w tkankach, w szczególności jądrach, mózgu, czy narządach dokrewnych takich jak tarczyca<sup>176</sup>. Jednak systematyczne analizy danych pochodzących z modeli zwierzęcych, u których zmniejszono lub zwiększono zasoby selenu w czasie oraz badania tkanki tarczycy usuniętej podczas interwencji medycznych u ludzi (wole, rak tarczycy, autoimmunologiczne choroby tarczycy) wskazują na coś innego<sup>187,188</sup>. Obniżenie stężenia Se w surowicy lub u analizowanych zwierząt np. w tkankach takich jak wątroba, nerki, mięśnie i innych narządach, miały minimalny lub nie miały wcale wpływu na zawartość tego pierwiastka w tarczycy oraz na ekspresję selenoprotein w gruczole tarczowym. Odnotowano nawet wyższe niż normalne wartości dla ekspresji DIO, GPx i TxnR w tarczycy w warunkach wyczerpania Se w pozostałych częściach ciała. Podobna sytuacja miała miejsce w mózgu, w którym stężenie Se może być tylko minimalnie uszczuplone przez interwencje żywieniowe<sup>189-191</sup>. Te obserwacje dostarczyły pierwszych dowodów na to, że tarczyca (i mózg) mają specyficzny wychwyt lub mechanizm retencji selenu nawet w warunkach poważnego niedoboru żywieniowego i w surowicy<sup>192</sup>.

### **1.6.5 Wpływ selenu na układ odpornościowy człowieka**

Selen i selenoproteiny są istotne nie tylko w kontekście inicjowania lub wzmacniania odporności, ale uczestniczą również w immunoregulacji, która ma kluczowe znaczenie w zapobieganiu powstawania nadmiernych reakcji, które mogą prowadzić do autoimmunizacji lub przewlekłego stanu zapalnego<sup>193</sup>. W komórkach układu odpornościowego dochodzi do ekspresji wielu cząsteczek z rodziny selenoprotein, gdzie pełnią one między innymi funkcje antyoksydacyjne, czy promujące sygnalizację komórkową. Na poziomie komórkowym selen może wpływać na różne funkcje efektorowe leukocytów, w tym adhezję, migrację, fagocytozę i wydzielanie cytokin<sup>194</sup>. Jednym z najszerzej badanych powiązań między selenem a układem odpornościowym jest efekt działania tego mikroelementu na funkcję neutrofilów. Neutrofile wytwarzają reaktywne formy tlenu (ROS) w celu obrony przed patogenami. Ten rodzaj działania wymaga zachowania równowagi między produkcją wystarczającej ilości ROS do zabicia inwazyjnych organizmów a systemami, które ochronią same neutrofile przed wolnymi rodnikami. Wykazano, iż neutrofile myszy, szczurów oraz bydła ze stwierdzonym niedoborem selenu, są w stanie fagocytować patogeny *in vitro*, lecz z dużo

mniejszą efektywnością je zabijają na drodze wybuchu tlenowego, w porównaniu do tych, od zwierząt o prawidłowym stężeniu selenu<sup>195</sup>. Upośledzenie tej funkcji zostało powiązane z obniżoną aktywnością cytozolowej GPx (GPx1) w komórkach, przez co pozwala ona wolnym rodnikom zabijać same neutrofile<sup>192</sup>. Wyniki badań z udziałem zwierząt wykazały, że niedobór selenu może prowadzić do upośledzenia funkcji immunologicznych, które skutkuje niezdolnością neutrofilów i makrofagów do niszczenia antygenów. Zauważono, że niskie stężenie selenu u ludzi może powodować zmniejszoną odpowiedź immunologiczną na szczepienie przeciwko wirusowi polio<sup>3</sup>. Badanie to wykazało również, że u osób suplementujących selen obecnych jest mniej mutacji w wirusie polio niż u badanych, którzy otrzymali placebo. Zarówno niedobór selenu i supresję ekspresji selenobiałek powiązano z wyższymi poziomami cytokin prozapalnych w tkankach: przewodu pokarmowego<sup>196,197</sup>, macicy<sup>198</sup>, gruczołu sutkowego<sup>199</sup>.

ROS również zostały uznane za ważne mediatory sygnalizacji komórkowej i komunikacji komórka-komórka dla wielu fagocytycznych i nefagocytycznych komórek odpornościowych<sup>200</sup>. Zauważono, iż wyższe spożycie Se powoduje powstawanie silniejszego wybuchu tlenowego również w limfocytach T, w odpowiedzi na stymulację receptora komórek T (TCR)<sup>201</sup>. W tej samej publikacji wykazano, iż wysokie spożycie selenu wpływa na odpowiedź odpornościową swoistą poprzez aktywację i nasilenie funkcji limfocytów T i B. Jedną z właściwości immunomodulacyjnych wysokiego stężenia selenu *in vivo* jest wpływ na proliferację i różnicowanie limfocytów CD4<sup>+</sup> T pomocniczych. Ponadto istnieje doniesienie o polaryzacji komórek T w kierunku fenotypu Th1 pod wpływem zwiększenia stężenia selenu<sup>201</sup>.

Suplementacja selenem w większości przypadków działa immunostymulująco, co zostało udowodnione względem wielu parametrów immunologicznych, w tym proliferacji limfocytów T, aktywności komórek NK oraz funkcjonowania komórek odporności wrodzonej<sup>194</sup>. Efekt ten zależy od wyjściowego stężenia selenu, a najsilniejszy wpływ jest zauważalny, gdy suplementacja podnosi stężenie selenu z niewystarczającego do odpowiedniego. Korzyści płynące z podniesienia stężenia selenu do poziomów jeszcze wyższych są już mniej znaczące. Wykazano, że aktywacja ludzkich leukocytów wzrasta w odpowiedzi na żywność wzbogaconą w selen<sup>202</sup>.



### 1.6.6 Rola selenu w AITD

Selen został powiązany z rozwojem autoimmunizacyjnej choroby tarczycy na wielu różnych poziomach. Oprócz roli, jaką pełni on w dejodacji hormonów tarczycy, w neutralizacji aktywności nadprodukowanego  $H_2O_2$  za pośrednictwem GPx1 i GPx3, zachowaniu integralności tyreocytów, wspiera on również gruczoł tarczowy na poziomie immunologicznym. Limfocyty T  $CD4^+$  mogą różnicować się do komórek Th1 lub Th2, w zależności od aktywacji środowiska pro-Th1 lub pro-Th2. Wiadome jest, że subpopulacje Th0 i Th1 mogą działać jako pomocnicze komórki T, prowadząc do produkcji autoprzeciwciał przeciwko TG i TPO<sup>203</sup>. TCR stymuluje różnicowanie komórek  $CD4^+$  do limfocytów Treg, na co znaczący wpływ może mieć wysoki poziom Se w diecie<sup>9</sup>. Redukcja liczby lub funkcjonalne nieprawidłowości komórek  $CD4^+CD25^+$  Treg prowadzą do rozwoju choroby autoimmunizacyjnej. W badaniu eksperymentalnym nieorganiczny selen zahamował ekspresję cząsteczki HLA-DR poprzez neutralizację reaktywnych form tlenu (ROS) w linii komórkowej zawierającej ludzkie tyreocyty eksponowane na  $IFN-\gamma$ <sup>204</sup>. Suplementacja Se u pacjentów z AITD wpływa na IL-2 i inne cytokiny zaangażowane w patogenezę tej choroby<sup>205</sup>. Selen również może pośrednio hamować aktywację TNF i uwalnianie cytokin. Warto zauważyć, że poprzez zwiększenie suplementacji Se, ekspresja liganda receptora aktywującego jądrocy czynnik NF- $\kappa$ B (RANKL, ang. *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand*), który jest powiązany z aktywacją TNF- $\alpha$ , może być zmniejszona. W badaniu eksperymentalnym analizującym skutki wpływu SeMet na uwalnianie prozapalnych cytokin z monocytów i limfocytów pacjentów z nieleczonym AITD, wykazano znaczące hamowanie wydzielania  $IFN-\gamma$  i IL-2 przez SeMet, a efekt ten został wzmocniony zastosowaniem leczenia skojarzonego z LT4 (sól sodowa lewotyroksyny) oraz SeMet. Zatem Se wykazuje bezpośrednio i pośrednio działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne. W innym badaniu suplementacja Se w formie selenitu (50  $\mu$ g/dzień lub 100  $\mu$ g/dzień) zwiększyła aktywność zarówno GPx1 i GPx4 w limfocytach u osób przyjmujących selen w porównaniu z kontrolą<sup>206</sup>. Jednym z głównych zadań makrofagów jest wykrywanie obecności cząsteczek sygnalizujących infekcję i/ lub uszkodzenie tkanek<sup>207</sup>. W jednym z eksperymentalnych badań wykazano, że zwiększone uwalnianie  $H_2O_2$  przez makrofagi po stymulacji zymosanem może być bezpośrednio związane z utratą aktywności peroksydazy glutationowej, co prowadzi do redukcji rozkładu nadtlenu wodoru. Co więcej, niedobór

selenu w diecie myszy i szczurów powodował spadek GSH (glutation) oraz wzrost aktywności wydzielniczej ( $H_2O_2$ ) makrofagów otrzewnowych<sup>208</sup>.

## 2. Cele pracy

Nadrzędnymi celami pracy było określenie:

- zależności między stężeniem selenu a odsetkiem limfocytów T regulatorowych u pacjentek z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy,
- wpływu selenu na markery uszkodzenia i niedoczynności tarczycy (anty-TPO, anty-TG, TSH, fT4 i fT3),

Dodatkowo zbadano stężenie selenu w surowicy krwi obwodowej u pacjentek z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy na terenie Trójmiasta, wpływ suplementacji selenu na tempo jego wzrostu w surowicy krwi u tych kobiet oraz dokonano analizy dostępnej literatury pod kątem bezpieczeństwa jego długotrwałego stosowania.

### 3. Materiał i Metodyka

#### 3.1 Pacjentki

Grupa badana i kontrolna: do badania zakwalifikowano 23 dorosłe kobiety w wieku 18 - 50 lat ze zdiagnozowanym AITD w eutyreozie, objętych opieką lekarzy endokrynologów z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Jako metodę doboru prób do poszczególnych grup zastosowano metodę dorobu losowego systematycznego.

Kryteria włączenia: hipoechogeniczny obraz gruczołu tarczowego w USG, podwyższone miano przeciwciał przeciwko peroksydazie tarczycowej (TPO) i/lub tyreoglobulinie (TG). Osoby z włączonym leczeniem tyroksyną. Kobiety z aktywną hormonalnie czynnością jajników (obecność miesiączki przez 3 ostatnie cykle przed badaniem).

Kryteria wyłączenia: współistniejąca choroba autoimmunizacyjna, endometrioza, przedwczesne wygasanie czynności jajników, palenie tytoniu, przyjmowanie hormonalnej antykoncepcji, ciąża.

Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Gdańsku nr 342/2016.

Karta Informacyjna dla pacjenta oraz Zgoda Pacjenta znajdują się w **Załączniku nr 1**.

Za każdym razem kiedy w pracy pojawia się sformułowanie „grupa z placebo”, oznacza ono grupę osób badaną po trzech miesiącach otrzymywania placebo. Przeprowadzono analizę wyników laboratoryjnych oraz cytometrycznych w punkcie startowym badania oraz po trzech miesiącach przyjmowania placebo przez uczestniczki i nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic między tymi punktami czasowymi.

### 3.2 Schemat badania

U wszystkich uczestniczek badania, przy okazji jednego wkłucia, między szóstym a dziesiątym dniem cyklu menstruacyjnego (ze względu na wpływ estrogenów na liczbę limfocytów T regulatorowych) pobrano krew:

- a) 1x probówka z heparyną litową: profil lipidowy, glukoza (zlecone w Laboratorium Medycznym Bruss grupa Alab sp. z o.o.)
- b) 1x probówka z żelem separującym i aktywatorem krzepnięcia: fT3, fT4, TSH, FSH, estradiol (zlecone w Laboratorium Medycznym Bruss grupa Alab sp. z o.o.)
- c) 3x probówka z inaktywatorem krzepnięcia EDTA K2:
  - morfologia (Laboratorium Medyczne Bruss grupa Alab sp. z o.o.);
  - selen (podwykonawcą tego badania jest LIMBACH LABORATORY Heidelberg - analizę stężenia selenu wykonano metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (ASA lub AAS));
  - badania fenotypu limfocytów CD4<sup>+</sup> oraz komórek T CD25<sup>high</sup>CD4<sup>low</sup>CD3<sup>+</sup> we krwi obwodowej - wykonano, za pomocą cytometrii przepływowej w Laboratorium Katedry i Zakładu Fizjopatologii oraz Zakładu Patologii i Reumatologii Doświadczalnej

Wszystkie badania zlecone zawiera tabela nr 2.

*Tabela 2. Zestawienie analiz laboratoryjnych wykonanych u wszystkich uczestniczek badania.*

1. Morfologia krwi
2. Glukoza na czczo
3. Profil lipidowy (LDL - HDL cholesterol)
4. Tyreotropina (TSH) trzeciej generacji
5. Wolna Trijodotyronina (fT3)
6. Wolna Tyroksyna (fT4)
7. P/C przeciw peroksydazie tarczycowej (anty-TPO)
8. P/C antytyreoglobulinowe (anty-TG)
9. Estradiol
10. FSH
11. Selen

Przebieg badania rozdzielono na poszczególne etapy:

Etap 1:

- oznaczenie stężenia: selenu, glukozy na czczo, morfologii krwi, profilu lipidowego, FSH, estradiolu, hormonów tarczycy (fT3, fT4) tyreotropiny (TSH) oraz przeciwciał przeciwarczycowych (anty- TPO i anty-TG);
- wykonanie izolacji PBMC i oznaczenie liczby oraz odsetka limfocytów CD4<sup>+</sup> i limfocytów T regulatorowych. Oznaczenie wykonywano między 6. a 10. dniem cyklu menstruacyjnego.

Etap 2:

Podawanie suplementu selenu (selenometionina, 200 µg) lub placebo przez trzy kolejne miesiące.

Etap 3:

Po trzech miesiącach suplementacji selenem lub placebo ponowne oznaczenie wszystkich parametrów z etapu 1. Wówczas oznaczenie również wykonywano między 6. a 10. dniem cyklu menstruacyjnego.

### **3.3 Placebo**

Opracowane i wykonane zostało z pomocą wykwalifikowanego farmaceuty z Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zastosowano wegetariańskie kapsułki (ADOX Sp. z o. o.) i skrobię ziemniaczaną jako wypełniacz.

### **3.4 Suplement selenu**

W Polsce za dopuszczenie suplementów do sprzedaży nie odpowiada Główny Inspektor Farmaceutyczny oraz Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, a Główny Inspektor Sanitarny. W rezultacie suplementy traktowane są jak produkt spożywczy, a konsument nie posiada żadnej gwarancji, co do zgodności zawartości składników zadeklarowanych przez producenta

na etykiecie produktu. Stąd w celu wyodrębnienia odpowiedniego suplementu spośród dostępnych na rynku, przeprowadzono odpowiednie testy.

Przebadano 3 próbki suplementów zawierających selenometioninę (każda w deklarowanej dawce 200 µg/kapsułka) od trzech różnych producentów dostępnych na rynku aptecznym w Polsce. Analizę próbek wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS, *ang.* High Performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry) we współpracy z Katedrą Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w celu sprawdzenia rzeczywistej zawartości selenu w porównaniu z tą deklarowaną przez producenta.

Ostatecznie wybrano suplement, w którym zawartość selenu była najbardziej zbliżona do deklarowanej przez producenta.

Uczestniczki badania, po zakwalifikowaniu do odpowiedniej grupy, otrzymywały suplement selenu lub placebo rozdzielone do specjalnych kasetek na leki. W tym celu wybrano wersję tygodniową, posiadającą komory na każdy dzień tygodnia. Uczestniczki badania otrzymały cały komplet kasetek za jednym razem, tuż przed rozpoczęciem suplementacji.

### **3.5 Analiza subpopulacji limfocytów w krwi pełnej**

Od wszystkich osób biorących udział w badaniu pobrano krew w ilości 4 ml, w rannym pobraniu na czczo z żyły łokciowej do probówki z antykoagulantem - EDTA - oraz do probówki z aktywatorem krzepnięcia.

Krew pobrana do probówki z EDTA posłużyła do analizy fenotypu komórek układu odpornościowego – limfocytów T zgodnie z poniższą procedurą.

Skład samodzielnie wykonanych odczynników użytych w procedurze znajduje się w tabeli nr 3.

Tabela 3. Lista oraz skład samodzielnie wykonanych odczynników.

Odczynnik	Skład	Producent
kompletne medium	RPMI-1640	Wszystkie składniki
hodowlane	penicylina 100 U/mL	pochodzą z Sigma
	streptomycyna 100 µg/mL	Chemical Co, USA
	L-glutamina 2mM	
	surowica bydlęca 10%	
	(vol/vol)	

Procedura izolacji PBMC oraz znakowania barwienia powierzchniowego receptorów limfocytów:

1. Krew pobraną na EDTA przechowywano nie dłużej niż 2 godziny od pobrania w temperaturze pokojowej.
2. Następnie rozcieńczono krew przy użyciu PBS (ang. *phosphate sodium buffer*) (1:1) (Sigma Chemical Co., USA), nałożono do próbek wirówkowych na warstwę fikolu (Histopaque™ 1077) (Sigma Chemical Co., USA), aby pod wpływem siły odśrodkowej stworzyć gradient stężeń i móc wyizolować komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.
3. Krew wirowano w wirówce przez 30 minut, przy 2000 obrotów/min w 18°C bez hamulca.
4. Komórki w postaci „obłoczka” pomiędzy warstwą osocza a warstwami fikolu, granulocytów i erytrocytów zebrano za pomocą pipety pasterowskiej i dwukrotnie przepłukano buforem PBS, aby pozbyć się resztek fikolu.
5. Następnie komórki policzono z użyciem kamery hematologicznej Burkera i zawieszono w kompletnym środowisku hodowlanym RPMI 1640 (skład – tabela nr 3.).
6. Komórki rozdzielono po 500 tys. komórek na próbkę.
7. Komórki inkubowano z odpowiednią ilością przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami, przez 30 minut w ciemności, na lodzie. Ilość dodawanych przeciwciał była zgodna z protokołem producenta. Panel barwień cytometrycznych przedstawiono w tabeli nr 4., natomiast charakterystykę wykorzystanych przeciwciał zawiera tabela nr 5.
8. Po inkubacji komórki przepłukano buforem PBS i zwirowano (1400 obrotów/min, przez 5 minut w 15°C).



Procedura znakowania wewnątrzkomórkowych białek w limfocytów krwi obwodowej:  
(dotyczy próbek i przeciwciał zaznaczonych w tabeli nr 4 przy pomocy ‘\*’)

Do znakowania antygenów wewnątrzkomórkowych użyto zestawu True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, San Diego, USA). Jego użycie zapewnia, że procedury związane z utrwalaniem powierzchni komórki i perforacją błony komórkowej nie wpłyną na intensywność fluorescencji uprzednio związanych przeciwciał powierzchniowych.

Przed każdym rozpoczęciem procedury na świeżo mieszano 1 część 4X Fix Concentrate z 3 częściami Fix Diluent. W ten sposób otrzymywano True Nuclear 1X Fix Concentrate.

True Nuclear 1X Perm Buffer został przygotowany poprzez zmieszanie 1 części 10X Perm Buffer i 9 części ddH<sub>2</sub>O (podwójnie destylowana woda).

1. Po wyznakowaniu antygenów powierzchniowych zgodnie z powyższą procedurą dodano 1 mL True Nuclear 1X Fix Concentrate, wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej w ciemności przez około 50 minut.
2. Następnie, do próbek dodano 2 mL True Nuclear 1X Perm Buffer, próbki zwirowano przy 1400 obrotów/min, przez 7 minut w 15°C i zlano nadsącz. Procedurę wykonano w sumie dwukrotnie.
3. Komórki zawieszono w 100 µL True Nuclear 1X Perm Buffer i dodano przeciwciał monoklonalnych, w ilości rekomendowanej przez producenta.
4. Komórki inkubowano przez 30 minut, w ciemności, w temperaturze pokojowej.
5. W następnej kolejności płukano komórki z użyciem PBSu i zwirowano (1400 obrotów/min, przez 7 minut w 15°C).
6. Dokonano odczytu cytometrycznego przy użyciu BD FACSVerser™ (Becton-Dickinson, USA).

