

UNIWERSYTET MEDYCZNY  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Adam Maciejewski

**Polimorfizmy genu kodującego receptor witaminy D (*VDR*) a ryzyko  
występowania i przebieg kliniczny autoimmunizacyjnych chorób tarczycy**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor

prof. dr hab. n. med. Katarzyna Łącka

Promotor pomocniczy

dr n. med. Michał Kowalczyk

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Marek Ruchała

Poznań, 2019

Składam serdeczne podziękowania

Pani Profesor Katarzynie Łackiej za okazaną życzliwość oraz wszelkie wskazówki i uwagi przekazywane na każdym etapie przygotowywania niniejszej pracy

Panu Doktorowi Michałowi Kowalczykowi za merytoryczne wsparcie w szczególności w zakresie wykonywanych badań molekularnych

Panu Profesorowi Markowi Ruchale za umożliwienie realizacji pracy doktorskiej w Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych

## Spis treści

<b>1.</b>	<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>WSTĘP .....</b>	<b>7</b>
2.1.	Epidemiologia.....	8
2.2.	Etiopatogeneza.....	10
2.3.	Witamina D.....	20
2.4.	Receptor dla witaminy D (VDR).....	23
2.5.	Wpływ witaminy D na układ immunologiczny.....	25
2.6.	Witamina D a choroby autoimmunizacyjne .....	28
2.7.	Polimorfizmy genu <i>VDR</i> .....	30
<b>3.</b>	<b>CELE PRACY.....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>BADANI.....</b>	<b>40</b>
4.1.	Pacjenci.....	40
4.2.	Grupa kontrolna.....	42
<b>5.</b>	<b>METODY.....</b>	<b>44</b>
5.1.	Pobieranie i przechowywanie materiału.....	44
5.2.	Badania biochemiczne (TSH, anty-TPO, anty-Tg) .....	44
5.3.	Badania molekularne .....	45
5.4.	USG tarczycy.....	57
5.5.	Metody statystyczne .....	58
<b>6.</b>	<b>WYNIKI .....</b>	<b>60</b>
6.1.	Polimorfizm rs2228570 ( <i>FokI</i> ).....	60
6.2.	Polimorfizm rs1544410 ( <i>BsmI</i> ) .....	65
6.3.	Polimorfizm rs7975232 ( <i>ApaI</i> ).....	70
6.4.	Polimorfizm rs731236 ( <i>TaqI</i> ).....	74
6.5.	Polimorfizm rs11568820 ( <i>Cdx2</i> ).....	78

6.6.	Zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami <i>VDR</i> a obrazem klinicznym AITD.....	84
6.7.	Ocena nierównowagi sprzężeń .....	102
6.8.	Analiza haplotypów .....	103
<b>7.</b>	<b>OMÓWIENIE .....</b>	<b>108</b>
7.1.	Polimorfizm rs2228570 ( <i>FokI</i> ).....	111
7.2.	Polimorfizm rs1544410 ( <i>BsmI</i> ) .....	114
7.3.	Polimorfizm rs7975232 ( <i>ApaI</i> ).....	116
7.4.	Polimorfizm rs731236 ( <i>TaqI</i> ).....	117
7.5.	Polimorfizm rs11568820 ( <i>Cdx2</i> ).....	119
7.6.	Różnice w rozkładzie genotypów i alleli badanych polimorfizmów pomiędzy grupą z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy a chorymi z orbitopatią tarczycową .....	120
7.7.	Zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami <i>VDR</i> a wybranymi parametrami klinicznymi u chorych na autoimmunizacyjne choroby tarczycy .....	122
7.8.	Ocena nierównowagi sprzężeń oraz analiza haplotypów .....	126
<b>8.</b>	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>131</b>
<b>9.</b>	<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>132</b>
<b>10.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>135</b>
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>138</b>
<b>12.</b>	<b>SPIS TABEL I RYCIN .....</b>	<b>159</b>

## 1. Wykaz stosowanych skrótów

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy (ang. *Autoimmune Thyroiditis*)

AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy (ang. *Autoimmune Thyroid Diseases*)

anty-Tg – przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie

anty-TPO – przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie

anty-TSHR – przeciwciała przeciwko receptorowi dla TSH

APC – komórki prezentujące antygen (ang. *Antigen Presenting Cells*)

CAS – skala aktywności klinicznej (ang. *Clinical Activity Score*)

CI – przedział ufności (ang. *Confidence Interval*)

EDTA – kwas wersenowy (ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

FGF23 – czynnik wzrostu fibroblastów 23 (ang. *Fibroblast Growth Factor 23*)

GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' Disease*)

HLA – ludzki antygen leukocytarny (ang. *Human Leukocyte Antigen*)

HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga (ang. *Hardy-Weinberg Equilibrium*)

IBD – nieswoiste zapalenie jelit (ang. *Inflammatory Bowel Disease*)

LD – nierównowaga sprzężeń (ang. *Linkage Disequilibrium*)

MHC – główny układ zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*)

MS – stwardnienie rozsiane (ang. *Multiple Sclerosis*)

OR – iloraz szans (ang. *Odds Ratio*)

PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

PCR-RFLP – reakcja łańcuchowa polimerazy – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*)

PTH – parathormon

pz – para zasad

RA – reumatoidalne zapalenie stawów (ang. *Rheumatoid Arthritis*)

SD – odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

SLE – toczeń rumieniowaty układowy (ang. *Systemic Lupus Erythematosus*)

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*)

T1D – cukrzyca typu 1 (ang. *Type 1 Diabetes*)

TAO – orbitopatia tarczycowa (ang. *Thyroid Associated Orbitopathy*)

Treg – limfocyty T regulatorowe (ang. *Regulatory T Cells*)

TSH – hormon tyreotropowy (ang. *Thyroid Stimulating Hormone*)

VDR – receptor dla witaminy D (ang. *Vitamin D Receptor*)

VDRE – elementy odpowiadające na witaminę D (ang. *Vitamin D Responsive Elements*)

$\chi^2$  – test chi-kwadrat

## 2. Wstęp

Autoimmunizacyjne choroby tarczycy (ang. *Autoimmune Thyroid Diseases* – AITD) są najczęstszymi spośród narządowo-swoistych chorób autoimmunizacyjnych. Częstość występowania AITD szacowana jest na około 5% populacji, a w wielu regionach świata notuje się wzrost liczby zachorowań (Lee HJ, 2015; Vanderpump MP, 1995). Do AITD zalicza się przede wszystkim autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy (ang. *Autoimmune Thyroiditis* – AIT), określane również od nazwiska autora pierwszego opisu tej jednostki chorobowej jako choroba Hashimoto oraz chorobę Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' Disease* – GD). Obraz kliniczny obu tych chorób jest zazwyczaj przeciwstawny – AIT typowo manifestuje się niedoczynnością tarczycy, podczas gdy w przebiegu GD obserwuje się najczęściej objawy nadmiaru hormonów tarczycy. Obie choroby mogą przebiegać również z eutyreozą.

Odrębnym rozpoznaniem, choć blisko związanym z GD, jest orbitopatia Gravesa określana też jako orbitopatia tarczycowa (ang. *Thyroid Associated Orbitopathy* – TAO). TAO stanowi najczęstszą pozataarczycową manifestację GD. Nasilenie zmian ocznych w przebiegu tego schorzenia może być różne – od stosunkowo niegroźnych i zwykle przemijających objawów, jak dyskomfort w obrębie gałek ocznych, fotofobia, retrakcja powiek czy niewielki wytrzeszcz, po neuropatię nerwu wzrokowego, keratopatię, a nawet perforację rogówki. Te ostatnie niosą ryzyko powstania trwałych zaburzeń widzenia, łącznie z groźbą utraty wzroku. Choć dominują pacjenci z łagodną formą TAO, osoby z umiarkowaną lub ciężką postacią nadal stanowią duże wyzwanie terapeutyczne (Lee JH, 2010).

Jako częsty problemem endokrynologiczny AITD od lat stanowią przedmiot zainteresowania badaczy. Wciąż jednak nie są znane wszystkie szczegóły na temat ich etiopatogenezy. Wiadomo, że AITD to choroby o podłożu wieloczynnikowym, do ich rozwoju przyczynia się współistnienie predyspozycji genetycznej oraz oddziaływania określonych czynników środowiskowych (co zostało szczegółowo omówione w dalszych podrozdziałach). Problemem pozostaje jednak to, że dotychczas poznane przyczyny AITD

tłumaczą tylko niewielką część ryzyka rozwoju tych chorób. W związku z tym, aby poznać pełne spektrum czynników genetycznych i środowiskowych prowadzących do zachorowania na AITD, jak też determinanty przebiegu klinicznego tych chorób, konieczne są dalsze badania. Lepsze poznanie przyczyn AITD może pozwolić na podjęcie prób zapobiegania ich rozwojowi oraz powstanie nowych możliwości terapeutycznych u osób z już zdiagnozowanymi chorobami.

## 2.1. Epidemiologia

AITD uznaje się nie tylko za najczęstsze choroby autoimmunizacyjne, ale też najczęstsze spośród wszystkich chorób tarczycy. Wspomniana wyżej częstość występowania AITD w populacji ogólnej (około 5%) jest wartością szacunkową. Niewiele jest opracowań, które precyzyjnie i szczegółowo odpowiadałyby na pytanie o rozpowszechnienie autoimmunizacyjnych chorób tarczycy (Jacobson DL, 1997; Vanderpump MP, 1995). Informacje zebrane na podstawie bardzo dużej próby w ramach projektu NHANES III (*National Health and Nutrition Examination Survey* – Narodowy Program Badań Zdrowia i Żywnienia) pozwoliły na oszacowanie częstości występowania niedoczynności tarczycy w populacji amerykańskiej na 4,6% (łącznie jawna i subkliniczna niedoczynność tarczycy). Nadczynność tarczycy (dane również dotyczą łącznie postaci jawnej klinicznie, jak i subklinicznej) stwierdzono u 1,3% badanych. Zgromadzone informacje nie pozwalały na określenie częstości występowania AITD, ale obecność podwyższonego stężenia przeciwciał przeciwtarczycowych przeciwko tyreoperoksydazie (anty-TPO) lub przeciwko tyreoglobulinie (anty-Tg) zaobserwowano odpowiednio u 11,3% i 10,4% badanych (Hollowell JG, 2002). Inne kompleksowe opracowanie to publikacja z Wielkiej Brytanii autorstwa Tunbridge'a i wsp. – podwyższone stężenie hormonu tyreotropowego (ang. *Thyroid Stimulating Hormone* – TSH) zaobserwowano u 7,5% kobiet i 2,8% mężczyzn, a koincydencja dodatknych przeciwciał przeciwtarczycowych i podwyższonego stężenia TSH dotyczyła 3% badanych (5,1% wśród kobiet i 1,1% wśród mężczyzn) (Tunbridge WM, 1977). W nowszej publikacji tego samego autora częstość występowania AIT szacowana jest na 2% populacji ogólnej (Tunbridge WM, 2000). W populacji hiszpańskiej częstość występowania niedoczynności tarczycy określono na 9,1% (w tym 4,6% to postaci



subkliniczna), a nadczynności na 0,8%. U 7,5% badanych stwierdzono podwyższone stężenie przeciwciał anti-TPO (Valdés S, 2017). Praca chińskich badaczy z 2006 roku wskazuje z kolei, że AIT dotyczy 0,5 do 2,8% badanych (zależnie od regionu kraju), a częstość występowania GD waha się od 1,1 do 1,4% (Teng W, 2006). Brix i wsp. podają natomiast, że GD może dotyczyć nawet 2% mieszkańców niektórych regionów świata (Brix TH, 2001). Pomimo obserwowanych rozbieżności, z pewnością można stwierdzić, że AIT jest najczęstszą postacią zapalenia tarczycy (Tunbridge WM, 2000).

Jak pokazują przedstawione dane, liczba osób z rozpoznaniem AITD różni się w zależności od regionu zamieszkania. Również przynależność etniczna wydaje się mieć wpływ na ryzyko zachorowania na AITD. Wyniki Hollowella i wsp. pokazały, że przedstawiciele rasy czarnej charakteryzują się niższym średnim stężeniem TSH oraz mniejszą częstością występowania podwyższonych stężeń przeciwciał przeciwtarczycowych (Hollowell JG, 2002). Tymczasem jednak nadczynność tarczycy, której główną przyczyną w krajach o prawidłowej podaży jodu jest GD, częściej obserwowana była wśród Amerykanów rasy czarnej niż u białych Amerykanów (McLeod DS, 2015). Na AITD częściej chorują kobiety niż mężczyźni, co zresztą typowe jest dla większości chorób „z autoagresji” (Jacobson DL, 1997). Zapadalności na AITD jest od 4 do 10 razy wyższa u kobiet w stosunku do mężczyzn (Antonelli A, 2015; Wang C, 1997). Liczba osób chorujących na AIT rośnie ponadto wraz z wiekiem, co dotyczy przede wszystkim kobiet (Vanderpump MP, 2011). Zauważalny jest też wzrost liczby osób z rozpoznaniem AITD wśród populacji ogólnej na przestrzeni lat. Może to być wynikiem lepszej wykrywalności. Nie można jednak też wykluczyć faktycznych wzrostów, uwarunkowanych między innymi rozpowszechnieniem programów suplementacji jodem (Pedersen IB, 2007; Rizzo M, 2010).

Częstość występowania TAO jest trudniejsza do określenia, ale wiadomo, że choroba rozwija się u 25 do 50% pacjentów z GD (Kendall-Taylor P, 1998). Te charakterystyczne objawy oczne najczęściej towarzyszą właśnie GD (około 90% przypadków TAO), mogą jednak sporadycznie pojawiać się w przebiegu AIT (około 3% przypadków TAO) lub u osób z eutyreozą i prawidłowym obrazem ultrasonograficznym gruczołu tarczowego (Burch HB, 1993). Jak wskazuje Wiersinga i wsp., nawet u pozostałych pacjentów z GD, u których nie

obserwuje się jawnych klinicznie objawów TAO, dostrzec można subtelne wykładniki procesu chorobowego toczącego się w obrębie tkanek oczodołów (Wiersinga WM, 2002).

## 2.2. Etiopatogeneza

W przypadku AITD, podobnie jak w innych chorobach autoimmunizacyjnych, kluczowym etapem patogenezy jest przełamanie naturalnych mechanizmów tolerancji wobec własnych antygenów i zapoczątkowanie niekontrolowanej odpowiedzi układu immunologicznego skierowanej przeciwko komórkom gospodarza. AITD są chorobami o etiologii wieloczynnikowej – ich rozwój jest wynikiem współistnienia genetycznej predyspozycji (warunkowanej wielogenowo) oraz oddziaływania różnych tak zwanych spustowych czynników środowiskowych (Lee HJ, 2015; Łącka K, 2011). W ostatnich latach rośnie także zainteresowanie znaczeniem czynników epigenetycznych (Wang B, 2017). Udział genów potwierdzają chociażby dane obserwacyjne, zgodnie z którymi członkowie rodzin chorych na AITD mają wyższe ryzyko zachorowania na AIT lub GD w porównaniu do populacji ogólnej. Ryzyko zachorowania wśród rodzeństwa pacjentów jest nawet około 17 razy wyższe niż w populacji ogólnej, szacunkowo zachoruje 33% spośród rodzeństwa pacjentów. Podobnie, wśród osób spokrewnionych z pacjentami z AITD, częściej stwierdza się podwyższone stężenia przeciwciał przeciwko antygenom tarczycy (nawet 56% wśród rodzeństwa pacjentów) (Tomer Y, 2003). Zgodnie z wynikami badań prowadzonych wśród bliźniąt (ang. *twin study*) czynniki genetyczne przeważają nad czynnikami środowiskowymi, odpowiadając za ryzyko rozwoju AITD w około 70-80%. Zostało to potwierdzone zarówno w przypadku AIT, jak i GD (Brix TH, 2000; Brix TH, 2001; Brix TH, 2012; Hansen PS, 2006; Ringold DA, 2002). Warto jednak zaznaczyć, że *loci* dotychczas opisane jako predysponujące do rozwoju AITD tłumaczą tę dziedziczną predyspozycję jedynie w około 20% (Wiersinga WM, 2016).

Większość znanych czynników ryzyka, zarówno genetycznych, jak i środowiskowych, jest wspólna dla obu autoimmunizacyjnych chorób tarczycy. Wiele jest także podobieństw pomiędzy AITD a innymi chorobami autoimmunizacyjnymi. Istnieją jednak czynniki ryzyka swoiste dla AITD, jak też ściśle związane z AIT lub GD. Podejmowane są również próby

znalezienia markerów genetycznych TAO, które pozwoliłyby na wczesne wyselekcjonowanie spośród pacjentów z GD podgrupy zagrożonej wystąpieniem poważnych zmian ocznych.

### 2.2.1. Czynniki genetyczne

Przeważająca część genów mających znaczenie w etiopatogenezie AITD to geny regulujące różne aspekty funkcjonowania układu immunologicznego, który działając prawidłowo, ma zapewnić skuteczną odpowiedź na takie zagrożenia, jak między innymi infekcje bakteryjne czy wirusowe, przy jednoczesnym zachowaniu tolerancji dla antygenów własnych. Kolejną grupą są geny podlegające ekspresji w obrębie gruczołu tarczowego, które w przebiegu AITD stanowią autoantygeny. Czynniki genetyczne predysponujące do rozwoju AITD można podzielić też na kilka innych sposobów:

- 1) geny swoiste dla AITD oraz wspólne dla AITD i innych chorób autoimmunizacyjnych;
- 2) czynniki genetyczne wspólne dla obu głównych manifestacji klinicznych AITD – AIT i GD, oraz ściśle związane z ryzykiem zachorowania na AIT lub GD.

Do najlepiej poznanych oraz mających najsilniejszy wpływ na ryzyko rozwoju AITD czynników genetycznych należą określone warianty genów kodujących cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex* – MHC), określane też jako ludzkie antygeny leukocytarne (ang. *Human Leukocyte Antigen* – HLA). Szczególną rolę wydają się odgrywać geny HLA-DR, -DP oraz -DQ, kodujące cząsteczki MHC klasy II. MHC klasy II odpowiedzialne są za prezentację antygenów egzogennych limfocytom T CD4<sup>+</sup> przez komórki prezentujące antygen (ang. *Antigen Presenting Cells* – APC). Prezentacja autoantygenów w kontekście cząsteczek MHC klasy II należy do zasadniczych etapów na drodze rozwoju autoimmunizacji, stąd znaczenie genów kodujących te cząsteczki w etiopatogenezie AITD jest zrozumiałe. Do wariantów zidentyfikowanych jako predysponujące do AIT należą HLA-DR3 i -DR4, podczas gdy -DR7 wydaje się wywierać działanie ochronne. Podobne znaczenie wariantom HLA-DR3 i -DR7 przypisuje się w przypadku GD. Za sprzyjający rozwojowi GD uważa się też wariant HLA-DRB1\*08 (Gough SC, 2007). Również niektóre warianty genów kodujących cząsteczki MHC klasy I

wydają się mieć związek z ryzykiem zachorowania na AITD, chociaż temat ten jest mniej poznany i budzi większe wątpliwości (Simmonds MJ, 2007). Przedstawionych wyżej obserwacji, dotyczących w większości populacji kaukaskiej, nie udało się w pełni potwierdzić dla innych badanych grup etnicznych (Jacobson EM, 2008).

We wspomnianym już procesie prezentacji antygenów limfocytom T uczestniczą nie tylko cząsteczki MHC klasy II na powierzchni APC oraz receptory komórek T, ale także inne białka. Konieczna jest między innymi obecność tak zwanych cząsteczek kostymulujących (występujących zarówno na powierzchni APC, jak i komórek T CD4+) oraz odpowiednia między nimi interakcja. Jedną z cząsteczek obecnych na powierzchni błony komórkowej aktywowanych limfocytów T jest CTLA-4 (CD152), która konkuruje z kostymulującą cząsteczką CD28 o wiązanie z obecnymi na powierzchni APC ligandami B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86). W ten sposób CTLA-4 zapobiega nadmiernej odpowiedzi ze strony układu immunologicznego. Wykazano związek polimorfizmów genu *CTLA-4* z ryzykiem zachorowania na choroby zaliczane do AITD, zarówno AIT, jak i GD (Lee HJ, 2015). Wśród polimorfizmów sprzyjających zachorowaniu wymienia się dwa polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) – +49A>G w eksonie 1 i +6230G>A (CT60) w regionie 3'UTR – oraz jeden polimorfizm długości sekwencji mikrosatelitarnej (AT)<sub>n</sub> w regionie 3'UTR (Braun J, 1998; Donner H, 1997; Kotsa K, 1997; Ueda H, 2003; Yanagawa T, 1995).

Innym białkiem odpowiadającym za zapewnienie sygnału kostymulującego podczas prezentacji antygeny limfocytom T jest cząsteczka CD40. CD40 na komórkach APC łączy się z ligandem w postaci białka CD154 na komórkach T (Toubi E, 2004). Kodowany przez gen *CD40* receptor pełni też inne funkcje, między innymi odgrywa istotną rolę w procesie aktywacji limfocytów B i rozwoju odpowiedzi humoralnej (Bishop GA, 2003). Badania prowadzone wśród różnych grup etnicznych potwierdziły istnienie związku pomiędzy polimorfizmami genu *CD40* a ryzykiem zachorowania na GD (Ban Y, 2006; Kim TY, 2003; Kuryłowicz A, 2005; Tomer Y, 2002). Do najczęściej opisywanych należy polimorfizm rs1883832 (-1C>T) (Jacobson EM, 2005). Większość badań nie potwierdziła natomiast znaczenia polimorfizmów *CD40* w etiopatogenezie AIT, co podsumowane zostało w metaanalizie Yanga i wsp. (Yang J, 2012).

Do genów związanych z układem immunologicznym, mogących odgrywać rolę w etiopatogenezie AITD, zalicza się też gen *FCRL3*, kodujący cząsteczkę zaliczaną do nadrodziny receptorów dla immunoglobulin. Wykazano związek polimorfizmów tego genu z ryzykiem zachorowania między innymi na GD, AIT, jak też AITD (obie choroby rozpatrywane łącznie). Większość dotychczasowych badań dotyczyła jednak pacjentów z GD (Fang Y, 2016; Jin GX, 2015).

Prawidłowe działanie genu *FOXP3* również wydaje się być niezbędne dla zachowania tolerancji wobec własnych antygenów. Jest on jednym z genów kluczowych dla funkcjonowania limfocytów T regulatorowych (ang. *Regulatory T Cells* – Treg), które wywierają supresyjne działanie na autoreaktywne limfocyty T w przypadku, gdy zdołały one pokonać mechanizmy tolerancji centralnej. Wykazano, że niektóre warianty polimorficzne genu *FOXP3* są nadreprezentowane u pacjentów z AITD. Istotnie statystycznie różnice w częstości występowania określonych wariantów polimorficznych *FOXP3* w porównaniu z grupą zdrową stwierdzano zarówno dla AIT, jak i GD (Ban Y, 2007; Bossowski A, 2014; Inoue N, 2010; Zheng Y, 2007).

Kolejny gen – *CD25*, kodujący podjednostkę  $\alpha$  receptora dla IL-2, również ma wpływ na działanie Treg. W związku z tym, analogicznie do wcześniej omawianego *FOXP3*, podejrzewa się, że warianty polimorficzne genu powodujące zaburzenie jego działania prowadzą do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Wykazano, że niektóre polimorfizmy *CD25* mogą wpływać na ryzyko rozwoju GD w populacji kaukaskiej, jednakże badaczom chińskim nie udało się potwierdzić podobnej zależności (Brand OJ, 2007; Song ZY, 2013). Wydaje się, że może to być kolejny czynnik genetyczny swoisty dla GD, bowiem nie udowodniono dotychczas jego związku z zachorowaniem na AIT (Tomer Y, 2013).

Cząsteczka PTPN22/LYP kodowana przez gen *PTPN22* jest kolejnym białkiem mającym istotny wpływ na interakcję pomiędzy APC a limfocytami T CD4+. Udowodniono związek polimorfizmu +1858C>T genu *PTPN22* z podatnością na zachorowanie na liczne choroby autoimmunizacyjne, jak cukrzyca typu 1 czy reumatoidalne zapalenie stawów. Związek taki wykazano też dla GD (Houcken J, 2018; Velaga MR, 2004). Wydaje się natomiast, że polimorfizm ten nie wpływa na ryzyko zachorowania na AIT (Luo L, 2012).

Wśród czynników genetycznych związanych z AITD znajdują się też dwa geny kodujące autoantygeny charakterystyczne dla tych chorób. Pierwszy z tych genów to *TSHR* kodujący receptor dla tyreotropiny. Udało się potwierdzić związek niektórych polimorfizmów *TSHR* z ryzykiem zachorowania na GD, a szczególną rolę wydają się odgrywać polimorfizmy zlokalizowane w intronie 1 genu (rs179247, rs2284720, rs12101255, rs12101261 i rs2268458) (Dechairo BM, 2005; Ploski R, 2010; Tomer Y, 2013). Sugeruje się, że warianty polimorficzne *TSHR* mogą prowadzić do zmian w ekspresji tego genu w grasicy, zaburzając w ten sposób mechanizmy tolerancji centralnej wobec własnych antygenów (Lee HJ, 2015). Badano również związek polimorfizmów *TSHR* z ryzykiem zachorowania na AIT, potwierdzając w populacji azjatyckiej istnienie istotnych zależności w przypadku niektórych spośród polimorfizmów (Fujii A, 2017; Liu L, 2012). Powszechnie przyjmuje się jednak, że warianty genu *TSHR* są czynnikiem ryzyka swoistym dla GD (Stefan M, 2017). Badano także wpływ polimorfizmów w obrębie genu *TG* na ryzyko zachorowania na AITD. Koduje on tyreoglobulinę, będącą białkiem swoistym dla gruczołu tarczowego. W przypadku niektórych spośród licznych polimorfizmów tego genu udało się potwierdzić istnienie związku ze zwiększoną zapadalnością na AITD (zarówno GD, jak i AIT) (Ban Y, 2003; Ban Y, 2004; Ban Y, 2012). Istnieją też jednak badania na dużych grupach, które nie potwierdziły zależności pomiędzy polimorfizmami *TG* a zwiększonym ryzykiem występowania autoimmunizacyjnych chorób tarczycy (Belguith-Maalej S, 2008; Collins JE, 2004a).

Poza czynnikami genetycznymi swoście związanymi z ryzykiem zachorowania na AITD (polimorfizmy genów *TG* oraz *TSHR*) większość spośród wyżej wymienionych genów koduje białka odgrywające istotną rolę w procesie prezentacji antygeny limfocytom T przez komórki APC, wchodząc w skład tak zwanej synapsy immunologicznej lub też bierze udział w regulacji aktywacji limfocytów T i B na dalszych etapach rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Te genetyczne czynniki ryzyka związane z działaniem układu immunologicznego są w znacznym zakresie wspólne dla AITD i innych chorób autoimmunizacyjnych.

W AITD, podobnie jak w innych chorobach autoimmunizacyjnych czy zapalnych, zarówno na etapie rozwoju choroby, jak też później w jej przebiegu, istotnym elementem

patogenezy są zmiany stężeń poszczególnych cytokin oraz wzajemnych proporcji pomiędzy pro- i przeciwzapalnie działającymi cząsteczkami. Istnieją liczne doniesienia na temat znaczenia polimorfizmów genów kodujących cytokiny lub receptory dla cytokin w etiopatogenezie AITD. W przypadku GD przebadano dotychczas przynajmniej 22 różne geny związane z interleukinami. Wśród nich do najlepiej potwierdzonych czynników ryzyka należą SNP w obrębie genu *IL6* (Tu Y, 2017) czy *IL10* (Jung JH, 2016). W przypadku AIT sugeruje się, że na ryzyko rozwoju choroby mogą mieć wpływ między innymi SNP genu *IL6* oraz *IL1B* (Chen RH, 2006; Łącka K, 2014). Liczba potwierdzonych doniesień na temat wpływu polimorfizmów genów związanych z cytokinami na chorobę jest jednak mniejsza w przypadku AIT w porównaniu do GD.

Co charakterystyczne dla chorób wieloczynnikowych, żaden wariant pojedynczego genu nie jest wystarczający, aby wywołać zachorowanie na AITD. Dopiero współistnienie predysponujących do choroby wariantów polimorficznych kilku różnych genów może odgrywać istotną rolę. Udział pojedynczych genów w etiopatogenezie AITD szacowany jest na co najwyżej kilka procent. Wśród pojedynczych czynników genetycznych najsilniejszy jest wpływ wariantów HLA klasy II. Pojawiają się również próby zbadania interakcji pomiędzy predysponującymi do choroby wariantami różnych genów (Jurecka-Lubieniecka B, 2016).