Tabela 4. Panel przeciwciał wykorzystanych do oceny immunofenotypu limfocytów T, w tym limfocytów regulatorowych.

nr próbówki	Pacific Blue	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC-Cy7
1.	Helios*	CD3	FOXP3*	CD25	CD26	CD4
2.	CD304*	CD3	FOXP3*	CD25	CD26	CD4
3.#	---	CD3	FOXP3*	CD25	CD26	CD4
4.#	Helios*	---	FOXP3*	CD25	CD26	CD4
5.#	Helios*	CD3	---	CD25	CD26	CD4
6.#	CD304*	CD3	---	CD25	CD26	CD4
7.#	CD304*	CD3	FOXP3*	---	CD26	CD4
8.#	CD304*	CD3	FOXP3*	CD25	---	CD4
9.#	CD304*	CD3	FOXP3*	CD25	CD26	---

\* procedura barwienia wewnątrzkomórkowego

# oznaczenia FMO

Tabela 5. Panel przeciwciał monoklonalnych użytych do oceny immunofenotypu subpopulacji limfocytów T regulatorowych.

Przeciwciało	Fluorochrom	Klon	Producent
<b>Anti-human CD3</b>	<i>FITC</i>	UCHT1	BioLegend
<b>Anti-human CD4</b>	<i>APC/Cy7</i>	A161A1	BioLegend
<b>Anti-human CD25</b>	<i>PE/Cy5</i>	BC96	BioLegend
<b>Anti-human CD26</b>	<i>PE/Cy7</i>	BA5B	BioLegend
<b>Anti-human FOXP3</b>	<i>PE</i>	259D	BioLegend
<b>Anti-human Helios</b>	<i>Pacific Blue™</i>	22F6	BioLegend
<b>Anti-human CD304 (Neuropilin-1)</b>	<i>Pacific Blue™</i>	12C2	BioLegend

### 3.6 Odczyt cytometryczny

Fenotyp komórek analizowano na cytometrze przepływowym BD FACS Verse™ (Becton-Dickinson, USA). Podczas odczytu na cytometrze dla każdej badanej próbki z bramki limfocytarnej zbierano 20 tysięcy komórek. Analizę danych cytometrycznych przeprowadzono w programie FloJo V10.6.2 (FlowJo, LCC).

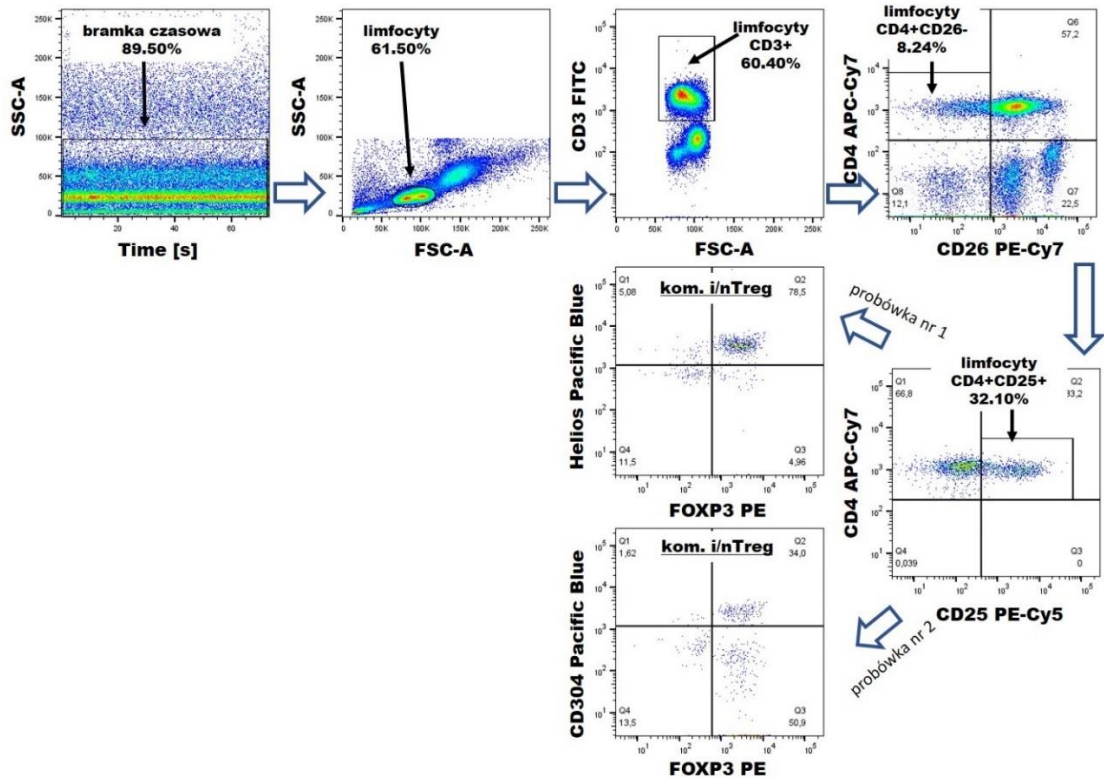
W obu punktach czasowych (przed suplementacją i po 3 miesiącach suplementacji) oznaczano fenotyp komórek spoczynkowych (*ex vivo*). W krwi określano procentową zawartość poszczególnych populacji komórek w puli wszystkich limfocytów. Oceniano odsetek komórek w populacji: limfocytów CD3<sup>+</sup>, limfocytów pomocniczych CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> i komórek regulatorowych o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>. Populacja limfocytów T krwi obwodowej CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> cechuje się obniżoną ekspresją białek powierzchniowych CD4 oraz wysoką ekspresją cząsteczek CD25, jest to populacja spełniająca obecne kryteria fenotypowe identyfikujące komórki T regulatorowe przy jednoczesnej ekspresji dużych ilości czynnika transkrypcyjnego FOXP3<sup>209</sup>.

Dodatkowo, uwzględniono populację posiadającą na swojej powierzchni receptor CD26, który jest negatywnym markerem selekcyjnym dla ludzkich komórek Treg.

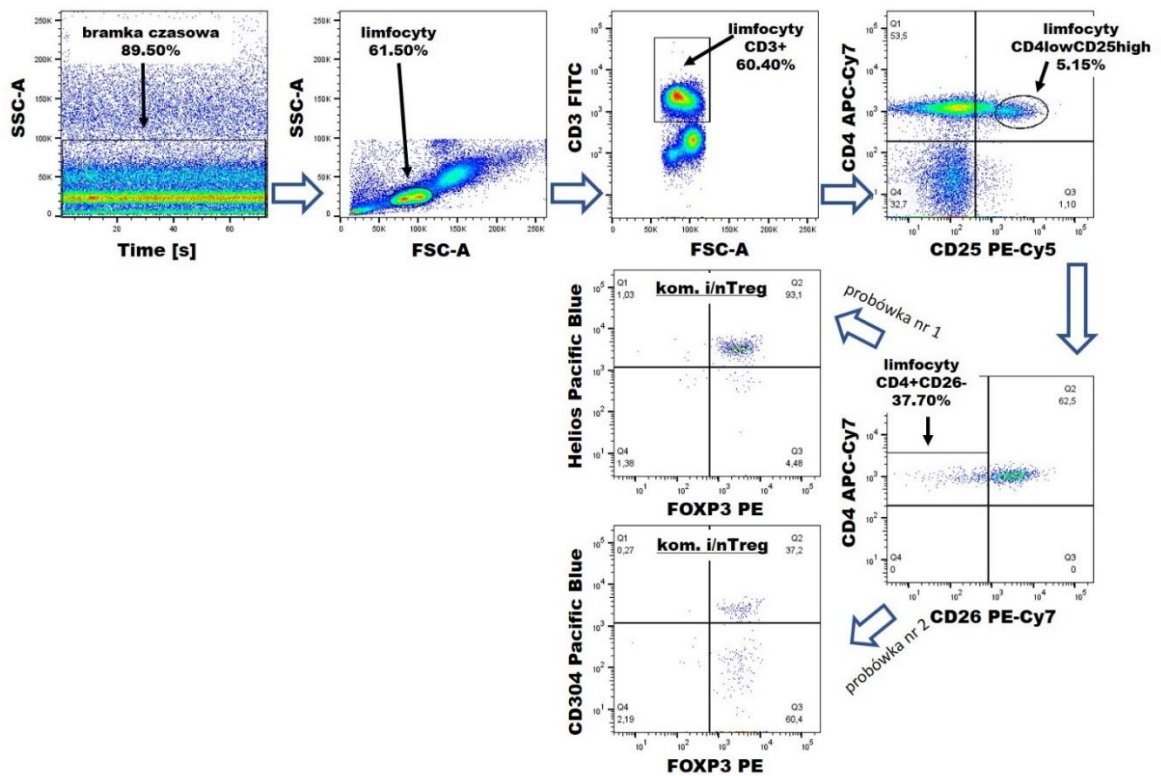
Następnie - wśród limfocytów CD3<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>CD26<sup>-</sup> wyróżniono dwie subpopulacje komórek regulatorowych (naturalną i indukowaną), przy użyciu dwóch markerów wewnątrzkomórkowych: CD304 oraz Helios gdzie obecność obu tych markerów jest charakterystyczna dla komórek nTreg, a ich brak odzwierciedla obecność limfocytów iTreg.

Kontrolą negatywną pozwalającą na prawidłową identyfikację komórek pozytywnych pod względem obecności danego receptora / białka było FMO (ang. *fluorescence minus one*). FMO jest metodą stosowaną w wielokolorowych analizach cytometrycznych, w których komórka jest barwiona jednocześnie wieloma fluorochromami. Kontrole FMO są miarą rozprzestrzeniania się fluorescencji w danym kanale, przedstawiają rozkład komórek negatywnych i pozytywnych pod względem braku/obecności danego receptora / białka i pozwalają na kompensację. Aby wygenerować kontrolę FMO, próbka jest barwiona przeciwciałami z wszystkimi fluorochromami użytymi w protokole doświadczenia z wyjątkiem tego, względem którego chcemy określić granicę między negatywną i pozytywną populacją.

Schematyczny sposób bramkowania limfocytów CD4<sup>+</sup> oraz T regulatorowych przedstawiono na Rycinach nr 3 i 4.



Rycina 3. Schemat bramkowania limfocytów T regulatorowych z wykorzystaniem komórek CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>



Rycina 4. Schemat bramkowania limfocytów T regulatorowych z wykorzystaniem populacji CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>

### **3.7 Zastosowane metody analizy statystycznej danych**

Analizę statystyczną wyników wykonano z użyciem programów GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc. USA) oraz pakietu Statistica wersja 13.1 (StatSoft Polska).

Na podstawie wyników testu Shapiro-Wilka uznano, iż otrzymane wyniki nie spełniają założeń rozkładu normalnego, stąd do analizy wyników użyto testów nieparametrycznych. Do porównania pomiędzy sobą grup zależnych, czyli pacjentów stosujących selen wykorzystano test Wilcoxon dla par obserwacji. Natomiast w celu porównania grup niezależnych, czyli przyjmujących selen i placebo użyto testu U Manna-Whitneya.

Na wykresach zaznaczono medianę z rozstępem międzykwartylowym. W tabelach dotyczących porównania wyników badań laboratoryjnych zaznaczono mediany wraz z pierwszym i trzecim kwartylem. Dane dotyczące wieku oraz BMI podano jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe.

Za różnice istotne statystyczne uznawano wartości  $p < 0,05$ .

## 4. Wyniki

### 4.1 Charakterystyka badanych grup pacjentek

Do badania ostatecznie włączono 19 kobiet do części badań laboratoryjnych oraz 18 do części immunologicznej (różnica wynika z jednorazowej awarii cytometru) – wszystkie osoby - chorujące na autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy, leczone L-tyroksyną oraz będące w eutyreozie. Grupę z selenem w badaniach immunologicznych stanowiło 9 kobiet, grupę z placebo 10. Średni wiek badanych w grupie z selenem wynosił  $31,6 \pm 9,5$  lat, gdzie najmłodsza z uczestniczek miała 19 lat, a najstarsza 47 lat. Średni wiek osób badanych w grupie z placebo wynosił  $32,6 \pm 8,98$  lat, w tej grupie najmłodsza uczestniczka miała 21 lat, a najstarsza 51 lat. Obie grupy nie różniły się istotnie rozkładem wieku.

**Wszystkie badane parametry laboratoryjne i immunologiczne pomiędzy grupą suplementującą selen oraz grupą otrzymującą placebo nie różniły się statystycznie istotnie między sobą w punkcie początkowym projektu.**

**W przypadku osób przyjmujących placebo również wszystkie badane parametry laboratoryjne i immunologiczne nie różniły się statystycznie istotnie między sobą w punkcie początkowym jak i w punkcie końcowym, czyli po trzech miesiącach przyjmowania placebo. Z tego też powodu w wynikach pracy nie zostały umieszczone te dane.**

Wskaźnik masy ciała BMI (ang. *body mass index*) uczestniczek grupy z selenem wynosił  $26 \pm 6,4$  kg/m<sup>2</sup>, wskazując średnio na lekką nadwagę. Jednak biorąc pod uwagę najniższą oraz najwyższą wartość widać dużą rozbieżność w wartościach, gdyż najniższą wartością BMI było 18,8 kg/m<sup>2</sup>, a najwyższą 39,8 kg/m<sup>2</sup>. Natomiast grupie z placebo BMI wyniosło  $25,6 \pm 3,3$  kg/m<sup>2</sup>, również wskazując na lekką nadwagę. Z kolei w tej grupie najniższa wartość BMI wyniosła 20,7 kg/m<sup>2</sup>, a najwyższa 30,8 kg/m<sup>2</sup>. Obie grupy nie różniły się istotnie pod względem BMI.

Dane porównawcze przedstawiono w Tabeli nr 6.

Tabela 6. Podstawowa charakterystyka pacjentek w punkcie startowym grup: z selenem i placebo, obejmująca wiek oraz BMI, test U Manna-Whitneya.

Parametry	Grupa z selenem [n=9]	Grupa z placebo [n=10]	Istotność (p)
Wiek [lata]	31,6 ± 9,5	32,6 ± 8,98	0,7327
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	26 ± 6,4	25,6 ± 3,3	0,6759

#### 4.2 Porównanie wyników badań laboratoryjnych z krwi

Wszystkie podstawowe parametry morfologii krwi mieściły się w zakresach prawidłowych we wszystkich badanych grupach (tabela z wartościami referencyjnymi laboratorium - **Załącznik nr 2**). Zaobserwowano jednak istotne statystycznie różnice w składzie procentowym oraz parametrach bezwzględnych eozynocytów po zakończeniu suplementacji pomiędzy grupą przyjmującą selen, a grupą z placebo. W grupie z selenem wspomniane parametry były znamienne wyższe.

Dane porównawcze przedstawiono w Tabelach 7-10.

Tabela 7. Porównanie wyników badań morfologii krwi obwodowej żyłnej pomiędzy pacjentkami przyjmującymi selen [n=9], przed badaniem i po 3-miesięcznej suplementacji (Se przed vs. Se po), test Wilcoxon.

Parametr	Mediana		Q25-Q75		Istotność (p)
	Se przed	Se po	Se przed	Se po	
Leukocyty [G/l]	6,88	6,89	5,395-7,36	5,14-7,495	0,9102
Limfocyty [G/l]	2,150	2,160	1,87-2,705	1,69-2,37	0,4453
% limfocytów	35	33	29,65-41,85	30,75-36,7	0,4258
Monocyty [G/l]	0,56	0,57	0,355-0,61	0,39-0,69	0,1250
% monocytów	7,6	8,4	6,65-8,75	7,3-9,55	0,0977
Neutrocyty [G/l]	3,51	3,68	2,805-4,125	2,590-4,170	0,6406
% neutrocytów	51,0	54,4	45,95-57,7	50,05-57,05	0,4961
Eozynocyty [G/l]	0,18	0,15	0,13-0,235	0,11-0,28	0,3750
% eozynocytów	2,8	2,7	2,05-4,2	1,6-4,25	0,5547
Bazocyty [G/l]	0,06	0,06	0,04-0,07	0,045-0,07	0,99
% bazocytów	0,9	0,9	0,65-1,2	0,6-1,1	0,8047
Erytrocyty [T/l]	4,58	4,5	4,34-4,835	4,32-4,735	0,5664

<b>Hemoglobina [g/dl]</b>	13,8	13,4	12,65-14,2	13,1-13,95	0,9766
<b>Hematokryt [%]</b>	41,4	39,7	39-42,35	38,45-41,2	0,6523
<b>MCV [fl]</b>	87,5	87,4	85,2-91,5	86,25-90,15	0,6328
<b>MCH [pg]</b>	29,8	30,2	28,15-30,3	28,75-30,4	0,3672
<b>MCHC [g/dl]</b>	33,5	33,7	32,3-34,25	32,95-34,65	0,125
<b>RDW [%]</b>	13,0	12,7	12,35-14,35	12,1-13,7	0,2617
<b>Płytki krwi [G/l]</b>	308	272	256,5-380,5	246,5-364	0,2031
<b>MPV [fl]</b>	10,3	10,4	10,15-11,0	9,85-11,05	0,6719

Tabela 8. Porównanie wyników pozostałych badań laboratoryjnych z krwi obwodowej żyłnej pomiędzy pacjentkami przyjmującymi selen [n=9], przed badaniem i po 3-miesięcznej suplementacji (Se przed vs. Se po), test Wilcoxon.

### Pozostałe wyniki badań laboratoryjnych

Parametr	Mediana		Q25-Q75		Istotność (p)
	Se przed	Se po	Se przed	Se po	
<b>Glukoza [mg/dl]</b>	85	89	82-88,5	83,5-93	0,2969
<b>Triglicerydy [mg/dl]</b>	83	82	64,5-114,0	67,0-120,0	0,8125
<b>HDL [mg/dl]</b>	57	56	53,0-67,5	47,5-63,0	0,4102
<b>LDL [mg/dl]</b>	120	117	79,0-134,0	70,5-146,0	0,7969
<b>fT3 [pmol/l]</b>	3,84	3,90	3,7-4,04	3,36-4,135	0,99
<b>fT4 [pmol/l]</b>	12,78	11,84	10,53-13,42	10,71-12,91	0,99
<b>TSH [mIU/l]</b>	1,067	2,111	0,672-1,436	1,12-2,417	0,0742
<b>Anty-TPO [IU/ml]</b>	295,9	248,7	84,91-425,9	116,1-445,0	0,4961
<b>Anty-TG [IU/ml]</b>	23,08	26,54	12,46-613,8	26,54-553,0	0,99
<b>FSH [mIU/ml]</b>	5,25	5,0	3,7-7,505	3,13-6,380	0,4961
<b>Estradiol [pmol/l]</b>	210	265	140,0-401,5	106,5-437,5	0,7344
<b>Selen [µg/l]</b>	79	188	68,5-86,5	154,0-243,0	<b>0,0039</b>



Tabela 9. Porównanie wyników morfologii krwi obwodowej żyłnej pomiędzy pacjentkami przyjmującymi selen [n=9], a grupą z placebo [n=10] (Se vs. P), po trzech miesiącach badania, test U Manna-Whitneya.

Parametr	Mediana		Q25-Q75		Istotność (p)
	Se	P	Se	P	
	<i>Leukocyty [G/l]</i>	6,89	5,685	5,14-7,495	
<i>Limfocyty [G/l]</i>	2,160	1,85	1,87-2,705	1,318-2,228	0,4002
<i>% limfocytów</i>	33	33,5	29,65-41,85	26,83-37,75	0,9682
<i>Monocyty [G/l]</i>	0,57	0,415	0,39-0,69	0,385-0,595	0,2860
<i>% monocytów</i>	8,4	7,75	7,3-9,55	6,75-9,75	0,6176
<i>Neutrocyty [G/l]</i>	3,68	3,33	2,590-4,170	2,59-3,798	0,447
<i>% neutrocytów</i>	54,4	56,3	50,05-57,05	49,55-63,9	0,6038
<i>Eozynocyty [G/l]</i>	0,15	0,09	0,11-0,28	0,04-0,13	<b>0,0404</b>
<i>% eozynocytów</i>	2,7	1,45	1,6-4,25	0,7-2,5	<b>0,023</b>
<i>Bazocyty [G/l]</i>	0,06	0,045	0,045-0,07	0,0275-0,0725	0,3446
<i>% bazocytów</i>	0,9	0,8	0,6-1,1	0,475-1,1	0,4584
<i>Erytrocyty [T/l]</i>	4,5	4,645	4,32-4,735	4,243-4,828	0,7968
<i>Hemoglobina[g/dl]</i>	13,4	13,75	13,1-13,95	12,43-14,43	0,8267
<i>Hematokryt [%]</i>	39,7	40,6	38,45-41,2	37,63-42,33	0,8892
<i>MCV [fl]</i>	87,4	88,25	86,25-90,15	83,25-91,48	0,9682
<i>MCH [pg]</i>	30,2	30,15	28,75-30,4	29,03-30,83	0,8262
<i>MCHC [g/dl]</i>	33,7	33,5	32,95-34,65	32,9-35,45	0,985
<i>RDW [%]</i>	12,7	12,95	12,1-13,7	12,58-13,28	0,7915
<i>Płytki krwi [G/l]</i>	272	246	246,5-364	226,8-281	0,0985
<i>MPV [fl]</i>	10,4	10,95	9,85-11,05	10,48-12,0	0,0819

Tabela 10. Porównanie wyników pozostałych badań laboratoryjnych z krwi obwodowej żyłnej pomiędzy pacjentkami przyjmującymi selen [n=9], a grupą z placebo [n=10] (Se vs. P), po trzech miesiącach badania, test U Manna-Whitneya.

Parametr	Pozostałe wyniki badań laboratoryjnych				
	Mediana		Q25-Q75		Istotność (p)
	Se	P	Se	P	
Glukoza [mg/dl]	89	89	83,5-93	83,75-95,25	0,6755
Triglicerydy[mg/dl]	82	70	67,0-120,0	58,0-83,75	0,218
HDL [mg/dl]	56	58,5	47,5-63,0	55,5-66,25	0,4085
LDL [mg/dl]	117	138	70,5-146,0	105,5-151,8	0,2871
fT3 [pmol/l]	3,90	4,22	3,36-4,135	3,8-4,628	0,211
fT4 [pmol/l]	11,84	12,61	10,71-12,91	11,83-13,86	0,2775
TSH [mIU/l]	2,111	1,347	1,12-2,417	0,6153-2,113	0,211
Anty-TPO [IU/ml]	248,7	203,4	116,1-445,0	14,42-406,8	0,6607
Anty-TG [IU/ml]	26,54	88,05	26,54-553,0	20,18-547,5	0,6194
FSH [mIU/ml]	5,0	5,225	3,13-6,380	3,958-6,755	0,6038
Estradiol [pmol/l]	265	215	106,5-437,5	193,0-574,0	0,9243
Selen [µg/l]	188	92,5	154,0-243,0	78,75-102,0	<b>&lt;0,0001</b>

#### 4.2.1 Porównanie stężenia selenu, przed i po suplementacji oraz pomiędzy grupą z selenem a grupą z placebo

Wykazano istotne statystycznie różnice w stężeniu selenu w surowicy krwi, zarówno w grupie przyjmującej selen przed suplementacją i po jej zakończeniu ( $p=0,0039$ ) i pomiędzy grupami: przyjmującą selen i placebo ( $p<0,0001$ ). Spośród wszystkich osób, które początkowo zostały zakwalifikowane do badania [n=23], jedynie u pięciu z nich (21,7%) odnotowano stężenie Se poniżej normy. Zatem u przeważającej liczby kobiet zakwalifikowanych do badania (78,3%) stężenie selenu było w normie. Średnio wynosiło ono  $83,522 \pm 22,54$  µg/l.

Z kolei 3-miesięczna suplementacja selenem skutkowała przekroczeniem jego normy w surowicy krwi u wszystkich pacjentek go przyjmujących. Mediana wzrostu stężenia selenu u tych osób wyniosła 188 µg/l, przy czym wszystkie osoby przekroczyły normę. Średnio osiągnięto wzrost o 139%, przy czym najwyższa jednostkowa zmiana wyniosła aż 271%.

Dane porównawcze przedstawiono w Tabelach 8 i 10.

#### **4.2.2 Porównanie wpływu selenu na poziom markerów uszkodzenia i niedoczynności tarczycy, przed i po suplementacji oraz pomiędzy grupą z selenem a grupą z placebo**

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach TSH, fT3, fT4 oraz przeciwciał anti-TPO i anti-TG w grupie przyjmującej selen (przed i po suplementacji), ani pomiędzy grupą przyjmującą selen a grupą z placebo.

Dane porównawcze przedstawiono w Tabelach 8 i 10.

#### **4.2.3 Porównanie wpływu selenu na pozostałe parametry metaboliczne**

Nie wykazano negatywnego wpływu suplementacji selenem na pozostałe parametry metaboliczne, takie jak: poziom glukozy, FSH oraz estradiolu oraz profil lipidowy.

Dane porównawcze przedstawiono w Tabelach 8 i 10.

### **4.3 Cytometryczna ocena składu procentowego subpopulacji limfocytów**

W obu grupach oznaczano fenotyp limfocytów z krwi pełnej, obwodowej, żyłnej, w komórkach spoczynkowych (*ex vivo*) pacjentek z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy w porównywalnym wieku, którym podawano selen lub placebo przez trzy miesiące.

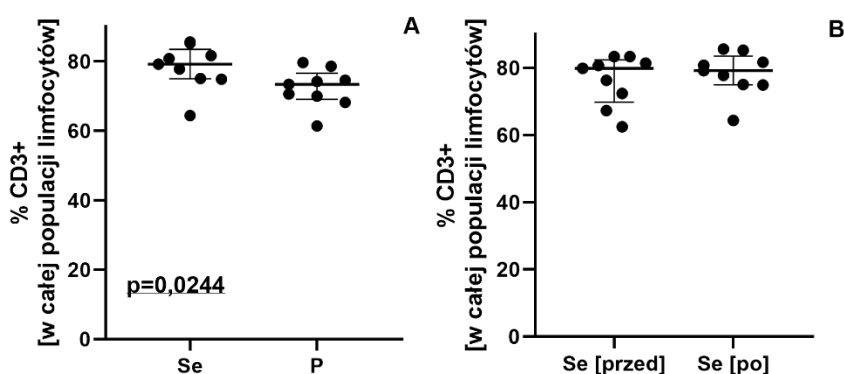
Próbki krwi analizowano pod kątem procentowej zawartości poszczególnych populacji komórek T (CD3<sup>+</sup>) oraz pomocniczych (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) w puli wszystkich limfocytów. Następnie sprawdzono liczebność limfocytów T regulatorowych (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) z wyszczególnieniem populacji pozytywnych i negatywnych pod względem występowania antygeny CD26 na tych komórkach<sup>210</sup>. Subpopulację limfocytów regulatorowych badano również pod kątem obecności markerów wewnątrzkomórkowych Helios i CD304 (Neuropilin-1), determinujących postać indukowaną tych komórek (iTregs) (FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>/FOXP3<sup>+</sup>CD304<sup>-</sup>), bądź naturalną (nTregs) (FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup>CD304<sup>+</sup>)<sup>211</sup>. Dodatkowo dane próbki analizowano pod kątem występowania komórek o fenotypie CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup><sup>209</sup>.

Badaniem fenotypu *ex vivo* objęto dwie grupy: każda liczyła 9 pacjentek cierpiących na AITD, otrzymujących suplement selenu lub placebo. Krew od uczestniczek projektu pobierano między szóstym a dziesiątym dniem cyklu

miesiączkowego, ze względu na znamieny wpływ poziomu estrogenów na immunoregulację u kobiet. Komórki T regulatorowe osiągają maksymalną liczbę w późnym okresie fazy folikularnej, czyli tuż przed owulacją. A następnie dochodzi do dramatycznej redukcji odsetka Treg podczas fazy lutealnej<sup>212</sup>.

#### 4.3.1 Cytometryczna ocena składu procentowego limfocytów T i pomocniczych w grupie pacjentek z AITD przyjmujących suplement selenu oraz w grupie z placebo

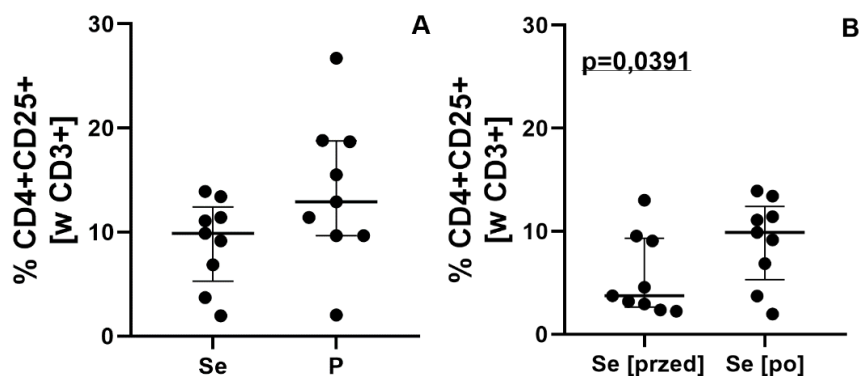
Wśród wszystkich limfocytów określono udział populacji CD3<sup>+</sup> oraz CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w odsetku komórek CD3<sup>+</sup> pomiędzy grupą przyjmującą selen a grupą z placebo ( $p=0,0244$ ) (Ryc. 5A). Takiej zależności nie odnotowano jednak w grupie przyjmującej selen, przed i po suplementacji (Ryc. 5B).



Rycina 5. Porównanie odsetka limfocytów T spośród wszystkich limfocytów, pomiędzy grupą suplementującą selen (po suplementacji) [ $n=9$ ] a grupą przyjmującą placebo [ $n=9$ ] (A), oraz w grupie suplementującej selen - przed i po suplementacji (B); test U Manna-Whitneya (A) oraz Wilcoxon (B)

W populacji CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> wyodrębnionych z puli wszystkich limfocytów nie wykazano istotnie statystycznych różnic w obu grupach.

Natomiast wśród komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> wyodrębnionych z puli limfocytów CD3<sup>+</sup> wykazano znamieny procentowy ich wzrost w grupie pacjentek suplementujących selen - po zakończeniu 3-miesięcznej suplementacji selenem ( $p=0,0391$ ) (Ryc. 6A), czego nie zaobserwowano pomiędzy grupą przyjmującą selen a grupą przyjmującą placebo (Ryc. 6B).

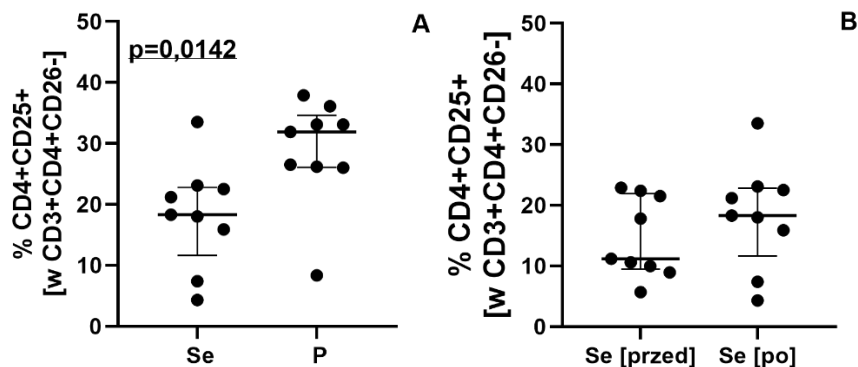


Rycina 6. Porównanie odsetka komórek  $CD4^+CD25^+$  wśród limfocytów T, pomiędzy grupą suplementującą selen (po suplementacji) [ $n=9$ ] (Se) a grupą przyjmującą placebo [ $n=9$ ] (A), oraz w grupie suplementującej selen - przed i po suplementacji (B); test U Manna-Whitneya (A) oraz test Wilcoxon (B)

#### 4.3.2 Cytometryczna ocena składu procentowego limfocytów T regulatorowych w grupie pacjentek z AITD przyjmujących suplement selenu oraz w grupie z placebo

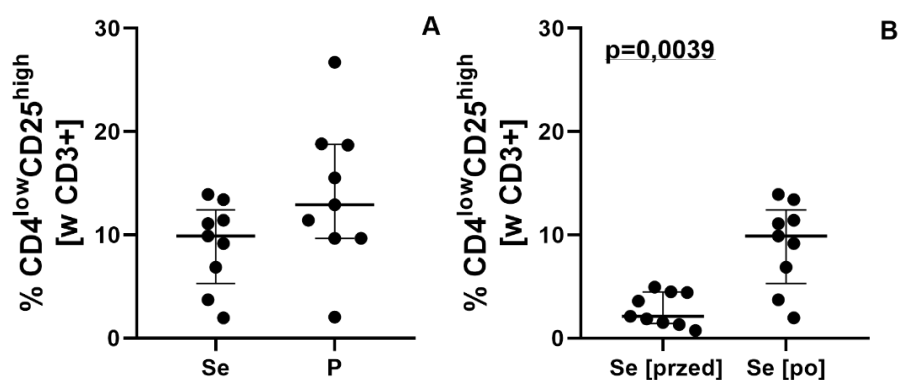
Analizowano również udział subpopulacji  $CD4^+CD26^-$  wśród komórek  $CD3^+$ , jednakże w żadnej z badanych grup nie wykazano istotnych statystycznie różnic.

Natomiast analiza subpopulacji  $CD4^+CD25^+$  wyodrębniona z puli komórek  $CD3^+CD4^+CD26^-$  wykazała znamiennie obniżony odsetek tych limfocytów w grupie pacjentek suplementujących selen w porównaniu do grupy suplementującej placebo ( $p=0,0142$ ) (Ryc. 7A), istotnej różnicy nie zaobserwowano w grupie przyjmującej selen przed i po zakończeniu suplementacji (Ryc. 7B).



Rycina 7. Porównanie odsetka komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> wśród komórek CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup> pomiędzy grupą suplementującą selen (po suplementacji) a grupą przyjmującą placebo [n=9] (A) oraz w grupie suplementującej selen - przed i po suplementacji [n=9] (B); testy U Manna-Whitneya (A) oraz Wilcoxona (B)

W toku dalszej analizy wykazano znamienne podwyższenie ( $p=0,0039$ ) odsetka limfocytów T regulatorowych o fenotypie CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> w grupie przyjmującej selen, po zakończeniu suplementacji (Ryc. 8B). Nie wykazano podobnej istotności pomiędzy grupami: suplementującą selen i przyjmującą placebo (Ryc. 8A).



Rycina 8. Porównanie odsetka komórek CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> wyodrębnionych z puli komórek CD3<sup>+</sup> pomiędzy grupą suplementującą selen (po suplementacji) i grupą przyjmującą placebo [n=9] (A) oraz w grupie przyjmującej selen - przed i po suplementacji [n=9] (B); testy U Manna-Whitneya (A) oraz Wilcoxona (B)

W niniejszym badaniu wzięto pod uwagę również ekspresję markerów wewnątrzkomórkowych Helios i CD304 (Neuropilin-1) w puli komórek o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>. Obecność tych markerów pozwala różnicować limfocyty T

regulatorowe na naturalne (nTregs - CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>Helios<sup>+</sup>/CD304<sup>+</sup>) i indukowane (iTregs - CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>Helios<sup>-</sup>/CD304<sup>+</sup>). W niniejszej analizie nie wykazano znamienne istotnych różnic w odsetku tych subpopulacji w obu badanych grupach.

Dane porównawcze przedstawiono w Tabeli nr 11.

*Tabela 11. Porównanie odsetków komórek T regulatorowych pod kątem subpopulacji Helios i CD304, w grupie pacjentek suplementujących selen: przed i po suplementacji [n=9] oraz pomiędzy pacjentkami suplementującymi: selen (po suplementacji) i placebo [n=9]; testy U Manna-Whitneya oraz Wilcoxon.*

% komórek	Mediana (Q25-Q75)			Istotność statystyczna (p)	
	Se (przed)	Se (po)	P	Se vs. P	Se vs. Se
<b>FOXP3<sup>+</sup></b>	0,9	0,27	0,0	0,6048	0,6523
<b>CD304<sup>+</sup></b>	(0,12-2,05)	(0,0-1,56)	(0,0-1,015)		
<b>(nTreg)</b>					
<b>FOXP3<sup>+</sup> CD304<sup>-</sup></b>	77,0	76,1	80,5	0,9314	0,9102
<b>(iTreg)</b>	(60,85-90,35)	(71,25-83,85)	(59,75-85,9)		
<b>FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup></b>	59,3	61,6	61,0	0,5457	0,8203
<b>(nTreg)</b>	(51,25-85,2)	(57,45-70)	(1,075-73,5)		
<b>FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup></b>	8,9	11,3	14,3	0,1615	0,99
<b>(iTreg)</b>	(6,44-25,75)	(7,56-13,3)	(9,3-59,4)		

#### 4.4 Charakterystyka grupy badanej po włączeniu suplementacji selenem

Jednostkowa analiza odpowiedzi wybranych elementów układu immunologicznego na zastosowany suplement selenu u uczestniczek badania została zobrazowana na rycinach 9-17, z kolei tabela 12. zawiera legendę symboli odpowiadających kolejnym pacjentkom, przedstawionych na tych rycinach.

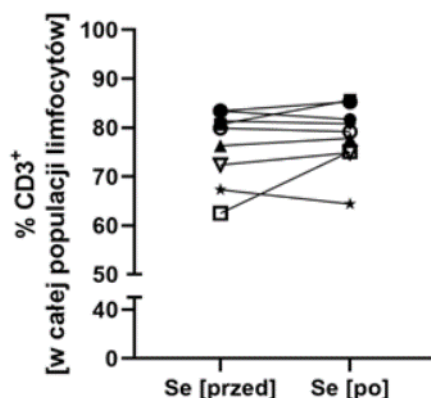
**Do niniejszej analizy włączono tylko pacjentki, które otrzymywały selen. Wynika to z faktu, iż między grupami z selenem a placebo w punkcie startowym nie wykazano istotnych różnic.**

*Tabela 12. Lista pacjentek w grupie przyjmującej selen. W kolumnie znak przedstawiono symbol, który charakteryzuje pacjentkę na grafach przed i po suplementacji.*

	Znak	Charakterystyka (wiek/ BMI)
Pacjentka 1	●	34/ 24,3 (norma)
Pacjentka 2	■	25/ 26,6 (nadwaga)
Pacjentka 3	▲	47/ 21,4 (norma)
Pacjentka 4	▽	44/ 39,8 (otyłość II stopnia)
Pacjentka 5	◆	19/ 20,6 (norma)
Pacjentka 6	□	24/ 26 (nadwaga)
Pacjentka 7	○	26/ 25 (nadwaga)
Pacjentka 8	★	36/ 31,5 (otyłość I stopnia)
Pacjentka 9	◎	29/ 18,8 (norma)

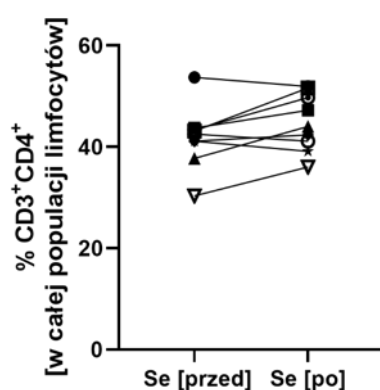


Przyjmowanie selenu u większej części badanych (5 osób) spowodowało wzrost odsetka limfocytów  $CD3^+$ , u czterech pozostałych odnotowano spadek. Nie zauważono związku z wiekiem czy masą ciała w tym przypadku (Ryc. 9).



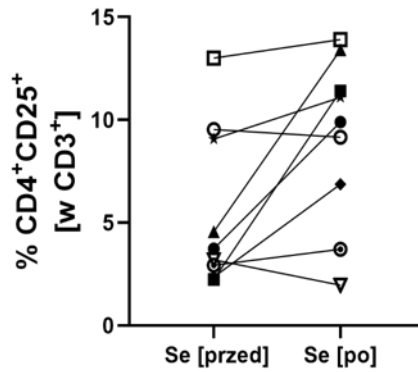
Rycina 9. Graficzne przedstawienie osiągniętych odsetków komórek  $CD3^+$  wyodrębnionych z całej populacji limfocytów, u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxon dla par obserwacji

Podobną do tej powyższej zależność można zauważyć w przypadku odsetka komórek  $CD3^+CD4^+$  wyodrębnionych z puli wszystkich limfocytów. Tutaj również rozkład osób, które zareagowały wzrostem lub spadkiem odsetka rozłożył się mniej więcej po połowie. Podobnie jak w powyższej analizie, nie wykazano wpływu masy ciała lub wieku na osiągnięty wynik (Ryc. 10).