W przypadku TAO podłoże genetyczne wydaje się w dużym stopniu tożsame z genetycznymi czynnikami ryzyka charakterystycznymi dla samej GD. Większość publikacji nie potwierdza istnienia istotnych różnic w zakresie polimorfizmów badanych genów pomiędzy GD a TAO (Khalilzadeh O, 2011; Yin X, 2012). Niektórzy badacze wskazują jednak na istnienie czynników genetycznych swoistych dla wystąpienia TAO w przebiegu GD. Huber i wsp. stwierdzili, że niektóre warianty polimorficzne genu kodującego IL-23R wiążą się ze zwiększonym ryzykiem wystąpieniem TAO (Huber AK, 2007). Podobnie w przypadku SNP genów kodujących IL-1 $\alpha$  oraz IL-1RA autorzy wykazali, że istnieją istotne różnice nie tylko pomiędzy TAO a grupą kontrolną, ale także pomiędzy GD z TAO a GD bez TAO (Khalilzadeh O, 2009). Kolejnym genem, w przypadku którego określone warianty polimorficzne wydają się modyfikować obraz kliniczny GD, zwiększając ryzyko rozwoju objawów ocznych, jest gen kodujący TNF- $\alpha$  (Bednarczuk T, 2004;

Kamizono S, 2000). Problemem pozostaje jednak to, że wielu tego typu obserwacji nie udaje się potwierdzić w kolejnych badanych grupach. Niedawna metaanaliza dotycząca roli czynników genetycznych związanych z interleukinami w patogenezie TAO wskazała jedynie na znaczenie SNP rs1800587 genu *IL1A*, nie potwierdzając istotnego wpływu innych badanych dotychczas genów (Wong KH, 2015).

### 2.2.2. Czynniki środowiskowe

Wśród czynników środowiskowych predysponujących do rozwoju AITD znajduje się nieprawidłowa dieta. Niektóre mikroelementy dostarczane w zbyt dużych lub zbyt małych ilościach zwiększają ryzyko rozwoju AITD. Jednym z takich składników jest jod – pierwiastek niezbędny do syntezy hormonów tarczycy. Dostarczany w nadmiarze może powodować ujawnianie się dodatkowych epitopów w obrębie tyreoglobuliny (Tg). Prawdopodobnie właśnie w ten sposób zwiększa ryzyko immunizacji przeciwko antygenom tarczycy (Latrofa F, 2013). Dowodów na wpływ zawartości jodu w diecie na rozwój AITD dostarczają też badania epidemiologiczne. Okazało się, że po wdrożeniu programów profilaktyki niedoboru jodu obserwuje się wzrost częstości występowania podwyższonych stężeń przeciwciał przeciwarczycowych (anty-TPO i anty-Tg), częściej stwierdza się także niedoczynność tarczycy (Aghini Lombardi F, 2013; Pedersen IB, 2007; Pedersen IB, 2011).

Również ilość selenu spożywanego wraz z posiłkami wydaje się mieć wpływ na rozwój AITD. Tym razem to niedobór mikroelementu jest potencjalnym czynnikiem ryzyka zachorowania (Łączka K, 2015). Selen jest składnikiem enzymów odpowiedzialnych za ochronę przed stresem oksydacyjnym (peroksydaza glutationowa oraz reduktaza tioredoksyny), które w dużych ilościach znajdują się w tarczycy (Effraimidis G, 2014). Według wielu publikacji suplementacja selenem może prowadzić do zmniejszenia stężenia przeciwciał anty-TPO, a także chroni kobiety w okresie poporodowym przed rozwojem autoimmunizacyjnych zaburzeń tarczycy (Gartner R, 2002; Negro R, 2007). Selen prawdopodobnie działa korzystnie także u osób z TAO, zmniejszając ryzyko występowania zaostrzeń (Maccocci M, 2011). Równocześnie są też publikacje, które takiego korzystnego wpływu suplementacji selenem na przebieg AITD nie potwierdzają (Karanikas G, 2008).



Palenie papierosów wywiera wielokierunkowy negatywny wpływ na zdrowie, a jego szkodliwe działanie ujawnia się między innymi w przypadku GD. Osoby palące w większym stopniu zagrożone są wystąpieniem GD, a u tych już chorujących można spodziewać się gorszej odpowiedzi na leczenie. Być może w jeszcze większym stopniu negatywny wpływ palenia dotyczy pacjentów z TAO. Dopiero wiele lat po zaprzestaniu palenia papierosów ryzyko zachorowania wraca do wartości populacyjnych (Vestergaard P, 2002). Inaczej przedstawia się jednak związek palenia wyrobów tytoniowych z AIT. Od lat uważa się, że używka ta nie wpływa na zwiększenie prawdopodobieństwa rozwoju choroby, a nowsze publikacje sugerują wręcz protekcyjny wpływ palenia papierosów. U palaczy obserwowano mniejsze ryzyko rozwoju podwyższonego stężenia przeciwciał przeciwtarczycowych czy też zachorowania na AIT (Asvold BO, 2007; Belin RM, 2004). Rzucenie palenia może być z kolei czynnikiem sprzyjającym pojawieniu się podwyższonych stężeń przeciwciał przeciwko antygenom tarczycy (anty-Tg, w mniejszym stopniu anty-TPO) oraz zachorowaniu na AIT (Carlé A, 2012).

Inna powszechnie znana używka – alkohol – okazał się być czynnikiem chroniącym przed rozwojem AITD. Osoby spożywające alkohol rzadziej zapadają na AIT w porównaniu do abstynentów (Carlé A, 2012). Podobnie, osoby pijące alkohol w mniejszym stopniu zagrożone są zachorowaniem na GD, a efekt ten jest zależny od dawki (Carlé A, 2013). Nie do końca jasny jest mechanizm tego oddziaływania, ale alkohol prawdopodobnie wpływa na układ immunologiczny, redukując ryzyko autoimmunizacji nie tylko wobec antygenów tarczycowych, ale także skierowanej przeciwko innym autoantygenom (Effraimidis G, 2014).

Wśród czynników środowiskowych przyczyniających się do powstania AITD wymienia się też różnego rodzaju infekcje bakteryjne oraz wirusowe. Istnieje kilka koncepcji tłumaczących związek pomiędzy infekcją a późniejszym rozwojem chorób autoimmunizacyjnych. Sugeruje się na przykład, że ze względu na możliwe podobieństwo pomiędzy białkami mikroorganizmów a autoantygenami, może dochodzić do rozwoju reakcji krzyżowej (teoria molekularnej mimikry). Poza tym proces zapalny związany z infekcją może lokalnie zmieniać równowagę pomiędzy elementami tworzącymi układ immunologiczny i ułatwiać w ten sposób autoreaktywnym limfocytom przełamanie

obwodowych mechanizmów tolerancji (teoria „biernego obserwatora”) (Łącka K, 2011). Do czynników infekcyjnych najczęściej wiązanych z podwyższonym ryzykiem zachorowania na AITD zalicza się bakterię *Yersinia enterocolitica* (Brix TH, 2008; Guarneri F, 2011), chociaż niektórzy badacze kwestionują ten związek (Effraimidis G, 2011). Postuluje się też wpływ infekcji wirusem zapalenia wątroby typu C (ang. *Hepatitis C Virus* – HCV) na zwiększone ryzyko rozwoju chorób autoimmunizacyjnych tarczycy (Tomer Y, 2010). Istotne może być w tym przypadku między innymi to, że wirus jest w stanie infekować bezpośrednio tyreocyty (Blackard J, 2012). Innymi wirusami stwierdzanymi w obrębie tyreocytów są enterowirusy, stąd również w ich przypadku sugeruje się wpływ na rozwój AITD, a w szczególności AIT (Hammerstad SS, 2013).

Inną grupą mikroorganizmów, które mogą mieć istotne znaczenie w etiopatogenezie AITD, są bakterie tworzące mikroflorę jelitową. Aktualnie przyjmuje się, że rola tych dotychczas niedocenianych bakterii jest istotna, a zmiany składu mikroflory jelitowej i zaburzenie naturalnej równowagi pomiędzy tworzącymi ją bakteriami mogą sprzyjać wielu chorobom, nie tylko tym dotyczącym bezpośrednio przewodu pokarmowego (Mori K, 2012). Jedną z takich pozajelitowych chorób związanych z mikrobiomem jest z dużym prawdopodobieństwem AIT. U pacjentów chorych na AIT obserwuje się inny, zmieniony mikrobiom jelitowy, a nasilenie tych zmian może nawet korelować z obrazem klinicznym zapalenia tarczycy (Ishaq HM, 2017; Zhao F, 2018).

Wśród środowiskowych czynników ryzyka zachorowania na AITD nie można pominąć leków. Amiodaron oraz jodowe środki kontrastowe, stosowane między innymi przy wykonywaniu tomografii komputerowej, indukują AITD poprzez dużą zawartość jodu. Inne leki oddziałują bezpośrednio na układ immunologiczny, między innymi modyfikując stężenia cytokin. Tak dzieje się w przypadku interferonu  $\alpha$  (stosowanego głównie w leczeniu wirusowego zapalenia wątroby typu C), alemtuzumabu (leczenie stwardnienia rozsianego (ang. *Multiple Sclerosis* – MS) oraz chorób hematologicznych) czy też nowszych leków stosowanych w immunoterapii chorób nowotworowych (ang. *Immune Checkpoint Inhibitors*) (Akeno N, 2011; Ferrari SM, 2018; Weetman AP, 2009). Niedoczynność tarczycy może też zostać wywołana solami litu, co również tłumaczy się głównie wpływem leku na układ immunologiczny (Kibirige D, 2013).

Postuluje się, że również stres może być czynnikiem spustowym wyzwalającym zachorowanie na AITD. Istnieją publikacje potwierdzające tę hipotezę w przypadku GD (Falgarone G, 2013). Prospektywne badania obserwacyjne nie potwierdziły jednak związku stresu z pojawieniem się podwyższonego stężenia przeciwciał anty-TPO lub zachorowaniem na AIT (Effraimidis G, 2012).

### 2.2.3. Czynniki epigenetyczne

Analizując dane epidemiologiczne na temat zapadalności na AITD, nie sposób nie zauważyć wśród pacjentów przewagi kobiet w stosunku do mężczyzn. W przypadku całej grupy AITD stosunek kobiet do mężczyzn szacuje się na od 5 : 1 do 10 : 1 (Effraimidis G, 2014). Choć przyczyna nie jest nadal jednoznaczna, rolę w rozwoju AITD może mieć między innymi zjawisko mikrochimeryzmu płodowo-matczyne. Wykazano też, że liczba przebytych ciąż jest powiązana z ryzykiem zachorowania (Lepez T, 2011; Friedrich N, 2008). Kolejnym, być może nawet ważniejszym czynnikiem sprawiającym, że to kobiety częściej rozwijają AITD, jest zjawisko losowej inaktywacji jednego z chromosomów X w komórkach na etapie rozwoju embrionalnego (mechanizm po raz pierwszy zaproponowany przez Lyon) (Lyon MF, 1961). Zaobserwowano, że ukierunkowana (nierównomierna) inaktywacja chromosomów X (ang. *Skewed X Chromosome Inactivation*) wiąże się z większym ryzykiem rozwoju zarówno AIT, jak i GD (Simmonds MJ, 2014). Ta losowa inaktywacja chromosomów X u kobiet zaliczana jest do epigenetycznych mechanizmów regulacji.

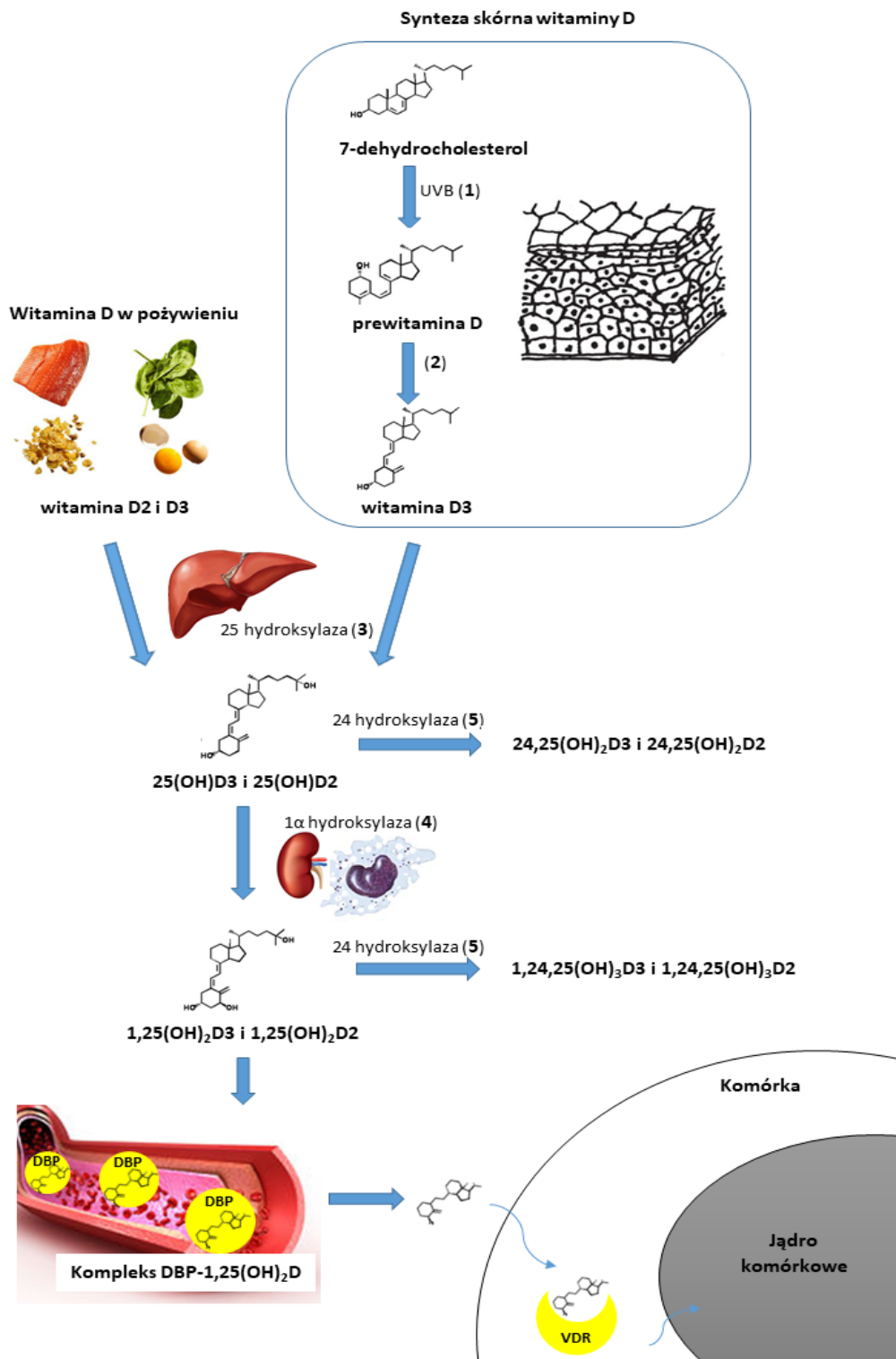
Ryzyko rozwoju AITD zależne jest także od takich mechanizmów epigenetycznych, jak zmiana wzorca metylacji DNA. U chorych na AITD (większość publikacji dotyczyła pacjentów z GD) istnieją obszary o zwiększonym lub zmniejszonym stopniu metylacji w porównaniu do zdrowych, zarówno w obrębie genów związanych z działaniem układu immunologicznego, jak i tych swoistych dla tarczycy (*TSHR*). Wskazuje się też, że polimorfizmy genów związanych z regulacją metylacji DNA mogą wpływać na ryzyko zachorowania na AITD (Wang B, 2017). Innym mechanizmem regulacji epigenetycznej jest modyfikacja histonów – również w tym zakresie obserwuje się różnice pomiędzy pacjentami

z AITD a kontrolą. Postuluje się także, że zmiany w ekspresji niektórych cząsteczek mikroRNA (miRNA) oraz długiego niekodujące RNA (ang. *long non-coding RNA* - lncRNA) mogą odgrywać rolę w etiopatogenezie AITD (Wang B, 2017).

### 2.3. Witamina D

Witamina D jest przedstawicielem heterogennej grupy rozpuszczalnych w tłuszczach cząsteczek steroidowych określanych jako sekosteroidy. Jest ona syntetyzowana w naskórku z 7-dehydrocholesterolu (7-DHC) na drodze nieenzymatycznej reakcji zachodzącej pod wpływem promieniowania UVB. Powstaje w ten sposób cholekalcyferol, określany też jako witamina D<sub>3</sub>. Synteza skórna stanowi główne źródło witaminy D dla organizmu człowieka, może być ona jednak dostarczana również z pożywieniem. Zależnie od rodzaju pokarmu jest to ergokalcyferol – witamina D<sub>2</sub> lub witamina D<sub>3</sub>. Aktywność biologiczną witamina D uzyskuje dopiero w wyniku dwóch reakcji hydroksylacji, stąd czasem określana jest jako prohormon. Pierwsza z tych dwóch reakcji to przyłączenie grupy hydroksylowej w pozycji 25. Zachodzi ona niemal wyłącznie w wątrobie, a głównym enzymem odpowiedzialnym za tę reakcję jest CYP2R1 (cytochrom P450 2R1). Aktywność 25-hydroksylazy wykazują też inne enzymy z grupy cytochromu P450 (między innymi CYP27A1, CYP3A4), ale ich wpływ na stężenie 25-hydroksywitaminy D (25(OH)D – kalcyfediol) jest mniejszy (Bikle DD, 2014). Kolejna hydroksylacja – w pozycji 1 $\alpha$ , ma typowo miejsce w nerkach (w komórkach kanalików proksymalnych), a niezbędnym w jej przebiegu enzymem jest CYP27B1. W efekcie powstaje 1 $\alpha$ ,25-dihydroksywitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D – kalcytriol), będąca metabolitem o największej aktywności biologicznej. Ta hydroksylowana postać witaminy D oddziałuje na komórki organizmu za pośrednictwem jądrowego receptora dla witaminy D (ang. *Vitamin D Receptor* – VDR). Omawiając metabolizm witaminy D, nie można pominąć innego enzymu z grupy hydroksylaz – CYP24A1, którego efektem działania jest przyłączanie grupy hydroksylowej w pozycji 24. W ten sposób tworzone są metabolity o niskiej aktywności biologicznej (24,25(OH)<sub>2</sub>D i 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D) (Bikle DD, 2014). Na rycinie 1 schematycznie przedstawiono metabolizm witaminy D.

Hydroksylacja w pozycji 25 nie podlega ścisłej regulacji, a ilość powstającej 25(OH)D jest w dużej mierze zależna od dostępności substratu. Inaczej jest w przypadku zachodzącej w nerkach hydroksylacji w pozycji 1 $\alpha$ , która zależna jest od stężeń parathormonu (PTH), czynnika wzrostu fibroblastów 23 (ang. *Fibroblast Growth Factor 23* – FGF23), wapnia i fosforanów oraz, na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, samego produktu reakcji – 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Bikle DD, 2014). Wiadomo jednak, że komórki kanalików proksymalnych nefronów nie są jedynymi wykazującymi ekspresję CYP27B1. Enzym ten stwierdzany jest też między innymi w obrębie naskórka, płuc, jelit, przytarczyc, osteoblastów czy niektórych komórek układu immunologicznego (głównie makrofagi i komórki dendrytyczne, w mniejszym stopniu limfocyty T i B) (Bikle DD, 2014). Synteza aktywnego metabolitu witaminy D zachodząca w tych pozanerkowych lokalizacjach wydaje się nie mieć znaczącego wpływu na systemowe stężenie 1,25(OH)<sub>2</sub>D, nie podlega też wspomnianym wcześniej hormonalnym mechanizmom regulacji. Wśród tych „nieklasycznych” miejsc syntezy kalcytriolu zainteresowanie budzą między innymi komórki układu odpornościowego, a kwestią wymagającą dalszego wyjaśnienia pozostają mechanizmy regulujące tę lokalną syntezę 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Aktywność 1 $\alpha$ -hydroksylazy może prawdopodobnie zależeć w tym wypadku od stężenia cytokin takich jak IL-2, TNF- $\alpha$  czy IFN- $\gamma$  oraz samej dostępności substratu (Van Etten E, 2008).



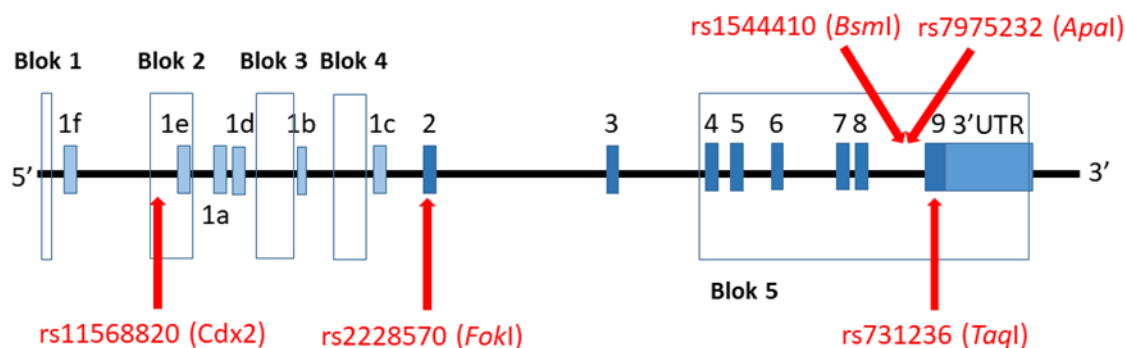
**Rycina 1.** Metabolizm witaminy D

- 1 – promieniowanie UVB 290-315 nm
- 2 – reakcja nieenzymatycznej izomeryzacji pod wpływem temperatury
- 3 – 25 hydroksylaza, główny enzym – **CYP2R1**, mniejsza rola **CYP27A1**
- 4 – 1 $\alpha$  hydroksylaza – **CYP27B1**; 5 – 24 hydroksylaza – **CYP24A1**
- DBP – białko wiążące witaminę D; VDR – receptor dla witaminy D

Witamina D po raz pierwszy została opisana przez McColluma i wsp. w początkach XX wieku, a przyczyniły się do jej odkrycia badania prowadzone nad krzywicą – niegdyś powszechnym problemem zdrowotnym na wielu obszarach (McCollum EV, 1922). Wpływ na gospodarkę wapniowo-fosforanową oraz metabolizm kostny nadal zresztą uważa się za podstawową funkcję witaminy D. Witamina ta, działając poprzez receptory zlokalizowane w komórkach śluzówki przewodu pokarmowego, zwiększa wchłanianie jelitowe wapnia i fosforanów, w nefronach nasila reabsorpcję wapnia, a poprzez osteoklasty wpływa na remodeling kości. W określonych warunkach prowadzi do zwiększenia uwalniania wapnia z kości (nasilenie resorpcji kości). W celu utrzymania właściwych stężeń wapnia i fosforanów (homeostazy wapniowo-fosforanowej) współdziała przede wszystkim z PTH i FGF23. Jest też niezbędna do prawidłowego wzrastania kości oraz w procesie ich mineralizacji (DeLuca HF, 2004). Wiadomo jednak obecnie, że witamina D, oprócz tej dobrze poznanej, tradycyjnej roli, spełnia także inne funkcje – jest istotnym czynnikiem immunomodulującym i przeciwzapalnym, może oddziaływać na sekrecję insuliny oraz funkcjonowanie układu renina-angiotensyna-aldosteron, a także na proliferację i różnicowanie komórek (Fang Y, 2005). W związku z tym zaczęto podejrzewać, że witamina ta może mieć znaczenie w patogenezie wielu schorzeń dotychczas z nią niewiązanych. Dotyczy to między innymi chorób zapalnych, w tym autoimmunizacyjnych, a także nowotworowych (np. raka jajnika, piersi czy jelita grubego) (Bai YH, 2012; Di Rosa M, 2011; Guy M, 2004; Lurie G, 2007).

#### **2.4. Receptor dla witaminy D (VDR)**

Witamina D, jak już zostało wspomniane, działa za pośrednictwem receptora jądrowego – VDR. Receptor dla witaminy D kodowany jest przez gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 12 (12q12–12q14). Gen *VDR* rozciąga się na przestrzeni około 75 kbp i zbudowany jest z 8 eksonów kodujących (2-9). Koniec 5' genu ma złożoną budowę i zawiera co najmniej 6 eksonów niekodujących: 1a-1f (rycina 2) (Zella LA, 2006).



## Rycina 2. Budowa genu *VDR*

Strzałkami zaznaczono przybliżoną lokalizację badanych polimorfizmów w obrębie genu *VDR*  
 Ramki odpowiadają blokom haplotypowym opisywanym wśród rasy kaukaskiej (według Fang Y, 2005)

Receptor VDR jest receptorem jądrowym zaliczanym do nadrodziny aktywowanych przez steroidy i hormony tarczycy czynników transkrypcyjnych. W obrębie komórki lokalizuje się w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym (Margolis RN, 2010). Kalcetriol przenika przez błonę komórkową i łączy się z cząsteczkami VDR obecnymi w cytoplazmie. Tak powstały kompleks wspólnie migruje do jądra komórkowego. Cząsteczka receptora tworzona jest przez trzy domeny – N-kończową wiążącą DNA, C-kończową wiążącą ligand oraz środkową domenę będącą łącznikiem między dwiema wcześniejszymi (Bikle DD, 2014). VDR po związaniu kalcetriolu i wywołanej tym zmianie konformacji przestrzennej cząsteczki jest w stanie połączyć się w kompleks z cząsteczką RXR (ang. *Retinoid X Receptor* – receptor retinoidowy X), a powstały heterodimer oddziałuje z sekwencjami VDRE (ang. *Vitamin D Responsive Elements* – elementy odpowiadające na witaminę D). VDRE zlokalizowane są w sekwencjach promotorowych i pozwalają witaminie D wpływać na ekspresję wybranych genów. Cały ten kompleks tworzony przez VDR, RXR i sekwencję VDRE oddziałuje dodatkowo z jądrowymi cząsteczkami koregulującymi, które mogą wpływać między innymi na białka histonowe, remodelowanie chromatyny czy też wiązanie polimerazy RNA typu II, co ma już bezpośredni wpływ na proces transkrypcji genów (Trochoutsou AI, 2015). Liczbę genów, których ekspresja podlega regulacji za pośrednictwem VDR, szacuje się na przynajmniej 230 (Ramagopalan SV, 2010). Nowsze badania zidentyfikowały od 2000 do 8000 miejsc wiążących VDR (Pike JW, 2015). Wpływ



VDR na ekspresję genów może być dwojaki, niektóre z nich są promowane, inne z kolei podlegają wyciszaniu.

Poza działaniem genomowym witamina D może prawdopodobnie działać też na drodze pozagenomowej. Sprawa ta pozostaje przedmiotem badań, wydaje się jednak, że również w przypadku działania pozagenomowego pośrednikiem w przekazywaniu informacji jest VDR, którego cząsteczki wykazano we wgłębieniach błony komórkowej (kaweolach) (Huhtakangas JA, 2004). Podejrzewa się, że miejscem wiązania kalcytriolu w przypadku tego niegenomowego działania jest alternatywna kieszeń w obrębie VDR, przesunięta w stosunku do miejsca wiązania witaminy D znanego z działania genomowego (Mizwicki MT, 2009).

Gen *VDR* podlega najsilniejszej ekspresji w tkankach i komórkach mających związek z klasycznym działaniem witaminy D (jelito, nerki, kości). Jednakże umiarkowana lub niewielka ekspresja *VDR* ma miejsce w ponad połowie spośród wszystkich rodzajów tkanek i komórek (Carlberg C, 2018), w tym w komórkach układu immunologicznego oraz tyreocytach (Khadzkou K, 2006).

## **2.5. Wpływ witaminy D na układ immunologiczny**

Wpływ witaminy D na układ immunologiczny postulowany był już od bardzo dawna – pierwsze obserwacje naukowe na temat związku pomiędzy witaminą D a odpornością i chorobami infekcyjnymi takimi jak gruźlica czyniono już w latach pięćdziesiątych XX wieku (Ellman P, 1948). Jeszcze wcześniej, bo w wieku XIX, leczono pacjentów z gruźlicą przy pomocy światła. Można podejrzewać, że to terapeutyczne działanie wynikało ze wzmożonej skórnej syntezy witaminy D (Azrielant S, 2017). W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój wiedzy na temat oddziaływania witaminy D na układ immunologiczny, stąd wiemy obecnie, że jest ono szerokie oraz wielokierunkowe. Witamina D wywiera wpływ na funkcjonowanie zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej. Oddziaływać może bezpośrednio na różne komórki układu odpornościowego, ponieważ jak wykazano, *VDR* podlega ekspresji w komórkach dendrytycznych i monocytach, jak też limfocytach T i B

(szczególnie po ich wcześniejszej stymulacji antygenem) (Baekke F, 2010; Chen S, 2007). Nie bez znaczenia wydaje się fakt, że liczne komórki układu odpornościowego zdolne są do syntezy aktywnej postaci witaminy D – 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Bikle DD, 2014). W ten sposób zależne od witaminy D procesy mogą być regulowane lokalnie, niezależnie od systemowego stężenia kalcytriolu.

Mechanizmy odporności wrodzonej mają na celu przede wszystkim walkę z patogenami, w czym istotną rolę odgrywają monocyty, makrofagi oraz komórki dendrytyczne. Kalcytriol wydaje się być czynnikiem stymulującym odporność wrodzoną. Odbywa się to między innymi poprzez indukcję różnicowania monocytów w kierunku komórek o większej dojrzałości, zdolnych do fagocytozy (Koeffler HP, 1984). Pod wpływem witaminy D dochodzi też do zwiększenia syntezy katelicyny – istotnej cząsteczki z grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, uwalnianej przez monocyty w odpowiedzi na związanie receptorów TLR1 i TLR2 (ang. *Toll-like Receptors* – receptory Toll-podobne) z drobnoustrojami (Gombart AF, 2005; Yuk JM, 2009). W przypadku komórek dendrytycznych, będących swego rodzaju łącznikiem pomiędzy odpornością wrodzoną a nabytą, witamina D pełni natomiast funkcję czynnika hamującego. Sprzyja też utrzymaniu stanu niepełnej dojrzałości komórek dendrytycznych, w którym wykazują one właściwości tolerogenne. Aktywne metabolity witaminy D hamują ponadto zdolność prezentowania antygenów przez komórki dendrytyczne (Everts B, 2014).

Oddziaływanie na odporność nabytą jest w głównej mierze supresyjne, chociaż bardziej właściwym określeniem byłoby w tym wypadku immunomodulacja. Wiadomo między innymi, że pod wpływem działania kalcytriolu zmniejszać się może ilość cząsteczek MHC klasy II oraz białek kostymulatorowych (CD40, CD80, CD86) na powierzchni APC (Prietl B, 2013). Innym efektem działania witaminy D jest zwiększenie produkcji przez komórki dendrytyczne przeciwzapalnej IL-10 (Korf H, 2012). W konsekwencji tych działań witamina D zmniejsza zdolność komórek APC do prezentacji antygenów (w tym potencjalnych autoantygenów) i aktywacji komórek Th (Coussens A, 2009; Korf H, 2012).

Poza tym pośrednim wpływem na limfocyty T, poprzez komórki APC czy też modyfikację stężeń cytokin, kalcytriol działa też na nie bezpośrednio. Witamina D może hamować proliferację limfocytów T (Rigby WF, 1984). Dotyczy to w szczególności

limfocytów Th1 – efektem jest przesunięcie równowagi w kierunku limfocytów Th2 (Słoka S, 2011). Bezpośredni wpływ na limfocyty Th2 jest mniej jednoznaczny. Część prac sugeruje, że witamina D promuje różnicowanie w kierunku komórek Th2 i zwiększa produkcję IL-4 (Boonstra A, 2001). Tymczasem inni autorzy wskazują, że podobnie jak w przypadku limfocytów Th1, efekt działania kalcytriolu jest głównie hamujący (Pichler J, 2002; Staeva-Vieira TP, 2002). Nie można wykluczyć, że obie obserwacje są prawdziwe, a efekt działania kalcytriolu na limfocyty T jest różny w zależności od stopnia zróżnicowania i stanu funkcjonalnego komórek (Mahon BD, 2003). Witamina D może ponadto indukować rozwój naiwnych komórek T w kierunku Treg (Barrat FJ, 2002; Jeffery LE, 2009). Komórki T CD8+ poddane działaniu kalcytriolu wykazują z kolei słabszą odpowiedź proliferacyjną na stymulację (Chen J, 2014). Witamina D zmniejsza też produkcję IL-2 przez tę subpopulację limfocytów (Cantorna MT, 2015).

Limfocyty B również wykazują ekspresję *VDR*, szczególnie w warunkach aktywacji. Pod wpływem witaminy D zmniejsza się produkcja przeciwciał przez komórki B poddane wcześniejszej stymulacji. W warunkach *in vitro* dochodzi ponadto pod działaniem kalcytriolu do zahamowania tworzenia się komórek plazmatycznych (Chen S, 2007; Linker-Israeli M, 2001).

Aktywne metabolity witaminy D powodują szereg zmian w wydzielaniu cytokin przez komórki układu immunologicznego, czego konsekwencją jest działanie przeciwzapalne. Potwierdzono między innymi, że pod wpływem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  zmniejsza się stężenie IL-12, IL-23 oraz IL-6 – cytokin istotnych dla rozwoju limfocytów Th1 i Th17. Zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio działanie kalcytriolu prowadzi też do zmniejszenia stężenia IFN- $\gamma$ , IL-2 (produkowanych przez komórki Th1) oraz IL-17 (produkowanej przez komórki Th17) (Daniel C, 2008; Joshi S, 2011). Podobnie kalcytriol może działać w odniesieniu do IL-1 oraz TNF- $\alpha$  – powoduje supresję ich wydzielania (Lemire JM. 1995). W konsekwencji tych wszystkich działań dochodzi do przesunięcia równowagi w kierunku produkcji cytokin Th2 i Th17, z ograniczeniem wydzielania cytokin związanych z limfocytami Th1 (Boonstra A, 2001).

## 2.6. Witamina D a choroby autoimmunizacyjne

Korzystne działanie witaminy D w postaci zmniejszenia zachorowalności lub złagodzenia przebiegu choroby obserwowano na modelach zwierzęcych chorób autoimmunizacyjnych, między innymi nieswoistego zapalenia jelit (ang. *Inflammatory Bowel Disease* – IBD), MS, toczenia rumieniowatego układowego (ang. *Systemic Lupus Erythematosus* – SLE), reumatoidalnego zapalenia stawów (ang. *Rheumatoid Arthritis* – RA) oraz cukrzycy typu 1 (ang. *Type 1 Diabetes* – T1D) – chorób, w których etiopatogenezie istotną rolę odgrywają limfocyty Th1 i Th17 (Cantorna MT, 1998; Cantorna MT, 2000; Van Etten E, 2003; Zella JB, 2003; Zhu Y, 2005). Podobny, korzystny efekt działania 1,25(OH)<sub>2</sub>D potwierdzono także na modelu autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy (Fournier C, 1990).

Poza wpływem witaminy D na poszczególne komórki układu immunologicznego oraz obserwacjami z badań *in vitro* i na modelach zwierzęcych, kolejnym argumentem za rolą witaminy D w etiopatogenezie chorób autoimmunizacyjnych było stwierdzenie niższych stężeń 25(OH)D oraz częstszego występowania jej niedoboru w grupach chorych w stosunku do osób zdrowych. To właśnie 25(OH)D uznawana jest za najlepszy wykładnik zaopatrzenia organizmu w witaminę D, ze względu na jej relatywnie długi okres półtrwania wynoszący około dwóch tygodni (Holick MF, 2006). Zależność pomiędzy występowaniem choroby a niedoborem witaminy D stwierdzono między innymi w przypadku RA, łysienia plackowatego, bielactwa, SLE, MS, IBD czy T1D (Bae SC, 2018; Duan S, 2014; Feng R, 2015; Lee S, 2018; Lee YH, 2016; Liu C, 2015; Lu C, 2015; Sadeghian M, 2016; Shen L, 2016; Upala S, 2016). Również w przypadku AITD osoby chore częściej mają niedobór kalcydiolu, a jego średnie stężenia są niższe niż w grupie kontrolnej. W analizach podgrup według rodzaju choroby potwierdzono, że dotyczy to zarówno AIT, jak i GD (Wang J, 2015; Xu MY, 2015). Obserwacja ta została potwierdzona także wśród polskich pacjentów z autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy (Maciejewski A, 2015).

Kolejną obserwacją, która w sposób pośredni może wskazywać na udział witaminy D w etiopatogenezie chorób autoimmunizacyjnych, w tym AITD, jest zależność występująca pomiędzy miesiącem urodzenia a ryzykiem zachorowania na choroby z tej grupy. W zależności od pory roku zmienia się ekspozycja matki na promieniowanie UVB,

a w związku z tym także ilość witaminy D docierającej w okresie życia płodowego do rozwijającego się organizmu. Wpływ momentu urodzenia na ryzyko zachorowania w przyszłości wykazano między innymi dla MS, RA, SLE, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, choroby Addisona, T1D, a także AITD – osoby urodzone w miesiącach zimowych i wiosennych częściej zapadały na te choroby autoimmunizacyjne (Disanto G, 2012; Dobrakowski P, 2017; Kahn HS, 2009; Krassas GE, 2007; Pazderska A, 2016). Nie można oczywiście wykluczyć, że to inne niż stężenie witaminy D czynniki (np. sezonowo występujące infekcje wirusowe) są głównymi determinantami występowania takich zależności.

W związku z tym, że niedobór witaminy D postulowany jest jako czynnik ryzyka rozwoju chorób autoimmunizacyjnych, podejmuje się próby suplementacji witaminą D, z następczą oceną wpływu takiego postępowania na ryzyko zachorowania lub przebieg już rozpoznanej choroby. Wykazano na przykład, że suplementacja we wczesnym dzieciństwie wiązała się z mniejszym ryzykiem zachorowania na T1D w przyszłości (Zipitis CS, 2008). W przypadku MS stwierdzono, że osoby ze stężeniem witaminy D w górnym zakresie normy mają mniejsze ryzyko wystąpienia nawrotów choroby (Holmøy T, 2012). Ponadto leczenie z zastosowaniem IFN- $\beta$  przynosiło korzyści tylko u pacjentów z MS z dostatecznie wysokimi stężeniami witaminy D (Stewart N, 2012). W przypadku SLE wnioski na temat skuteczności suplementacji witaminą D są niejednoznaczne. Niektórzy badacze wskazują na zmniejszenie aktywności choroby i spadek stężenia przeciwciał anti-DNA pod wpływem przyjmowania kalcydiolu, podczas gdy inne publikacje nie potwierdzają korzyści z suplementacji (Andreoli L, 2015; Aranow C, 2015; Petri M, 2013; Terrier B, 2012). Podobnie w przypadku RA, pojawiają się zarówno obserwacje potwierdzające korzystny wpływ uzupełniania niedoborów witaminy D na aktywność choroby, jak też badania które tego typu zależności nie potwierdzają (Gopinath K, 2011; Hansen KE, 2014; Salesi M, 2012).

W przypadku AITD wnioski na temat korzyści odnoszonych przez pacjentów suplementujących witaminę D również są niejednoznaczne. W metaanalizie Wanga i wsp. udało się potwierdzić, że u pacjentów z AIT pod wpływem witaminy D spada stężenie przeciwciał przeciwtarczycowych (Wang S, 2018). Tego typu pozytywnych skutków suplementacji można spodziewać się przede wszystkim w grupie chorych z wcześniejszym

niedoborem witaminy D (Simsek Y, 2016). Co więcej, według niektórych źródeł dzięki suplementacji witaminą D zmniejsza się nasilenie nadczynności tarczycy u chorych na GD, a także spada częstość występowania jawnej oraz subklinicznej niedoczynności tarczycy (Kawakami-Tani T, 1997; Mirhosseini N, 2017). Niemniej jednak nie wykazano aby pod wpływem witaminy D dochodziło do spadku stężenia przeciwciał przeciwko receptorowi dla TSH (anty-TSHR) u chorych na GD (Kawakami-Tani T, 1997). Dość liczne są też doniesienia, które wskazują, że suplementacja witaminą D nie ma wpływu na poprawę czynności tarczycy u osób z już rozpoznanymi AITD (Simsek Y, 2016; Vahabi Anaraki P, 2017).

## 2.7. Polimorfizmy genu *VDR*

Liczba polimorfizmów w obrębie genu *VDR* szacowana jest na ponad 200. Są to głównie polimorfizmy typu SNP, ale występują także polimorfizmy VNRT (ang. *Variable Number of Tandem Repeats* - zmienna liczba powtórzeń tandemowych) (Iqbal MUN, 2015). Większość z tych polimorfizmów znajduje się poza sekwencją kodującą genu, nie ma więc wpływu na samą sekwencję aminokwasową białka. Polimorfizmy te mogą jednak potencjalnie wpływać na poziom ekspresji genu receptora, na przykład poprzez wpływ na stabilność mRNA. Wśród licznych polimorfizmów położonych w obrębie genu *VDR* cztery z nich są najlepiej znane i to właśnie ich najczęściej dotyczą badania, w szczególności w zakresie chorób autoimmunizacyjnych. Są to SNP: rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*ApaI*) i rs731236 (*TaqI*). Przedmiotem badań, głównie w kontekście wpływu na predyspozycję do osteoporozy oraz rozwój chorób nowotworowych, był też polimorfizm rs11568820 (*Cdx2*). Budowę genu *VDR* wraz z zaznaczeniem lokalizacji wymienionych polimorfizmów przedstawia schematycznie rycina 2. Sporadycznie znaleźć można doniesienia na temat związku innych polimorfizmów *VDR* z ryzykiem rozwoju różnych stanów patologicznych, w tym chorób autoimmunizacyjnych. Te rzadziej pojawiające się w publikacjach polimorfizmy *VDR* to między innymi: poly (A) 3' UTR, rs4516035 (*EcoRV*) czy rs757343 (*Tru9I*).

Wcześniejsze badania wykazały, że u osób rasy kaukaskiej w obrębie genu *VDR* wyróżnić można pięć bloków haplotypowych, obejmujących wiele spośród polimorfizmów *VDR*. SNP *BsmI*, *ApaI* oraz *TaqI* wchodzi w skład bloku 5, najbardziej oddalonego w kierunku 3', SNP *Cdx2* jest elementem bloku 2, natomiast SNP *FokI* znajduje się poza wyznaczonymi blokami haplotypowymi ze względu na brak silnego sprzężenia z innymi polimorfizmami *VDR* (rycina 2) (Fang Y, 2005). W przypadku innych grup etnicznych struktura haplotypów i nierównowaga sprzężeń (ang. *Linkage Disequilibrium* – LD) pomiędzy poszczególnymi SNP kształtują się nieco inaczej. Różnice są widoczne szczególnie w porównaniu do Afroamerykanów, u których obserwuje się większą liczbę bloków haplotypowych o mniejszych rozmiarach. Struktura sprzężeń pomiędzy polimorfizmami *VDR* wydaje się być jednak stała dla poszczególnych populacji europejskich (Nejentsev S, 2004).

W przypadku AITD powstało dotychczas 21 (według bazy PubMed, 12.2018) oryginalnych publikacji, w których oceniano wpływ wybranych polimorfizmów *VDR* na ryzyko zachorowania na AIT, GD lub AITD (obie choroby rozpatrywane łącznie). Badano głównie znaczenie czterech polimorfizmów *VDR*: rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*ApaI*) oraz rs731236 (*TaqI*). Uzyskane wyniki nie są jednoznaczne, istnieją bowiem zarówno publikacje potwierdzające znaczenie poszczególnych SNP w etiopatogenezie AIT lub GD, jak też prace, które taką zależność negują. Wydaje się ponadto, że zależności pomiędzy SNP *VDR* a ryzykiem rozwoju AITD mogą kształtować się odmiennie w różnych populacjach. Powstało kilka metaanaliz podsumowujących rolę SNP *VDR* w chorobach autoimmunizacyjnych tarczycy, ich autorzy sugerują jednak, że nadal konieczne są dalsze badania prowadzone na dużych grupach chorych (Feng M, 2013; Gao XR, 2018; Wang X, 2017). Polimorfizm rs11568820 (*Cdx2*) zalicza się do tak zwanych funkcjonalnych polimorfizmów, istnieją ponadto doniesienia na temat wpływu SNP *Cdx2* genu *VDR* na działanie układu immunologicznego. Mimo to związek SNP *Cdx2* *VDR* z chorobami autoimmunizacyjnymi tarczycy – AIT i GD – nie był dotychczas badany. Ponadto nie badano dotychczas wpływu polimorfizmów *VDR* na ryzyko zachorowania na AIT wśród polskich pacjentów. Niewiele jest też doniesień na temat wpływu polimorfizmów *VDR* na orbitopatię tarczycową.

### 2.7.1. Polimorfizm rs2228570 (*FokI*)

Polimorfizm rs2228570 zlokalizowany jest w obrębie eksonu 2 (pierwszego eksonu kodującego) genu *VDR*. Określany jest też jako SNP *FokI* genu *VDR* (od nazwy enzymu restrykcyjnego stosowanego w genotypowaniu tego polimorfizmu metodą PCR-RFLP (ang. *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* - reakcja łańcuchowa polimerazy - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych)) lub polimorfizm kodonu start (ze względu na lokalizację w obrębie kodonu startowego ATG). Analiza sekwencji genu *VDR* wykazała, że w jego obrębie może dwukrotnie pojawiać się kodon startowy ATG, będący miejscem inicjacji translacji (Baker AR, 1988). Omawiany polimorfizm zlokalizowany jest w obrębie tego pierwszego potencjalnego kodonu start i polega na zamianie nukleotydu tymidynowego na nukleotyd cytydynowy. Obecność nukleotydu tymidynowego w tej pozycji wiąże się z obecnością kodonu AUG w sekwencji mRNA. To z kolei prowadzi do inicjacji translacji i wytworzenia produktu białkowego o długości 427 aminokwasów. W przypadku nukleotydu cytydynowego (wariant polimorficzny, w mRNA AUG zamieniane na ACG) istnieje tylko jeden kodon start, który pojawia się nieco później w sekwencji mRNA. W związku z tym powstaje produkt białkowy o długości 424 aminokwasów, krótszy o 3 aminokwasy końca N.

Badania *in vitro* dowodzą, że krótszy wariant *VDR* wiąże się z silniejszą transaktywacją genów zawierających VDRE w odpowiedzi na związanie ligandu (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (Arai H, 1997). Poza tym krótszy wariant *VDR* silniej oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym TFIIB, co również przekłada się na wyższą aktywność transkrypcyjną *VDR* (Jurutka PW, 2000). Możliwe jest jednak, że ta wyższa aktywność transkrypcyjna wariantu *VDR* o długości 424 aminokwasów ujawnia się w przypadku interakcji z obszarami promotorowymi tylko części genów (Uitterlinden AG, 2004). W badaniu, które bezpośrednio oceniało wpływ SNP *FokI VDR* na komórki układu immunologicznego, wykazano natomiast, że krótszy wariant (homozygota CC) wiązał się z silniejszą aktywacją odpowiedzi immunologicznej (wyższa ekspresja genu kodującego IL-12 w komórkach dendrytycznych i monocytach, silniejsza odpowiedź proliferacyjna limfocytów po stymulacji mitogenem). W związku z tym to właśnie krótszy wariant receptora może być czynnikiem sprzyjającym autoimmunizacji (Van Etten E, 2007).



Wydaje się, że polimorfizm ten nie wpływa na stężenie 25(OH)D, kalcytriolu, jak też na takie parametry metabolizmu kostnego, jak stężenia PTH czy osteokalcyny (Gross C, 1996). Jednocześnie jednak wskazuje się na związek SNP *FokI VDR* z gęstością mineralną kości czy stężeniem frakcji kostnej fosfatazy zasadowej (Ban Y, 2000a). Wykazano także związek SNP *FokI* z niektórymi spośród chorób autoimmunizacyjnych. Allel C zwiększał w niektórych populacjach ryzyko zachorowania na T1D czy RA, a genotyp CC wiązał się z predyspozycją do wystąpienia SLE wśród Azjatów (Mao S, 2014; Song GG, 2016; Tizaoui K, 2015; Wang G, 2014). Odwrotnie sytuacja przedstawia się w przypadku chorób nowotworowych, gdzie wykazano, że allel T lub homozygota TT mogą być związane z większym ryzykiem rozwoju raka piersi, jajnika, a w populacji kaukaskiej także raka prostaty (Iqbal MUN, 2017; Mi YY, 2016; Xu H, 2013).

Zgodnie z danymi opracowanymi w ramach „Projektu 1000 Genomów” (faza 3) w populacjach europejskich dominuje allel G (odpowiadający allelowi C), którego częstość występowania to 62,2%. Częstość występowania allelu A (odpowiadającego allelowi T) wśród Europejczyków to 37,8%. Częstości genotypów SNP *FokI VDR* dla populacji europejskiej przedstawiały się następująco: GG (CC) – 40,4%, GA (CT) – 43,7%, AA (TT) – 15,9%. W przypadku populacji afrykańskiej zauważalna jest większa niż u Europejczyków częstość występowania allelu G (81,1%) oraz homozygoty GG (65,8%).

### **2.7.2. Polimorfizm rs1544410 (*BsmI*)**

Pierwszy opis polimorfizmu został zawarty w pracy Morrisona i wsp. z 1992 roku. Dotyczyła ona wpływu polimorfizmów genu *VDR* na ekspresję osteokalcyny (Morrison NA, 1992). SNP rs1544410 określa się też jako SNP *BsmI* genu *VDR*, od nazwy enzymu restrykcyjnego stosowanego w genotypowaniu metodą PCR-RFLP. Polimorfizm ten położony jest w sekwencji intronowej genu (intron 8) i podobnie jak dwa przedstawione w dalszej części pracy – SNP rs7975232 oraz rs731236 – znajduje się bliżej końca 3' *VDR*. Polimorfizmy te nie są sprzężone z SNP *FokI VDR*, co zostało potwierdzone dla różnych populacji (Gross C, 1996). Wyraźna nierównowaga sprzężeń występuje natomiast pomiędzy poszczególnymi SNP końca 3' (Morrison NA, 1994; Tokita A, 1996). Warto zwrócić jednak

uwagę, że siła sprzężenia między nimi może być różna w poszczególnych populacjach (Ingles SA, 1997). SNP *BsmI VDR* (jak też dwa pozostałe wspomniane SNP końca 3'), w przeciwieństwie do SNP *FokI*, nie ma wpływu na sekwencję aminokwasową białka VDR (Morrison NA, 1994). Może jednak wpływać na stabilność i szybkość rozpadu transkryptu (mRNA) genu *VDR*, co w konsekwencji zmienia ilość cząsteczek VDR w komórkach i ostatecznie także odpowiedź na witaminę D (Fang Y, 2005; Grundberg E, 2007). W przypadku SNP *BsmI* niektóre badania wskazują na allel G jako związany z silniejszą odpowiedzią na witaminę D (Uitterlinden AG, 2004). Z kolei w przypadku allelu A obserwowano większą produkcję IFN- $\gamma$  w hodowlach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMC) w porównaniu do wariantu G (Inoue N, 2014). Ze względu na położenie w obrębie bloku haplotypowego (blok 5, jak opisano powyżej) i sprzężenie z innymi polimorfizmami wchodzącymi w jego skład, nie można wykluczyć, że efekty związane z wariantami SNP *BsmI VDR* są wynikiem innych funkcjonalnych polimorfizmów (Uitterlinden AG, 2004).

Przegląd piśmiennictwa pozwala odnaleźć informacje na temat możliwego związku SNP *BsmI* z ryzykiem zachorowania na niektóre spośród chorób autoimmunizacyjnych, między innymi cukrzycę typu 1 (allel A związany z większym ryzykiem zachorowania wśród Azjatów, genotyp AA/GA – czynnik ryzyka w przypadku dzieci z T1D) czy też toczeń rumieniowaty układowy (metaanaliza dotychczasowych badań wskazała na allel A jako predysponujący do choroby) (Mao S, 2014; Sahin OA, 2017; Wang G, 2014). Wiele jest też publikacji dotyczących związku SNP *BsmI VDR* z chorobami nowotworowymi. Wykazano między innymi, że genotyp GG sprzyja zachorowaniu na raka piersi, a allel A może być wśród Europejczyków czynnikiem chroniącym przed rozwojem czerniaka (Iqbal MUN, 2017; Lee YH, 2015).

Dane opracowane w ramach „Projektu 1000 Genomów” (faza 3) wskazują, że w populacjach europejskich dominuje allel C (odpowiadający allelowi G), którego częstość występowania to 59,6%. Częstość występowania allelu T (odpowiadającego allelowi A) wśród Europejczyków to 40,4%. Częstości genotypów SNP *BsmI VDR* dla populacji europejskiej przedstawiały się następująco: CC (GG) – 37,0%, CT (GA) – 45,3%, TT (AA) – 17,7%. W przypadku populacji afrykańskiej zauważalna jest większa niż wśród

Europejczyków częstość występowania allelu C (72,8%). Populacja azjatycka wydaje się być dość niejednorodna pod względem rozkładu genotypów i alleli SNP *BsmI*.

### 2.7.3. Polimorfizm rs7975232 (*ApaI*)

Podobnie jak SNP *BsmI* genu *VDR*, polimorfizm rs7975232 położony jest w sekwencji intronowej (inton 8). Alternatywna nazwa polimorfizmu - SNP *ApaI* genu *VDR* - podobnie jak w poprzednich przypadkach, wzięła się od nazwy enzymu restrykcyjnego stosowanego do genotypowania w metodzie PCR-RFLP. Polimorfizm *ApaI VDR* w związku z lokalizacją nie wpływa na zmianę sekwencji aminokwasowej receptora *VDR*. Postuluje się natomiast jego wpływ na stabilność mRNA kodującego receptor oraz efektywność procesu translacji (Morrison NA, 1994). SNP *ApaI VDR* sprzężony jest z innymi polimorfizmami końca 3', dlatego też nie można wykluczyć, że to inne funkcjonalne polimorfizmy odpowiadają za przypisywane mu efekty.

Wcześniejsze badania na temat tego polimorfizmu dowodzą między innymi, że allel A związany może być ze zwiększonym ryzykiem rozwoju stwardnienia rozsianego wśród Azjatów (Zhang YJ, 2018). Genotyp CC jest natomiast wymieniany wśród czynników ryzyka zachorowania na raka piersi (Iqbal MUN, 2017).

Na podstawie „Projektu 1000 Genomów” (faza 3) wiadomo, że w populacjach europejskich dominuje allel A, którego częstość występowania to 55,5%. Częstość występowania allelu C wśród Europejczyków to 44,5%. Częstości genotypów SNP *ApaI VDR* dla populacji europejskiej przedstawiały się następująco: AA – 33,8%, CA – 43,3%, CC – 22,9%. W przypadku populacji afrykańskiej zauważalna jest mniejsza niż u Europejczyków częstość występowania allelu C (35,9%) oraz homozygoty CC (13,5%). Populacja azjatycka wydaje się dość niejednorodna pod względem rozkładu genotypów i alleli SNP *ApaI* – występują duże różnice pomiędzy mieszkańcami Azji południowej a tymi zamieszkałymi na wschodzie kontynentu.

#### 2.7.4. Polimorfizm rs731236 (*TaqI*)

W bliskiej odległości od dwóch poprzednio omawianych SNP, w obrębie końca 3', leży kolejny polimorfizm – rs731236. Określany jest też jako SNP *TaqI* genu *VDR*, od nazwy enzymu restrykcyjnego używanego w genotypowaniu. W przeciwieństwie do SNP *BsmI* i *ApaI* *VDR* znajduje się on w obrębie sekwencji kodującej, w eksonie 9. Mimo to polimorfizm ten nie zmienia sekwencji aminokwasowej kodowanego białka. Należy on bowiem do tak zwanych cichych albo synonimicznych SNP – pomimo zmiany nukleotydu (w tym przypadku z cytydynowego na adenozynowy) nie dochodzi do zmiany kodowanego aminokwasu (Morrison NA, 1992; Morrison NA, 1994). Wyniki badań na temat polimorfizmów genu *VDR* wykazały, że haplotyp baT utworzony przez trzy polimorfizmy końca 3' *VDR* (*BsmI*-*ApaI*-*TaqI*) związany był z niższym stężeniem mRNA tego genu. W związku z tym pojawiały się sugestie, że między innymi to polimorfizm *TaqI*, mimo braku wpływu na sekwencję aminokwasową receptora *VDR*, może wpływać na stabilność kodującego go mRNA (Carling T, 1998). W innej pracy Verbeek i wsp. stwierdza, że nie ma związku pomiędzy wariantami SNP *TaqI* a stabilnością mRNA. Nie można jednak wykluczyć, że zmiana nukleotydu w tej pozycji wpływa między innymi na regulację transkrypcji genu (Verbeek W, 1997).

Wskazuje się, że polimorfizm *TaqI* *VDR* może być związany z ryzykiem zachorowania na reumatoidalne zapalenie stawów (Tizaoui K, 2015). Homozygota TT SNP *TaqI* działa z kolei prawdopodobnie ochronnie przed rozwojem cukrzycy typu 1 wśród dzieci (Sahin OA, 2017). W badaniach na temat chorób nowotworowych wykazano związek wariantów CT/TT z większym ryzykiem rozwoju raka prostaty wśród Azjatów i Afroamerykanów (Liu S, 2017).

Zgodnie z danymi opracowanymi w ramach „Projektu 1000 Genomów” (faza 3) w populacjach europejskich dominuje allel A (odpowiadający allelowi T), którego częstość występowania szacuje się na 60,0%. Częstość występowania allelu G (odpowiadającego allelowi C) wśród Europejczyków to 40,0%. Częstości genotypów SNP *TaqI* *VDR* dla populacji europejskiej przedstawiały się następująco: AA (TT) – 37,8%, AG (TC) – 44,5%, GG (CC) – 17,7%. W przypadku populacji afrykańskiej zauważalna jest większa niż u Europejczyków częstość występowania allelu A (71,5%) oraz homozygoty AA (51,3%).

Podobnie jak w przypadku poprzednich SNP *VDR*, populacja azjatycka wydaje się dość niejednorodna pod względem rozkładu genotypów i alleli tego SNP – występują wyraźne różnice pomiędzy mieszkańcami Azji południowej a tymi zamieszkałymi na wschodzie kontynentu.