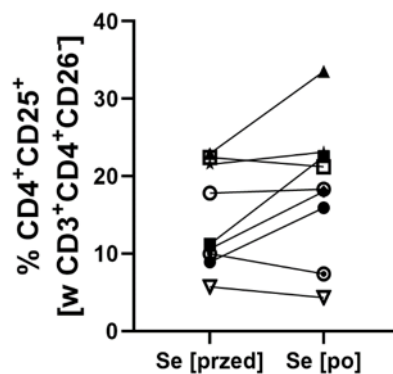
Rycina 10. Graficzne przedstawienie osiągniętych odsetków komórek  $CD3^+CD4^+$  wyodrębnionych z puli wszystkich limfocytów, u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxon dla par obserwacji

W analizie wpływu selenu na subpopulację komórek  $CD4^+CD25^+$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^+$ , jedynie u dwóch osób zanotowano nieznaczny spadek ich odsetka. Być może warto zauważyć, że obie te osoby charakteryzowały się nadwagą, przy czym istotne jest, że nie były to jedyne osoby w grupie z podwyższonym BMI a więc nie można jednoznacznie powiązać ze sobą tych dwóch zjawisk (Ryc. 11).



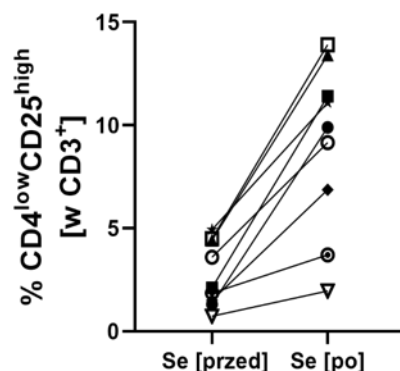
Rycina 11. Graficzne przedstawienie osiągniętych odsetków komórek  $CD4^+CD25^+$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^+$ , u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxona dla par obserwacji

W analizie wpływu selenu na komórki  $CD4^+CD25^+$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^+CD4^+CD26^+$ , jedynie u trzech osób zanotowano nieznaczny spadek ich odsetka. Dwie z trzech z tych osób charakteryzowały się nadwagą. Natomiast największy wzrost odsetka badanej populacji zanotowano u osób najstarszych w tej grupie (Ryc. 12).



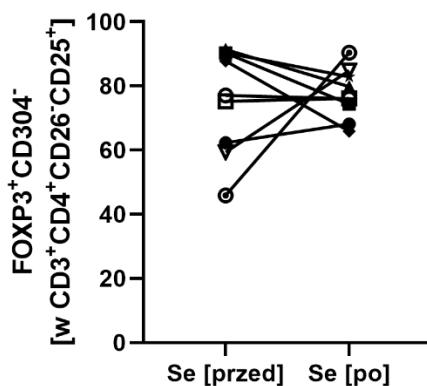
Rycina 12. Graficzne przedstawienie osiągniętych odsetków komórek  $CD4^+CD25^+$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^+CD4^+CD26^+$ , u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxona dla par obserwacji

Analiza wpływu przyjmowanego selenu na procent komórek  $CD4^{low}CD25^{high}$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^{+}$ , wykazała bardzo jednorodną reakcję. W tym przypadku u wszystkich badanych zanotowano duży wzrost odsetka tych komórek (Ryc. 13).



Rycina 13. Graficzne przedstawienie osiągniętych odsetków komórek  $CD4^{low}CD25^{high}$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^{+}$ , u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxon dla par obserwacji

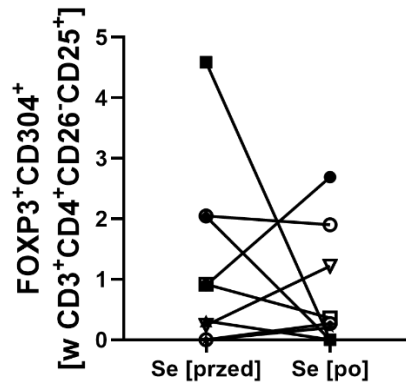
Z kolei analiza osiągniętych w badaniu odsetków komórek  $FOXP3^{+}CD304^{-}$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^{+}CD4^{+}CD26^{-}CD25^{+}$ , wykazała duże zróżnicowanie i brak zależności od wieku czy masy ciała (Ryc. 14).



Rycina 14. Graficzne przedstawienie osiągniętych odsetków komórek  $FOXP3^{+}CD304^{-}$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^{+}CD4^{+}CD26^{-}CD25^{+}$ , u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxon dla par obserwacji

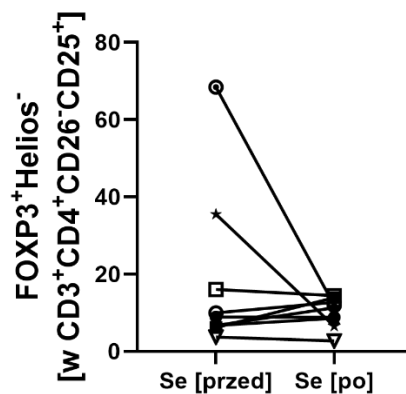
Podobnie jak w przypadku tzw. indukowanych komórek regulatorowych opisywanych fenotypem  $FOXP3^{+}CD304^{-}$ , w jednostkowej analizie wpływu selenu na subpopulację  $FOXP3^{+}CD304^{+}$  wyodrębnionych z puli limfocytów  $CD3^{+}CD4^{+}CD26^{-}$

CD25<sup>+</sup>, wykazano bardzo zróżnicowaną odpowiedź. Największy spadek odsetka tej populacji zauważono u najstarszych osób w tej grupie, o prawidłowej masie ciała (Ryc. 15).



Rycina 15. Graficzne przedstawienie osiągniętych odsetków komórek FOXP3<sup>+</sup>CD304<sup>+</sup> wyodrębnionych z puli limfocytów CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>, u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxon dla par obserwacji

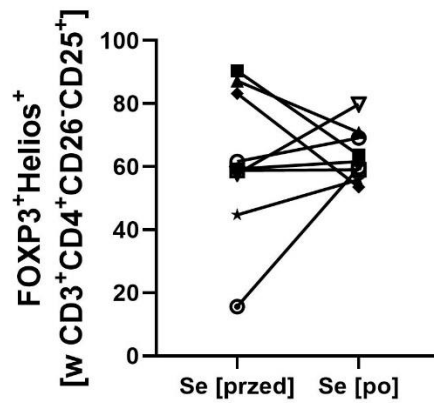
Jednostkowa analiza wpływu selenu na osiągnięte odsetki komórek FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup> wyodrębnionych z puli limfocytów CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>, wykazała duże zróżnicowanie, natomiast nie było ono zależne od wieku czy masy ciała badanych (Ryc. 16).



Rycina 16. Graficzne przedstawienie osiągniętych odsetków komórek FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup> wyodrębnionych z puli limfocytów CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>, u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxon dla par obserwacji

Z kolei analiza wpływu selenu na osiągnięte odsetki tzw. komórek nTreg opisywanych fenotypem FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> wyodrębnionych z puli limfocytów CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>, wykazała bardzo duże zróżnicowanie. U osób o niskich

początkowych odsetkach tych komórek osiągnęły wzrost, natomiast u osób o wysokich początkowych wartościach (osoby o masie ciała w normie lub bardzo nieznacznej nadwadze) zauważono spadek odsetka badanych limfocytów (Ryc. 17).



Rycina 17. Graficzne przedstawienie osiąganych odsetków komórek FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> wyodrębnionych z puli limfocytów CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>, u każdej pacjentki przyjmującej selen: przed oraz po zakończeniu suplementacji; test Wilcoxon dla par obserwacji

## 4.5 Podsumowanie wyników

1. Struktura wieku i BMI badanych grup była porównywalna (brak istotnych różnic).
2. W badaniach laboratoryjnych z krwi obwodowej wykazano istotne statystycznie różnice w składzie procentowym oraz parametrach bezwzględnych eozynocytów pomiędzy grupą przyjmującą selen, a grupą przyjmującą placebo.
3. W analizie stężenia selenu we krwi odnotowano istotne statystycznie różnice w jego stężeniach zarówno w grupie przyjmującej selen przed po zakończeniu suplementacji i pomiędzy grupami: przyjmującą selen i przyjmującą placebo. Warto odnotować, iż wszystkie osoby przyjmujące selen osiągnęły jego stężenie powyżej normy, a średni wzrost stężenia tego pierwiastka u tych osób wyniósł 139%, przy czym najwyższa jednostkowa zmiana wyniosła aż 271%.
4. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach TSH, fT3, fT4 oraz przeciwciałach anti-TPO i anti-TG w grupie suplementującej selen (Se przed vs Se po), oraz w obu badanych grupach po zakończeniu suplementacji placebo / selenem (P vs Se po).
5. Cytometryczna ocena składu procentowego całej populacji limfocytów wykazała, iż odsetek komórek CD3<sup>+</sup> istotnie zwiększył się w grupie przyjmującej selen w porównaniu do grupy, która otrzymała placebo.
6. Wykazano znamienne wzrost procentowej zawartości komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> wyodrębnionych z populacji limfocytów T w grupie przyjmującej suplement selenu przez 3 miesiące.
7. Cytometryczna analiza składu procentowego limfocytów T regulatorowych wykazała znamienne obniżony odsetek limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> wyodrębnionych z puli komórek CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup> w grupie osób suplementujących selen (po suplementacji) w porównaniu do grupy przyjmującej placebo.
8. Wykazano znamienne wysoko podwyższony odsetek limfocytów T regulatorowych o fenotypie CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> w grupie przyjmującej selen, po 3-miesięcznej suplementacji.
9. W niniejszym badaniu nie wykazano znamienne istotnych różnic w odsetku komórek FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> i FOXP3<sup>+</sup>CD304<sup>+</sup> (tzw. nTreg) oraz w odsetku komórek FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup> i FOXP3<sup>+</sup>CD304<sup>-</sup> (tzw. iTreg) w obu badanych grupach.

Brak różnic prawdopodobnie wynika m.in. z bardzo zróżnicowanej reakcji poszczególnych pacjentek suplementujących selen.

## 5. Dyskusja

Autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy jest najczęściej występującą chorobą tego typu na świecie<sup>23</sup>, dotyka głównie kobiet<sup>19</sup>, a jej podłoże wciąż pozostaje nieznanne. Podejmowano liczne próby określenia czynników wyzwalających tę chorobę, a wśród tych dociekań pojawiały się spostrzeżenia na temat znaczenia niedoboru selenu w kontekście prawidłowych funkcji tarczycy oraz układu odpornościowego przytoczone w pierwszej części tej rozprawy. W niniejszej pracy podjęto próbę ustalenia wpływu tego pierwiastka na subpopulację limfocytów T regulatorowych u osób chorujących na AITD, gdyż w momencie rozpoczęcia prac nad tym projektem nie dysponowaliśmy danymi na ten temat.

Zanim jednak zostanie opisany wpływ selenu na limfocyty Treg, należy skupić się w pierwszej kolejności na bezpieczeństwie stosowania suplementów zawierających ten pierwiastek. Określono, iż prawidłowe stężenie Se w surowicy wynosi 70-140  $\mu\text{g/l}$ <sup>213</sup>. W świetle wielu badań zarówno zbyt niskie stężenie selenu i zbyt wysokie powiązane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju wielu chorób oraz dysfunkcji układu immunologicznego.

Przeciwnowotworowy charakter selenu jest badany od kilku dekad. Naukowcy odkryli, iż istnieje odwrotna zależność między spożyciem tego pierwiastka a ryzykiem rozwoju nowotworu. Na przykład Whanger<sup>214</sup> wykazał, że dawki selenu na poziomie 100–200  $\mu\text{g/d}$  hamują uszkodzenia genetyczne i rozwój raka u ludzi; jednak przy  $\geq 400$   $\mu\text{g/d}$ , selen prawdopodobnie wywołuje raka<sup>215</sup>. Chociaż wykazano, iż przyjmowanie Se w nadmiarze może wywoływać choroby nowotworowe u ludzi, związek między tym pierwiastkiem a nowotworami pozostaje nadal nie w pełni wyjaśniony.

We włoskim dużym ( $n=7\ 182$ ), kohortowym badaniu ORDET (ang. *hORMones and Diet in the ETiology of Breast Cancer*) dowiedziono, iż zwiększona zawartość selenu w diecie wiązała się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2<sup>5</sup>. W innym randomizowanym badaniu z podwójnie ślełą próbą, podawano zdrowym osobom ( $n=1202$ ) selen w dawce 200  $\mu\text{g/l}$  lub placebo. Przeprowadzona w kolejnych siedmiu latach analiza danych medycznych uczestników badania wykazała, iż suplementacja selenem nie zapobiega rozwojowi cukrzycy typu 2, a wręcz mogła zwiększać ryzyko choroby<sup>216</sup>.



W metaanalizie pięciu badań (13 460 uczestników), potwierdzono istotnie wyższą częstość występowania cukrzycy typu 2 u pacjentów ze stosunkowo niskim ( $\leq 97,5$  g/l) lub wysokim stężeniem Se w surowicy ( $\geq 132,50$  g/l)<sup>217</sup>.

Z wyników analiz NHANES (ang. *National Health and Nutrition Examination Survey*) można wnioskować, że podwyższone stężenia selenu w osoczu są powiązane z niekorzystnym profilem lipidowym, w tym wyższym poziomem cholesterolu, a w modelach regresji splajnowej poziomy cholesterolu całkowitego i LDL wzrastały progresywnie wraz ze wzrostem stężenia selenu<sup>218</sup>. Podobnie inne badania przeprowadzone w Europie wykazały związek między wysoką ekspozycją na selen a niekorzystnym profilem lipidowym. W podwójnie ślepej, randomizowanej, kontrolowanej placebo analizie mającej na celu sprawdzenie wpływu długoterminowej suplementacji antyoksydantami na zmniejszenie ryzyka choroby niedokrwiennej serca, Hercberg i wsp.<sup>219</sup> wykazali dodatni związek między stężeniem selenu a poziomem cholesterolu. Ponadto wykazano również związek między suplementacją selenu, a wyższym poziomem triglicerydów i niższym poziomem cholesterolu HDL<sup>219</sup> oraz podwyższonym poziomem cholesterolu LDL<sup>220</sup>.

PRECISE przeprowadzone w Danii było randomizowanym, podwójnie zaślepionym, kontrolowanym placebo badaniem, w którym wykazano że przyjmowanie selenu w dawce 300  $\mu\text{g/d}$  przez 5 lat w kraju o umiarkowanie niskim stężeniu tego pierwiastka, zwiększa śmiertelność po 10 latach od suplementacji<sup>221</sup>.

W niniejszym badaniu stężenie selenu w osoczu podniósł się do wartości 284  $\mu\text{g/l}$ .

Kolejne badanie, którego wyniki budzą obawy, że podwyższone stężenie selenu w surowicy może wiązać się ze zwiększoną śmiertelnością, przeprowadzono z udziałem 13 887 dorosłych uczestników. W badaniu tym mierzono stężenie selenu we krwi uczestników przez kolejne sześć lat, a po 12 latach określono jego wpływ na ryzyko śmiertelności czy rozwoju nowotworów. Analiza wyników jakie uzyskano, wykazała wzrost śmiertelności i ryzyka rozwoju raka przy wysokim stężeniu selenu ( $>150$  ng/ml), natomiast w przypadku stężenia selenu poniżej 130 ng/ml ryzyko śmierci było obniżone<sup>222</sup>.

Spożycie około 330  $\mu\text{g}$  selenu dziennie może wpływać toksycznie nie tylko na metabolizm hormonów wzrostu i insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1), ale również na syntezę hormonów tarczycy<sup>223</sup>.

Z dostępnych danych dotyczących stężenia selenu w surowicy krwi chorych na autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy, zarówno z Polski i ze świata wynika, iż są one bardzo różne i niekoniecznie zależne od jego stężenia w glebie. W artykule Sochy i wsp.<sup>67</sup> średnia zawartość Se w surowicy pacjentów z AITD wynosiła  $63,03 \pm 17,31 \mu\text{g/l}$  i była istotnie niższa niż w grupie kontrolnej ( $75,16 \pm 19,92 \mu\text{g/l}$ ). W badaniu tym dowiedziono również, że osoby palące cechują się dodatkowo istotnie obniżoną zawartością tego pierwiastka w porównaniu do osób niepalących.

Z badania przeprowadzonego w Turcji<sup>224</sup> również dowiadujemy się, iż podobnie jak w powyższym badaniu stężenie selenu w grupie pacjentek z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy było poniżej normy w porównaniu do grupy kontrolnej ( $67,7 \pm 10,4$  wobec  $83,7 \pm 17,3 \mu\text{g/dl}$ ).

W przeciwieństwie do przytoczonych wyżej wyników, w niniejszym badaniu u niespełna 80% uczestniczek w początkowej fazie badania stężenie selenu było w normie, a ogólna średnia wynosiła  $83,522 \pm 22,54 \mu\text{g/l}$ .

Mimo, iż wiele artykułów naukowych dostarcza dowodów potwierdzających tezę, iż stężenie selenu u pacjentów z AITD jest obniżone, to badanie przeprowadzone w czterech europejskich krajach (Grecji, Rumunii, Austrii i Włoszech) wyłamuje się z tego nurtu. Tutaj średnie stężenie tego pierwiastka u osób z AITD wynosił  $84,6 \pm 42,2 \mu\text{g/l}$ <sup>225</sup>. Podobnie we włoskim prospektywnym badaniu przeprowadzonym przez Piroli i wsp. stężenie selenu na początku badania wynosiło  $97,39 \pm 15,02 \mu\text{g/l}$ <sup>226</sup>.

Powyższe dane sugerują, iż rutynowe włączanie suplementacji selenem u osób z AITD, ze względu na jego rzekome niskie stężenie u tych pacjentów może okazać się błędne.

Warto zwrócić w tym miejscu uwagę na fakt, iż jednym z powodów włączania suplementacji selenem, były wyniki badań epidemiologicznych, które wskazywały, iż regiony zubożone w Se cechowały się większą liczbą osób z AITD. Kolejną kwestią zasługującą na bliższy wgląd, jest dawka oraz prędkość wzrostu stężenia selenu we krwi u pacjentów przyjmujących ten pierwiastek. W projekcie Piroli podawano  $83 \mu\text{g/d}$  selenometioniny przez 4 miesiące i osiągnięto 50% wzrost stężenia selenu we krwi, do około  $150 \mu\text{g/l}$ , lekko przekraczając jego normę.

Porównywalne wyniki otrzymano w projekcie zakładającym suplementację na poziomie  $80\text{--}200 \mu\text{g/dzień}$  przez 6-12 miesięcy. Tutaj podobnie jak w powyższej pracy

przekroczono zalecaną wartość referencyjną – ale tylko w części badania, gdzie podawano 160 µg/dzień selenometioniny przez 6 miesięcy. Doprowadziło to do osiągnięcia średniego stężenia selenu w surowicy na poziomie 156 µg/l<sup>227</sup>.

Powyższe wyniki są zbieżne z otrzymanymi w niniejszym badaniu. W omawianej pracy podawano pacjentkom podobnie, jak w wielu innych projektach, 200 µg/d selenometioniny - typową dawkę, jaką posiadają suplementy dostępne na polskim rynku. W niniejszym badaniu po trzech miesiącach suplementacji osiągnięto średnio około 140% wzrost stężenia selenu we krwi ( $198,111 \pm 43,716$  µg/l). Wszystkie osoby przyjmujące Se przekroczyły normę, a najwyższa jednostkowa zmiana wyniosła aż 271%, w tym przypadku osiągnięto stężenie 256 µg/l.

Innym powodem dla którego włączana jest suplementacja selenu, jest jego wpływ na poziom markerów uszkodzenia i niedoczynności tarczycy. W literaturze można odnaleźć szereg przeglądów systematycznych/metaanaliz czy kontrolowanych badań dotyczących stosowania selenu u pacjentów z AITD. Metaanaliza opublikowana w 2016 r. dotyczy szesnastu badań. Stwierdzono w niej, że suplementacja selenem obniża przeciwciała przeciwko TPO w surowicy po 3, 6 i 12 miesiącach w populacji z AITD leczonej L-T4. Jednak w nieleczonej populacji z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy efekt był istotny jedynie po 3 miesiącach<sup>228</sup>. Niektóre z tych badań również odnotowały spadek miana przeciwciał anti-TG po 12 miesiącach, poprawę echogeniczności tarczycy i wzrost subiektywnego samopoczucia<sup>229</sup>. Pośród dostępnej literatury można również odnaleźć wiele doniesień, które wykazują brak jakiegokolwiek wpływu suplementacji selenem na poziom przeciwciał anti-TPO i anti-TG oraz markerów niedoczynności tarczycy. Obszerne zestawienie badań poświęconych suplementacji selenem u pacjentów z AITD (lata 2002 - 2018) opublikowano w 2020 roku<sup>230</sup>.