### **2.7.5. Polimorfizm rs11568820 (*Cdx2*)**

Polimorfizm rs11568820, określany również jako *Cdx2*, zlokalizowany jest w odcinku 5' genu *VDR* w obrębie tak zwanego promotora 1 e, w kierunku 5' w stosunku do pierwszego eksonu kodującego (rycina 2). Pozycja ta wchodzi w skład sekwencji wiążącej czynnik transkrypcyjny swoisty dla jelit – CDX2 (ang. *Caudal Type Homeobox 2*), stąd też nazwa polimorfizmu (Yamamoto H, 1999). Ten region genu odgrywa istotną rolę w swoistej dla jelit regulacji transkrypcji *VDR*. W wariacie dzikim w pozycji rs11568820 obserwuje się obecność nukleotydu zawierającego guaninę. W wariacie polimorficznym zostaje on zamieniony na nukleotyd adeninowy. Badania *in vitro* wskazują, że w przypadku allelu G czynnik transkrypcyjny CDX2 słabiej wiąże się z promotorem genu *VDR* (Crofts LA, 1998; Fang Y, 2005). W konsekwencji obserwuje się niższą o około 30% aktywność transkrypcyjną genu *VDR* w wariacie G w porównaniu do allelu A (Arai H, 2001). Mniejsza ilość cząsteczek receptora *VDR* w komórkach nabłonka jelit może się z kolei przekładać między innymi na zmniejszoną ekspresję genów kodujących białka transportujące, mniejsze wchłanianie jelitowe tego pierwiastka, a w końcu mniejszą gęstość mineralną kości oraz wyższe ryzyko złamań u posiadaczy tego wariantu genu *VDR* (Arai H, 2001; Stykarsdottir U, 2008). Wyniki niektórych badań wskazują ponadto, że u osób z genotypem GG SNP *Cdx2* stężenie 25(OH)<sub>2</sub>D było istotnie niższe w porównaniu do pozostałych. Obserwacja ta wymaga jednak dalszego wyjaśnienia (Uitterlinden AG, 2004).

SNP *Cdx2* jest silnie sprzężony z kilkoma innymi polimorfizmami położonymi w tym samym regionie genu *VDR* (między innymi 1e-C2090T, 1a-G1521C czy 1a-A1012G), tworząc blok haplotypowy (blok 2, jak przedstawiono na rycinie 2). Nie można zatem wykluczyć, że za część efektów przypisywanych temu polimorfizmowi odpowiedzialne są inne, pozostające w nim w silnej LD. Takim polimorfizmem mógłby być np. SNP

1a-A1012G (rs4516035), będący miejscem wiązania czynnika transkrypcyjnego GATA (Fang Y, 2005).

Obserwuje się duże różnice w rozkładzie genotypów i alleli SNP Cdx2 genu *VDR* w poszczególnych grupach etnicznych: częstość występowania allelu A szacuje się na podstawie wcześniejszych publikacji na 74% wśród przedstawicieli rasy czarnej, 43% u Azjatów i tylko około 19% u rasy kaukaskiej (Uitterlinden AG, 2004). Zostało to potwierdzone przez badania prowadzone w ramach „Projektu 1000 Genomów” (faza 3). Stwierdzono tam, że w populacjach europejskich częstość występowania allelu T (odpowiadającego allelowi A) to 22,8%. Częstość występowania allelu C (odpowiadającego allelowi G) wśród Europejczyków wynosiła z kolei 77,2%. Częstości genotypów SNP Cdx2 *VDR* dla populacji europejskiej przedstawiały się następująco: CC (GG) – 60,2%, CT (GA) – 34,0%, TT (AA) – 5,8%. Odwrotnie było w przypadku populacji afrykańskiej, gdzie genotyp CC (GG) występował u tylko około 1% badanych.

Poza pracami dotyczącymi wpływu SNP Cdx2 *VDR* na osteoporozę, większość pozostałych publikacji skupia się na jego znaczeniu w etiopatogenezie chorób nowotworowych (między innymi raka prostaty, jelita grubego, piersi czy jajnika). Postuluje się, że genotyp AA może zwiększać ryzyko raka jelita grubego, a w przypadku homozygoty GG wskazują się na działanie protekcyjne przed rozwojem raka jajnika (Dai ZM, 2015). Niektórzy badacze wskazują, że genotyp AA może być ogólnym czynnikiem ryzyka nowotworzenia (Serrano D, 2016).

Postuluje się także modulujący wpływ polimorfizmu Cdx2 *VDR* na działanie układu immunologicznego, co opiera się głównie na badaniach dotyczących gruźlicy. Według publikacji Selvaraja i wsp. homozygota GG wiąże się z mniejszym ryzykiem rozwoju tej choroby infekcyjnej (Selvaraj P, 2008). Genotyp AA polimorfizmu Cdx2 związany był z kolei z istotnie niższymi stężeniami MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  i RANTES w hodowlach PBMC poddanych działaniu witaminy D, co autorzy tłumaczą możliwym wyższym stężeniem IL-10 u homozygot AA (Harishankar M, 2016; Harishankar M, 2017). Inna praca – dotycząca odporności indukowanej szczepionkami na różyczkę – wskazuje natomiast, że SNP Cdx2 *VDR* wpływa na sekrecję TNF- $\alpha$  w odpowiedzi na stymulację antygenem (Ovsyannikova IG, 2010).

### 3. Cele pracy

Chociaż etiopatogeneza chorób autoimmunizacyjnych tarczycy od dawna stanowi przedmiot zainteresowania badaczy, wciąż nie są znane wszystkie genetyczne oraz środowiskowe determinanty ich rozwoju. W ostatnich latach zwrócono uwagę na modulujący wpływ witaminy D na działanie układu immunologicznego oraz możliwy związek pomiędzy niedoborem 25(OH)D a występowaniem chorób autoimmunizacyjnych. Podobny efekt do niedoboru witaminy D może być też skutkiem nieprawidłowego funkcjonowania receptora dla witaminy D. Powstały dotychczas prace na temat znaczenia polimorfizmów *VDR* w etiopatogenezie AITD, w tym AIT oraz GD, jednak ich wyniki są niejednorodne i nie dają jednoznacznej odpowiedzi na temat znaczenia polimorfizmów *VDR* w etiopatogenezie AITD.

Cele pracy przedstawiają się następująco:

#### 1. Cel główny:

Ocena częstości genotypów i alleli wybranych polimorfizmów genu *VDR* (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236 oraz rs11568820) u chorych na autoimmunizacyjne choroby tarczycy (autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy i orbitopatię Gravesa) w porównaniu do osób zdrowych, aby odpowiedzieć na pytanie o znaczenie tych polimorfizmów w etiopatogenezie autoimmunizacyjnych chorób tarczycy.

#### 2. Cele dodatkowe:

- a. Ocena różnic w rozkładach genotypów oraz częstościach alleli pięciu badanych polimorfizmów genu *VDR* pomiędzy grupą AIT a grupą TAO.
- b. Analiza zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR* a wybranymi parametrami przebiegu klinicznego AIT (wiek w momencie rozpoznania choroby, brak lub obecność zmian ogniskowych w obrębie gruczołu tarczowego, objętość tarczycy).
- c. Analiza zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR* a wybranymi parametrami przebiegu klinicznego TAO (wiek w momencie rozpoznania choroby Gravesa-Basedowa, czas pomiędzy rozpoznaniem choroby Gravesa-Basedowa a wystąpieniem TAO, aktywność kliniczna TAO w momencie rozpoznania).

## 4. Badani

### 4.1. Pacjenci

Do badania włączono 330 niespokrewnionych, losowo wybranych dorosłych pacjentów rasy kaukaskiej narodowości polskiej z rozpoznaniem AITD – 222 z AIT oraz 108 z TAO w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa. Byli oni rekrutowani spośród osób pozostających w opiece ambulatoryjnej u prof. Teresy Gasińskiej (Klinika Chorób Wewnętrznych i Chemioterapii Onkologicznej, Śląska Akademia Medyczna, Katowice), dr. Waldemara Hermana (Poradni Endokrynologicznej, Wschowa) oraz prof. Katarzyny Łackiej.

Grupę AIT stanowiły 222 osoby z rozpoznaniem autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy. Diagnoza została postawiona na podstawie powszechnie stosowanych kryteriów, obejmujących obecność przynajmniej 3 spośród 4 elementów (Caturegli P, 2014):

- 1) podwyższone stężenie przeciwciał przeciw tarczycowym (anty-TPO i/lub anty-Tg);
- 2) obraz ultrasonograficzny tarczycy typowy dla przewlekłego zapalenia;
- 3) biochemiczne wykładniki niedoczynności tarczycy lub eutyreozy;
- 4) objawy kliniczne niedoczynności tarczycy.

U niektórych pacjentów rozpoznanie zostało dodatkowo potwierdzone w badaniu cytologicznym materiału z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC). W momencie włączenia do badania wszyscy pacjenci znajdowali się w eutyreozie (stężenia TSH w zakresie 0,5-3,0 mIU/l), w trakcie substytucji doustnej L-tyroksyną (średnia dawka 83,39 (SD 35,14) µg/d; mediana 75 (25-175) µg/d).

Kryteriami wyłączenia było współwystępowanie:

- 1) innych chorób o podłożu autoimmunizacyjnym (między innymi reumatoidalnego zapalenia stawów, cukrzycy typu 1, choroby Addisona, niedokrwistości złośliwej, stwardnienia rozsianego);
- 2) chorób nowotworowych;
- 3) przewlekłych chorób zapalnych (np. sarkoidozy);



4) chorób metabolicznych kości, w szczególności osteoporozy.

Celem kwalifikacji pacjentów zbierano szczegółowy wywiad oraz przeprowadzono badanie przedmiotowe. Spośród badań dodatkowych uwzględniano stężenie TSH we krwi, przeciwciał anti-TPO i/lub anti-Tg oraz badanie ultrasonograficzne tarczycy. Wstępnie wytypowano 259 osób z AIT, a po analizie dostępnej dokumentacji medycznej ostatecznie zakwalifikowano grupę 222 pacjentów. Podstawowa charakterystyka pacjentów z AIT została przedstawiona w tabeli 1.

W grupie TAO znalazło się 108 osób z rozpoznaniem orbitopatii tarczycowej w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa. Kwalifikowano osoby o umiarkowanym lub ciężkim nasileniu objawów ocznych (według klasyfikacji NOSPECS – klasyfikacja stopnia zaawansowania orbitopatii Gravesa Amerykańskiego Towarzystwa Tyreologicznego). Diagnoza choroby Gravesa-Basedowa opierała się na powszechnie przyjętych kryteriach, do których zaliczano:

- 1) występowanie jawnej lub subklinicznej nadczynności tarczycy;
- 2) podwyższone stężenie przeciwciał anti-TSHR w surowicy krwi;
- 3) zmiany ultrasonograficzne w gruczole tarczowym o charakterze wola naczyniowego.

W celu rozpoznania orbitopatii poza badaniem podmiotowym i przedmiotowym oraz oceną okulistyczną wykonywano badania obrazowe w postaci tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego oczodołów (Dolman PJ, 2018). Kryteriami wyłączenia, podobnie jak w grupie AIT, było współwystępowanie innych chorób mogących mieć związek z polimorfizmami genu *VDR*:

- 1) innych chorób o podłożu autoimmunizacyjnym;
- 2) chorób nowotworowych;
- 3) przewlekłych chorób zapalnych;
- 4) osteoporozy.

Wstępnie do grupy TAO zakwalifikowano 150 osób, spośród których po zebraniu szczegółowego wywiadu oraz ocenie dostępnej dokumentacji medycznej ostatecznie do badania włączono 108 pacjentów. Charakterystyka pacjentów z TAO została zaprezentowana w tabeli 1.

## 4.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 130 zdrowych ochotników:

- 1) 99 dawców krwi, u których choroby tarczycy, w tym AITD, wykluczono na podstawie oceny klinicznej oraz stężenia TSH we krwi;
- 2) 31 ochotników, u których choroby tarczycy, a w szczególności AITD, wykluczono na podstawie wywiadu, badania ultrasonograficznego tarczycy, a także oceny stężenia TSH oraz przeciwciał przeciw-tarczycowych anty-TPO i anty-Tg. W ten sposób z grupy około 90 ochotników wyłoniono 31 osób, u których nie stwierdzano jakichkolwiek zaburzeń w zakresie gruczołu tarczowego.

Pozostałymi kryteriami wyłączenia w przypadku dawców krwi oraz ochotników stanowiących grupę kontrolną były:

- 1) dodatni wywiad rodzinny w kierunku AITD u krewnych pierwszego stopnia;
- 2) rozpoznanie innych chorób o podłożu autoimmunizacyjnym;
- 3) współistnienie chorób nowotworowych;
- 4) współistnienie przewlekłych chorób zapalnych (np. sarkoidozy);
- 5) rozpoznanie osteoporozy.

Charakterystyka grupy kontrolnej została przedstawiona w tabeli 1. W grupie tej zauważalny był wyższy odsetek mężczyzn w porównaniu do grup pacjentów (rycina 3).

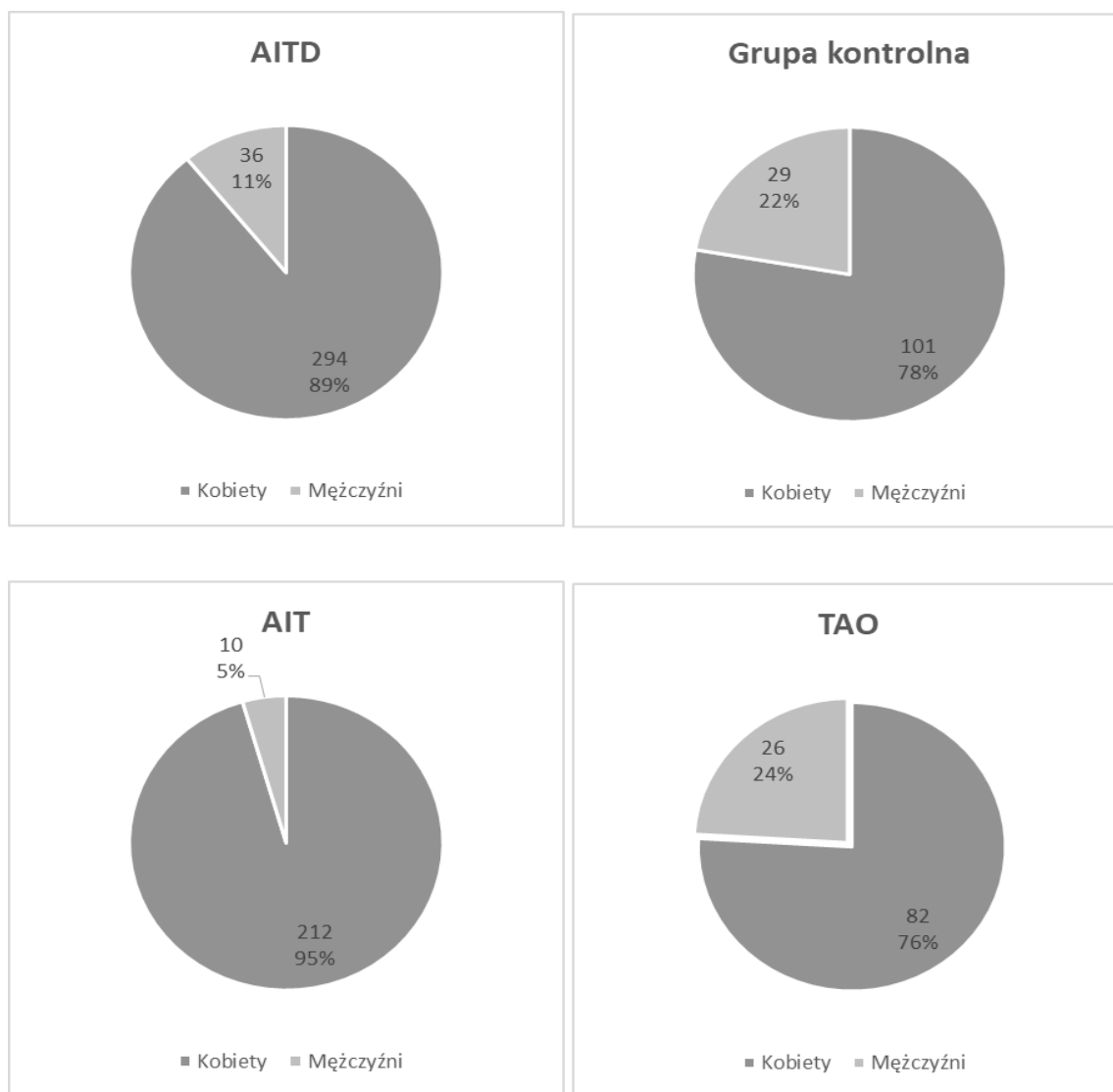
Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała Komisji Bioetycznej nr 443/15 z dnia 06.05.2015 r. oraz nr 443/17 z dnia 06.04.2017 r.). Wszyscy badani (zarówno w grupie chorych, jak i grupie kontrolnej) po zapoznaniu się z informacją na temat badania wyrazili świadomą pisemną zgodę na uczestnictwo. Projekt współfinansowany z grantu dla „Młodych Naukowców” UMP nr: 502-14-02221355-41204.

**Tabela 1.** Charakterystyka grup pacjentów (AIT i TAO) oraz grupy kontrolnej

	<b>AITD</b>	<b>AIT</b>	<b>TAO</b>	<b>Grupa kontrolna</b>
<b>Liczba osób</b>	330	222	108	130
<b>Wiek [w latach]</b>	50,20 (SD 12,33)	47,33 (SD 13,49)	52,99 (SD 10,42)	35,42 (SD 14,96)
<b>Płeć [K/M]</b>	294/36	212/10	82/26	101/29
<b>TSH [mIU/l]</b>	3,22 (SD 7,90)	2,98 (SD 3,54)	3,85 (SD 14,08)	1,52 (SD 0,49)
<b>Objętość tarczycy [ml]</b>	13,39 (SD 12,02)	11,39 (SD 8,80)	20,44 (SD 18,09)	10,22 (SD 4,09)

Wyniki zaprezentowano jako średnia i odchylenie standardowe (SD) lub licznosc

AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy; AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy; TAO – orbitopatia tarczycowa



**Rycina 3.** Rozkład płci w grupie badanej oraz grupie kontrolnej

Osobno przedstawiono też wykresy dla grupy AIT i TAO

## 5. Metody

### 5.1. Pobieranie i przechowywanie materiału

Krew obwodową, potrzebną do przeprowadzenia badań genetycznych oraz oznaczeń biochemicznych, pobierano od badanych (zarówno w grupie chorych, jak i w grupie kontrolnej) w łącznej objętości około 10 ml. Z tego około 5 ml obwodowej krwi żyłnej pobierano do probówek z K<sub>3</sub>EDTA (Monovette™ vacuum system). Po pobraniu była ona mieszana z odczynnikiem poprzez kilkukrotne odwrócenie góra-dół. Do czasu izolacji DNA krew ta była przechowywana w temperaturze -20°C. Podobną objętość krwi (około 5 ml) pobierano do probówek z aktywatorem wykrzepiania. Probówki te następnie odwirowywano (1300 x g, 10 min), uzyskując surowicę do badań biochemicznych.

Do badań molekularnych włączono również materiał w postaci wyizolowanego już wcześniej DNA. Był to materiał zgromadzony w ramach wcześniejszych projektów i stanowił około 30% wszystkich badanych próbek. Również w tym przypadku DNA uzyskiwane było w wyniku izolacji z krwi obwodowej. Do czasu przeprowadzenia badań próbki DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

### 5.2. Badania biochemiczne (TSH, anty-TPO, anty-Tg)

U części spośród badanych (w grupie chorych oraz grupie kontrolnej) wykonano oznaczenia biochemiczne:

- 1) stężenie TSH w surowicy krwi;
- 2) stężenie przeciwciał anty-TPO w surowicy krwi;
- 3) stężenie przeciwciał anty-Tg w surowicy krwi.

Wymienione parametry oceniano w surowicy, z zastosowaniem odpowiednich zestawów ELISA: 1) TSH ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Niemcy); 2) Thyroglobulin-Ab (Tg-Ab) ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Niemcy) oraz 3) Thyreoidal Peroxidase-Ab (TPO-Ab) ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Niemcy). Oznaczenia przeprowadzono

zgodnie z instrukcją producenta, z wykorzystaniem czytnika mikroplacytek EPOCH microplate reader (BioTek). Część projektu badawczego polegająca na wykonaniu oznaczeń biochemicznych została przeprowadzona przy współpracy z Zakładem Neurobiologii Kliniki Neurologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego (kierownik Zakładu: prof. dr hab. Jolanta Dorszewska).

### **5.3. Badania molekularne**

Zasadniczą część projektu stanowiło badanie częstości genotypów oraz alleli pięciu wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu *VDR*. W przypadku czterech spośród tych polimorfizmów: rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*ApaI*), rs731236 (*TaqI*), celem genotypowania zastosowana została metoda PCR-RFLP. Rozkład genotypów polimorfizmu rs11568820 (*Cdx2*) w grupie badanej oraz grupie kontrolnej określono metodą real-time PCR z wykorzystaniem sond TaqMan®. Losowo wybrane próbki zostały poddane sekwencjonowaniu celem weryfikacji poprawności oznaczeń wykonywanych wymienionymi wcześniej metodami. Badania molekularne realizowano przy współpracy z Pracownią Molekularną Zakładu Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego (kierownik Zakładu: prof. dr hab. Ryszard Żaba).

#### **5.3.1. Izolacja DNA genomowego**

W celu uzyskania DNA genomowego, niezbędnego do przeprowadzenia dalszych etapów badań molekularnych, konieczna była jego izolacja z próbek pobranej wcześniej krwi obwodowej. DNA izolowano z krwi pełnej w oparciu o metodę kolumnkową, z zastosowaniem zestawu do izolacji NucleoSpin® Blood L (MACHEREY-NAGEL, Niemcy). Izolację przeprowadzono zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Do 2 ml krwi pełnej (pobranej wcześniej do probówek z EDTA) dodawano 150 µl proteiny K oraz 2 ml buforu do lizy BQ1, po czym worteksowano przez 10 sekund. Tak uzyskaną mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie przez kolejne

15 minut w łaźni wodnej w temperaturze 56°C. Po wychłodzeniu do temperatury pokojowej dodawano 2 ml 99,8% etanolu i mieszano poprzez kilkukrotne odwrócenie góra-dół. Otrzymany w ten sposób lizat nakładano na wiążącą DNA membranę krzemionkową kolumnienek (2 x po 3 ml lizatu) z następczym wirowaniem przy 4500 x g, odpowiednio przez 3 i 5 minut. Kolejnym krokiem było przemywanie membrany z wykorzystaniem buforu do przemywania BQ2 (2 x po 2 ml) z następczym wirowaniem przy 4500 x g (odpowiednio 2 i 10 minut). Ostatnim etapem była elucja DNA – nakładano 200 µg buforu do elucji podgrzanego do 70°C na membranę krzemionkową oraz inkubowano przez 2 minuty. Ostatecznie, po odwirowaniu przy 4500 x g (przez 4 minuty), uzyskiwano eluat zawierający oczyszczone DNA genomowe.

Wyizolowane DNA genomowe poddawano ocenie ilościowej poprzez pomiar fluorometryczny stężenia DNA (zestaw do pomiaru Qubit™ dsDNA HS Assay Kit; Thermo Fisher) z użyciem fluorometru Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher), wykorzystując do tego 1 µl izolatu DNA. Średnie uzyskane stężenie DNA wynosiło 174,74 (SD 117,00) µg/ml (wartości w zakresie 17,50-565,00 µg/ml).

W przypadku próbek wcześniej wyizolowanego DNA również przeprowadzono ocenę ilościową materiału. Pomiar stężenia wykonywano przy pomocy spektrofotometru NanoDrop™ (Thermo Fisher). Kontrolę jakości przechowywanego materiału genetycznego wykonano natomiast poprzez przeprowadzenie próbnych reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy) dla wybranych losowo próbek.

### **5.3.2. PCR**

W celu namnożenia wybranych fragmentów genu *VDR* wykorzystano reakcję PCR. Do reakcji użyty został zestaw do PCR Color OptiQa PCR Master Mix (2x) (EURx, Polska) zawierający polimerazę DNA OptiQa (zoptymalizowana i zmodyfikowana mieszanina termostabilnych polimeraz DNA *Thermus aquaticus* i *Pyrococcus sp.*), bufor B (2x) z 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM każdego z dNTP oraz dwa barwniki ułatwiające śledzenie rozdzielu elektroforetycznego na żelu. Wraz z zestawem do PCR dostarczona była także woda wolna od nukleaz. Zestawy starterów (forward i reverse) dla poszczególnych reakcji PCR zostały

zaprojektowane w oparciu o dane z piśmiennictwa. Startery dostarczone przez firmę TIB Molbiol rozcieńczano do stężenia 5 pmol/ $\mu$ l.

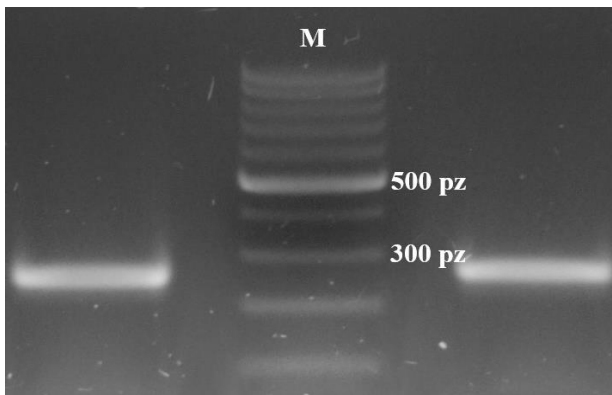
Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 50  $\mu$ l, a składały się na nią: 1) zestaw do PCR Color OptiTaq PCR Master Mix (2x) w objętości 25  $\mu$ l; 2) po 5  $\mu$ l obu starterów (forward i reverse, odpowiednich dla danej reakcji); 3) 0,8 do 1,2  $\mu$ l matrycowego DNA genomowego (w zależności od reakcji); 4) woda wolna od nukleaz do całkowitej objętości 50  $\mu$ l. Reakcje PCR wykonywano z zastosowaniem termocyklera MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). Na program reakcji składały się następujące etapy: 1) predenaturacja przez 5 min w temp. 95°C; 2) amplifikacja – 33-36 cykli (w zależności od namnażanego fragmentu), obejmujących etapy denaturacji, przyłączania i wydłużania (czasy poszczególnych etapów i temperatury zależne od namnażanego fragmentu); 3) ostatnie wydłużanie przez 7 min w temp. 72°C; 4) chłodzenie przez czas  $\geq$  30 s do temp. 4°C. Sekwencje starterów oraz szczegółowe warunki reakcji PCR dla poszczególnych polimorfizmów przedstawiono w tabeli 2. Produkty reakcji PCR wykorzystywano w dalszej kolejności do przeprowadzenia analizy restrykcyjnej (polimorfizmy *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*). Przykłady otrzymywanych produktów reakcji PCR (po elektroforezie na żelu agarozowym) przedstawiają ryciny 4-6.

**Tabela 2.** Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genu *VDR*

Polimorfizm	Sekwencja startera F	Sekwencja startera R	Warunki reakcji	Liczba cykli	Produkt PCR	Źródło
<i>FokI</i>	5'- AGCTGGC CCTGGCAC TGACTCTG GCT-3'	5'- ATGGAAA CACCTTGC TTCTTCTC CCTC-3'	1. <b>Predenaturacja:</b> 95°C przez 5 min 2. <b>Amplifikacja:</b> 95°C 30 s 63°C 30 s 72°C 30 s 3. <b>Ostatnie wydłużanie:</b> 72°C 7 min 4. <b>Chłodzenie:</b> 4°C 30 s	33	267 pz	Harris SS, 1997
<i>BsmI</i>	5'- ACTTGCAT GAGGAGG AGCATGTC -3'	5'- GGAGAGG AGCCTGTG TCCATT G-3'	1. <b>Predenaturacja:</b> 95°C przez 5 min 2. <b>Amplifikacja:</b> 95°C 45 s 61°C 30 s 72°C 45 s 3. <b>Ostatnie wydłużanie:</b> 72°C 7 min 4. <b>Chłodzenie:</b> 4°C 30 s	36	812 pz	Ozaki Y, 2000
<i>ApaI / TaqI</i>	5'- GGTGGGA TTGAGCA GTG-3'	5'- ATGCTGCA CTCAGGCT G-3'	1. <b>Predenaturacja:</b> 95°C przez 5 min 2. <b>Amplifikacja:</b> 95°C 30 s 56°C 30 s 72°C 45 s 3. <b>Ostatnie wydłużanie:</b> 72°C 7 min 4. <b>Chłodzenie:</b> 4°C 30 s	35	280 pz	Oh JY, 2002

pz – para zasad

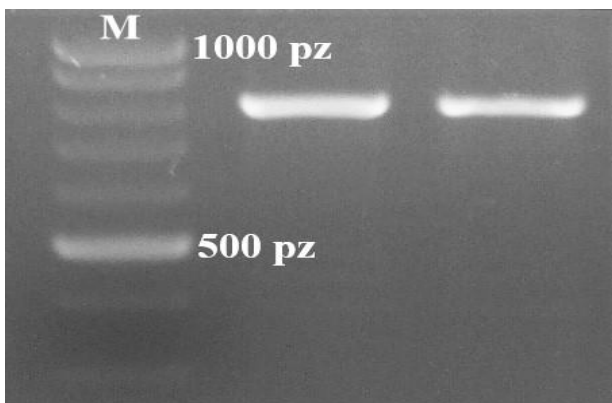




**Rycina 4.** Produkt reakcji PCR dla polimorfizmu *FokI VDR*

Uzyskano fragment długości 267 pz

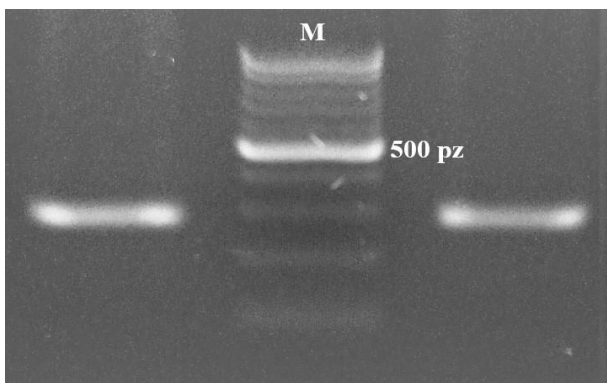
M – marker 100-1000 pz; pz – para zasad



**Rycina 5.** Produkt reakcji PCR dla polimorfizmu *BsmI VDR*

Uzyskano fragment długości 812 pz

M – marker 100-1000 pz; pz – para zasad



**Rycina 6.** Produkt reakcji PCR dla polimorfizmów *TaqI* oraz *ApaI VDR*

Uzyskano fragment długości 280 pz

M – marker 100-1000 pz; pz – para zasad

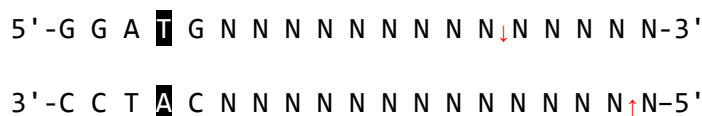
### 5.3.3. Trawienie restrykcyjne

W przypadku czterech z pięciu badanych polimorfizmów VDR: *FokI*, *BsmI*, *ApaI* oraz *TaqI*, produkty reakcji PCR poddawano trawieniu z zastosowaniem odpowiednich enzymów restrykcyjnych celem określenia genotypów (metoda PCR-RFLP). Szczegółowe informacje na temat poszczególnych reakcji trawienia enzymatycznego, w tym warunki ich przeprowadzenia, omówiono w kolejnych podrozdziałach.

#### 5.3.4.1. SNP rs2228570 (*FokI*)

W przypadku SNP *FokI* VDR fragment genu długości 267 pz, namnożony na drodze reakcji PCR, poddany został trawieniu z zastosowaniem enzymu *FokI* (EURx, Polska). Mieszanina reakcyjna przygotowywana była w oparciu o informacje zawarte w instrukcji producenta: 1) 5 µl buforu ONE Buffer (10x); 2) 1 µl BSA (100x); 3) 0,25 µl enzymu *FokI* (co odpowiada 2,5 U enzymu, dodawany jako ostatni składnik); 4) 23,75 µl sterylnej wody wolnej od nukleaz (tak aby całkowita objętość mieszaniny po dodaniu produktu PCR wynosiła 50 µl). Do przygotowanej w ten sposób mieszaniny dodawano 20 µl produktu PCR i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę (termoblok Bio TDB-100, Biosan).

Sekwencję rozpoznawaną przez enzym tnący wraz z miejscem cięcia przedstawiono poniżej (miejsce cięcia zaznaczono czerwonymi strzałkami, czarne tło – lokalizacja polimorfizmu):



W przypadku obecności w namnożonym fragmencie DNA sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez enzym tnący, w efekcie jego działania, z fragmentu długości 267 pz uzyskiwano dwa fragmenty: krótszy o długości 70 lub 74 pz i dłuższy liczący 193 lub 197 pz. Dwie różne długości otrzymywanych fragmentów związane są z niesymetrycznym przecięciem dwuniciowej cząsteczki DNA przez enzym restrykcyjny. W konsekwencji

powstają tak zwane końce lepkie lub kohezyjne, co widać na powyższym fragmencie sekwencji.

Polimorfizm *FokI* genu *VDR* to zmiana nukleotydu tymidynowego (T) na cytydynowy (C). W przypadku homozygoty dzikiej (TT) dochodzi do przecięcia fragmentu namnożonego na drodze reakcji PCR. Inaczej jest w przypadku homozygoty polimorficznej (CC) – całość powielonego produktu pozostaje nieprzecięta. W przypadku heterozygoty (CT) otrzymujemy zarówno fragmenty DNA nieprzecięte, jak i przecięte. Oznaczenia poszczególnych alleli polimorfizmu utworzono na podstawie oznaczeń literowych występujących nukleotydów (jak powyżej). Alternatywnie, jak w niektórych pozycjach z piśmiennictwa, allele można oznaczyć też od pierwszej litery nazwy enzymu restrykcyjnego stosowanego w metodzie PCR-RFLP – wielka litera oznacza wariant nieulegający przecięciu (w tym wypadku F), a mała litera wariant przecinany przez ten enzym (w tym wypadku f).

Aby ocenić efekt działania enzymu restrykcyjnego, poddany trawieniu produkt PCR rozdzielany był w polu elektrycznym po nałożeniu na żel agarozowy. W przypadku polimorfizmu *FokI VDR* do rozdziału elektroforetycznego wykorzystywano żel agarozowy o stężeniu 2,2%. Był on otrzymywany poprzez rozpuszczenie 1g agarozy (Agarozą w tabletkach, EURx) w 45 ml TAE 1x (roztwór zawierający 40 mM Tris (pH 8,0), 20 mM kwasu octowego oraz 1 mM EDTA, otrzymywany poprzez rozcieńczenie TAE 50x wodą demineralizowaną). Przed zastygnięciem agarozy żel był wybarwiany poprzez dodanie 2,5 µl barwnika fluorescencyjnego (SYBR<sup>®</sup> Green I nucleic acid gel stain, Thermo Fisher). Do studzienek utworzonych po zastygnięciu agarozy nakładano po 20 µl mieszaniny zawierającej produkt trawienia enzymatycznego. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przez 30 minut przy napięciu 5 V/cm z wykorzystaniem zestawu do elektroforezy poziomej MultiSub Mini (Clever Scientific). W celu określenia wielkości prążków uzyskiwanych w wyniku elektroforezy stosowano wzorzec wielkości DNA (Perfect 100-1000 bp DNA Ladder, EURx).

### 5.3.4.2. SNP rs1544410 (*BsmI*)

W przypadku SNP *BsmI* genu *VDR* produkt reakcji PCR długości 812 pz poddawany był działaniu enzymu restrykcyjnego *BsmI/Mva1269I* (Thermo Fisher). Na mieszaninę reakcyjną składały się: 1) 2 µl buforu R (10x); 2) 0,2 µl (2 U) enzymu *BsmI/Mva1269I* (dodawany jako ostatni składnik); 3) 18 µl sterylnej wody wolnej od nukleaz. Do przygotowanej w ten sposób mieszaniny dodawano 12 µl produktu PCR i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 godziny (termoblok Bio TDB-100, Biosan).

Sekwencję rozpoznawaną przez enzym tnący wraz z miejscem cięcia przedstawiono poniżej (czerwonymi strzałkami zaznaczono miejsce cięcia, na czarnym tle – lokalizacja polimorfizmu):



W przypadku obecności przedstawionej wyżej sekwencji nukleotydowej, w efekcie działania enzymu restrykcyjnego, z pierwotnego fragment DNA długości 812 pz, uzyskiwano dwa fragmenty: krótszy 335 lub 337 pz i dłuższy 477 lub 475 pz. Różne długości fragmentów związane są z asymetrycznym przecięciem dwuniciowej cząsteczki DNA przez enzym restrykcyjny, podobnie jak w przypadku enzymu *FokI*.

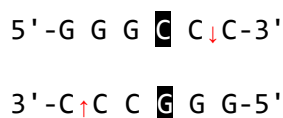
SNP *BsmI VDR* polega na zmianie nukleotydu guaninowego (G) na adeninowy (A). W przypadku homozygoty dzikiej (GG) dochodzi do przecięcia fragmentu namnożonego na drodze reakcji PCR. Inaczej jest w przypadku homozygoty polimorficznej (AA) – całość powielonego produktu pozostaje nieprzecięta. W przypadku heterozygoty (GA) otrzymujemy zarówno fragmenty DNA nieprzecięte, jak i przecięte (efektem są fragmenty DNA o trzech różnych długościach). Oznaczenia poszczególnych alleli polimorfizmu utworzono na podstawie oznaczeń literowych występujących nukleotydów (jak powyżej). Alternatywnie, jak w niektórych pozycjach z piśmiennictwa, allele można oznaczyć też od pierwszej litery nazwy enzymu restrykcyjnego stosowanego w metodzie PCR-RFLP – wielka litera oznacza wariant nieulegający przecięciu (w tym wypadku B), a mała litera wariant przecinany przez ten enzym (w tym wypadku b).

Aby ocenić efekt działania enzymu restrykcyjnego, poddany trawieniu produkt PCR rozdzielany był za pomocą elektroforezy. W przypadku polimorfizmu *BsmI VDR* rozdział elektroforetyczny prowadzony był z wykorzystaniem żelu o stężeniu 1,7%, otrzymywanego poprzez rozpuszczenie 1g agarozy (Agaroz w tabletkach, EURx) w 60 ml TAE 1x. Żel agarozowy wybarwiany był poprzez dodanie 2,5 µl barwnika fluorescencyjnego (SYBR® Green I nucleic acid gel stain, Thermo Fisher) do 60 ml żelu. Do studzienek utworzonych po zastygnięciu agarozy nakładano po 20 µl mieszaniny zawierającej produkt trawienia enzymatycznego. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przez 20 minut przy napięciu 3,75 V/cm, z wykorzystaniem zestawu do elektroforezy poziomej MultiSub Mini (Clever Scientific). W celu określenia wielkości prążków uzyskiwanych w wyniku elektroforezy stosowano wzorzec wielkości DNA (Perfect 100-1000 bp DNA Ladder, EURx).

#### 5.3.4.3. SNP rs7975232 (*ApaI*)

Namnożony fragment genu *VDR* długości 280 pz poddawany był działaniu enzymu restrykcyjnego *ApaI* (Thermo Fisher). Na mieszaninę reakcyjną składały się: 1) 2 µl buforu B (10x); 2) 0,5 µl (5 U) enzymu *ApaI* (dodawany jako ostatni składnik); 3) 18 µl sterylnej wody wolnej od nukleaz. Do przygotowanej w ten sposób mieszaniny dodawano 12 µl produktu PCR i po wymieszaniu inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 godziny (termoblok Bio TDB-100, Biosan).

Sekwencję rozpoznawaną przez enzym tnący wraz z miejscem cięcia przedstawiono poniżej (czerwonymi strzałkami zaznaczono miejsce cięcia, na czarnym tle – lokalizacja polimorfizmu):



W przypadku obecności w obrębie namnożonego fragmentu DNA przedstawionej wyżej sekwencji nukleotydowej, w efekcie działania enzymu restrykcyjnego, z odcinka DNA długości 280 pz, uzyskiwano dwa fragmenty: krótszy 20 lub 24 pz i dłuższy 260 lub 256 pz.

Różne długości fragmentów związane są z asymetrycznym przecięciem dwuniciowej cząsteczki DNA przez enzym restrykcyjny, podobnie jak opisano w poprzednich podrozdziałach.

Polimorfizm *ApaI* genu *VDR* to zmiana nukleotydu cytydynowego (C) na adeninowy (A). W przypadku homozygoty dzikiej (CC) dochodzi do przecięcia fragmentu namnożonego na drodze reakcji PCR. Natomiast w przypadku homozygoty polimorficznej (AA) całość powielonego produktu pozostaje nieprzecięta. W przypadku heterozygoty (CA) otrzymujemy zarówno DNA nieprzecięte, jak i przecięte. Podobnie jak w przypadku poprzednich SNP, oznaczenia poszczególnych alleli polimorfizmu utworzono na podstawie oznaczeń literowych nukleotydów. Innym sposobem jest oznaczenie alleli na podstawie pierwszej litery nazwy enzymu restrykcyjnego stosowanego w metodzie PCR-RFLP – wielka litera oznacza wariant nieulegający przecięciu (w tym wypadku A), a mała litera wariant przecinany przez ten enzym (w tym wypadku a).

Celem oceny efektu działania enzymu restrykcyjnego, poddany reakcji trawienia produkt PCR rozdzielany był za pomocą elektroforezy. W przypadku SNP *ApaI VDR* rozdział elektroforetyczny prowadzony był na żelu agarozowym o stężeniu 3%, otrzymywanym poprzez rozpuszczenie 2,5 g agarozy (Agaroz w tabletkach, EURx) w 84 ml TAE 0,5x. Przed zastygnięciem agarozy żel wybarwiany był barwnikiem fluorescencyjnym (SYBR<sup>®</sup> Green I nucleic acid gel stain, Thermo Fisher) – 5 µl/84 ml żelu. Do studzienek utworzonych po zastygnięciu agarozy nakładano po 20 µl mieszaniny zawierającej produkt trawienia enzymatycznego. Rozdział w polu elektrycznym o napięciu 6 V/cm prowadzony był przez 50 minut, z wykorzystaniem zestawu do elektroforezy poziomej MultiSub Mini (Clever Scientific). Stosowano wzorzec wielkości DNA (Perfect 100-1000 bp DNA Ladder, EURx).

#### **5.3.4.4. SNP rs731236 (*TaqI*)**

W przypadku SNP *TaqI* genu *VDR* produkt reakcji PCR długości 280 pz (wspólny dla SNP *TaqI* oraz omawianego we wcześniejszym podrozdziale SNP *ApaI*) poddany został

działaniu enzymu restrykcyjnego *TaqI* (Thermo Fisher). Na mieszaninę reakcyjną składały się: 1) 2 µl buforu *TaqI* 10x; 2) 0,5 µl (5 U) enzymu *TaqI* (dodawany jako ostatni składnik); 3) 18 µl sterylnej wody wolnej od nukleaz. Do przygotowanej w ten sposób mieszaniny dodawano 12 µl produktu PCR i inkubowano w temperaturze 65°C przez 2 godziny (termoblok Bio TDB-100, Biosan).

Sekwencję rozpoznawaną przez enzym tnący wraz z miejscem cięcia przedstawiono poniżej:

5' - T ↓ **C** G A - 3'

3' - A **G** C ↑ T - 5'

W przypadku obecności w sekwencji nukleotydowej miejsca rozpoznawanego przez enzym, w efekcie jego działania na fragment długości 280 pz, uzyskiwano dwa fragmenty: krótszy 100 lub 102 pz i dłuższy 180 lub 178 pz. Powstawanie fragmentów różnej długości związane jest z asymetrycznym przecięciem dwuniciowej cząsteczki DNA przez zastosowany (jak omówiono w poprzednich podrozdziałach).

SNP *TaqI* *VDR* to zmiana nukleotydu tymidynowego (T) na cytydynowy (C). W przypadku homozygoty dzikiej (TT) nie dochodzi do przecięcia fragmentu namnożonego na drodze reakcji PCR. Z kolei w przypadku homozygoty polimorficznej (CC) całość powielonego produktu zostaje przecięta. W przypadku heterozygoty (TC) otrzymujemy zarówno fragmenty DNA nieprzecięte, jak i przecięte. Oznaczenia poszczególnych alleli polimorfizmu utworzono na podstawie oznaczeń literowych nukleotydów. Innym sposobem jest oznaczenie alleli na podstawie pierwszej litery nazwy enzymu restrykcyjnego stosowanego w metodzie PCR-RFLP – wielka litera oznacza wariant nieulegający przecięciu (w tym wypadku T), a mała litera wariant przecinany przez ten enzym (w tym wypadku t).

Poddany trawieniu enzymatycznemu produkt PCR rozdzielano następnie w polu elektrycznym. W przypadku SNP *TaqI* rozdział elektroforetyczny prowadzony był po nałożeniu na żel agarozowy o stężeniu 1,7%, który otrzymywano poprzez rozpuszczenie 1 g agarozy (Agaroz w tabletkach, EURx), w 60 ml TAE 1x. Żel wybarwiany był barwnikiem fluorescencyjnym (SYBR<sup>®</sup> Green I nucleic acid gel stain, Thermo Fisher) – 2,5 µl

barwnika/60 ml. Do studzienek utworzonych po zastygnięciu agarozy nakładano po 20  $\mu$ l mieszaniny zawierającej produkt trawienia enzymatycznego. Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przez 20 minut z zastosowaniem napięcia 4,5 V/cm. Wykorzystywano zestaw do elektroforezy poziomej MultiSub Mini (Clever Scientific).

#### **5.3.4. Genotypowanie polimorfizmu rs11568820 (Cdx2)**

SNP Cdx2 VDR to zmiana nukleotydu guaninowego (G) na adeninowy (A). Poszczególne allele polimorfizmu oznaczono zgodnie z symbolami literowymi występujących nukleotydów.

W przypadku polimorfizmu rs11568820 do oznaczenia genotypów w grupie badanej oraz grupie kontrolnej zastosowano metodę real-time PCR z wykorzystaniem zmodyfikowanych sond molekularnych TaqMan<sup>®</sup>. Reakcja prowadzona była przy użyciu termocyklera LightCycler 2.0 thermal cycler (Roche). Na mieszaninę reakcyjną składało się: 1) 10  $\mu$ l mieszaniny do real-time PCR (Probe qPCR Master Mix (2x), EURx); 2) 8,4  $\mu$ l wody; 3) 0,4  $\mu$ l mieszaniny do genotypowania (TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay ID: C\_\_2880808\_10, ThermoFisher); 4) 0,2  $\mu$ l UNG (Uracil N-glycosylase – N-glikozyłaza uracylu); 5) 1  $\mu$ l DNA matrycowego (stężenie DNA 20 ng/ $\mu$ l, próbki rozcieńczano do odpowiedniego stężenia). Reakcję prowadzono w objętości 20  $\mu$ l. UNG stosowano, aby zapobiegać kontaminacji mieszaniny materiałem DNA z poprzednich reakcji. Na program reakcji składały się następujące etapy: 1) 37°C, 2 min – przygotowanie z zastosowaniem UNG; 2) 95°C, 10 min – predenaturacja; 3) 40 cykli: 92°C, 15 s, ramp rate (RR – szybkość zmiany temperatury) 5°C/s; 60°C, 1 min, RR 5°C/s z detekcją sygnału. Sygnał fluorescencyjny był odczytywany dla: 1) fali długości 530 nm, co w tym wypadku odpowiadało allelowi A (fwd/T) lub T (rev/B), z którymi wiązał się barwnik fluorescencyjny FAM (6-karboksylofluoresceina); 2) fali długości 560 nm, co odpowiadało allelowi G (fwd/T) lub C (rev/B), z którymi wiązał się barwnik fluorescencyjny VIC. Wszystkie trzy genotypy (AA, GG lub GA) wykazywały dobrą separację pod względem wartości współczynnika sygnałów fluorescencyjnych 530 nm/560 nm.



### 5.3.5. Sekwencjonowanie

Celem weryfikacji poprawności oznaczeń wykonanych metodą PCR-RFLP lub real-time PCR z zastosowaniem sond molekularnych wybrane losowo próbki zostały poddane sekwencjonowaniu. Wykonanie sekwencjonowania zlecano Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Do sekwencjonowania wykorzystywano DNA uzyskane wcześniej na drodze reakcji PCR. Warunki reakcji dla polimorfizmów *FokI*, *BsmI*, *ApaI* i *TaqI* genu *VDR* były zgodne z przedstawionymi w poprzednich podrozdziałach. Warunki reakcji PCR dla SNP *Cdx2* genu *VDR* przedstawia tabela 3. Produkty reakcji PCR poddawane były oczyszczaniu z zastosowaniem standardowych zestawów do oczyszczania. W celu określenia stężenia DNA wykonywano pomiar spektrofotometryczny (jak w opisie powyżej), a następnie rozcieńczano próbki tak, aby uzyskać stężenie około 5 ng DNA/ $\mu$ l/100 pz. Próbki przekazywano do sekwencjonowania jako mieszaninę DNA matrycowego i starterów.

**Tabela 3.** Warunki reakcji PCR dla polimorfizmu *Cdx2* genu *VDR*

Polimorfizm	Sekwencja startera F	Sekwencja startera R	Warunki reakcji	Liczba cykli	Produkt PCR	Źródło
<b>Cdx2</b>	5'- AGGATAG AGAAAAT AATAGAA AACATT- 3'	5'- ACGTTAA GTTCAGA AAGATTA ATTC-3'	<b>1. Predenaturacja:</b> 95°C przez 5 min <b>2. Amplifikacja:</b> 95°C 30 s 58°C 30 s 72°C 30 s <b>3. Ostatnie wydłużanie:</b> 72°C 7 min <b>4. Chłodzenie:</b> 4°C 30 s	35	297 pz	Fang Y, 2003

pz – para zasad

### 5.4. USG tarczycy

U części spośród pacjentów oraz grupy kontrolnej wykonywano USG tarczycy. Używano ultrasonografu ALOKA PROSOUND SSD-3500SX wraz z sondą linową o częstotliwości 7,5 MHz (Hitachi Aloka Medicals, Japonia). Objętość tarczycy wyliczano

jako sumę objętości dwóch płatów (objętość każdego z nich wyrażoną w ml obliczono według wzoru  $\pi/6 \times \text{wysokość [cm]} \times \text{szerokość [cm]} \times \text{wymiar przednio-tylny [cm]}$ ).

## 5.5. Metody statystyczne

Zasadniczym elementem analizy statystycznej było porównanie rozkładu genotypów oraz częstości alleli wybranych polimorfizmów *VDR* pomiędzy badanymi z AITD a grupą kontrolną. Przeprowadzono też obliczenia z uwzględnieniem podgrup AITD: AIT vs. grupa kontrolna, TAO vs. grupa kontrolna oraz AIT vs. TAO. Pierwszym etapem obliczeń była w tych przypadkach ocena zgodności rozkładu genotypów poszczególnych polimorfizmów w badanych grupach z równowagą Hardego-Weinberga (ang. *Hardy-Weinberg Equilibrium* - HWE). Obliczenia te wykonywano w oparciu o statystykę  $\chi^2$ , wykorzystując kalkulator dostępny on-line ([www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml](http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml), 01.09.2018 r.) (Rodriguez S, 2009). Przeprowadzono też analizy polegające na porównaniu rozkładu genotypów oraz częstości alleli poszczególnych polimorfizmów *VDR* pomiędzy podgrupami AIT i TAO utworzonymi w zależności od wybranych parametrów klinicznych (np. AIT ze zmianami ogniskowymi vs. AIT bez zmian ogniskowych). Do oceny istotności statystycznej różnicy w częstościach genotypów i alleli obserwowanych pomiędzy grupami stosowano: 1) dla tabel kontyngencji 2 x 2 test chi-kwadrat ( $\chi^2$ ) lub test Fishera (w przypadku gdy licznosci oczekiwane w którejkolwiek z komórek utworzonej tabeli kontyngencji były  $< 15$ ); 2) dla tabel kontyngencji 3 x 2 test  $\chi^2$  (w przypadku gdy żadna z licznosci oczekiwanych nie była  $< 1$ , a ponadto przynajmniej 80% licznosci oczekiwanych było  $\geq 5$ ) lub test Fishera-Freemana- Haltona (przy braku spełnienia warunków dla testu  $\chi^2$ ). Dla tabel 3 x 2 wyliczono także wartości p dla trendu ( $p^{\text{trend}}$ ), używając testu  $\chi^2$  dla trendu. Przy ocenie różnic w dystrybucji genotypów pomiędzy grupami wykonywano również obliczenia przyjmując trzy różne modele dziedziczenia: dominujący (AA + AB vs. BB), recesywny (AA vs. AB + BB) oraz addytywny (AA vs. BB). Jako wykładnik znamienności statystycznej różnic pomiędzy porównywanymi grupami przyjęto wartość  $p < 0,05$ . Celem wyznaczenia siły potencjalnych zależności pomiędzy wariantami badanych polimorfizmów a ryzykiem występowania choroby lub innymi stanami klinicznymi, wyliczono iloraz szans

(ang. *Odds Ratio* - OR) z 95% przedziałami ufności (ang. *Confidence Interval* - 95% CI). Obliczenia te wykonano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism w wersji 7.03 dla systemu MS Windows (GraphPad Software).

Analizowano także występowanie sprzężeń pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR* wraz z określeniem nierównowagi sprzężeń między nimi. Następnie na podstawie uzyskanych wyników konstruowane były bloki haplotypowe (w oparciu o metodę opisaną przez Gabriel i wsp. – według przedziałów ufności lub według solid spine of LD) (Gabriel SB, 2002). Analizie poddawano częstości występowania haplotypów w poszczególnych grupach wraz z oceną istotności statystycznej ewentualnych różnic. Wszystkie te obliczenia wykonywano z wykorzystaniem oprogramowania Haploview w wersji 4.2 (Broad Institute) (Barrett JC, 2005).

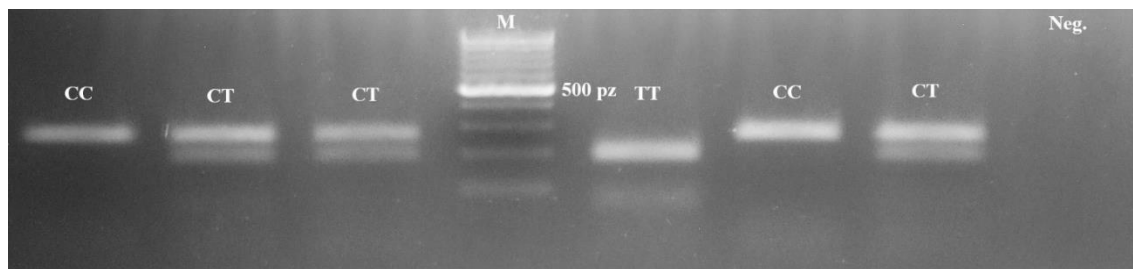
Do porównywania zmiennych ciągłych (między innymi objętość tarczycy, wiek w momencie rozpoznania choroby) pomiędzy grupami/podgrupami wykorzystywano: 1) w przypadku dwóch grup test t-Studenta (dla zmiennych mających rozkład normalny) lub test Manna-Whitneya (dla zmiennych bez zachowanego rozkładu normalnego); 2) w przypadku więcej niż dwóch grup statystykę ANOVA (dla zmiennych mających rozkład normalny) lub test Kruskala-Wallisa (przy braku rozkładu normalnego zmiennych). Jeśli wykazano istnienie istotnych różnic pomiędzy grupami w testach dla więcej niż dwóch grup, w dalszej kolejności wykonywano testy *post-hoc*, aby określić, które spośród par grup różnią się istotnie. W praktyce zastosowanie znalazł test Dunna, stosowany w przypadku istotnych różnic w teście Kruskala-Wallisa. Obliczenia wykonywano przy użyciu oprogramowania STATISTICA w wersji 12 (StatSoft) oraz GraphPad Prism 7.03.

Wyniki przedstawiano jako: 1) licznosc oraz procent calosci dla zmiennych nominalnych); 2) srednia i odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation* – SD) dla zmiennych ciągłych mających rozkład normalny (oceniany w teście Shapiro-Wilka); 3) mediana i zakres (minimum-maksimum) dla zmiennych ciągłych niemających rozkładu normalnego (na podstawie testu Shapiro-Wilka).

## 6. Wyniki

### 6.1. Polimorfizm rs2228570 (*FokI*)

Genotypowanie polimorfizmu *FokI* genu *VDR* przeprowadzono metodą PCR-RFLP (jak opisano w rozdziale Metody). Przykłady uzyskiwanych wyników przedstawia rycina 7. Miarodajne wyniki otrzymano w przypadku 458 spośród 460 badanych próbek (99,57%): 130/130 (100%) w przypadku grupy kontrolnej, 222/222 (100%) w grupie AIT oraz 106/108 (98,15%) w grupie TAO. Wybrane losowo próbki poddano ponadto sekwencjonowaniu, celem weryfikacji wyników uzyskanych metodą PCR-RFLP. We wszystkich przypadkach wyniki uzyskiwane obiema metodami były zgodne. Przykłady wyników uzyskanych na drodze sekwencjonowania przedstawia rycina 8.