Należy zwrócić uwagę, iż powszechnie mierzony pierwotny wynik końcowy w tych badaniach to głównie spadek przeciwciał tarczycowych. Jednak niektórzy autorzy podkreślają potrzebę znalezienia dowodów klinicznych, wyrażonych poprzez zmniejszenie stężenia tyreotropiny TSH (lub brak progresji jawnej choroby) albo możliwości obniżenia dawki LT4 w trakcie leczenia kombinacją LT4 i Se. W najnowszej opublikowanej metaanalizie (z 2017 roku) podsumowującej dane od europejskich i brazylijskich pacjentów, autorzy nie wykazali pozytywnych zmian w poziomie TSH u osób nieleczonych LT4 po 3, 6 lub 12 miesiącach suplementacji selenem<sup>231</sup>. Autorzy obu metaanaliz, z 2016 i 2017 roku, podkreślają brak uzasadnienia dla rutynowej

suplementacji Se u pacjentów z AITD w stanie eutyreozy, ze względu na brak klinicznych dowodów na poprawę zdrowia. Tym samym podtrzymane zostało stanowisko członków Cochrane z 2014 roku wskazujące na brak wystarczających obiektywnych dowodów klinicznych na poparcie podejmowania decyzji dotyczących stosowania suplementacji selenem w leczeniu pacjentów z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy<sup>232</sup>.

Wyniki niniejszej pracy, podobnie jak te uzyskane we wielu innych badaniach przytoczonych w powyższej pracy, nie wskazywały na występowanie różnic w poziomach TSH, fT3, fT4 oraz przeciwciałach anti-TPO i anti-TG po zastosowaniu suplementu z selenem w porównaniu do placebo.

W 2018 roku Europejskie Towarzystwo Tarczycowe (*ang.* European Thyroid Association, ETA) podjęło próbę oszacowania rzeczywistego zakresu stosowania suplementacji selenem u pacjentów z AITD przez lekarzy endokrynologów<sup>233</sup>. W badaniu tym rozesłano kwestionariusze z pytaniami za pośrednictwem sieci internetowej do niespełna 900 członków ETA, ostatecznie na pytanie dotyczące włączania suplementacji selenem odpowiedziało 147 osób. Kluczowe pytanie w ankiecie brzmiało: „Czy używasz suplementów selenu u pacjentów z chorobami tarczycy?”. Spośród uczestników badania 20% zaznaczyło, że: „Tak, polecam je rutynowo”, natomiast 60%: „Nie, ale polecam je sporadycznie”. Zdecydowana mniejszość pytanym lekarzy (35 ze 147; 24%) nigdy nie polecała suplementacji tego pierwiastka. Ponadto, co wydaje się być najistotniejsze z punktu widzenia praktyki lekarskiej, tylko nieliczni respondenci (30 ze 147; 20%) przyznali, że ogólnie (4%) lub sporadycznie (16%) mierzyli stężenie przed zaleceniem jego suplementacji, natomiast większość (110 ze 147; 75%) nie brała w ogóle pod uwagę stężenia jodu przy podejmowaniu decyzji czy zalecić suplementację Se.

Podobne badanie przeprowadzono w 2016 roku wśród 815 włoskich lekarzy endokrynologów (43,2% członków AME, *it.* *Associazione Medici Endocrinologi*)<sup>234</sup>. W tym projekcie uzyskane wyniki wskazują, że 85,2% respondentów używało selenu w leczeniu chorób tarczycy (58,1% rzadko/sporadycznie i 27,1% często/zawsze), natomiast 79,4% z nich przepisało ten mikroelement pacjentom z AITD (39,1% czasami i 40,3% często/zawsze). Niespełna dwie trzecie respondentów przyznało, że stosuje selen w przypadkach subklinicznej autoimmunizacyjnej niedoczynności tarczycy oraz około 40% zasugerowało stosowanie Se pacjentkom z AITD, które: planują ciążę lub już były w ciąży. Odnośnie sugerowanej dziennej dawki Se, 60% ankietowanych wskazywało na 100–200 µg, 20–30% zalecało <100 µg, a 10–20% >200 µg.

Suplementy zawierające selen, jak wnioskujemy z powyższych danych, są powszechnie przepisywane pacjentom z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy przez europejskich endokrynologów, pomimo braku oficjalnych wytycznych. Co więcej, suplementacja Se jest często stosowana lub sugerowana w celach wykraczających poza te poparte medycyną opartą na dowodach. Większa część powierzchni Europy jest uboga w naturalne źródła selenu, a codzienne jego spożycie przez ludność naszego kontynentu nie jest zgodne z zalecanymi wartościami. Suplementy z tym mikroelementem są przepisywane w sposób niekontrolowany. Ponadto ich dawki są niedostosowane do specyficznego profilu populacji (dzieci, dorośli, mężczyźni, kobiety, kobiety w ciąży, osoby z AITD, z innymi chorobami tarczycy i zamieszkiwany obszar). Zatem dostępne preparaty z selenem wymagają rewizji i standaryzacji.

Za potwierdzenie tego stanowiska można uznać badanie przeprowadzone w 2013 roku na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w Poznaniu, gdzie przebadano 86 preparatów dostępnych na polskim rynku. W wielu z nich dawka rzeczywista selenu odbiegała od deklarowanej przez producenta, natomiast notorycznym problemem był brak zgodności z rekomendowaną dzienną dawką Se, 18 preparatów zawierało 70-130% rekomendowanej dziennej dawki ( $55\mu\text{g}$ )<sup>235</sup>.

Brakuje ustaleń co do referencyjnych zakresów stężeń Se w różnych lokalizacjach geograficznych, jak również istnieje potrzeba ustalenia specyficznych biomarkerów dla tkanki tarczycy w celu oceny czynnościowego Se. Ponadto w każdym przypadku należy rozważyć ocenę stosunku korzyści do ryzyka przed wprowadzeniem suplementacji selenem.

Szeroki wpływ selenu na układ immunologiczny został udowodniony w wielu pracach naukowych, najważniejsze wnioski części z nich zostały przytoczone we wstępie niniejszej pracy. W ostatnich latach coraz więcej dowodów wskazuje, że komórki Treg są subpopulacją niezbędną w kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznej i utrzymaniu tolerancji. Jednakże wśród literatury naukowej poświęconej oddziaływaniu selenu na limfocyty  $\text{CD4}^+$  oraz T regulatorowe można odnaleźć bardzo niewiele prac.

Od dłuższego czasu wiadome jest, że sygnalizacja redox odgrywa kluczową rolę w modulacji aktywacji limfocytów T efektorowych<sup>236-238</sup>, a to właśnie selenoproteiny regulują ową sygnalizację. Pomimo kluczowej roli, jaką komórki  $\text{CD4}^+$  odgrywają w inicjowaniu odpowiedzi immunologicznych, brakuje kompletnej informacji dotyczącej bezpośredniego wpływu selenu na te komórki. Niedawne badanie wykazało, że całkowity

brak selenoproteiny w limfocytach T, w wyniku nadprodukcji wolnych rodników, doprowadził do zmniejszenia puli dojrzałych limfocytów, co skutkowało hamowaniem stymulacji receptora i w konsekwencji proliferacji tych komórek<sup>4</sup>.

W swojej pracy Huang i jego zespół badali naiwne komórki CD4<sup>+</sup> myszy za pośrednictwem stymulacji receptora TCR komórek T oraz ekspresji wewnątrzkomórkowych markerów komórek Th w celu określenia wpływu na ich różnicowanie poprzez zwiększanie poziomu Se w diecie<sup>194</sup>. Zwiększając dawkowanie selenu - od poziomu adekwatnego do ponadnormatywnego powodowano zmiany w zróżnicowaniu się tych komórek w kierunku Th1, co wykazano za pomocą ekspresji powierzchniowej markera Th1, CD40L. Niedobór selenu lub stres oksydacyjny również promował różnicowanie się komórek w kierunku Th1<sup>194</sup>. Odkryto także, iż zawartość selenu w diecie wpływa na różnicowanie w kierunku komórek Treg. Różnicowanie limfocytów T CD4<sup>+</sup> indukowanych TCR do komórek CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg wzrastało wraz ze wzrostem spożywanego selenu.

Zespół badawczy pod przewodnictwem Hoffmanna wykazał, że dieta bogata w Se zwiększała ekspresję interleukiny 2 oraz powinowactwo do receptora IL-2 w porównaniu z dietą o niskiej i średniej zawartości Se<sup>201</sup>. Limfocyty T regulatorowe, które wykazują ekspresję dużych ilości receptora IL-2 (IL-2R), są kompletnie zależne od IL-2 wytwarzanej przez aktywowane komórki T. Wrodzony niedobór IL-2R powoduje zmniejszoną ekspresję czynnika regulującego proliferację i różnicowanie komórek Treg<sup>239</sup>. Ponadto udowodniono, iż przed aktywacją komórek T CD4<sup>+</sup>, poziomy reaktywnych form tlenu nie różniły się między grupami, ale dieta o niskiej zawartości Se zmniejszała ilość wolnych tioli w porównaniu z dietą o średniej i wysokiej zawartości Se. Dodanie egzogennych wolnych tioli eliminowało różnice w aktywacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> wśród badanych grup. Dane te sugerują, że poziomy Se w diecie moduluje poziomy wolnych tioli i specyficzne zdarzenia sygnalizacyjne podczas aktywacji limfocytów T CD4<sup>+</sup>, które wpływają na ich proliferację i różnicowanie<sup>201</sup>.

Liczba przeprowadzonych badań, które miały na celu określenie wpływu selenu na limfocyty regulatorowe, jest bardzo niewielka. W badaniu eksperymentalnym, gryzonie którym usunięto tarczycę lub zaburzono funkcję FOXP3 wytworzyły wielonarządową chorobę autoimmunizacyjną oraz stan zapalny, w tym przewlekłe limfocytarne zapalenie tarczycy<sup>240</sup>. Badanie przeprowadzone na mysim modelu NOD.H-2<sup>h4</sup>, w którym w

kontrolowanych warunkach wywołano autoimmunizację, obrazuje wpływ selenu na przebieg AITD. W początkowym etapie eksperymentu, myszy rozwinęły nacieki limfocytarne w tarczycy oraz cechowało się zwiększonym mianem przeciwciał anti-TG w porównaniu do myszy zdrowych. W kolejnej fazie badania, zwierzętom podano selen, co wywołało spadek poziomu przeciwciał anti-TG, wzrost liczby limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> oraz zwiększoną ekspresję czynnika FOXP3 w porównaniu do myszy nieleczonych<sup>241</sup>. Dane te sugerują, że suplementacja selenem może wpływać na przywrócenie normalnego poziomu komórek T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> poprzez zwiększenie ekspresji mRNA FOXP3 u myszy z AITD.

W późniejszych eksperymentach na tym samym mysim modelu wykazano z kolei, że niski poziom Se w diecie wzmacniał rozwój autoprzeciwciał anti-TG i anti-TPO<sup>242</sup>.

Innym badaniem z udziałem myszy, w którym zastosowanie selenu wpłynęło korzystnie na funkcje limfocytów Treg, jest praca Sang i wsp.<sup>243</sup>. Tutaj badano wpływ selenianu sodu na stan zapalny w okrężnicy wywołany siarczanem dekstranu (DSS) u myszy C57BL/6. Podawanie Se znacząco złagodziło objawy zapalenia jelita grubego, poprzez zwiększenie proporcji neutrofilów i limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i zmniejszenie proporcji komórek  $\gamma\delta$ T, limfocytów T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> w LPL (limfocyty blaszki właściwej, ang. *lamina propria lymphocytes*). Ponadto selen wpłynął na zmniejszenie ekspresji IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-21, T-bet i ROR $\gamma$ t, natomiast wzmocnił ekspresję IL-10 i FOXP3.

**W niniejszej pracy otrzymane wyniki nie były do końca jednoznaczne. Z jednej strony doszło do zwiększenia liczby komórek CD3<sup>+</sup>, co pokrywa się z wynikami badań Hoffmanna i Huanga. Z drugiej strony wpływ selenu na populację limfocytów Treg wymaga szerszych wyjaśnień ze względu na niejednoznaczne wyniki, związane z różnymi metodami oceny odsetka tej populacji, jakich użyto w niniejszej pracy. Dwie z trzech metod dały wyniki mówiące o pozytywnym wpływie selenu na konkretne badane subpopulacje limfocytów Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> oraz CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>). Ponadto nie wykazano również statystycznie istotnych różnic w części badania, w której wykorzystano metodę barwienia wewnątrzkomórkowego (Helios i CD304), co nie pokrywa się z wynikami omówionej poniżej publikacji.**

Artykułem do którego można odnieść wyniki niniejszej pracy, jest opublikowane w 2020 roku i jak dotąd jedyne przeprowadzone z udziałem ludzi, badanie poruszające owo

zagadnienie<sup>244</sup>. W tym przypadku pacjentów z AITD podzielono na dwie grupy: kontrolną (n = 47) oraz suplementującą selen (n = 43), która otrzymywała suplement w postaci drożdży selenowych przez 6 miesięcy. Wyniki wykazały, że leczenie drożdżami selenowymi znacząco zmniejszyło miana przeciwciał anty-TPO, anty-TG, a także poziom TSH, którym to towarzyszyły podwyższone stężenie Se, GPx3 i SePP1 (selenoproteina P1) w porównaniu z grupą kontrolną. W badaniu tym wyjściowe stężenie selenu w surowicy krwi u pacjentów z AITD wynosił około 73 µg/l, czyli był w normie. W trakcie badania dwukrotnie wykonywano pomiar selenu, po trzech (ok. 146 µg/l), oraz po sześciu miesiącach suplementacji (ok. 187 µg/l). Ostatecznie mocno przekroczono ustanowioną normę dla stężenia selenu w surowicy krwi. Fakt ten rodzi pytanie, czy jeśli stężenie selenu utrzymane zostałyby w granicach bezpiecznej normy, to czy uzyskany wynik dotyczący poziomu TSH, byłby równie spektakularny. Analizując ową pracę można zauważyć, iż istotność statystyczną w kontekście wpływu suplementacji selenem na komórki T regulatorowe osiągnięto dopiero w 6. miesiącu podawania tego pierwiastka, czyli po osiągnięciu stężenia dużo powyżej ustalonej powszechnie normy.

**Na podstawie badań prezentowanych w niniejszej pracy nie stwierdzono wzrostu odsetka tzw. nTreg - limfocytów Treg FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> i FOXP3<sup>+</sup>CD304<sup>+</sup>. Porównując owe wyniki z wynikami opisanego wyżej projektu i biorąc pod uwagę zmianę stanu wiedzy dotyczącej wiarygodności tych czynników transkrypcyjnych jako markerów dla subpopulacji nTreg (rozwinięcie poniżej), nasuwa się pytanie, czy odsetek wspomnianej frakcji komórek T regulatorowych zależy od bardzo wysokich stężeń omawianego pierwiastka i/ lub długości samej suplementacji.**

Dyscyplina zajmująca się sposobami oznaczania i różnicowania istniejących subpopulacji limfocytów T regulatorowych jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się gałęzi immunologii. Niezwykle często pojawiają się nowe doniesienia, które znacząco zmieniają stan wiedzy, przez co uznane w środowisku naukowym metody oznaczania tych komórek ulegają dezaktualizacji. Taka sytuacja ma obecnie miejsce w odniesieniu do wykorzystywania popularnych markerów wewnątrzkomórkowych Helios i Neuropiliny-1 (Nrp1, CD304). Jeszcze w trakcie przygotowywania metodologii niniejszego projektu, oba te markery uznawane były za odpowiednie do oznaczania i różnicowania naturalnych i indukowanych komórek Treg, natomiast w trakcie trwania



projektu pojawiły się doniesienia prezentujące nowe fakty, kompletnie burzące tę koncepcję.

Zainteresowanie czynnikiem transkrypcyjnym Helios w kontekście różnicowania limfocytów T regulatorowych przypadło na początek lat dwutysięcznych. W tamtym czasie uznano, iż czynnik ten może odgrywać znaczącą rolę w tworzeniu i/lub funkcjonowaniu Treg<sup>245-247</sup>. Szeroko badano związek między Helios a FOXP3 - markerem odróżniającym komórki regulatorowe od innych subpopulacji limfocytów T<sup>248,249</sup>. W toku dalszych dociekań ustalono również, iż Helios jest dobrym markerem pozwalającym na różnicowanie dwóch istotnie różnych subpopulacji limfocytów T regulatorowych: indukowanych na obwodzie (FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>) oraz naturalnych, czyli powstających w grasicy (FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>)<sup>111,112</sup>. Z biegiem czasu jednak Himmel i wsp. wykazali, że brak ekspresji Helios w komórkach FOXP3<sup>+</sup> nie jest specyficzny jedynie dla ludzkich iTreg, a przedstawione przez nich dane dostarczyły pierwszych dowodów na współistnienie Helios<sup>+</sup> i Helios<sup>-</sup> komórek nTreg w ludzkiej krwi obwodowej<sup>250</sup>. Ogromna ilość przeprowadzonych w ostatnim czasie badań jednoznacznie przekreśla znaczenie Heliosa jako markera komórek nTreg. Na przykład wykazano, że silna ekspresja Helios może być indukowana w populacji iTreg<sup>251</sup>, ponadto ekspresja Helios jest markerem aktywacji i proliferacji komórek T<sup>252</sup>.

Podobnie potoczyła się historia badań nad markerem CD304 - Neuropilina-1 - w celach rozróżniania konkretnych subpopulacji Treg. Początkowo dowiedziono, iż cząsteczka ta wykazuje silną ekspresję w subpopulacji nTreg<sup>113,114</sup>. Jednak z czasem, tak jak w przypadku Helios, okazało się, iż za pomocą tego markera nie można jednoznacznie określić pochodzenia badanych subpopulacji Treg<sup>253</sup>.

Spośród wybranych przez autorkę niniejszej pracy markerów limfocytów T regulatorowych, najsilniejszą odpowiedź wykazał fenotyp CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>.

Na podstawie własnych doświadczeń naszego zespołu uważamy, że T CD4<sup>+</sup>, które cechują się najwyższą ekspresją CD25 (subpopulacja CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) posiadają zdolność hamowania działania komórek układu odpornościowego a więc właściwości regulatorowe<sup>254,255</sup>. Ponadto limfocyty CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>, charakteryzują się również wysokim poziomem ekspresji czynnika FOXP3, co spełnia fenotypowe kryterium rozróżnienia Treg'. Grupa naukowców z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. Witkowskiego ustaliła, że najbardziej prawdopodobny tryb działania ludzkich komórek CD4<sup>low</sup> CD25<sup>high</sup> Treg, polega na „uspokojeniu” aktywacji układu

odpornościowego poprzez bezpośrednią, niespecyficzną eliminację aktywowanych, proliferujących komórek T cytotoksycznych i pomocniczych dzięki wysokiej ekspresji perforyny i granzymu B<sup>209</sup>.

W niniejszej pracy analiza jednostkowa wykazała związek między odsetkiem limfocytów Treg a wiekiem osób przyjmujących suplement selenu. Podobną zależność wykazano w badaniu z 2001 roku<sup>256,257</sup>. W jednym z nich wykazano, że wraz z wiekiem wzrasta nie tylko liczba omawianych komórek, ale także ich aktywność supresorowa<sup>257</sup>.

Ze względu na brak większej ilości danych dotyczących wpływu suplementacji selenem na limfocyty T regulatorowe u osób z AITD, przeszukano publikacje pod kątem wpływu tego pierwiastka na ową subpopulację w kontekście innych schorzeń, odnaleziono jedną pracę. W pracy z 2021 dotyczącej wpływu selenu na limfocyty T regulatorowe u pacjentów z chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B, nie wykazano wpływu tego pierwiastka na liczebność komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Tregs<sup>258</sup>. Mimo to, badacze zauważyli możliwość wpływu Se na właściwości funkcjonalne innych subpopulacji Treg, takich jak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>.