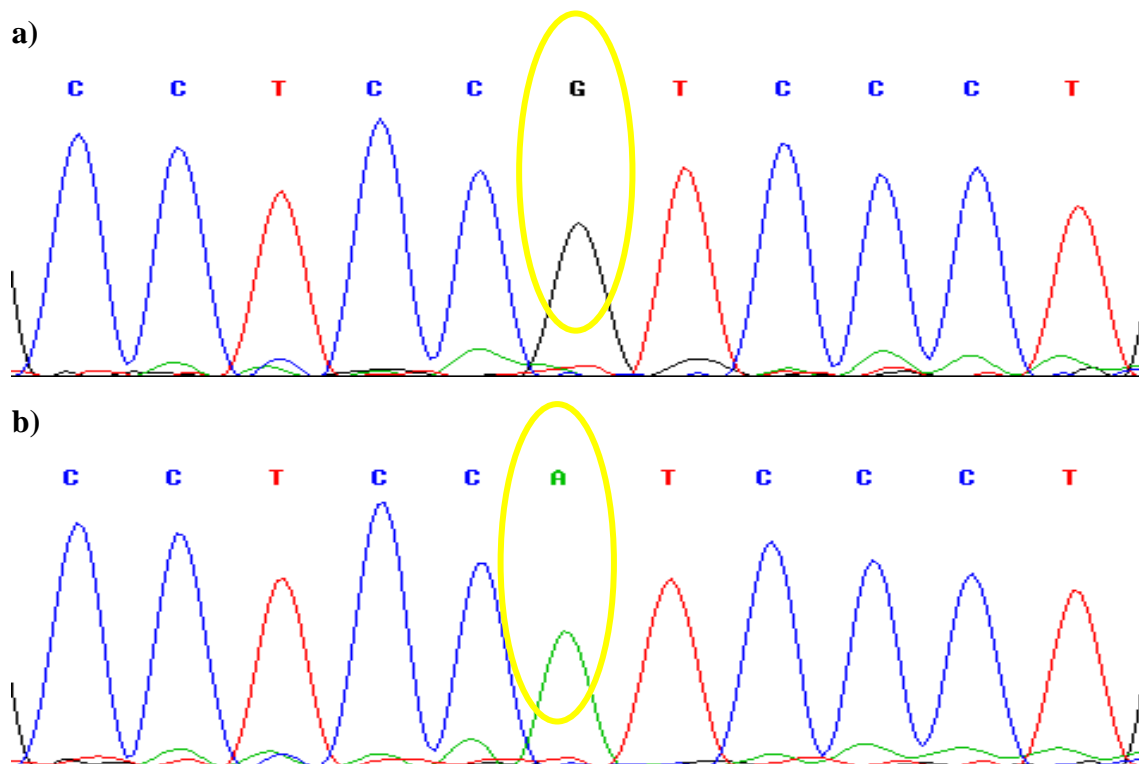
**Rycina 7.** Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem *FokI*

M – wzorzec wielkości DNA 100-1000 pz

Neg. – kontrola negatywna

pz – para zasad

CC – homozygota polimorficzna (prążek 267 pz), CT – heterozygota (prążki 267, 193 i 74 pz), TT – homozygota dzika (prążki 193 i 74 pz)



**Rycina 8.** Sekwencjonowanie fragmentu genu *VDR* zawierającego polimorfizm *FokI*:

- a) allel G w pozycji SNP *FokI* *VDR* na nici antysensownej, odpowiadający allelowi C na nici sensownej;
- b) allel A w pozycji SNP *FokI* *VDR* na nici antysensownej, odpowiadający allelowi T na nici sensownej

### 6.1.1. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *FokI* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie AITD, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *FokI* był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,98$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 0,09$ ;  $p > 0,05$ ).

Analiza rozkładu genotypów pokazała, że w grupie AITD homozygota CC była częstsza w porównaniu do zdrowych ochotników (33,84% vs. 29,23%), podczas gdy częstości heterozygoty CT oraz homozygoty TT były większe w grupie kontrolnej. Obserwowane różnice nie były jednak istotne statystycznie. Analizy prowadzone przy założeniu różnych modeli dziedziczenia (recesywny, dominujący, addytywny) również nie

wykazały istotnych różnic pomiędzy grupami. W analizie alleli wariant C obserwowano częściej wśród chorych niż u zdrowych (57,01% vs. 53,46%). Różnica ta ponownie nie była jednak istotna statystycznie. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 4.

**Tabela 4.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *FokI* genu *VDR* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AITD n = 328 (%)	Grupa kontrolna n = 130 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
<b>CC (FF)</b>	<b>111</b> (33,84)	<b>38</b> (29,23)	CC vs. CT + TT	0,98 (0,91*)	0,61 (0,34*)	1,24	0,80-1,91
<b>CT (Ff)</b>	<b>152</b> (46,34)	<b>63</b> (48,46)		0,90	0,34		
<b>TT (ff)</b>	<b>65</b> (19,82)	<b>29</b> (22,31)	CC + CT vs. TT	0,35	0,55	1,16	0,72-1,89
			CC vs. TT	0,83	0,36	1,30	0,74-2,26
<b>Częstość alleli</b>							
<b>C (F)</b>	<b>374</b> (57,01)	<b>139</b> (53,46)	C vs. T	0,95	0,33	1,15	0,87-1,55
<b>T (f)</b>	<b>282</b> (42,99)	<b>121</b> (46,54)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.1.2. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *FokI* w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *FokI* był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 2,68$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 0,09$ ;  $p > 0,05$ ).

Obserwowano pewne różnice w częstościach genotypów oraz alleli pomiędzy grupą AIT a zdrowymi ochotnikami. Między innymi genotyp CC był nieznacznie częstszy u pacjentów w stosunku do grupy kontrolnej (32,43% vs. 29,23%). Również allel C obserwowano z większą częstością wśród chorych niż u zdrowych (54,50% vs. 53,46%). Nie były to jednak różnice istotne statystycznie. Również obliczenia przy założeniu poszczególnych modeli dziedziczenia (recesywny, dominujący, addytywny) nie pozwoliły na wykazanie istotnych różnic. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 5.

**Tabela 5.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *FokI* genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AIT n = 222 (%)	Grupa kontrolna n = 130 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
<b>CC (FF)</b>	<b>72 (32,43)</b>	<b>38 (29,23)</b>	CC vs. CT + TT CC + CT vs. TT CC vs. TT	0,65 (0,07*)	0,72 (0,80*)	1,16	0,72-1,88
<b>CT (Ff)</b>	<b>98 (44,14)</b>	<b>63 (48,46)</b>		0,39	0,53		
<b>TT (ff)</b>	<b>52 (23,42)</b>	<b>29 (22,31)</b>		0,06	0,81		
				0,03	0,86	1,06	0,57-1,94
<b>Częstość alleli</b>							
<b>C (F)</b>	<b>242 (54,50)</b>	<b>139 (53,46)</b>	C vs. T	0,07	0,79	1,04	0,77-1,42
<b>T (f)</b>	<b>202 (45,50)</b>	<b>121 (46,54)</b>					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.1.3. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *FokI* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *FokI* był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,75$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 0,09$ ;  $p > 0,05$ ).

W grupie TAO częściej w porównaniu do grupy kontrolnej obserwowano genotyp CC (36,79% vs. 29,23%) oraz heterozygotę (50,94% vs. 48,46%). Występowanie homozygoty TT było natomiast rzadsze u pacjentów niż u zdrowych ochotników (12,26% vs. 22,31%). Test  $\chi^2$  wskazał, że pomimo pewnych zauważalnych tendencji, rozkłady genotypów nie różniły się w sposób istotny statystycznie pomiędzy badanymi grupami ( $p = 0,11$ ). W przypadku testu  $\chi^2$  dla trendu uzyskiwano wynik na granicy istotności statystycznej ( $p = 0,05$ ). Przy przyjęciu dominującego modelu dziedziczenia (CC + CT vs. TT) wykazano, że posiadanie przynajmniej jednego allelu C związane było z około dwukrotnie wyższym prawdopodobieństwem wystąpienia TAO w stosunku do homozygot TT (OR = 2,05; 95% CI: 1,03-4,08;  $p = 0,04$ ). Analizując allele, zaobserwowano, że allel C występował

częściej u chorych niż w grupie kontrolnej (62,26% vs. 53,46%). Stwierdzona różnica była na granicy istotności statystycznej ( $p = 0,05$ ). Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 6.

**Tabela 6.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *FokI* genu *VDR* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	TAO n = 106 (%)	Grupa kontrolna n = 130 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
<b>CC (FF)</b>	<b>39 (36,79)</b>	<b>38 (29,23)</b>		4,41 (3,75*)	0,11 (0,05*)		
<b>CT (Ff)</b>	<b>54 (50,94)</b>	<b>63 (48,46)</b>	CC vs. CT + TT	1,52	0,22	1,41	0,82-2,43
<b>TT (ff)</b>	<b>13 (12,26)</b>	<b>29 (22,31)</b>	CC + CT vs. TT	<b>4,03</b>	<b>0,04</b>	<b>2,05</b>	<b>1,03-4,08</b>
			CC vs. TT	<b>4,29</b>	<b>0,04</b>	<b>2,29</b>	<b>1,06-5,10</b>
<b>Częstość alleli</b>							
<b>C (F)</b>	<b>132 (62,26)</b>	<b>139 (53,46)</b>					
<b>T (f)</b>	<b>80 (37,74)</b>	<b>121 (46,54)</b>	C vs. T	3,70	0,05	1,44	0,99-2,06

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

TAO – orbitopatia tarczycowa

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

Wartości  $p < 0,05$  zaznaczono kolorem czerwonym

#### 6.1.4. Porównanie częstości genotypów i alleli polimorfizmu *FokI* pomiędzy grupą AIT a TAO

Porównano również rozkład genotypów i alleli SNP *FokI VDR* pomiędzy dwoma chorobami zaliczanymi do AITD – AIT i TAO. Zarówno homozygota CC, jak i heterozygota CT częstsze były u chorych z TAO (odpowiednio 36,79% i 50,94%) w porównaniu do grupy AIT (32,43% i 44,14%). W związku z tym w analizie alleli zauważalna była większa częstość wariantu C w grupie TAO w stosunku do AIT (62,26% vs. 54,50%). Obserwowane różnice w rozkładzie genotypów i alleli były na granicy istotności statystycznej ( $p = 0,06$  w obu przypadkach). Znamiennej różnicę pomiędzy dwiema grupami stwierdzono przy założeniu modelu dominującego oraz addytywnego ( $p = 0,02$  oraz  $p = 0,03$ ). Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 7.



**Tabela 7.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *FokI* genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO

Genotyp/ allel	AIT n = 222 (%)	TAO n = 106 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
CC (FF)	72 (32,43)	39 (36,79)	CC vs. CT + TT CC + CT vs. TT CC vs. TT	5,63 (3,34*)	0,06 (0,07*)	1,21 2,19 2,17	0,76-1,96 1,15-4,29 1,09-4,28
CT (Ff)	98 (44,14)	54 (50,94)		0,61	0,44		
TT (ff)	52 (23,42)	13 (12,26)		5,62 4,51	0,02 0,03		
<b>Częstość alleli</b>							
C (F)	242 (54,50)	132 (62,26)	C vs. T	3,53	0,06	1,38	0,99-1,91
T (f)	202 (45,50)	80 (37,74)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

TAO – orbitopatia tarczycowa

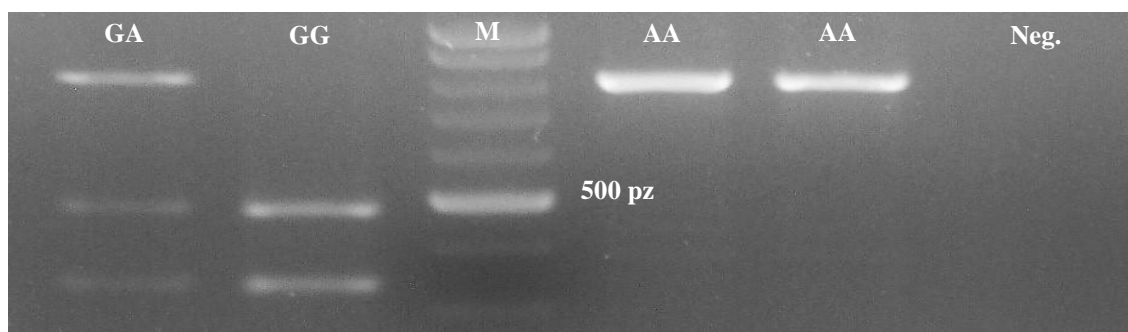
OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

Wartości p < 0,05 zaznaczono kolorem czerwonym

## 6.2. Polimorfizm rs1544410 (*BsmI*)

Miarodajne wyniki genotypowania polimorfizmu *BsmI* uzyskano w przypadku 441 spośród 460 badanych próbek (95,87%): 120/130 (92,31%) w przypadku grupy kontrolnej, 219/222 (98,65%) w grupie AIT oraz 102/108 (94,44%) w grupie TAO. Przykłady wyników uzyskiwanych metodą PCR-RFLP, jak i bezpośredniego sekwencjonowania przedstawiają ryciny 9 i 10.



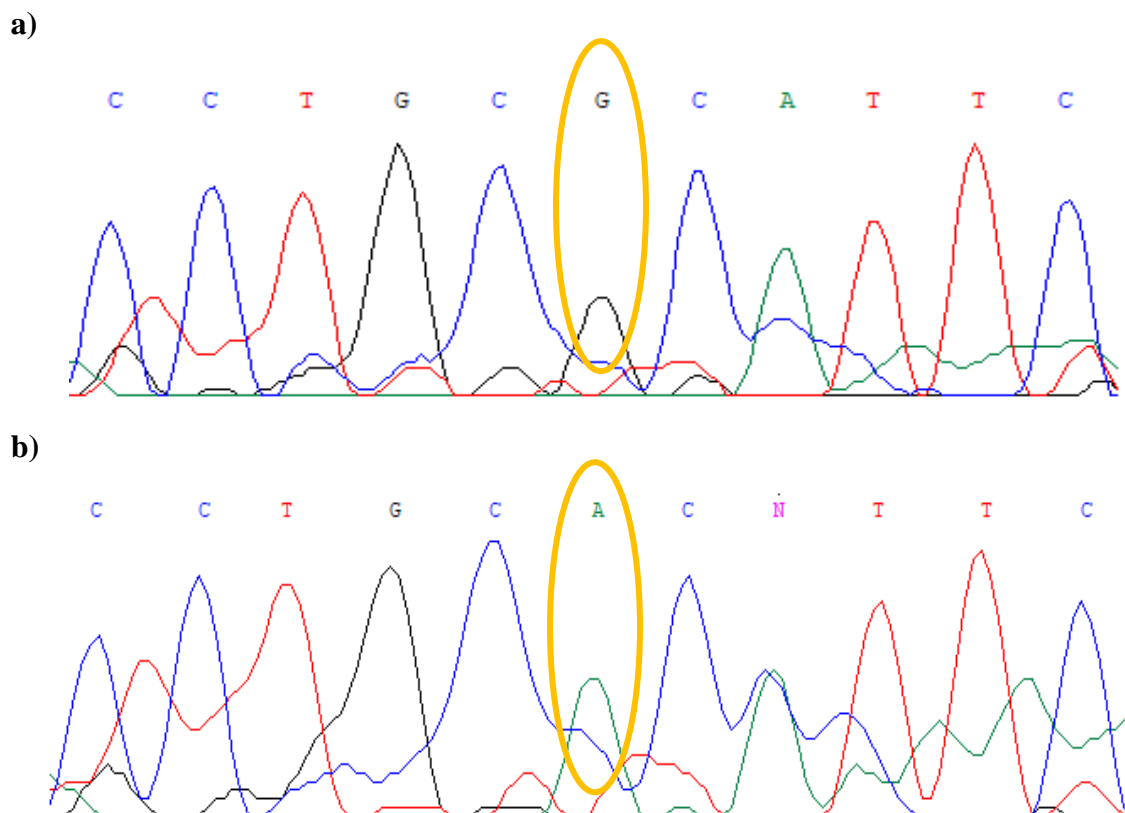
**Rycina 9.** Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem *BsmI*

M – wzorzec wielkości DNA 100-1000 pz

Neg. – kontrola negatywna

pz – para zasad

GG – homozygota dzika (prążki 477 i 335 pz), GA – heterozygota (prążki 812, 477 i 335 pz), AA – homozygota polimorficzna (prążek 812 pz)



**Rycina 10.** Sekwencjonowanie fragmentu genu *VDR* zawierającego polimorfizm *BsmI*:

- a) allel G w pozycji SNP *BsmI* *VDR* na nici antysensownej, odpowiadający allelowi C na nici sensownej;
- b) allel A w pozycji SNP *BsmI* *VDR* na nici antysensownej, odpowiadający allelowi T na nici sensownej

### 6.2.1. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *BsmI* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkłady genotypów SNP *BsmI* były zgodne z równowagą Hardy'ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,34$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 1,54$ ;  $p > 0,05$ ).

W grupie AITD nieco częściej w porównaniu do grupy kontrolnej obserwowano homozygotę dziką GG (38,63% vs. 35,83%) oraz heterozygotę (45,79% vs. 43,33%), co przełożyło się też na większą częstość allelu G u chorych w porównaniu do zdrowych

ochotników (61,53% vs. 57,50%). Obserwowane różnice nie były jednak istotne statystycznie. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 8.

**Tabela 8.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *BsmI* genu *VDR* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AITD n = 321 (%)	Grupa kontrolna n = 120 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
<b>GG (bb)</b>	<b>124 (38,63)</b>	<b>43 (35,83)</b>		1,72 (1,12*)	0,42 (0,29*)		
<b>GA (bB)</b>	<b>147 (45,79)</b>	<b>52 (43,33)</b>	GG vs. GA + AA	0,29	0,59	1,13	0,73-1,74
<b>AA (BB)</b>	<b>50 (15,58)</b>	<b>25 (20,83)</b>	GG + GA vs. AA	1,71	0,19	1,43	0,85-2,43
			GG vs. AA	1,47	0,2	1,44	0,81-2,58
<b>Częstość alleli</b>							
<b>G (b)</b>	<b>395 (61,53)</b>	<b>138 (57,50)</b>					
<b>A (B)</b>	<b>247 (38,47)</b>	<b>102 (42,50)</b>	G vs. A	1,18	0,28	1,18	0,88-1,60

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.2.2. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *BsmI* w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *BsmI* był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,47$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 1,54$ ;  $p > 0,05$ ).

Porównując rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu *BsmI* w grupie AIT oraz u osób zdrowych, podobnie jak przy porównaniu AITD vs. grupa kontrolna, można zauważyć, że zarówno homozygota GG, jak i heterozygota były nieznacznie częstsze u chorych (38,81% i 45,21%) niż u zdrowych (35,83% i 43,33%). Zaobserwowano ponadto, że allel G występował z większą częstością w grupie AIT w porównaniu do osób zdrowych (61,42% vs. 57,50%). W żadnej z przeprowadzonych analiz statystycznych nie obserwowano jednak wartości  $p < 0,05$ , która pozwalałaby stwierdzić istotną różnicę. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 9.

**Tabela 9.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *BsmI* genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AIT n = 219 (%)	Grupa kontrolna n = 120 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
<b>GG (bb)</b>	<b>85 (38,81)</b>	<b>43 (35,83)</b>	GG vs. GA + AA	1,27 (0,92*)	0,53 (0,34*)	1,14	0,71-1,79
<b>GA (bB)</b>	<b>99 (45,21)</b>	<b>52 (43,33)</b>		0,29	0,59		
<b>AA (BB)</b>	<b>35 (15,98)</b>	<b>25 (20,83)</b>	GG + GA vs. AA	1,25	0,26	1,38	0,78-2,48
			GG vs. AA	1,15	0,28	1,41	0,75-2,62
<b>Częstość alleli</b>							
<b>G (b)</b>	<b>269 (61,42)</b>	<b>138 (57,50)</b>	G vs. A	0,99	0,32	1,18	0,85-1,62
<b>A (B)</b>	<b>169 (38,58)</b>	<b>102 (42,50)</b>					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.2.3. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *BsmI* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *BsmI* był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,00$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 1,54$ ;  $p > 0,05$ ).

Porównanie grupy TAO oraz zdrowych ochotników pokazało, że podobnie jak we wcześniejszych podrozdziałach dotyczących grupy AITD i AIT, w przypadku osób chorych częściej niż w grupie kontrolnej, zaobserwować można homozygotę dziką GG (38,24% vs. 35,83%) oraz heterozygotę (47,06% vs. 43,33%). Nie są to jednak różnice znamienne statystycznie. W analizie alleli wariant G nieznacznie częściej występował u chorych z TAO niż w kontroli (61,76% vs. 57,50%), ponownie jednak nie była to różnica istotna statystycznie. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 10.

**Tabela 10.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *BsmI* genu *VDR* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	TAO n = 102 (%)	Grupa kontrolna n = 120 (%)	Statystyka					
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI	
<b>Częstość genotypów</b>								
<b>GG (bb)</b>	<b>39 (38,24)</b>	<b>43 (35,83)</b>	GG vs. GA + AA	1,41 (0,78*)	0,50 (0,38*)	1,11	0,64-1,91	
<b>GA (bB)</b>	<b>48 (47,06)</b>	<b>52 (43,33)</b>		GG + GA vs. AA	0,14			0,71
<b>AA (BB)</b>	<b>15 (14,71)</b>	<b>25 (20,83)</b>		GG vs. AA	1,40			0,24
				1,10	0,29	1,51	0,71-3,16	
<b>Częstość alleli</b>								
<b>G (b)</b>	<b>126 (61,76)</b>	<b>138 (57,50)</b>	G vs. A	0,83	0,36	1,19	0,82-1,75	
<b>A (B)</b>	<b>78 (38,24)</b>	<b>102 (42,50)</b>						

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

TAO – orbitopatia tarczycowa

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

#### 6.2.4. Porównanie częstości genotypów i alleli polimorfizmu *BsmI* pomiędzy grupą AIT a TAO

Porównano również rozkład genotypów i alleli SNP *BsmI VDR* pomiędzy AIT i TAO. Częstości poszczególnych genotypów oraz alleli w obu grupach były jednak zbliżone, nie obserwowano żadnych znamienych różnic. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 11.

**Tabela 11.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *BsmI* genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO

Genotyp/ allel	AIT n = 219 (%)	TAO n = 102 (%)	Statystyka					
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI	
<b>Częstość genotypów</b>								
<b>GG (bb)</b>	<b>85 (38,81)</b>	<b>39 (38,24)</b>	GG vs. GA + AA	0,13(0,01*)	0,94 (0,93*)	1,03	0,64-1,64	
<b>GA (bB)</b>	<b>99 (45,21)</b>	<b>48 (47,06)</b>		GG + GA vs. AA	0,01			0,92
<b>AA (BB)</b>	<b>35 (15,98)</b>	<b>15 (14,71)</b>		GG vs. AA	0,09			0,77
				0,04	0,85	0,93	0,45-1,87	
<b>Częstość alleli</b>								
<b>G (b)</b>	<b>269 (61,42)</b>	<b>126 (61,76)</b>	G vs. A	0,01	0,93	0,99	0,70-1,39	
<b>A (B)</b>	<b>169 (38,58)</b>	<b>78 (38,24)</b>						

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

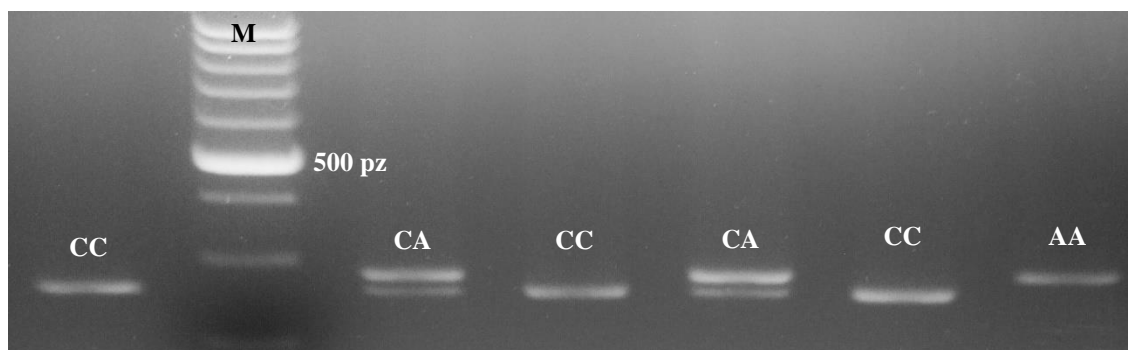
TAO – orbitopatia tarczycowa

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.3. Polimorfizm rs7975232 (*ApaI*)

Miarodajne wyniki genotypowania polimorfizmu *ApaI* uzyskano w przypadku 446 spośród 460 badanych próbek (96,96%): 125/130 (96,15%) w przypadku grupy kontrolnej, 215/222 (96,85%) w grupie AIT oraz 106/108 (98,15%) w grupie TAO. Przykłady wyników uzyskiwanych metodą PCR-RFLP przedstawia rycina 11.



**Rycina 11.** Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem *ApaI*

M – wzorzec wielkości DNA 100-1000 pz

Neg. – kontrola negatywna

pz – para zasad

CC – homozygota dzika (prążki 256 i 24 pz), CA – heterozygota (prążki 280, 256 i 24 pz), AA – homozygota polimorficzna (prążek 280 pz)

#### 6.3.1. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *ApaI* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *ApaI* był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 1,13$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 1,84$ ;  $p > 0,05$ ).

Częstości genotypów w obu grupach były zbliżone. Zauważalne jest jedynie nieznacznie częstsze występowanie homozygot CC i AA w grupie AITD (odpowiednio 23,99% i 23,05%) w porównaniu do kontroli (22,40% i 21,60%). Wariant heterozygotyczny był nieco częstszy w przypadku grupy kontrolnej (56,00% vs. 52,96% w AITD). Częstości alleli niemal nie różniły się pomiędzy dwoma badanymi grupami. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 12.

**Tabela 12.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *ApaI* genu *VDR* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AITD n = 321 (%)	Grupa kontrolna n = 125 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
CC (aa)	77 (23,99)	28 (22,40)	CC vs. CA + AA CC + CA vs. AA CC vs. AA	0,33(<0,01*)	0,85 (0,99*)	1,09	0,68-1,76
CA (aA)	170 (52,96)	70 (56,00)		0,13	0,72		
AA (AA)	74 (23,05)	27 (21,60)		0,11	0,74		
				<0,01	0,99	1,00	0,55-1,83
<b>Częstość alleli</b>							
C (a)	324 (50,47)	126 (50,40)	C vs. A	<0,01	0,99	1,00	0,75-1,34
A (A)	318 (49,53)	124 (49,60)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.3.2. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *ApaI* w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *ApaI* był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,38$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 1,80$ ;  $p > 0,05$ ).

Homozygoty CC oraz AA częściej pojawiały się w grupie chorych (odpowiednio 24,65% i 23,26%) w stosunku do grupy kontrolnej (odpowiednio 22,40% i 21,60%), podczas gdy heterozygota z większą częstością obserwowana była u zdrowych ochotników (56,00% vs. 52,09% w AIT). Różnice te były jednak niewielkie i nie osiągały istotności statystycznej. Częstości alleli w obu grupach były niemal tożsame. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 13.

**Tabela 13.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *ApaI* genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AIT n = 215 (%)	Grupa kontrolna n = 125 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
CC (aa)	53 (24,65)	28 (22,40)	CC vs. CA + AA CC + CA vs. AA CC vs AA	0,49(0,01*)	0,78 (0,94*)	1,13 0,91 1,02	0,68-1,92 0,53-1,55 0,52-2,01
CA (aA)	112 (52,09)	70 (56,00)		0,22	0,64		
AA (AA)	50 (23,26)	27 (21,60)		0,12	0,73		
<b>Częstość alleli</b>							
C (a)	218 (50,70)	126 (50,40)	C vs. A	0,01	0,94	1,01	0,74-1,39
A (A)	212 (49,30)	124 (49,60)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.3.3. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *ApaI* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *ApaI* był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,94$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 1,80$ ;  $p > 0,05$ ).

Homozygoty – CC oraz AA – występowały z podobną częstością w grupie TAO (odpowiednio 22,64% i 22,64%) oraz wśród zdrowych (22,40% i 21,60%), podczas gdy heterozygoty była nieznacznie częstsza w grupie kontrolnej (56,00% vs. 54,72% w TAO). Częstości alleli niemal nie różniły się pomiędzy dwoma grupami. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 14.



**Tabela 14.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *ApaI* genu *VDR* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	TAO n = 106 (%)	Grupa kontrolna n = 125 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
CC (aa)	24 (22,64)	28 (22,40)	CC vs. CA + AA CC + CA vs. AA CC vs. AA	0,05(0,01*)	0,98 (0,93*)	1,01	0,55-1,85
CA (aA)	58 (54,72)	70 (56,00)		<0.01	0,97		
AA (AA)	24 (22,64)	27 (21,60)		0,04	0,85		
				0,01	0,93	0,96	0,44-2,11
<b>Częstość alleli</b>							
C (a)	106 (50,00)	126 (50,40)	C vs. A	0,01	0,93	0,98	0,68-1,42
A (A)	106 (50,00)	124 (49,60)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

TAO – orbitopatia tarczycowa

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

#### 6.3.4. Porównanie częstości genotypów i alleli polimorfizmu *ApaI* pomiędzy grupą AIT a TAO

Porównano również rozkład genotypów i alleli SNP *ApaI VDR* pomiędzy dwoma chorobami zaliczanymi do AITD – AIT i TAO. Obie homozygoty – CC i AA z większą częstością występowały w grupie AIT (odpowiednio 24,65% i 23,26%) niż w grupie TAO (22,64% i 22,64%). Heterozygota CA była natomiast częściej obserwowana u chorych z orbitopatią (54,72% vs. 52,09%). Różnice te były jednak zbyt małe, by osiągnąć znamienność statystyczną. W analizie alleli różnice pomiędzy dwoma grupami chorych były minimalne. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 15.

**Tabela 15.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *ApaI* genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO

Genotyp/ allel	AIT n = 215 (%)	TAO n = 106 (%)	Statystyka					
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI	
<b>Częstość genotypów</b>								
CC (aa)	53 (24,65)	24 (22,64)	CC vs. CA + AA CC + CA vs. AA CC vs AA	0,22(0,03*)	0,89 (0,86*)	1,12	0,64-1,94	
CA (aA)	112 (52,09)	58 (54,72)		0,16				0,69
AA (AA)	50 (23,26)	24 (22,64)		0,02				0,90
				0,03		1,06	0,53-2,10	
<b>Częstość alleli</b>								
C (a)	218 (50,70)	106 (50,00)	C vs. A	0,03	0,87	1,03	0,74-1,43	
A (A)	212 (49,30)	106 (50,00)						

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

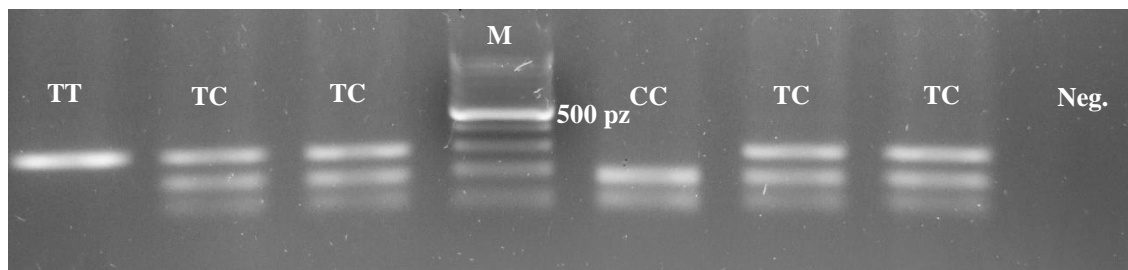
OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

#### 6.4. Polimorfizm rs731236 (*TaqI*)

Miarodajne wyniki genotypowania polimorfizmu *TaqI* uzyskano w przypadku 446 spośród 460 badanych próbek (96,96%): 125/130 (96,15%) w przypadku grupy kontrolnej, 215/222 (96,85%) w grupie AIT oraz 106/108 (98,15%) w grupie TAO. Przykłady wyników uzyskiwanych metodą PCR-RFLP przedstawia rycina 12.

**Rycina 12.** Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem *TaqI*



M – wzorzec wielkości DNA 100-1000 pz

Neg. – kontrola negatywna

pz – para zasad

TT – homozygota dzika (prążek 280 pz), TC – heterozygota (prążki 280, 180 i 100 pz), CC – homozygota polimorficzna (prążki 180 i 100 pz)

#### 6.4.1. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *TaqI* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *TaqI* był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,13$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 0,00$ ;  $p > 0,05$ ).

W grupie AITD genotyp TT oraz heterozygota występowały częściej (odpowiednio 38,46% i 49,68%) w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 33,60% i 48,80%), różnice te nie były jednak istotne statystycznie. Analiza alleli wykazała z kolei, że wariant T z większą częstością występował u chorych na AITD niż u zdrowych (61,53% vs. 58,00%), ponownie jednak różnice nie były na tyle duże, by uzyskać znamienność statystyczną. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 16.

**Tabela 16.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *TaqI* genu *VDR* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AITD n = 321 (%)	Grupa kontrolna n = 125 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
TT (TT)	120 (37,38)	42 (33,60)	TT vs. TC + CC	0,99 (0,95*)	0,61 (0,33*)	1,18	0,77-1,83
TC (Tt)	155 (48,29)	61 (48,80)	TT + TC vs. CC	0,74	0,39	1,28	0,72-2,18
CC (tt)	46 (14,33)	22 (17,60)	TT vs. CC	0,99	0,32	1,37	0,73-2,56
<b>Częstość alleli</b>							
T (T)	395 (61,53)	145 (58,00)	T vs. C	0,94	0,33	1,16	0,86-1,56
C (t)	247 (38,47)	105 (42,00)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

#### 6.4.2. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *TaqI* w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *TaqI* był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,35$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 0,00$ ;  $p > 0,05$ ).

Homozygotę TT oraz heterozygotę obserwowano częściej u chorych na AIT (36,74% i 49,30%) niż w grupie kontrolnej (33,60% i 48,80%). Ponadto w grupie AIT częstość allelu T była nieznacznie większa niż w kontroli (61,40% vs. 58,00%). Testy statystyczne nie wykazały jednak istotnych różnic w rozkładzie genotypów oraz częstościach alleli pomiędzy dwiema grupami. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 17.

**Tabela 17.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *TaqI* genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AIT n = 215 (%)	Grupa kontrolna n = 125 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
TT (TT)	79 (36,74)	42 (33,60)		0,91 (0,78*)	0,63 (0,38*)		
TC (Tt)	106 (49,30)	61 (48,80)	TT vs. TC + CC	0,34	0,56	1,15	0,72-1,82
CC (tt)	30 (13,95)	22 (17,60)	TT + TC vs. CC	0,81	0,37	1,32	0,73-2,40
			TT vs. CC	0,90	0,34	1,38	0,72-2,74
<b>Częstość alleli</b>							
T (T)	264 (61,40)	145 (58,00)					
C (t)	166 (38,60)	105 (42,00)	T vs. C	0,76	0,38	1,15	0,84-1,58

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.4.3. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *TaqI* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *TaqI* był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 0,05$   $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 0,00$   $p > 0,05$ ).

Zauważalna była większa częstości genotypu TT, a także allelu T w grupie TAO (odpowiednio 38,68% i 61,79%) w porównaniu do kontroli (33,60% i 58,00%). Obserwowane różnice pomiędzy TAO a grupą kontrolną nie były jednak istotne statystycznie. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 18.

**Tabela 18.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *TaqI* genu *VDR* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	TAO n = 106 (%)	Grupa kontrolna n = 125 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
<b>TT (TT)</b>	<b>41 (38,68)</b>	<b>42 (33,60)</b>		0,71 (0,68*)	0,70 (0,41*)		
<b>TC (Tt)</b>	<b>49 (46,23)</b>	<b>61 (48,80)</b>	TT vs. TC + CC	0,64	0,42	1,25	0,73-2,12
<b>CC (tt)</b>	<b>16 (15,09)</b>	<b>22 (17,60)</b>	TT + TC vs. CC	0,26	0,61	1,20	0,60-2,38
			TT vs. CC	0,56	0,46	1,34	0,62-2,81
<b>Częstość alleli</b>							
<b>T (T)</b>	<b>131 (61,79)</b>	<b>145 (58,00)</b>					
<b>C (t)</b>	<b>81 (38,21)</b>	<b>105 (42,00)</b>	T vs. C	0,69	0,41	1,17	0,80-1,69

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

TAO – orbitopatia tarczycowa

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.4.4. Porównanie częstości genotypów i alleli polimorfizmu *TaqI* pomiędzy grupą AIT a TAO

Porównano również rozkład genotypów i alleli SNP *TaqI* *VDR* AIT i TAO. W grupie AIT nieco częściej niż u pacjentów z TAO obserwowano heterozygotę TC (49,30% vs. 46,23%), podczas gdy homozygoty TT oraz CC z nieznacznie większą częstością pojawiały

się u chorych z orbitopatią (odpowiednio 38,68% oraz 15,09%) niż w AIT (36,74% i 13,95%). W analizie alleli obie grupy niemal nie różniły się między sobą. Testy statystyczne nie wykazały istotnych różnic pomiędzy dwoma grupami. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 19.

**Tabela 19.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu *TaqI* genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO

Genotyp/ allel	AIT n = 215 (%)	TAO n = 106 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
<b>TT (TT)</b>	<b>79</b> (36,74)	<b>41</b> (38,68)		0,27 (0,01*)	0,87 (0,92*)		
<b>TC (Tt)</b>	<b>106</b> (49,30)	<b>49</b> (46,23)	TT vs. TC + CC	0,11	0,74	0,92	0,57-1,49
<b>CC (tt)</b>	<b>30</b> (13,95)	<b>16</b> (15,09)	TT + TC vs. CC	0,08	0,78	1,10	0,57-2,12
			TT vs. CC	0,01	0,94	1,03	0,50-2,10
<b>Częstość alleli</b>							
<b>T (T)</b>	<b>264</b> (61,40)	<b>131</b> (61,79)					
<b>C (t)</b>	<b>166</b> (38,60)	<b>81</b> (38,21)	T vs. C	0,01	0,92	0,98	0,70-1,38

\* test  $\chi^2$  dla trendu; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

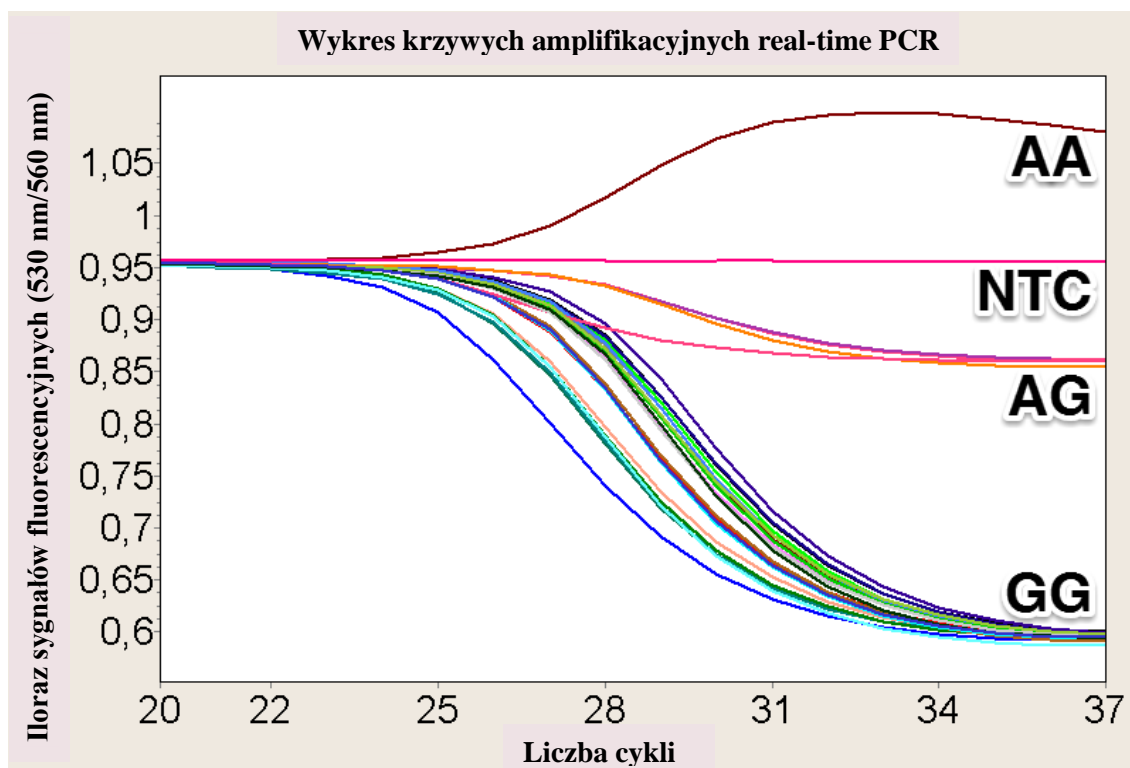
TAO – orbitopatia tarczycowa

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

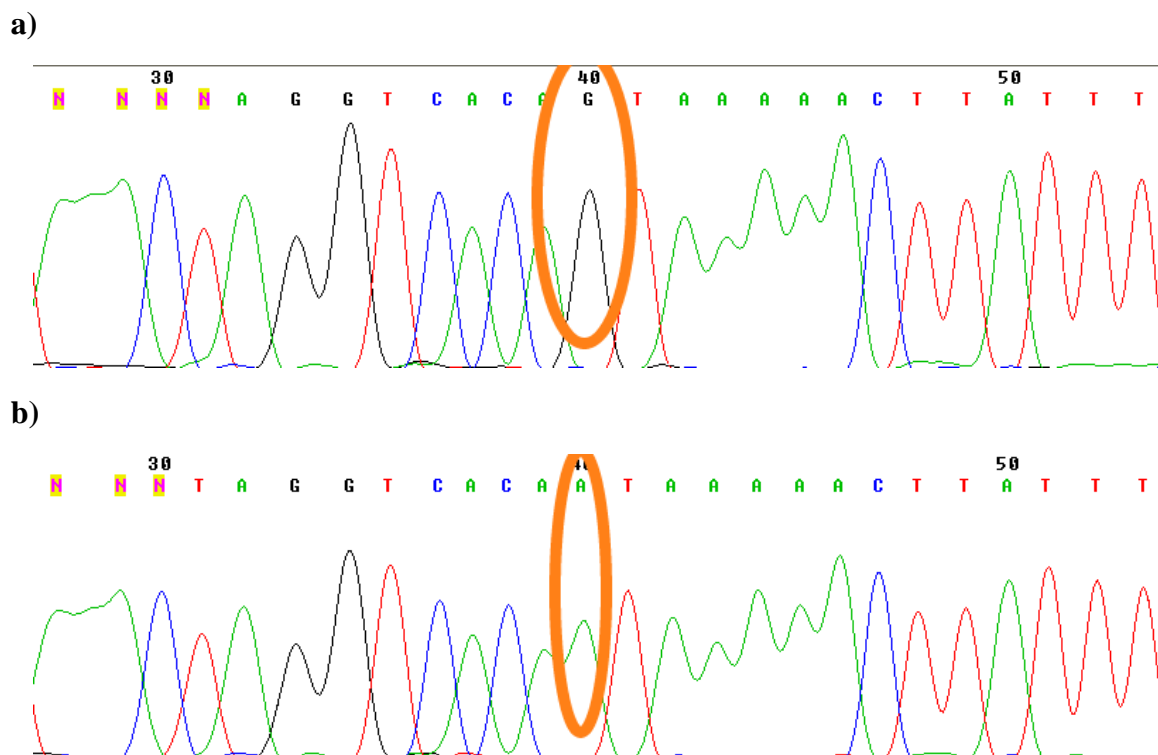
## 6.5. Polimorfizm rs11568820 (*Cdx2*)

Genotypowanie polimorfizmu *Cdx2 VDR* przeprowadzono metodą real-time PCR z wykorzystaniem zmodyfikowanych sond molekularnych TaqMan<sup>®</sup> (jak opisano w rozdziale Metody). Przykłady uzyskiwanych wyników przedstawia rycina 13. W celu weryfikacji poprawności oznaczeń wybrane próbki poddano ponadto sekwencjonowaniu (rycina 14). Miarodajne wyniki uzyskano w przypadku 391 spośród 397 badanych próbek (98,49%): 119/121 (98,35%) w przypadku grupy kontrolnej, 166/168 (98,81%) w grupie AIT oraz 106/108 (98,15%) w grupie TAO. Liczba przebadanych próbek dla polimorfizmu *Cdx2* była mniejsza w stosunku do tej dla pozostałych polimorfizmów ze względu na ograniczenia użytego zestawu odczynników.



**Rycina 13.** Wykres krzywych amplifikacyjnych uzyskanych w reakcji real-time PCR – SNP Cdx2 genu *VDR*

Na osi x przedstawiono liczbę cykli reakcji, a na osi y wartości ilorazu sygnałów fluorescencyjnych 530 nm/560 nm. NTC – kontrola negatywna; AA, AG, GG – warianty genotypów



**Rycina 14.** Sekwencjonowanie fragmentu genu *VDR* zawierającego polimorfizm *Cdx2*:

- allel G w pozycji SNP *Cdx2 VDR* na nici sensownej, odpowiadający allelowi C na nici antysensownej;
- allel A w pozycji SNP *Cdx2 VDR* na nici sensownej, odpowiadający allelowi T na nici antysensownej

### 6.5.1. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu *Cdx2* w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie AITD, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP *Cdx2* był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 1,36$ ;  $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 0,01$ ;  $p > 0,05$ ).

Wśród chorych na AITD obserwowano mniejszą częstość homozygoty GG oraz allelu G (odpowiednio 72,43% i 84,56%) w porównaniu do grupy kontrolnej (76,47% i 87,39%). Homozygota AA, która w całej badanej grupie obserwowana była z niewielką częstością, u chorych na AITD stanowiła 3,31% w porównaniu do 1,68% u zdrowych



ochotników. Również heterozygota była częstsza w grupie AITD w stosunku do kontroli (24,26% vs. 21,85%). Wykonane testy statystyczne nie wykazały jednak znamienności statystycznej obserwowanych różnic. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 20.

**Tabela 20.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu Cdx2 genu VDR w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AITD n = 272 (%)	Grupa kontrolna n = 119 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
AA	9 (3,31)	2 (1,68)	AA vs. AG + GG AA + AG vs. GG AA vs. GG	1,17 (1,01*)	0,56 (0,31*)	2,00 1,24 2,08	0,43-9,41 0,75-2,04 0,44-9,82
AG	66 (24,26)	26 (21,85)		0,70	0,52**		
GG	197 (72,43)	91 (76,47)		0,51**	0,40		
<b>Częstość alleli</b>							
A	84 (15,44)	30 (12,61)	A vs. G	1,07	0,30	1,27	0,81-1,98
G	460 (84,56)	208 (87,39)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; \*\* test dokładny Fishera; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.5.2. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu Cdx2 w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rozkład genotypów SNP Cdx2 był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (odpowiednio  $\chi^2 = 1,15$   $p > 0,05$  oraz  $\chi^2 = 0,01$ ;  $p > 0,05$ ).

Heterozygota AG z większą częstością występowała w grupie AIT niż w grupie kontrolnej (27,71% vs. 21,85%). Homozygoty – GG oraz AA nieco częstsze były natomiast u zdrowych ochotników (odpowiednio 76,47% i 1,68%) niż u chorych (71,08% i 1,20%). Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy dwoma grupami. W analizie alleli zauważalna jest większa częstość allelu A w grupie AIT w stosunku do kontroli (15,06% vs. 12,61%), ponownie jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 21.

**Tabela 21.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu Cdx2 genu VDR w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	AIT n = 166 (%)	Grupa kontrolna n = 119 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
AA	2 (1,20)	2 (1,68)	AA vs. AG + GG	(0,73*)	0,54**(0,39*)	0,71	0,10-5,14
AG	46 (27,71)	26 (21,85)					
GG	118 (71,08)	91 (76,47)	AA + AG vs. GG	1,03	0,31	1,32	0,77-2,27
			AA vs. GG		>0,99***	0,77	0,11-5,58
<b>Częstość alleli</b>							
A	50 (15,06)	30 (12,61)	A vs. G	0,69	0,41	1,23	0,76-2,00
G	282 (84,94)	208 (87,39)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; \*\* test Fishera-Freemana-Haltona; \*\*\* test dokładny Fishera; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

### 6.5.3. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu Cdx2 w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

W grupie TAO rozkład genotypów SNP Cdx2 nie był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga ( $\chi^2 = 9,50$ ;  $p < 0,05$ ), zgodność z HWE była zachowana w grupie kontrolnej ( $\chi^2 = 0,01$ ;  $p > 0,05$ ).

Analiza rozkładu genotypów pokazała, że w badanej grupie u pacjentów z TAO homozygotę GG oraz heterozygotę obserwowano rzadziej (odpowiednio 74,53% i 18,87%) niż w grupie kontrolnej (76,47% i 21,85%). Rzadki wariant – homozygota AA – był natomiast częstszy w grupie TAO w porównaniu do kontroli (6,60% vs. 1,68%). Analiza statystyczna z założeniem recesywnego modelu dziedziczenia alleli (AA vs. GA + GG) uwidoczniła tendencję w kierunku istotności statystycznej ( $p = 0,09$ ). W analizie alleli wariant A był częstszy w grupie TAO w porównaniu do kontroli (16,04% vs. 12,61%), ale różnica nie była istotna statystycznie. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 22.

**Tabela 22.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu Cdx2 genu *VDR* w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej

Genotyp/ allel	TAO n = 106 (%)	Grupa kontrolna n = 119 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
AA	7 (6,60)	2 (1,68)	AA vs. AG + GG	(0,93*)	0,17**(0,33*)	4,14	0,84-20,37
AG	20 (18,87)	26 (21,85)		0,11			
GG	79 (74,53)	91 (76,47)	AA + AG vs. GG		0,74	1,11	0,60-2,04
			AA vs. GG		0,09***	4,03	0,81-19,97
<b>Częstość alleli</b>							
A	34 (16,04)	30 (12,61)	A vs. G	1,08	0,30	1,32	0,78-2,25
G	178 (83,96)	208 (87,39)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; \*\* test Fishera-Freemana-Haltona; \*\*\* test dokładny Fishera; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

TAO – orbitopatia tarczycowa

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

#### 6.5.4. Porównanie częstości genotypów i alleli polimorfizmu Cdx2 pomiędzy grupą AIT a TAO

Porównano również rozkład genotypów i alleli SNP Cdx2 *VDR* pomiędzy dwoma chorobami zaliczanymi do AITD – AIT i TAO. Stwierdzono, że rozkład genotypów istotnie różnił się pomiędzy dwoma badanymi grupami ( $p = 0,02$ ). Heterozygota AG częstsza była wśród chorych na AIT w porównaniu do TAO (27,71% vs. 18,87%), podczas gdy oba warianty homozygotyczne – GG i AA – częściej obserwowano wśród pacjentów z TAO (odpowiednio 74,53% i 6,60%) niż w grupie AIT (71,08% i 1,20%). Częstości alleli nie różniły się wyraźnie pomiędzy dwoma grupami. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 23.

**Tabela 23.** Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu Cdx2 genu *VDR* w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO

Genotyp/ allel	AIT n = 166 (%)	TAO n = 106 (%)	Statystyka				
			Model	$\chi^2$	p	OR	95% CI
<b>Częstość genotypów</b>							
AA	2 (1,20)	7 (6,60)	AA vs. AG + GG AA + AG vs. GG AA vs. GG	7,89 (0,09*)	0,02 (0,77*)	5,80 0,84 5,23	1,25-27,90 0,49-1,44 1,11-25,24
AG	46 (27,71)	20 (18,87)		0,38	0,03 0,54		
GG	118 (71,08)	79 (74,53)		0,04			
<b>Częstość alleli</b>							
A	50 (15,06)	34 (16,04)	A vs. G	0,09	0,76	1,08	0,68-1,70
G	282 (84,94)	178 (83,96)					

\* test  $\chi^2$  dla trendu; \*\* test dokładny Fishera; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

TAO – orbitopatia tarczycowa

OR – iloraz szans

95% CI – 95% przedział ufności

Wartości  $p < 0,05$  zaznaczono kolorem czerwonym

## 6.6. Zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami *VDR* a obrazem klinicznym AITD

### 6.6.1. Polimorfizmy *VDR* a wybrane parametry ultrasonograficzne u chorych na AIT

W przypadku podgrupy pacjentów z AIT, u których dostępne były szczegółowe oraz porównywalne informacje na temat obrazu ultrasonograficznego gruczołu tarczowego (98 chorych), przeprowadzono dodatkowe analizy. W pierwszej kolejności pacjenci zostali podzieleni na dwie podgrupy w zależności od obecności zmian ogniskowych w gruczole tarczowym: 1) AIT ze zmianami ogniskowymi – osoby z rozpoznaniem AIT, u których w badaniu USG tarczycy stwierdzono  $\geq 1$  litą zmianę ogniskową o średnicy  $\geq 5$  mm; 2) AIT bez zmian ogniskowych – osoby z rozpoznaniem AIT, u których w badaniu USG tarczycy nie stwierdzono litych zmian ogniskowych o średnicy  $\geq 5$  mm. Podstawowa charakterystyka obu podgrup została przedstawiona w tabeli 24. Nie różniły się one istotnie pod względem średniego wieku, wieku w momencie rozpoznania AIT, czasu jaki minął od rozpoznania AIT ani rozkładu płci. Osoby z podgrupy AIT bez zmian ogniskowych wymagały natomiast znacząco wyższych dawek L-tyroksyny do wyrównania czynności hormonalnej tarczycy

w stosunku do osób z podgrupy AIT ze zmianami ogniskowymi. Zauważalna była też tendencja do występowania większych objętości tarczycy u osób z podgrupy AIT ze zmianami ogniskowymi. Następnie porównywano częstości genotypów oraz alleli badanych polimorfizmów genu *VDR* pomiędzy podgrupami AIT ze zmianami ogniskowymi oraz AIT bez zmian ogniskowych. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic pomiędzy tymi dwoma podgrupami dla żadnego z badanych polimorfizmów. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 25.

**Tabela 24.** Charakterystyka podgrup AIT ze zmianami ogniskowymi oraz AIT bez zmian ogniskowych

	<b>AIT ze zmianami ogniskowymi</b> n = 55	<b>AIT bez zmian ogniskowych</b> n = 43	<b>p</b>
<b>Wiek [l]</b>	46,35 (SD 12,39)	47,23 (SD 15,43)	0,75*
<b>Płeć [K/M]</b>	53/2	40/3	0,65**
<b>Wiek w momencie rozpoznania AIT [l]</b>	43,30 (SD 13,16)	43,31 (SD 16,89)	>0,99*
<b>Czas od rozpoznania AIT [l]</b>	3 (0-16)	2,5 (0-25)	0,89***
<b>Objętość tarczycy [ml]</b>	11,16 (0,4-44,99)	7,66 (1,49-25,05)	0,06***
<b>Dawka L-tyroksyny [µg]</b>	75 (25-175)	100 (25-175)	<0,01***

\* test t-Studenta; \*\* test dokładny Fishera; \*\*\* test Manna-Whitneya

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

Wartości  $p < 0,05$  zaznaczono kolorem czerwonym

Wyniki zaprezentowano jako średnia i odchylenie standardowe (SD), mediana (minimum-maksimum) lub liczności

**Tabela 25.** Częstości genotypów oraz alleli wybranych polimorfizmów genu *VDR* w grupie AIT ze zmianami ogniskowymi w porównaniu do AIT bez zmian ogniskowych

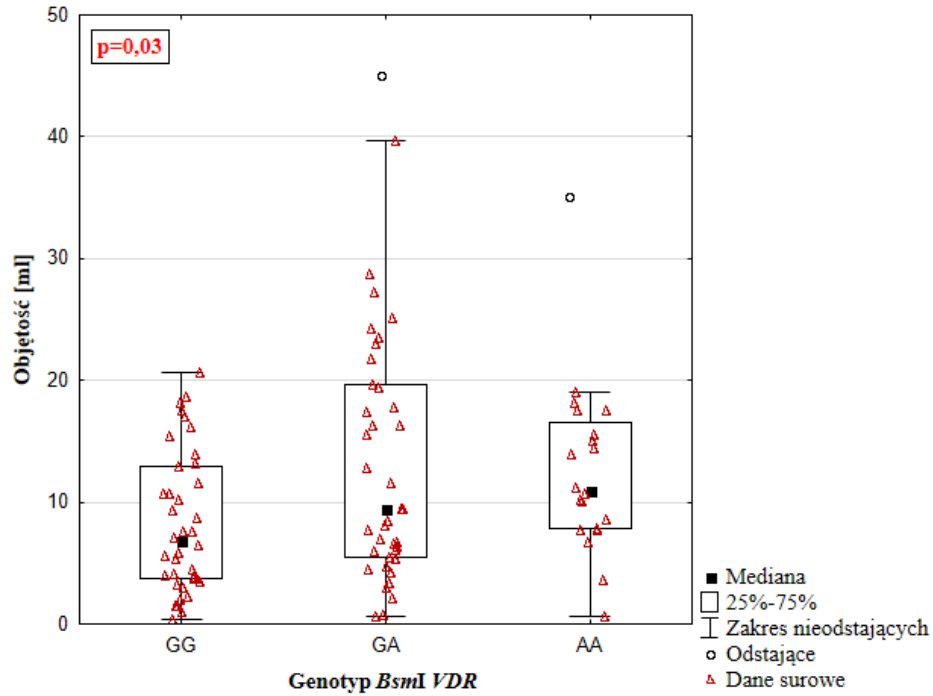
	<b>AIT ze zmianami ogniskowymi</b> n = 55 (%)	<b>AIT bez zmian ogniskowych</b> n = 43 (%)	<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>
<b><i>FokI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
CC (FF)	15 (27,27)	12 (27,91)	0,96 (0,93*)	
CT (Ff)	27 (49,09)	20 (46,51)		
TT (ff)	13 (23,64)	11 (25,58)		
<b>Allel</b>				
C (F)	57 (51,82)	44 (51,16)	0,93	1,03 (0,58-1,81)
T (f)	53 (48,18)	42 (48,84)		
<b><i>BsmI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
GG (bb)	20 (37,04)	18 (41,86)	0,62 (>0,99*)	
GA (bB)	24 (44,44)	15 (34,88)		
AA (BB)	10 (18,52)	10 (23,26)		
<b>Allel</b>				
G (b)	64 (59,26)	51 (59,30)	>0,99	1,00 (0,57-1,75)
A (B)	44 (40,74)	35 (40,70)		
<b><i>ApaI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
CC (aa)	9 (19,15)	9 (23,68)	0,64 (0,37*)	
CA (aA)	24 (51,06)	21 (55,26)		
AA (AA)	14 (29,79)	8 (21,05)		
<b>Allel</b>				
C (a)	42 (44,68)	39 (51,32)	0,39	0,77 (0,42-1,41)
A (A)	52 (55,32)	37 (48,68)		
<b><i>TaqI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
TT (TT)	15 (31,91)	15 (39,47)	0,76 (0,48*)	
TC (Tt)	23 (48,94)	17 (44,74)		
CC (tt)	9 (19,15)	6 (15,79)		
<b>Allel</b>				
T (T)	53 (56,38)	47 (61,84)	0,47	0,80 (0,43-1,48)
C (t)	41 (43,62)	29 (38,16)		
<b><i>Cdx2</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
AA	1 (2,44)	1 (2,86)	>0,99*** (0,85*)	
AG	10 (24,39)	9 (25,71)		
GG	30 (73,17)	25 (71,43)		
<b>Allel</b>				
A	12 (14,63)	11 (15,71)	>0,99***	0,92 (0,38-2,24)
G	70 (85,37)	59 (84,29)		

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy; OR – iloraz szans; CI – przedział ufności

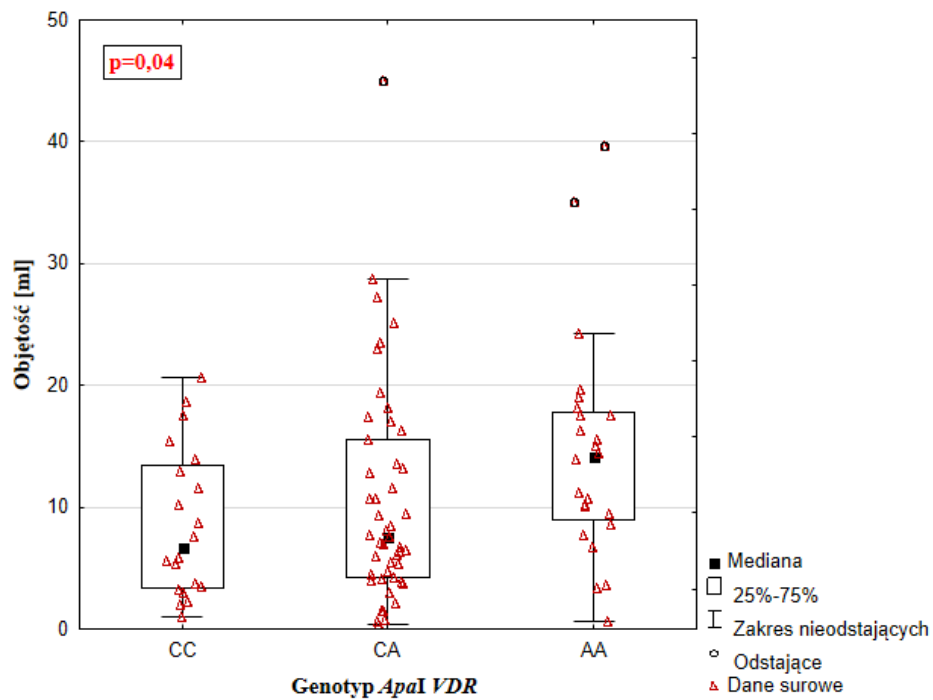
\* test  $\chi^2$  dla trendu; \*\* test Fishera-Freemana-Haltona; \*\*\* test dokładny Fishera; w pozostałych przypadkach wykorzystano test  $\chi^2$

Kolejną analizą przeprowadzoną w podgrupie AIT z pełnymi opisami USG tarczycy była ocena zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR* a objętością gruczołu tarczowego. Wykazano, że objętość tarczycy różniła się znacząco zależnie od genotypów polimorfizmów *BsmI* i *ApaI* (odpowiednio  $p = 0,03$  i  $p = 0,04$ ). Zależności objętość tarczycy – genotyp nie stwierdzono natomiast w przypadku pozostałych badanych polimorfizmów *VDR*: *FokI*, *TaqI* i *Cdx2* (wartość  $p$  wynosiła odpowiednio 0,29; 0,12 oraz 0,54). Zależności pomiędzy genotypami poszczególnych SNP a objętością tarczycy przedstawiają ryciny 15-19.