Podsumowując, wyniki badań laboratoryjnych oraz populacyjnych sugerują, że odpowiednie spożycie selenu może chronić przed rozwojem AITD, jednakże dotychczasowe próby suplementacji selenem u tych pacjentów nie wykazały znaczącej poprawy w przebiegu klinicznym choroby.

Stosowanie suplementacji selenem nie zostało zatwierdzone w międzynarodowych wytycznych ani dla prowadzenia pacjentów z AITD<sup>232</sup>, w niedoczynności tarczycy<sup>259,260</sup> ani dla osób z niedoczynnością tarczycy w ciąży<sup>261,262</sup>.

Uznano, że w pierwszej kolejności należy zapobiec nadmiernej akumulacji selenu w organizmie, skąd sugestia by jego suplementację ograniczyć jedynie do osób, u których stwierdzono niedobór tego pierwiastka. Przy czym należy podkreślić, iż prawidłowe funkcjonowanie systemów zależnych od selenu wymaga jego stężenia w osoczu w granicach 90-120 µg/l<sup>230</sup>, a przekroczenie tych wartości może skutkować rozwojem różnych chorób oraz zwiększonym ryzykiem ogólnej śmiertelności.

Porównując wyniki niniejszej pracy do nielicznej dostępnej literatury, można zaryzykować stwierdzenie, że suplementacja selenem zdaje się wywierać korzystny wpływ na profil limfocytów T regulatorowych, przy czym należy pamiętać, że dodatkowym, istotnym problemem w interpretacji danych dotyczących komórek Treg

jest różnorodna, fenotypowa identyfikacja tych komórek na przestrzeni lat i nadal zmieniająca się wiedza na temat potencjalnych markerów komórek iTreg oraz nTreg. Ponad wszelką wątpliwość jednak można uznać, że znikoma ilość danych na ten temat, również w kontekście innych schorzeń, wskazuje na konieczność przeprowadzenia większej ilości analiz.

## 6. Wnioski

1. Suplementacja selenu wykazuje potencjalnie korzystny wpływ na liczbę i odsetek limfocytów CD3<sup>+</sup> oraz T regulatorowych.
2. Suplementacja selenu nie wykazuje ani pozytywnego ani negatywnego wpływu na markery uszkodzenia i niedoczynności tarczycy (anty-TPO, anty-TG, TSH, fT4 i fT3).
3. Osoby z AITD mieszkające na terenie Trójmiasta nie wykazują niedoborów selenu.
4. Suplementacja selenu (selenometionina) w dawce 200 µg/ dobę przez trzy miesiące znacząco podniosła jego stężenie w surowicy, osiągając poziom znacząco przekraczający normę (188 µg/l).
5. Rynek suplementów zawierających selen wymaga regulacji i wprowadzenia konkretnych wytycznych dla osób w różnym wieku oraz stanie fizjologicznym czy chorobowym.

## 7. Bibliografia

1. Dayan CM, Daniels GH. Chronic Autoimmune Thyroiditis. *N Engl J Med.* 1996;335:99-107. doi:10.1056/NEJM199607113350206
2. Köhrle J, Gärtner R. Selenium and thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(6):815-827. doi:10.1016/j.beem.2009.08.002
3. Broome CS, McArdle F, Kyle JAM, et al. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2004;80(1):154-162. doi:10.1093/ajcn/80.1.154
4. Shrimali RK, Irons RD, Carlson BA, et al. Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(29):20181-20185. doi:10.1074/jbc.M802559200
5. Stranges S, Sieri S, Vinceti M, et al. A prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes. *BMC Public Health.* 2010;10. doi:10.1186/1471-2458-10-564
6. Kieliszek M, Błazejak S. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition.* 2013;29(5):713-718. doi:10.1016/j.nut.2012.11.012
7. Kieliszek M, Błazejak S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A review. *Molecules.* 2016;21(5). doi:10.3390/molecules21050609
8. Nakano A, Watanabe M, Iida T, et al. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Thyroid.* 2007;17(1):25-31. doi:10.1089/thy.2006.0231
9. Takahashi T, Sakaguchi S. Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease. *Curr Mol Med.* 2003;3(8):693-706. doi:10.2174/1566524033479429
10. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol.* 2005;24(3-4):211-226. doi:10.1080/08830180590934976
11. Xue H, Wang W, Shan Z, et al. Dynamic changes of CD4+CD25+ regulatory T cells in NOD.H-2h4 mice with iodine-induced autoimmune thyroiditis. *Biol Trace Elem Res.* 2011;143(1):292-301. doi:10.1007/s12011-010-8815-x

12. Duntas L, Geroulanos S, Laurberg P. From Hippocrates of Kos to Hashimoto and thyroid autoimmunity: A long road of discovery. *Hormones (Athens)*. 2012;12(1):9-11. doi:10.1007/BF03401281
13. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med*. 2003;348(26):2646-2655. doi:10.1056/NEJMra021194.
14. Stathatos N, Daniels GH. Autoimmune thyroid disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(1):70-75. doi:10.1097/BOR.0b013e32834ddb27
15. Almandoz JP, Gharib H. Hypothyroidism: Etiology, Diagnosis, and Management. *Medical Clinics of North America*. 2012;96(2):203-221. doi:10.1016/j.mcna.2012.01.005
16. Cho BY, Shong YK, Lee HK, Koh CS, Min HK, Sohn I. Role of blocking TSH receptor antibodies on the development of hypothyroidism and thyroid atrophy in primary myxedema. *Korean J Intern Med*. 1989;4(2):108-117. doi:10.3904/kjim.1989.4.2.108
17. Amaral De Carvalho G, Luhm C, Perez S, Sterian Ward L. Thyroid consensus The clinical use of thyroid function tests. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013;57(3):193-204.
18. Hollowell JG, Staehling NW, Dana Flanders W, et al. Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87(2):489-499. doi:10.1210/jcem.87.2.8182
19. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2003;2(3):119-125. doi:10.1016/S1568-9972(03)00006-5
20. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev*. 2015;14(2):174-180. doi:10.1016/j.autrev.2014.10.016
21. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NMH. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;84(3):223-243. doi:10.1006/CLIN.1997.4412
22. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM, et al. The incidence of thyroid disorders in the community: A twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1995;43(1):55-68. doi:10.1111/j.1365-2265.1995.tb01894.x

23. McLeod DSA, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine*. 2012;42(2):252-265. doi:10.1007/s12020-012-9703-2
24. Brix TH, Kyvik KO, Hegedüs L. A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000;85(2):536-539. doi:10.1210/jc.85.2.536
25. Strieder TGA, Prummel MF, Tijssen JGP, Endert E, Wiersinga WM. Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(3):396-401. doi:10.1046/j.1365-2265.2003.01862.x
26. Tomer Y, Ban Y, Conception E, et al. Common and Unique Susceptibility Loci in Graves and Hashimoto Diseases: Results of Whole-Genome Screening in a Data Set of 102 Multiplex Families. *Am J Hum Genet*. 2003;73(4):736-747. doi:10.1086/378588
27. Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, et al. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 2001;10(13):1379-1386.
28. Tomer Y, Greenberg DA, Concepcion E, Ban Y, Davies TF. Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):404-407. doi:10.1210/jcem.87.1.8291
29. Zeitlin AA, Heward JM, Newby PR, et al. Analysis of HLA class II genes in Hashimoto's thyroiditis reveals differences compared to Graves' disease. *Genes Immun*. 2008;9(4):358-363. doi:10.1038/gene.2008.26
30. Chistiakov DA, Turakulov RI. CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol*. 2003;31(1):21-36. doi:10.1677/jme.0.0310021
31. Zaletel K, Gaberscek S. Hashimotos Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Curr Genomics*. 2011;12(8):576-588. doi:10.2174/138920211798120763
32. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett*. 2011;585(23):3689-3698. doi:10.1016/j.febslet.2011.04.032
33. Inoue N, Watanabe M, Morita M, et al. Association of functional polymorphisms in promoter regions of IL5, IL6 and IL13 genes with development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol*. 2011;163(3):318-323. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04306.x

34. Argatska AB, Nonchev BI. Postpartum thyroiditis. *Folia Med (Plovdiv)*. 2014;56(3):145-151. doi:10.2478/folmed-2014-0021
35. Stagnaro-Green A, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Negro R. High rate of persistent hypothyroidism in a large-scale prospective study of postpartum thyroiditis in Southern Italy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011;96(3):652-657. doi:10.1210/jc.2010-1980
36. Radetti G. Clinical aspects of Hashimoto's thyroiditis. *Endocr Dev*. 2014;26:158-170. doi:10.1159/000363162
37. Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J Autoimmun*. 2009;32(3-4):231-239. doi:10.1016/j.jaut.2009.02.007
38. Desaillood R, Hober D. Viruses and thyroiditis: an update. *Virol J*. 2009;6(1):5. doi:10.1186/1743-422X-6-5
39. Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune manifestations in viral hepatitis. *Semin Immunopathol*. 2013;35(1):73-85. doi:10.1007/s00281-012-0328-6
40. Menconi F, Hasham A, Tomer Y. Environmental triggers of thyroiditis: Hepatitis C and interferon- $\alpha$ . *J Endocrinol Invest*. 2011;34(1):78-84. doi:10.3275/7499
41. Tomer Y, Peters JJ, Menconi F. Interferon induced thyroiditis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(6):703. doi:10.1016/j.beem.2009.07.004
42. Burch HB. Drug Effects on the Thyroid. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(8):749-761. doi:10.1056/nejmra1901214
43. Illouz F, Braun D, Briet C, Schweizer U, Rodien P. Endocrine side-effects of anti-cancer drugs: Thyroid effects of tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(3):R91-R99. doi:10.1530/EJE-14-0198
44. Desai J, Yassa L, Marqusee E, et al. Hypothyroidism after sunitinib treatment for patients with gastrointestinal stromal tumors. *Ann Intern Med*. 2006;145(9):660-664. doi:10.7326/0003-4819-145-9-200611070-00008
45. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(22):3584-3590. doi:10.1200/JCO.2008.20.1293
46. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(14):1277-1290. doi:10.1056/nejmoa1712126



47. Girardi P, Brugnoli R, Manfredi G, Sani G. Lithium in Bipolar Disorder: Optimizing Therapy Using Prolonged-Release Formulations. *Drugs in R and D*. 2016;16(4):293-302. doi:10.1007/s40268-016-0139-7
48. Perrild H, Hegedüs L, Baastrup PC, Kayser L, Kastberg S. Thyroid function and ultrasonically determined thyroid size in patients receiving long-term lithium treatment. *Am J Psychiatry*. 1990;147(11):1518-1521. doi:10.1176/ajp.147.11.1518
49. Lazarus JH. Lithium and thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(6):723-733. doi:10.1016/j.beem.2009.06.002
50. Miller KK, Daniels GH. Association between lithium use and thyrotoxicosis caused by silent thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(4):501-508. doi:10.1046/j.1365-2265.2001.01381.x
51. Wilson R, McKillop JH, Crockett GT, et al. The effect of lithium therapy on parameters thought to be involved in the development of autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991;34(5):357-361. doi:10.1111/j.1365-2265.1991.tb00305.x
52. Rayman MP. Symposium 2: Nutrient interactions and their role in protection from chronic diseases: Multiple nutritional factors and thyroid disease, with particular reference to autoimmune thyroid disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2019;78(1):34-44. doi:10.1017/S0029665118001192
53. Santos JAR, Christoforou A, Trieu K, et al. Iodine fortification of foods and condiments, other than salt, for preventing iodine deficiency disorders. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019;2019(2). doi:10.1002/14651858.CD010734.pub2
54. Pedersen IB, Knudsen N, Carlé A, et al. A cautious iodization programme bringing iodine intake to a low recommended level is associated with an increase in the prevalence of thyroid autoantibodies in the population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(1):120-126. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04008.x
55. Pedersen IB, Laurberg P, Knudsen N, et al. An increased incidence of overt hypothyroidism after iodine fortification of salt in Denmark: a prospective population study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3122-3127. doi:10.1210/jc.2007-0732
56. Lombardi FA, Fiore E, Tonacchera M, et al. The effect of voluntary iodine prophylaxis in a small rural community: The pescopagano survey 15 years later.

- Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013;98(3):1031-1039. doi:10.1210/jc.2012-2960
57. Miranda DMC, Massom JN, Catarino RM, et al. Impact of nutritional iodine optimization on rates of thyroid hypoechogenicity and autoimmune thyroiditis: A cross-sectional, comparative study. *Thyroid*. 2015;25(1):118-124. doi:10.1089/thy.2014.0182
  58. Luo Y, Kawashima A, Ishido Y, et al. Iodine Excess as an Environmental Risk Factor for Autoimmune Thyroid Disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15:12895-12912. doi:10.3390/ijms150712895
  59. Duntas LH. The Role of Iodine and Selenium in Autoimmune Thyroiditis. *Hormone and Metabolic Research*. 2015;47(10):721-726. doi:10.1055/s-0035-1559631
  60. Martino E, Bartalena L, Bogazzi F, Braverman LE. *The Effects of Amiodarone on the Thyroid\**; 2001. <https://academic.oup.com/edrv/article/22/2/240/2424097>
  61. Wu Q, Rayman MP, Lv H, et al. Low population selenium status is associated with increased prevalence of thyroid disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015;100(11):4037-4047. doi:10.1210/jc.2015-2222
  62. Derumeaux H, Valeix P, Castetbon K, et al. Association of selenium with thyroid volume and echostructure in 35- to 60-year-old French adults. *Eur J Endocrinol*. 2003;148(3):309-315. doi:10.1530/eje.0.1480309
  63. Rasmussen LB, Schomburg L, Köhrle J, et al. Selenium status, thyroid volume, and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(4):585-590. doi:10.1530/EJE-10-1026
  64. Glattre E, Thomassen Y, Thoresen ST, et al. Prediagnostic serum selenium in a case-control study of thyroid cancer. *Int J Epidemiol*. 1989;18(1):45-49. doi:10.1093/ije/18.1.45
  65. Lin JC, Kuo WR, Chiang FY, et al. Glutathione peroxidase 3 gene polymorphisms and risk of differentiated thyroid cancer. *Surgery*. 2009;145(5):508-513. doi:10.1016/j.surg.2008.12.008
  66. Bülow Pedersen I, Knudsen N, Carlé A, et al. Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: A population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(4):584-590. doi:10.1111/cen.12185

67. Socha K, Dziemianowicz M, Omeljaniuk WJ, et al. Nawyki żywieniowe a stężenie selenu w surowicy u pacjentów z chorobą Hashimoto. *Probl Hig Epidemiol.* 2012;93(4):824-827. <http://www.phie.pl/pdf/phe-2012/phe-2012-4-824.pdf>
68. Kristensen B. Regulatory B and T cell responses in patients with autoimmune thyroid disease and healthy controls. *Dan Med J.* 2016;63(2):1-27.
69. Ramos-Leví AM, Marazuela M. Patogenia de la enfermedad tiroidea autoinmune: papel de los mecanismos celulares. *Endocrinología y Nutrición.* 2016;63(8):421-429. doi:10.1016/j.endonu.2016.04.003
70. Yu S, Jia L, Zhang Y, Zhong J, Yang B, Wu C. IL-12 induced the generation of IL-21- and IFN- $\gamma$ -co-expressing. 2015;14(21):3362-3372.
71. Mackay CR. CXCR3+CCR5+T cells and autoimmune diseases: Guilty as charged? *Journal of Clinical Investigation.* 2014;124(9):3682-3684. doi:10.1172/JCI77837
72. Salgame P, JS A, C C, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 1991;254(5029):279-282. doi:10.1126/SCIENCE.254.5029.279
73. Carter LL, Dutton RW. Type 1 and Type 2: A fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 1996;8(3):336-342. doi:10.1016/S0952-7915(96)80122-1
74. Hu C, Salgame P. Inability of interleukin-12 to modulate T-helper 0 effectors to T-helper 1 effectors: A possible distinct subset of T cells. *Immunology.* 1999;97(1):84-91. doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00745.x
75. Roura-Mir C, Catálfamo M, Sospedra M, Alcalde L, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D. Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3290-3302. doi:10.1002/eji.1830271228
76. Hutchings PR, Verma S, Phillips JM, Harach SZ, Howlett S, Cooke A. Both CD4+ T cells and CD8+ T cells are required for iodine accelerated thyroiditis in NOD mice. *Cell Immunol.* 1999;192(2):113-121. doi:10.1006/cimm.1998.1446
77. Iwatani Y, AMINO N, HIDAKA Y, et al. Decreases in  $\alpha\beta$  T cell receptor negative T cells and CD8 cells, and an increase in CD4 + CD8+ cells in active Hashimoto's disease and subacute thyroiditis. *Clin Exp Immunol.* 1992;87(3):444-449. doi:10.1111/j.1365-2249.1992.tb03017.x

78. Mazziotti G, Sorvillo F, Naclerio C, et al. Type-1 response in peripheral CD4+ and CD8+ T cells from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(4):383-388. doi:10.1530/eje.0.1480383
79. Nada AM, Hammouda M. Immunoregulatory T cells, LFA-3 and HLA-DR in autoimmune thyroid diseases. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014;18(4):574-581. doi:10.4103/2230-8210.137524
80. Yamamoto N, Watanabe M, Matsuzuka F, Miyauchi A, Iwatani Y. Lower concentration of serum soluble CD8 in severe Hashimoto's disease. *Clin Exp Immunol.* 2004;137(3):601-605. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02576.x
81. Unutmas D. RORC2: The master of human Th17 cell programming. *Eur J Immunol.* 2009;39(6):1452-1455. doi:10.1002/EJI.200939540
82. Crome SQ, Wang AY, Kang CY, Levings MK. The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2009;39(6):1480-1493. doi:10.1002/EJI.200838908
83. Schraml BU, Hildner K, Ise W, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T H 17 differentiation HHS Public Access. *Nature.* 2009;460(7253):405-409. doi:10.1038/nature08114
84. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133-1141. doi:10.1038/NI1261
85. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223(1):87. doi:10.1111/J.1600-065X.2008.00628.X
86. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(9):950-957. doi:10.1038/ni1497
87. Acosta-Rodriguez E v., Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007;8(9):942-949. doi:10.1038/ni1496
88. Yang L, Anderson DE, Baecher-allan C, et al. IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human TH cells 17. *October.* 2009;454(7202):350-352. doi:10.1038/nature07021.IL-21

89. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421(6924):744-748. doi:10.1038/nature01355
90. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(2):233-240. doi:10.1084/jem.20041257
91. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710
92. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(3):1910-1914. doi:10.1074/jbc.M207577200
93. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 2005 6:11. 2005;6(11):1123-1132. doi:10.1038/ni1254
94. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol*. 2012;33(10):505-512. doi:10.1016/j.it.2012.05.004
95. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2007;148(1):32-46. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03356.x
96. Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: What do we know so far? *J Immunol Res*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/979167
97. Figueroa-Vega N, Alfonso-Pérez M, Benedicto I, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R, Marazuela M. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010;95(2):953-962. doi:10.1210/jc.2009-1719
98. Liu Y, You R, Yu N, et al. Increased proportions of Tc17 cells and NK cells may be risk factors for disease progression in Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol*. 2016;40:332-338. doi:10.1016/j.intimp.2016.09.016

99. Vitales-Noyola M, Ramos-Levi AM, Martínez-Hernández R, et al. Pathogenic Th17 and Th22 cells are increased in patients with autoimmune thyroid disorders. *Endocrine*. 2017;57(3):409-417. doi:10.1007/s12020-017-1361-y
100. Li D, Cai W, Gu R, et al. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. *Clinical Immunology*. 2013;149(3 PB):411-420. doi:10.1016/j.clim.2013.10.001
101. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ t. *Nat Immunol*. 2008;9(6):641-649. doi:10.1038/ni.1610
102. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor- $\beta$ , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses. *Nat Immunol*. 2008;9(6):650-657. doi:10.1038/ni.1613
103. Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science (1979)*. 2007;317(5835):256-260. doi:10.1126/science.1145697
104. Liu Y, Tang X, Tian J, et al. Th17/Treg Cells Imbalance and GITRL Profile in Patients with Hashimoto's Thyroiditis. *Int J Mol Sci*. 2014;15:21674-21686. doi:10.3390/ijms151221674
105. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-787. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009
106. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity*. 2009;30(5):636-645. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.010
107. Samstein RM, Arvey A, Josefowicz SZ, et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell*. 2012;151(1):153-166. doi:10.1016/j.cell.2012.06.053
108. Furtado GC, de Curotto Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4+ regulatory T cell function. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;196(6):851-857. doi:10.1084/jem.20020190
109. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1142-1151. doi:10.1038/ni1263
110. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription

- Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(12):1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152
111. Getnet D, Grosso JF, Goldberg M v., et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Mol Immunol*. 2010;47(7-8):1595-1600. doi:10.1016/j.molimm.2010.02.001
112. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2010;184(7):3433-3441. doi:10.4049/JIMMUNOL.0904028
113. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosagenerated induced Foxp3+ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(10):1723-1742. doi:10.1084/jem.20120914
114. Yadav M, Louvet C, Davini D, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(10):1713-1722. doi:10.1084/jem.20120822
115. Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(9):1209-1217. doi:10.1172/jci23395
116. Prakken B, Ellen Wehrens, van Wijk F. Editorial: Quality or quantity? Unraveling the role of Treg cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013;65(3):552-554. doi:10.1002/ART.37831
117. Scheinecker C, Bonelli M, Smolen JS. Pathogenetic aspects of systemic lupus erythematosus with an emphasis on regulatory T cells. *J Autoimmun*. 2010;35(3):269-275. doi:10.1016/j.jaut.2010.06.018
118. Bonelli M, Savitskaya A, von Dalwigk K, et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int Immunol*. 2008;20(7):861-868. doi:10.1093/intimm/dxn044
119. Lin SC, Chen KH, Lin CH, Kuo CC, Ling QD, Chan CH. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(12):987-996. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01882.x
120. Venigalla RKC, Tretter T, Krienke S, et al. Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory

- T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008;58(7):2120-2130. doi:10.1002/ART.23556
121. Dolff S, Bijl M, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CGM, Abdulahad WH. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T reg balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology.* 2011;141(2):197-204. doi:10.1016/j.clim.2011.08.005
  122. Humrich JY, Morbach H, Undeutsch R, et al. Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):204-209. doi:10.1073/pnas.0903158107
  123. Sarkar S, Fox DA. Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(3):710-713. doi:10.1002/ART.22415
  124. Wei WZ, Jacob JB, Zielinski JF, et al. Concurrent induction of antitumor immunity and autoimmune thyroiditis in CD4+CD25+ regulatory T cell-depleted mice. *Cancer Res.* 2005;65(18):8471-8478. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0934
  125. Wei WZ, Morris GP, Kong YCM. Anti-tumor immunity and autoimmunity: A balancing act of regulatory T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2004;53(2):73-78. doi:10.1007/s00262-003-0444-1
  126. Saitoh O, Nagayama Y. Regulation of Graves' hyperthyroidism with naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in a mouse model. *Endocrinology.* 2006;147(5):2417-2422. doi:10.1210/en.2005-1024
  127. Verginis P, Li HS, Carayanniotis G. Tolerogenic Semimature Dendritic Cells Suppress Experimental Autoimmune Thyroiditis by Activation of Thyroglobulin-Specific CD4 + CD25 + T Cells . *The Journal of Immunology.* 2005;174(11):7433-7439. doi:10.4049/jimmunol.174.11.7433
  128. Li C, Yuan J, Zhu YF, et al. Imbalance of Th17/Treg in Different Subtypes of Autoimmune Thyroid Diseases. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2016;40(1-2):245-252. doi:10.1159/000452541
  129. Xue H, Yu X, Ma L, et al. The possible role of CD4+CD25highFoxp3+/CD4+IL-17A+ cell imbalance in the autoimmunity of patients with Hashimoto thyroiditis. *Endocrine.* 2015;50(3):665-673. doi:10.1007/s12020-015-0569-y
  130. Hu Y, Zhang L, Chen H, et al. Analysis of Regulatory T Cell Subsets and Their Expression of Helios and PD-1 in Patients with Hashimoto Thyroiditis. *Int J Endocrinol.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/5368473



131. Bossowski A, Moniuszko M, Dabrowska M, et al. Lower proportions of CD4+CD25high and CD4 +FoxP3, but not CD4+CD25+CD127low FoxP3+T cell levels in children with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2013;46(3):222-230. doi:10.3109/08916934.2012.751981
132. Rodríguez-Muñoz A, Vitales-Noyola M, Ramos-Levi A, Serrano-Somavilla A, González-Amaro R, Marazuela M. Levels of regulatory T cells CD69+NKG2D+IL-10+ are increased in patients with autoimmune thyroid disorders. *Endocrine*. 2016;51(3):478-489. doi:10.1007/s12020-015-0662-2
133. Manolova I, Gerenova J, Ivanova M. Serum levels of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in patients with systemic lupus erythematosus and Hashimoto's thyroiditis. *Eur Cytokine Netw*. 2013;24(1):69-74. doi:10.1684/ECN.2013.0331
134. Chen Z, Wang Y, Ding X, et al. The proportion of peripheral blood tregs among the CD4+ T cells of autoimmune thyroid disease patients: A meta-analysis. *Endocr J*. 2020;67(3):317-326. doi:10.1507/endocrj.EJ19-0307
135. Chistiakov DA. Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis. *J Autoimmune Dis*. 2005;2:1-21. doi:10.1186/1740-2557-2-1
136. Many MC, Maniratunga S, Varis I, Dardenne M, Drexhage HA. Two-step development of Hashimoto-like thyroiditis in genetically autoimmune prone non-obese diabetic mice: effects of. *J Endocrinol*. 1994;147(2):311-320. doi:10.1677/joe.0.1470311
137. Simons PJ, Delemarre FGA, Drexhage HA. Antigen-presenting dendritic cells as regulators of the growth of thyrocytes: A role of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6. *Endocrinology*. 1998;139(7):3148-3156. doi:10.1210/endo.139.7.6110
138. Marazuela M, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Larranaga E, de Landazuri MO. Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol*. 1995;102(2):328. doi:10.1111/J.1365-2249.1995.TB03785.X
139. Fountoulakis S, Tsatsoulis A. On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: A unifying hypothesis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;60(4):397-409. doi:10.1046/j.1365-2265.2004.01978.x
140. Bottazzo GF, Hanafusa T, Pujol-Borrell R, Feldmann M. Role of Aberrant Hla-Dr Expression and Antigen Presentation in Induction of Endocrine Autoimmunity. *The Lancet*. 1983;322(8359):1115-1119. doi:10.1016/S0140-6736(83)90629-3

141. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Internal Medicine*. 2001;40(4):275-284. doi:10.2169/internalmedicine.40.275
142. Luty J, Ruckemann-Dziurdzińska K, Witkowski JM, Bryl E. Immunological aspects of autoimmune thyroid disease – Complex interplay between cells and cytokines. *Cytokine*. 2019;116(January):128-133. doi:10.1016/j.cyto.2019.01.003
143. Weekley CM, Harris HH. Which form is that? the importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. *Chem Soc Rev*. 2013;42(23):8870-8894. doi:10.1039/c3cs60272a
144. Schwarz K, Stesney JA, Foltz CM. Relation between selenium traces in L-cystine and protection against dietary liver necrosis. *Metabolism*. 1959;8:88-90. Accessed May 2, 2022. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19591404279>
145. El-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;475(1-2):123-139. doi:10.1016/S0027-5107(01)00075-6
146. Labunskyy VM, Lee BC, Handy DE, Loscalzo J, Hatfield DL, Gladyshev VN. Both maximal expression of selenoproteins and selenoprotein deficiency can promote development of type 2 diabetes-like phenotype in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(12):2327-2336. doi:10.1089/ars.2010.3526
147. Shanu A, Groebler L, Kim HB, et al. Selenium inhibits renal oxidation and inflammation but not acute kidney injury in an animal model of rhabdomyolysis. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(7):756-769. doi:10.1089/ars.2012.4591
148. Seale LA, Gilman CL, Hashimoto AC, Ogawa-Wong AN, Berry MJ. Diet-induced obesity in the selenocysteine lyase knockout mouse. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(10):761-774. doi:10.1089/ars.2015.6277
149. Wrobel JK, Power R, Toborek M. Biological activity of selenium: Revisited. *IUBMB Life*. 2016;68(2):97-105. doi:10.1002/iub.1466
150. Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*. 2013;18(3):3292-3311. doi:10.3390/molecules18033292
151. Pieczyńska J, Grajeta H. The role of selenium in human conception and pregnancy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015;29:31-38. doi:10.1016/j.jtemb.2014.07.003
152. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem*. 2003;86(1):1-12. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01854.x

153. Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Guicheney P, Allamand V. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2009;1790(11):1569-1574. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.002
154. Brooks JD, Metter EJ, Chan DW, et al. Plasma selenium level before diagnosis and the risk of prostate cancer development. *Journal of Urology*. 2001;166(6):2034-2038. doi:10.1016/S0022-5347(05)65500-0
155. Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(4):762-773. doi:10.1093/AJCN/84.4.762
156. Amaral AFS, Cantor KP, Silverman DT, Malats N. Selenium and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(9):2407-2415. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0544
157. Hughes DJ, Fedirko V, Jenab M, et al. Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. *Int J Cancer*. 2015;136(5):1149-1161. doi:10.1002/IJC.29071
158. Burbano X, Miguez-Burbano MJ, McCollister K, et al. Impact of a selenium chemoprevention clinical trial on hospital admissions of HIV-infected participants. *HIV Clin Trials*. 2002;3(6):483-491. doi:10.1310/A7LC-7C9V-EWKf-2Y0H
159. Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, et al. Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(7):1337-1383. doi:10.1089/ARS.2010.3275
160. Rayman MP. Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*. 2008;100(2):254-268. doi:10.1017/S0007114508939830
161. Godos J, Giampieri F, Micek A, et al. Effect of Brazil Nuts on Selenium Status, Blood Lipids, and Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Antioxidants*. 2022;11(2). doi:10.3390/ANTIOX11020403/S1
162. Fordyce F. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: *Essentials of Medical Geology*. Elsevier B.V.; 2005:373-415. Accessed May 2, 2022. <https://nora.nerc.ac.uk/id/eprint/19039/>
163. Goulding R. Book Reviews : EHC 58: Selenium. Report of the International Programme on Chemical Safety. Published by WHO, Geneva, 1987. Accessed May 2, 2022. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/146642408810800117>
164. Cuvardic M. Selenium in soil. *Zb Matice Srp Prir Nauk*. 2003;(104):23-37.

165. Reimann C, Birke M, Demetriades A, Filzmoser P, O'Connor P. GEMAS Project-Geochemical mapping of agricultural and grazing land soil of Europe. In: Schweizerbarth; 2013.
166. Alfthan G, Euroola M, Ekholm P, et al. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015;31:142-147. doi:10.1016/j.jtemb.2014.04.009
167. Jablonska E, Gromadzinska J, Klos A, et al. Selenium, zinc and copper in the Polish diet. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013;31(2):259-265. doi:10.1016/j.jfca.2013.05.016
168. Hurst R, Collings R, Harvey LJ, et al. EURRECA-Estimating Selenium Requirements for Deriving Dietary Reference Values. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(10):1077-1096. doi:10.1080/10408398.2012.742861
169. Jarosz M, Rychlik E, Stoś K, Charzewska J. *Normy Żywienia Dla Populacji Polski i Ich Zastosowanie*. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny; 2020.
170. Compounds I of M (US) P on DA and R. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Published online July 27, 2000. doi:10.17226/9810
171. Agostoni C, Canani RB, Fairweather-Tait S, et al. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal*. 2014;12(10). doi:10.2903/J.EFSA.2014.3846
172. Levander OA, Whanger PD. Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for selenium and iodine dietary recommendations. *J Nutr*. 1996;126(9 Suppl). doi:10.1093/JN/126.SUPPL\_9.2427S
173. Cavedon E, Manso J, Negro I, et al. Selenium Supplementation, Body Mass Composition, and Leptin Levels in Patients with Obesity on a Balanced Mildly Hypocaloric Diet: A Pilot Study. *Int J Endocrinol*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/4802739
174. Zhou J, Chen X. *Tolerable Upper Intake Level on Vitamins and Minerals*. Vol 33.; 2004.

175. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: A review. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58(3):391-402. doi:10.1038/sj.ejcn.1601800
176. Köhrle J, Jakob F, Contempré B, Dumont JE. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev.* 2005;26(7):944-984. doi:10.1210/ER.2001-0034
177. Carroll L, Davies MJ, Pattison DI. Reaction of low-molecular-mass organoselenium compounds (and their sulphur analogues) with inflammation-associated oxidants. *Free Radic Res.* 2015;49(6):750-767. doi:10.3109/10715762.2015.1018247
178. Speckmann B, Grune T. Epigenetic effects of selenium and their implications for health. *Epigenetics.* 2015;10(3):179-190. doi:10.1080/15592294.2015.1013792
179. Skowrońska-Józwiak E. The effect of Selenium on thyroid physiology and pathology. *Thyroid Res.* 2015;8(Suppl 1):A23. doi:10.1186/1756-6614-8-s1-a23
180. Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: Interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(3):160-171. doi:10.1038/nrendo.2011.174
181. Guastamacchia E, Giagulli V, Licchelli B, Triggiani V. Selenium and Iodine in Autoimmune Thyroiditis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2015;15(4):288-292. doi:10.2174/1871530315666150619094242
182. Schweizer U, Steegborn C. New insights into the structure and mechanism of iodothyronine deiodinases. *J Mol Endocrinol.* 2015;55(3):T37-T52. doi:10.1530/JME-15-0156
183. Triggiani V, Tafaro E, Giagulli V, et al. Role of Iodine, Selenium and Other Micronutrients in Thyroid Function and Disorders. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2009;9(3):277-294. doi:10.2174/187153009789044392
184. Contempré B, Je D, Bebe N, Ch T, At D, Vanderpas J. Effect of selenium supplementation in hypothyroid subjects of an iodine and selenium deficient area : The possible danger of indiscriminate supplementation of iodine-deficient subjects with selenium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1991;73(1):213-215. doi:10.1210/jcem-73-1-213
185. Vanderpas J B, Contempré B, Duale NL, et al. Selenium deficiency mitigates hypothyroxinemia in iodine-deficient subjects. *Paper Knowledge Toward a Media History of Documents.* 1993;57(2):271S-275S. doi:10.1093/ajcn/57.2.271S

186. Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of disease: Hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(10):713-720. doi:10.1038/ncpendmet0621
187. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(3):1143-1149. doi:10.1016/S0006-291X(05)80905-2
188. Maia AL, Goemann IM, Meyer ELS, Wajner SM. Type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *Journal of Endocrinology.* 2011;209(3):283-297. doi:10.1530/JOE-10-0481
189. Behne D, Kyriakopoulos A. Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine. *Journal of Nutrition.* 1993;57(2):310S-312S. doi:10.1093/ajcn/57.2.310S
190. Bermano G, Nicol F, Dyer JA, et al. Selenoprotein Gene Expression during Selenium-Repletion of Selenium-Deficient Rats. *Biol Trace Elem Res.* 1996;51(3):211-223. doi:10.1007/BF02784076
191. Zagrodzki P, Nicol F, Arthur JR, Słowiacek M. Selenoproteins in human thyroid tissues. *BioFactors.* 2001;14(1-4):223-227. doi:10.1002/biof.5520140128
192. Schweizer U, Weitzel JM, Schomburg L. Think globally: Act locally. New insights into the local regulation of thyroid hormone availability challenge long accepted dogmas. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;289(1-2):1-9. doi:10.1016/j.mce.2008.04.007
193. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ. Selenium in the immune system. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl 1). doi:10.1093/JN/133.5.1457S
194. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(7):705-743. doi:10.1089/ars.2011.4145
195. Boyne R, Arthur JR. The response of selenium-deficient mice to *Candida albicans* infection. *Journal of Nutrition.* 1986;116(5):816-822. doi:10.1093/jn/116.5.816
196. Barrett CW, Short SP, Williams CS. Selenoproteins and oxidative stress-induced inflammatory tumorigenesis in the gut. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2017;74(4):607-616. doi:10.1007/s00018-016-2339-2
197. Nettleford SK, Prabhu KS. Selenium and selenoproteins in gut inflammation—A review. *Antioxidants.* 2018;7(3):1-12. doi:10.3390/antiox7030036
198. Zhang Z, Gao X, Cao Y, et al. Selenium Deficiency Facilitates Inflammation Through the Regulation of TLR4 and TLR4-Related Signaling Pathways in the

- Mice Uterus. *Inflammation*. 2015;38(3):1347-1356. doi:10.1007/s10753-014-0106-9
199. Gao X, Zhang Z, Li Y, et al. Selenium Deficiency Facilitates Inflammation Following *S. aureus* Infection by Regulating TLR2-Related Pathways in the Mouse Mammary Gland. *Biol Trace Elem Res*. 2016;172(2):449-457. doi:10.1007/s12011-015-0614-y
200. Beck MA. Antioxidants and Viral Infections: Host Immune Response and Viral Pathogenicity. *J Am Coll Nutr*. 2001;20(June):384S-388S. doi:10.1080/07315724.2001.10719172
201. Hoffmann FKW, Hashimoto AC, Shafer LA, Dow S, Berry MJ, Hoffmann PR. Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4 + T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *Journal of Nutrition*. 2010;140(6):1155-1161. doi:10.3945/jn.109.120725
202. Bentley-Hewitt KL, Chen RKY, Lill RE, et al. Consumption of selenium-enriched broccoli increases cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated ex vivo, a preliminary human intervention study. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(12):2350-2357. doi:10.1002/mnfr.201400438
203. Fisfalen ME, Soltani K, Kaplan E, et al. Evaluating the role of Th0 and Th1 clones in autoimmune thyroid disease by use of Hu-SCID chimeras. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;85(3):253-264. doi:10.1006/CLIN.1997.4431
204. Balázs C, Kaczur V. Effect of selenium on HLA-DR expression of thyrocytes. *Autoimmune Dis*. 2012;1(1). doi:10.1155/2012/374635
205. Tan L, Sang ZN, Shen J, et al. Selenium supplementation alleviates autoimmune thyroiditis by regulating expression of TH1/TH2 cytokines. *Biomed Environ Sci*. 2013;26(11):920-925. doi:10.3967/BES2013.022
206. Krysiak R, Okopien B. The effect of levothyroxine and selenomethionine on lymphocyte and monocyte cytokine release in women with Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011;96(7):2206-2215. doi:10.1210/jc.2010-2986
207. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-964. doi:10.1038/nri1733
208. Parnham MJ, Winkelmann J, Leyck S. Macrophage, lymphocyte and chronic inflammatory responses in selenium deficient rodents. Association with decreased

- glutathione peroxidase activity. *Int J Immunopharmacol*. 1983;5(5):455-461. doi:10.1016/0192-0561(83)90022-X
209. Bryl E, Daca A, Jóźwik A, Witkowski JM. Human CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells indiscriminately kill autologous activated T cells. *Immunology*. 2009;128(1 PART 2):287-295. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02961.x
  210. Salgado FJ, Pérez-Díaz A, Villanueva NM, Lamas O, Arias P, Nogueira M. CD26: A negative selection marker for human Treg cells. *Cytometry Part A*. 2012;81 A(10):843-855. doi:10.1002/cyto.a.22117
  211. Lastovicka J. The Phenotypic Markers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Regulatory Lymphocytes. *Research in Immunology: An International Journal*. 2013;2013. doi:10.5171/2013.119348
  212. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4 + CD25 + and FOXP3 + Regulatory T Cells during the Follicular Phase of the Menstrual Cycle: Implications for Human Reproduction . *The Journal of Immunology*. 2007;178(4):2572-2578. doi:10.4049/jimmunol.178.4.2572
  213. Neumeister B, Besenthal I, Böhm BO, et al. *Diagnostyka Laboratoryjna : Poradnik Kliniczny*. Urban & Partner; 2013.
  214. Whanger PD. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr*. 2004;91(1):11-28. doi:10.1079/BJN20031015
  215. Zeng H, Combs GF. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem*. 2008;19(1):1-7. doi:10.1016/J.JNUTBIO.2007.02.005
  216. Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, et al. Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: A randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007;147(4):217-223. doi:10.7326/0003-4819-147-4-200708210-00175
  217. Wang XL, Yang TB, Wei J, Lei GH, Zeng C. Association between serum selenium level and type 2 diabetes mellitus: A non-linear dose-response meta-analysis of observational studies. *Nutr J*. 2016;15(1):1-9. doi:10.1186/S12937-016-0169-6/FIGURES/4
  218. Laclaustra M, Stranges S, Navas-Acien A, Ordovas JM, Guallar E. Serum selenium and serum lipids in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):643-648. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2010.01.005



219. Hercberg S, Bertrais S, Czernichow S, et al. Alterations of the lipid profile after 7.5 years of low-dose antioxidant supplementation in the SU.VI.MAX study. *Lipids*. 2005;40(4):335-342. doi:10.1007/s11745-006-1391-3
220. Coudray C, Roussel AM, Mainard F, Arnaud J, Favier A. Lipid peroxidation level and antioxidant micronutrient status in a pre-aging population; correlation with chronic disease prevalence in a French epidemiological study (Nantes, France). *J Am Coll Nutr*. 1997;16(6):584-591. doi:10.1080/07315724.1997.10718723
221. Rayman MP, Winther KH, Pastor-Barriuso R, et al. Effect of long-term selenium supplementation on mortality: Results from a multiple-dose, randomised controlled trial. *Free Radic Biol Med*. 2018;127(November 2017):46-54. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.015
222. Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med*. 2008;168(4):404-410. doi:10.1001/archinternmed.2007.74
223. Vinceti M, Wei ET, Malagoli C, Bergomi M, Vivoli G. Adverse health effects of selenium in humans. *Rev Environ Health*. 2001;16(4):233-251. doi:10.1515/REVEH.2001.16.4.233
224. Erdal M, Sahin M, Hasimi A, Uckaya G, Kutlu M, Saglam K. Trace element levels in hashimoto thyroiditis patients with subclinical hypothyroidism. *Biol Trace Elem Res*. 2008;123(1-3):1-7. doi:10.1007/s12011-008-8117-8
225. Gerasimos E Krassas, Nikolaos Pontikides, Kostas Tziomalos, Themistoklis Tzotzas, Ioana Zosin, Mihaela Vlad, Anton Luger, Alois Gessl, Rodrig Marculescu, Vincenzo Toscano, Sara Morgante, Enrico Papini, Valdis Pirags, Ilze Konrade, Sandra Hybsier, Peter J JK. Selenium status in patients with autoimmune and non-autoimmune thyroid diseases from four European countries. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2014;9(6):685-692. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L600553366%0Ahttp://dx.doi.org/10.1586/17446651.2014.960845>
226. Pirola I, Rotondi M, Cristiano A, et al. Selenium supplementation in patients with subclinical hypothyroidism affected by autoimmune thyroiditis: Results of the SETI study. *Endocrinol Diabetes Nutr*. 2020;67(1):28-35. doi:10.1016/j.endinu.2019.03.018
227. Pilli T, Cantara S, Schomburg L, et al. IFN $\gamma$ -Inducible Chemokines Decrease upon Selenomethionine Supplementation in Women with Euthyroid Autoimmune

- Thyroiditis: Comparison between Two Doses of Selenomethionine (80 or 160 µg) versus Placebo. *Thyroid J.* 2015;4:226-233. doi:10.1159/000439589
228. Wichman J, Winther KH, Bonnema SJ, Hegedüs L. Selenium Supplementation Significantly Reduces Thyroid Autoantibody Levels in Patients with Chronic Autoimmune Thyroiditis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid.* 2016;26(12):1681-1692. doi:10.1089/thy.2016.0256
229. Fan Y, Xu S, Zhang H, et al. Selenium supplementation for autoimmune thyroiditis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Endocrinol.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/904573
230. Winther KH, Rayman MP, Bonnema SJ, Hegedüs L. Selenium in thyroid disorders - essential knowledge for clinicians. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(3):165-176. doi:10.1038/S41574-019-0311-6
231. Winther KH, Wichman JEM, Bonnema SJ, Hegedüs L. Insufficient documentation for clinical efficacy of selenium supplementation in chronic autoimmune thyroiditis, based on a systematic review and meta-analysis. *Endocrine.* 2017;55(2):376-385. doi:10.1007/s12020-016-1098-z
232. van Zuuren EJ, Albusta AY, Fedorowicz Z, Carter B, Pijl H. Selenium Supplementation for Hashimoto's Thyroiditis: Summary of a Cochrane Systematic Review. *Eur Thyroid J.* 2014;3(1):25-31. doi:10.1159/000356040
233. Winther KH, Papini E, Attanasio R, Negro R, Hegedüs L. A 2018 European Thyroid Association Survey on the Use of Selenium Supplementation in Hashimoto's Thyroiditis. *Eur Thyroid J.* 2020;9(2):99-105. doi:10.1159/000504781
234. Negro R, Attanasio R, Grimaldi F, Marcocci C, Guglielmi R, Papini E. A 2016 Italian Survey about the Clinical Use of Selenium in Thyroid Disease. *Eur Thyroid J.* 2016;5(3):164-170. doi:10.1159/000447667
235. Niedzielski P, Rudnicka M, Wachelka M, et al. Selenium species in selenium fortified dietary supplements. *Food Chem.* 2016;190:454-459. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.125
236. Los M, Schenk H, Hexel K, Baeuerle PA, Dröge W, Schulze-Osthoff K. IL-2 gene expression and NF-κB activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO Journal.* 1995;14(15):3731-3740. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00043.x

237. Williams MS, Henkart PA. Role of reactive oxygen intermediates in TCR-induced death of T cell blasts and hybridomas. *J Immunol.* 1996;157(6):2395-2402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8805638>
238. Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. Discrete Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide by T Cell Receptor Stimulation. *Journal of Experimental Medicine.* 2002;195(1):59-70. doi:10.1084/jem.20010659
239. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, et al. An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nat Immunol.* 2016;17(11):1322-1333. doi:10.1038/NI.3540
240. Nagayama Y, Horie I, Saitoh O, Nakahara M, Abiru N. CD4+CD25+ naturally occurring regulatory T cells and not lymphopenia play a role in the pathogenesis of iodide-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H2h4 mice. *J Autoimmun.* 2007;29(2-3):195-202. doi:10.1016/J.JAUT.2007.07.008
241. Xue H, Wang W, Li Y, et al. Selenium upregulates CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in iodine-induced autoimmune thyroiditis model of NOD.H-2(h4) mice. *Endocr J.* 2010;57(7):595-601. doi:10.1507/endocrj.k10e-063
242. McLachlan SM, Aliesky H, Banuelos B, Que Hee SS, Rapoport B. Variable Effects of Dietary Selenium in Mice That Spontaneously Develop a Spectrum of Thyroid Autoantibodies. *Endocrinology.* 2017;158(11):3754. doi:10.1210/EN.2017-00275
243. Sang LX, Chang B, Zhu JF, et al. Sodium selenite ameliorates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice by decreasing Th1, Th17, and  $\gamma\delta$ T and increasing CD4(+)CD25(+) regulatory T-cell responses. *World J Gastroenterol.* 2017;23(21):3850-3863. doi:10.3748/wjg.v23.i21.3850
244. Hu Y, Feng W, Chen H, et al. Effect of selenium on thyroid autoimmunity and regulatory T cells in patients with Hashimoto's thyroiditis: A prospective randomized-controlled trial. *Clin Transl Sci.* 2021;14(4):1390-1402. doi:10.1111/cts.12993
245. Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, et al. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev.* 1998;12(6):782-796. doi:10.1101/GAD.12.6.782
246. Rebollo A, Schmitt C. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol Cell Biol.* 2003;81(3):171-175. doi:10.1046/J.1440-1711.2003.01159.X

247. Sridharan R, Smale ST. Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *J Biol Chem.* 2007;282(41):30227-30238. doi:10.1074/JBC.M702541200
248. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):981-985. doi:10.1126/SCIENCE.1079490
249. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):986-992. doi:10.1038/NI904
250. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia R v., Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol.* 2013;190(5):2001-2008. doi:10.4049/JIMMUNOL.1201379
251. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2012;188(3):976-980. doi:10.4049/JIMMUNOL.1102964
252. Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One.* 2011;6(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0024226
253. Szurek E, Cebula A, Wojciech L, et al. Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141161. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0141161
254. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, et al. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol.* 2004;172(10):6435-6443. doi:10.4049/JIMMUNOL.172.10.6435
255. Houot R, Perrot I, Garcia E, Durand I, Lebecque S. Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J Immunol.* 2006;176(9):5293-5298. doi:10.4049/JIMMUNOL.176.9.5293
256. Bryl E, Gazda M, Foerster J, Witkowski JM. Age-related increase of frequency of a new, phenotypically distinct subpopulation of human peripheral blood T cells expressing lowered levels of CD4. Published online 2001. Accessed September

- 19, 2022. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/98/4/1100/1675640/h8160101100.pdf>
257. Hou PF, Zhu LJ, Chen XY, Qiu ZQ. Age-related changes in CD4 + CD25 + FOXP3 + regulatory T cells and their relationship with lung cancer. Published online 2017. doi:10.1371/journal.pone.0173048
258. Dehghani M, Shokrgozar N, Ramzi M, Kalani M, Golmoghaddam H, Arandi N. The impact of selenium on regulatory T cell frequency and immune checkpoint receptor expression in patients with diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2021;70(10):2961-2969. doi:10.1007/s00262-021-02889-5
259. Pearce SHS, Brabant G, Duntas LH, et al. 2013 ETA Guideline: Management of Subclinical Hypothyroidism. *Eur Thyroid J*. 2014;2(4):215-228. doi:10.1159/000356507
260. Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, et al. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: Prepared by the American thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid*. 2014;24(12):1670-1751. doi:10.1089/thy.2014.0028
261. Lazarus J, Brown RS, Daumerie C, Hubalewska-Dydejczyk A, Negro R, Vaidya B. 2014 European Thyroid Association Guidelines for the Management of Subclinical Hypothyroidism in Pregnancy and in Children. *Eur Thyroid J*. 2014;3(2):76-94. doi:10.1159/000362597
262. Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, et al. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. *Thyroid*. 2017;27(3):315-389. doi:10.1089/THY.2016.0457

## 8. Streszczenie

Wśród czynników, które mogą mieć wpływ na etiopatogenezę autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy wymienia się między innymi niedobór selenu. W eksperymentalnych badaniach niedostateczna ilość selenu wiązała się z negatywnym wpływem na wszystkie składniki układu immunologicznego. Z kolei zbyt wysokie dawki selenu tłumią odpowiedź immunologiczną oraz mogą prowadzić do rozwoju cukrzycy typu 2. Dlatego istotne jest, aby przed rozpoczęciem suplementowania selenu oznaczyć jego stężenie w ustroju.

Znaczenie wpływu selenu na przebieg AITD przejawia się między innymi w funkcjonowaniu limfocytów T regulatorowych. Komórki Treg stanowią około 5% populacji limfocytów T i posiadają właściwości immunosupresyjne niezbędne w prewencji rozwoju autoimmunizacji. Prawidłowe funkcjonowanie limfocytów Treg determinuje czynnik transkrypcyjny FOXP3. W badaniu eksperymentalnym, gryzonie którym usunięto tarczycę lub zaburzono funkcję FOXP3 wytworzyły wielonarządową chorobę autoimmunizacyjną oraz stan zapalny, w tym przewlekłe limfocytarne zapalenie tarczycy. U zwierząt, którym podano selen, wykazano spadek poziomu przeciwciał anti-TG, wzrost liczby limfocytów T  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  oraz zwiększoną ekspresją czynnika FOXP3 w porównaniu do myszy nieleczonych. Brak podobnych badań nad wpływem selenu na komórki T regulatorowych u ludzi zainspirowało powstanie tej pracy.

Celem badawczym niniejszej pracy było określenie zależności między stężeniem selenu a odsetkiem limfocytów T regulatorowych u pacjentek z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy, jak również określenie wpływu selenu na markery uszkodzenia i niedoczynności tarczycy (anty-TPO, anti-TG, TSH, fT4 i fT3) oraz określenie wpływu tego pierwiastka na aktywność i zdolności proliferacyjne limfocytów  $CD3^+CD4^+$ . Dodatkowo zbadano stężenie selenu w surowicy krwi obwodowej u pacjentek z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy na terenie Trójmiasta, jak i wpływ suplementacji selenu na tempo wzrostu jego stężenia w surowicy krwi u tych kobiet. Ponadto przeprowadzono analizę dostępnej literatury pod kątem bezpieczeństwa długotrwałego stosowania selenu oraz obecnych standardów medycznych, jak i regulacji prawnych dotyczących tej grupy suplementów.

Badania wykazały, że suplementacja selenu wykazuje potencjalnie korzystny wpływ na limfocyty T regulatorowe, ale w tej kwestii niezbędne jest wykonanie dodatkowych badań na większej próbie. Dodatkowo wykazano, iż suplementacja selenu nie wykazuje ani pozytywnego ani negatywnego wpływu na markery uszkodzenia i niedoczynności tarczycy (anty-TPO, anty-TG, TSH, fT4 i fT3). Ponadto, selen korzystnie wpłynął na odsetek limfocytów CD3<sup>+</sup>, jednakże nie wykazano takiego wpływu na subpopulację CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>.

Wykonane analizy dowodzą, iż osoby z AITD zamieszkujące teren Trójmiasta nie wykazują niedoborów selenu. Suplementacja selenu w dawce 200 µg/ dobę przez trzy miesiące znacząco podniosła jego stężenie w surowicy, osiągając poziom znacząco przekraczający normę (188 µg/l). Analiza dostępnej literatury wykazała, że niekontrolowane i długotrwałe stosowanie suplementów selenu może przyczynić się do zwiększonego ryzyka rozwoju różnych chorób oraz śmiertelności. Niezbędne jest opracowanie regulacji dotyczących wprowadzanych na rynek suplementów zawierających selen.

## 9. Abstract

Selenium deficiency is among the factors that may influence the etiopathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). In experimental studies, the insufficient amount of selenium was associated with a negative effect on all components of the immune system. On the other hand, too high doses of selenium suppress the immune response and may lead to the development of type 2 diabetes (T2D). Therefore, it is important to determine its concentration in the body before starting supplementation with selenium.

The importance of the influence of selenium on the course of AITD is manifested, among others, in the functioning of regulatory T cells. Regulatory T cells (Tregs) constitute about 5% of the T-lymphocyte population and have immunosuppressive properties necessary to prevent the development of autoimmunity. The proper functioning of Treg lymphocytes is determined by the transcription factor FOXP3. In an experimental study, rodents who had their thyroid gland removed or had their FOXP3 function impaired, developed a multiorgan autoimmune disease and inflammation, including chronic lymphocytic thyroiditis. Animals treated with selenium showed a decrease in the level of AbTG antibodies, an increase in the number of CD4+CD25+FOXP3+ T cells, and increased expression of the FOXP3 factor compared to untreated mice. The lack of similar research on the effects of selenium on regulatory T cells in humans inspired this work.

The research objective of this study was to determine the relationship between the concentration of selenium and the percentage of regulatory T cells in patients with autoimmune thyroid disease, as well as to determine the effect of selenium on markers of thyroid damage and hypothyroidism (AbTPO, AbTG, TSH, fT4, and fT3) and to define the influence of selenium on the activity and proliferative capacity of CD3+CD4+ lymphocytes. Additionally, the concentration of selenium in peripheral blood serum was examined in patients with autoimmune thyroiditis in the Tri-City area. The rate of increase of selenium concentration in blood serum of these women during selenium supplementation has also been checked. In addition, the available literature on the safety of long-term selenium use was analyzed as well as the current medical standards. Legal regulations regarding this group of supplements were also reviewed.



Studies have shown that selenium supplementation has a potentially beneficial effect on regulatory T cells, but in this regard, additional research on a larger sample is necessary. Additionally, it has been shown that selenium supplementation has neither a positive nor negative effect on markers of thyroid damage and hypothyroidism (AbTPO, AbTG, TSH, fT4, and fT3). Moreover, selenium had a positive effect on the percentage of CD3+ lymphocytes, however, such an effect on the CD3+CD4+ subpopulation was not shown.

The conducted analyzes show that people with AITD living in the Tri-City area do not show selenium deficiencies. Selenium supplementation at a dose of 200 µg/day for three months significantly increased its concentration in the serum, reaching a level significantly above the norm (188 µg/l). An analysis of the available literature has shown that the uncontrolled and long-term use of selenium supplements may contribute to an increased risk of developing various diseases and increased mortality. It is necessary to develop regulations regarding the selenium supplements placed on the market.

## 10. Załącznik nr 1 Informacja dla pacjenta i Zgoda pacjenta

### INFORMACJA DLA PACJENTA

Choroba Hashimoto jest najczęściej występującą chorobą o podłożu autoimmunizacyjnym, znacznie częściej dotykającą kobiety niż mężczyzn. Wśród czynników, które mogą mieć wpływ na etiopatogenezę choroby Hashimoto wymienia się niedobory selenu. U chorych obserwuje się znaczne zróżnicowanie poziom selenu. W eksperymentalnych badaniach niedostateczna ilość selenu wiązała się z negatywnym wpływem na wszystkie składniki układu immunologicznego.

Szereg badań przeprowadzonych na ludziach dowodzi, iż w przebiegu choroby Hashimoto ilość komórek regulatorowe (Treg) i/lub ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxp3, który determinuje prawidłowe funkcjonowanie limfocytów, była obniżona. Komórki Treg posiadają właściwości immunosupresyjne niezbędne w prewencji rozwoju autoimmunizacji.

Planowane badania naukowe mają na celu określenie wpływu selenu na funkcjonowanie limfocytów Treg w przebiegu choroby Hashimoto.

Projekt badania zakłada włączenie placebo. Placebo to substancja lub działanie obojętne, niemające wpływu na stan zdrowia pacjenta, podawane choremu jako terapia. Chory nie wie, że to, co zastosowano, nie jest prawdziwym leczeniem, zaś wszystko (dla leku głównie: wygląd, zapach, smak, konsystencja), oprócz leczniczych właściwości placebo jest takie samo, jak w rzeczywistej terapii. W wyniku losowania połowie pacjentek biorących udział w badaniu podane zostanie placebo, drugiej połowie zaś suplement zawierający selenometioninę.

Zwracam się z uprzejmą prośbą o wyrażenie zgody na:

- dwukrotne pobranie 30 ml krwi żyłnej;
- udostępnienie danych klinicznych, które będą anonimizowane;
- 3-miesięczną suplementację preparatem selenu lub placebo.

Zaznaczam, że dane osobowe badanych, jak i ich wyniki badań będą objęte klauzulą poufności.

### ZGODA PACJENTA

Wyrażam zgodę na:

- dwukrotne pobranie 30 ml krwi żyłnej;
- udostępnienie danych klinicznych, które będą anonimizowane;
- 3-miesięczną suplementację preparatem selenu lub placebo.

Gdańsk, dnia.....

.....  
(podpis Pacjenta)

.....  
(podpis osoby odbierającej zgodę)

## 11. Załącznik nr 2 Parametry referencyjne wyników laboratoryjnych

<b>Parametr</b>	<b>Wartości referencyjne</b>
Leukocyty [G/l]	4,0-11,0
Limfocyty [G/l]	1,5-4,5
% limfocytów	12,0-50,0
Monocyty [G/l]	0,2-0,8
% monocytów	<12
Neutrocyty [G/l]	2,0-7,5
% neutrocytów	37,0-75,0
Eozynocyty [G/l]	0,04-0,40
% eozynocytów	<7,0
Bazocyty [G/l]	<0,10
% bazocytów	<2,0
Erytrocyty [T/l]	3,8-5,8
Hemoglobina[g/dl]	11,5-16,5
Hematokryt [%]	36-47
MCV [fl]	77-95
MCH [pg]	27-32
MCHC [g/dl]	32 - 36
RDW [%]	11,5-14,5
Płytki krwi [G/l]	150-400
MPV [fl]	9,4-12,6
Glukoza [mg/dl]	70 - 99
Triglicerydy[mg/dl]	<150
HDL [mg/dl]	K: => 45
LDL [mg/dl]	Wartości referencyjne zależą od poziomu ryzyka sercowo-naczyniowego: <115 u osób z małym lub umiarkowanym ryzykiem

<100 u osób z dużym  
ryzykiem

<70 u osób z bardzo dużym  
ryzykiem

<b>ft3 [pmol/l]</b>	2.89 - 4.88
<b>ft4 [pmol/l]</b>	9.01 - 19.05
<b>TSH [mIU/l]</b>	0.42-3.8
<b>Anty-TPO [IU/ml]</b>	<5.61
<b>Anty-TG [IU/ml]</b>	<4.11
<b>FSH [mIU/ml]</b>	faza: folikularna 3.03-8.08, owulacyjna 2.55-16.7, lutealna 1.38-5.47.
<b>Estradiol [pmol/l]</b>	fazy: folikularna 77-921, owulacyjna 139-2382, lutealna 77-1145.
<b>Selen</b>	50 - 120