W przypadku polimorfizmów *ApaI* i *BsmI* w celu dalszej analizy obserwowanych zależności genotyp – objętość tarczycy wykonywano test *post hoc* (test Dunna). Pozwoliło to na stwierdzenie, że dla polimorfizmu *BsmI* różnice GG vs. AA i GG vs. GA były na granicy istotności statystycznej (w obu przypadkach  $p = 0,07$ ). Mediana objętości tarczycy w przypadku poszczególnych genotypów wynosiła odpowiednio: homozygota AA – 10,96 (0,59-35,05) ml, heterozygota GA – 9,47 (0,64-44,99) ml, homozygota GG – 6,80 (0,40-20,69) ml. W przypadku SNP *ApaI* różnica w objętości tarczycy bliska znaczącej statystycznie występowała pomiędzy homozygotami AA i CC ( $p = 0,06$ ). U posiadaczy genotypu AA mediana objętości gruczołu tarczowego wynosiła 14,16 (0,59-39,73) ml w porównaniu do 6,70 (0,95-20,69) ml u homozygot CC. Heterozygoty CA charakteryzowały się pośrednią wielkością tarczycy, z medianą objętości gruczołu równą 7,61 (0,40-44,99) ml. Ponieważ objętość tarczycy może różnić się w zależności od wieku, płci, długości trwania choroby itd., podgrupy utworzone na podstawie genotypów SNP *BsmI* i *ApaI* porównano pod względem wieku, czasu od rozpoznania choroby, rozkładu płci oraz przyjmowanych dawek L-tyroksyny. Podgrupy te nie różniły się znacząco pod względem analizowanych parametrów (tabele 26 i 27).

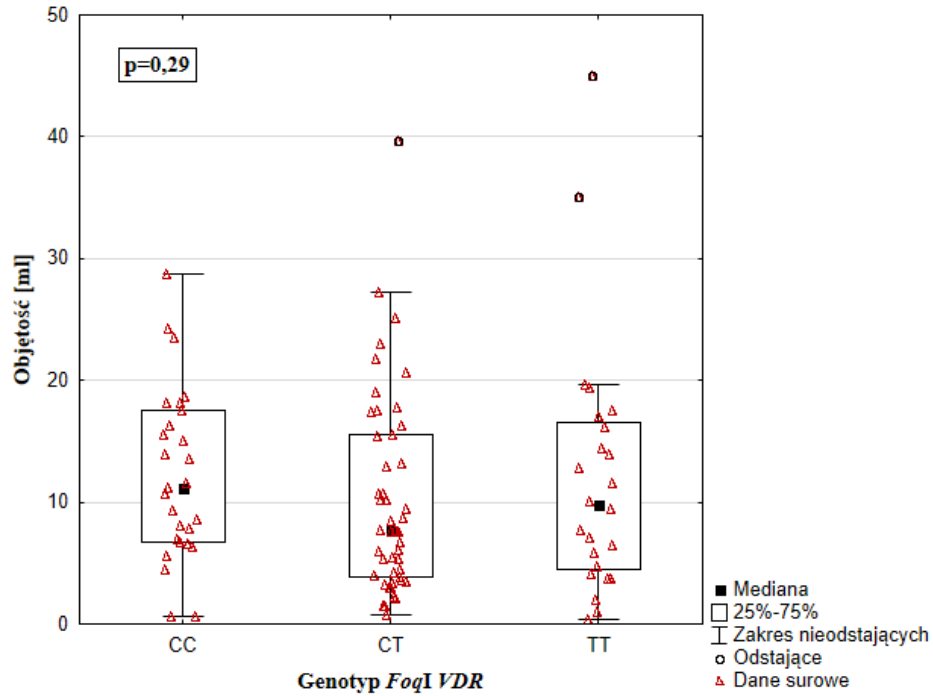


**Rycina 15.** Zależność pomiędzy genotypami SNP *BsmI* genu *VDR* a objętością tarczycy u chorych na AIT

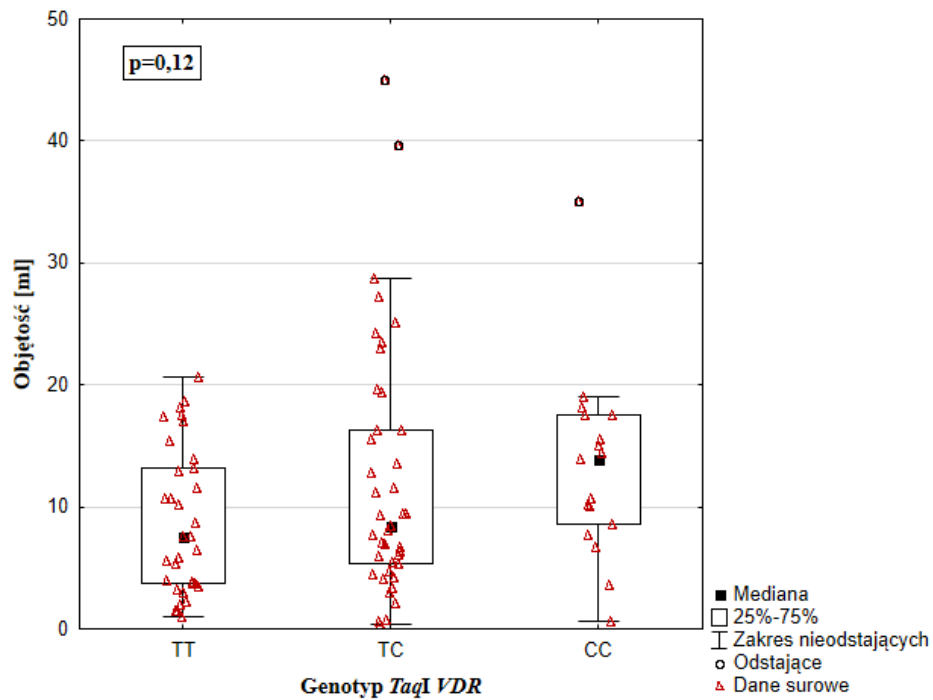


**Rycina 16.** Zależność pomiędzy genotypami SNP *ApaI* genu *VDR* a objętością tarczycy u chorych na AIT

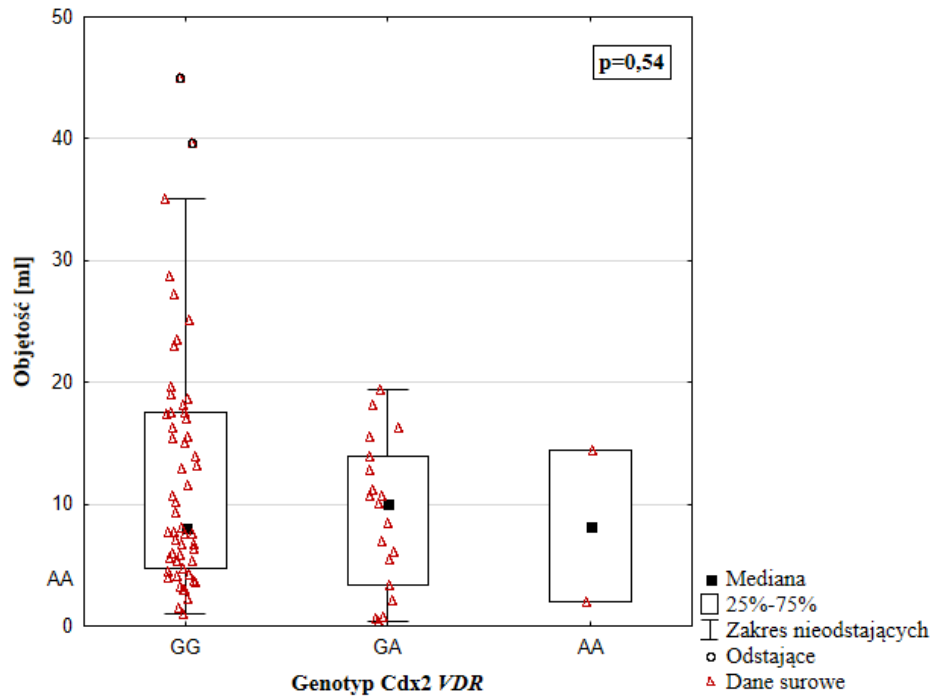




**Rycina 17.** Zależność pomiędzy genotypami SNP *FokI* genu *VDR* a objętością tarczycy u chorych na AIT



**Rycina 18.** Zależność pomiędzy genotypami SNP *TaqI* genu *VDR* a objętością tarczycy u chorych na AIT



**Rycina 19.** Zależność pomiędzy genotypami SNP Cdx2 genu *VDR* a objętością tarczycy u chorych na AIT

**Tabela 26.** Porównanie podgrup pacjentów z AIT utworzonych według genotypów SNP *BsmI VDR*

Genotyp <i>BsmI</i> Cecha	GG	GA	AA	p
Wiek [l]	48,47 (SD 13,15)	47,00 (SD 14,87)	42,85 (SD 12,77)	0,34*
Objętość [ml]	6,80 (0,40-20,69)	9,47 (0,64-44,99)	10,96 (0,59-35,05)	0,03**
Czas od rozpoznania [l]	3,0 (0-25)	2,0 (0-14)	2,5 (0-16)	0,35**
Płeć [K/M]	37/1	37/2	18/2	0,43***

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

Dane przedstawiono jako średnia i odchylenie standardowe (SD), mediana (minimum-maksimum) lub liczności

\* test ANOVA; \*\* test Kruskala-Wallisa; \*\*\* test Fishera-Freemana-Haltona

Wartości  $p < 0,05$  zaznaczono kolorem czerwonym

**Tabela 27.** Porównanie podgrup pacjentów z AIT utworzonych według genotypów SNP *ApaI VDR*

Genotyp <i>ApaI</i> Cecha	CC	CA	AA	p
Wiek [l]	50,85 (SD 14,15)	46,64 (SD 13,91)	45,58 (SD 14,07)	0,42*
Objętość [ml]	6,70 (0,95-20,69)	7,61 (0,40-44,99)	14,16 (0,59-39,73)	0,04**
Czas od rozpoznania [l]	3,0 (0-14)	2,0 (0-25)	3,0 (0-16)	0,84**
Płeć [K/M]	19/1	46/1	21/3	0,17***

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

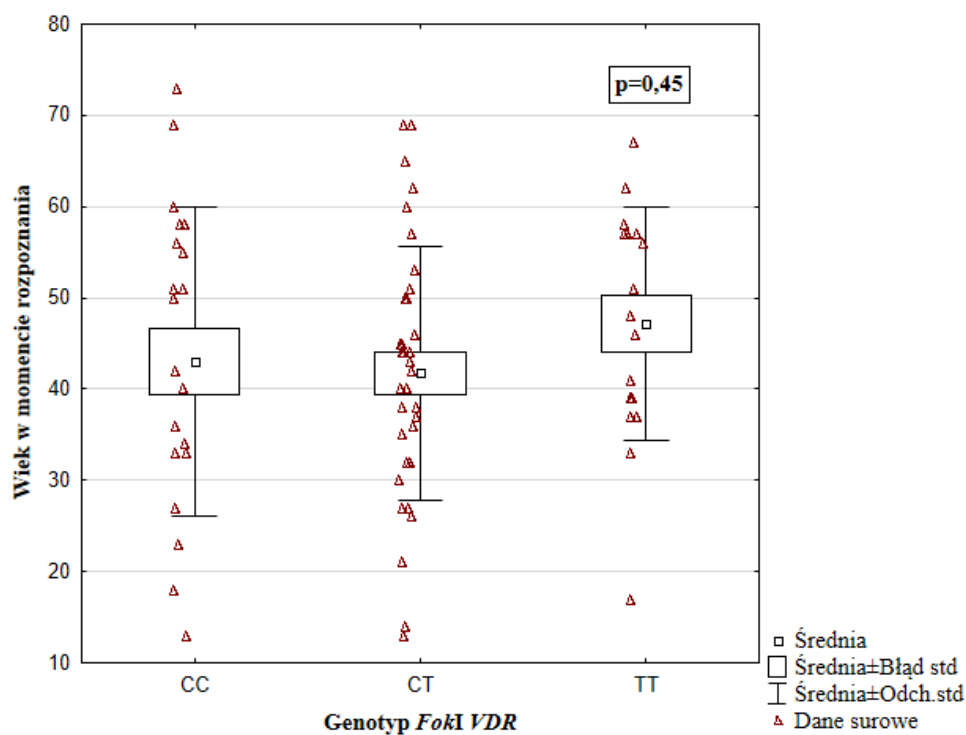
Dane przedstawiono jako średnia i odchylenie standardowe (SD), mediana (minimum-maksimum) lub liczności

\* test ANOVA; \*\* test Kruskala-Wallisa; \*\*\* test Fishera-Freemana-Haltona

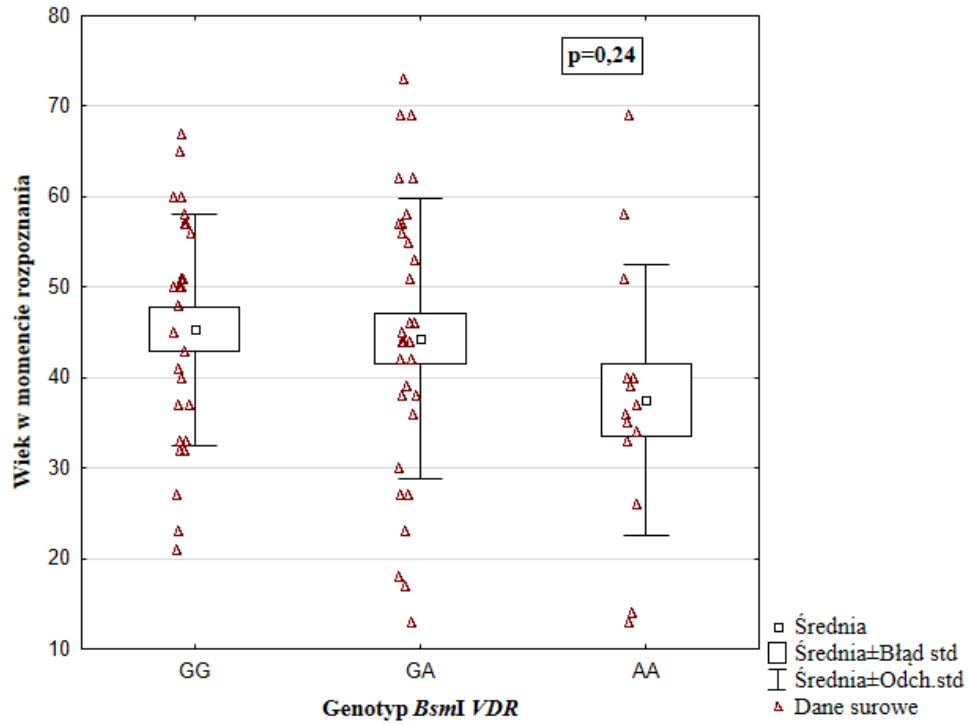
Wartości  $p < 0,05$  zaznaczono kolorem czerwonym

### 6.6.2. Polimorfizmy *VDR* a wybrane parametry kliniczne u chorych na AIT

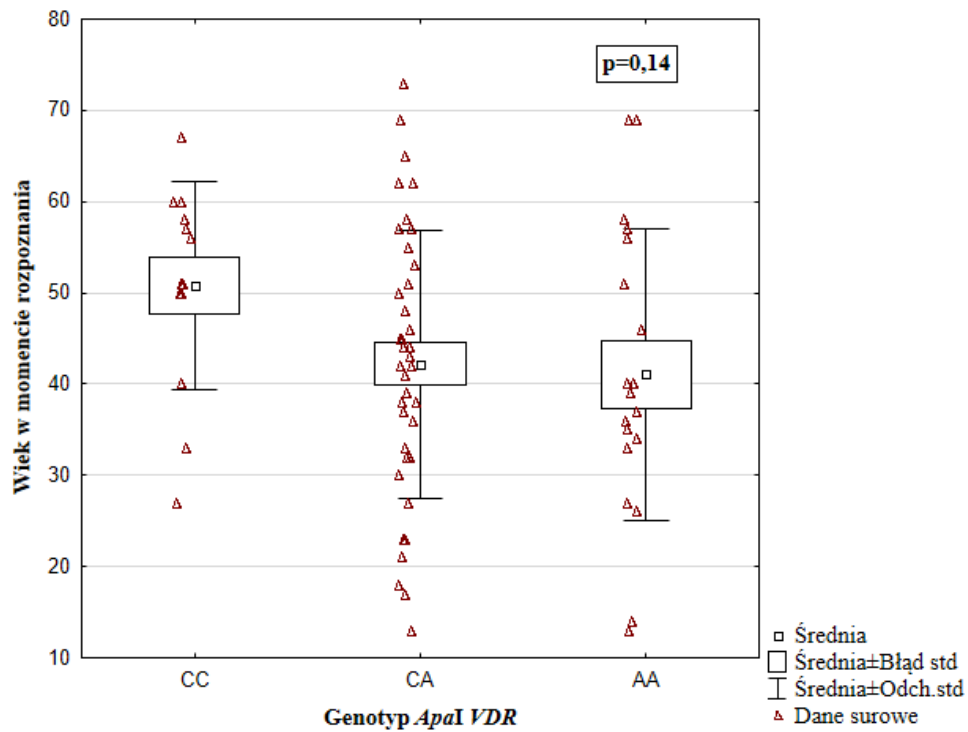
Poddano analizie zależność pomiędzy genotypami badanych polimorfizmów *VDR* a wiekiem w momencie rozpoznania AIT. Nie stwierdzono jednak, by którykolwiek z badanych SNP wykazywał istotny związek z wiekiem pacjentów w momencie ujawnienia się choroby. Największe różnice pomiędzy poszczególnymi genotypami obserwowano dla polimorfizmów *ApaI* oraz *TaqI VDR*, mimo to w badanej grupie różnice te nie były znamienne statystycznie (odpowiednio  $p = 0,14$  i  $p = 0,21$ ). Najmniejsze różnice pod względem średniego wieku w momencie rozpoznania AIT obserwowano pomiędzy genotypami SNP *Cdx2* genu *VDR* ( $p = 0,98$ ). Ryciny 20-24 przedstawiają wykresy zależności pomiędzy genotypami poszczególnych polimorfizmów *VDR* a wiekiem w momencie rozpoznania AIT.



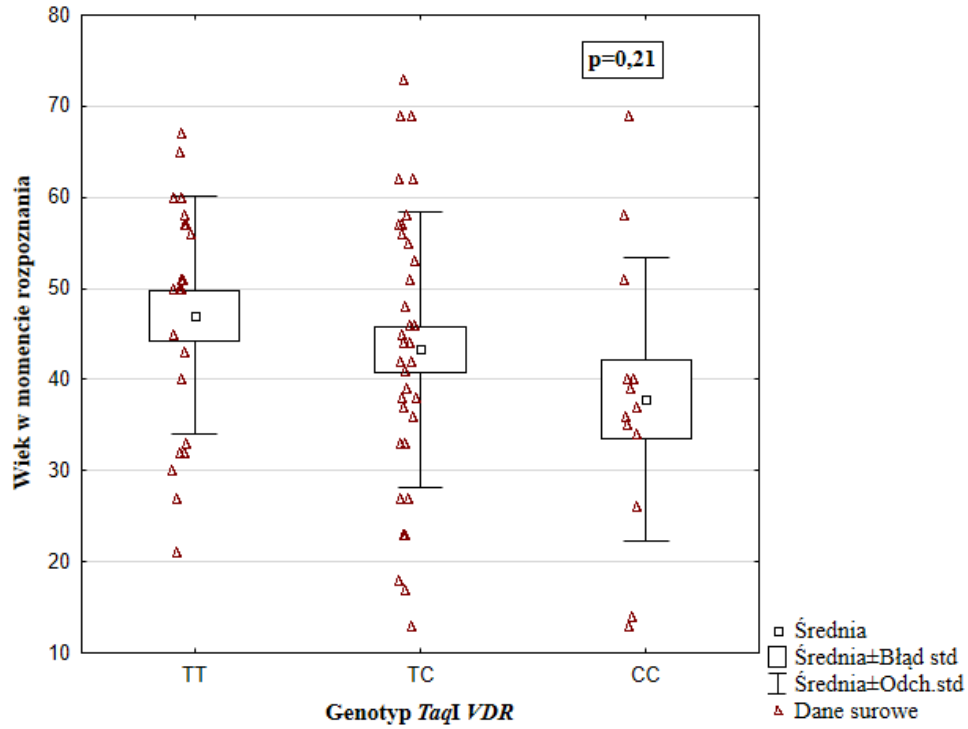
**Rycina 20.** Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP *FokI VDR*



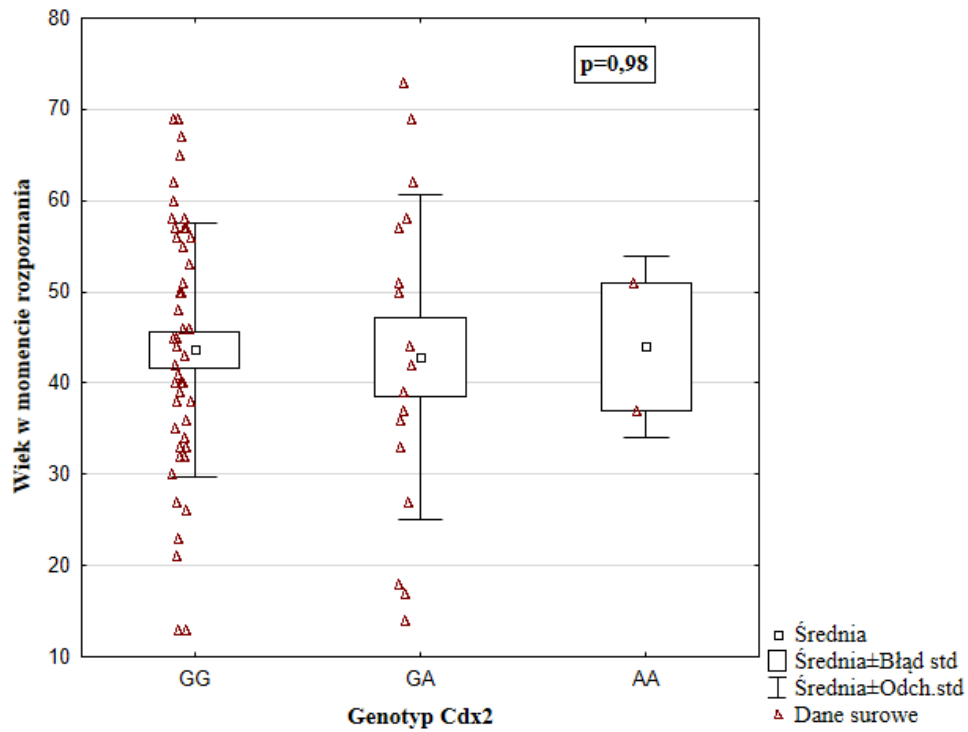
**Rycina 21.** Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP *BsmI VDR*



**Rycina 22.** Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP *ApaI VDR*



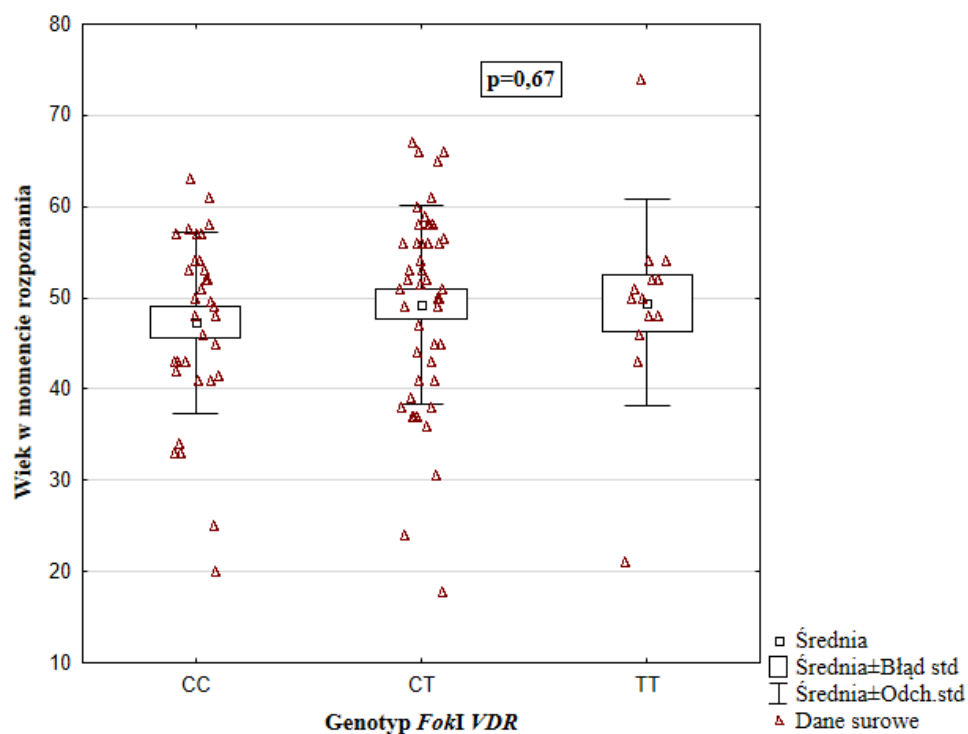
Rycina 23. Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP *TaqI VDR*



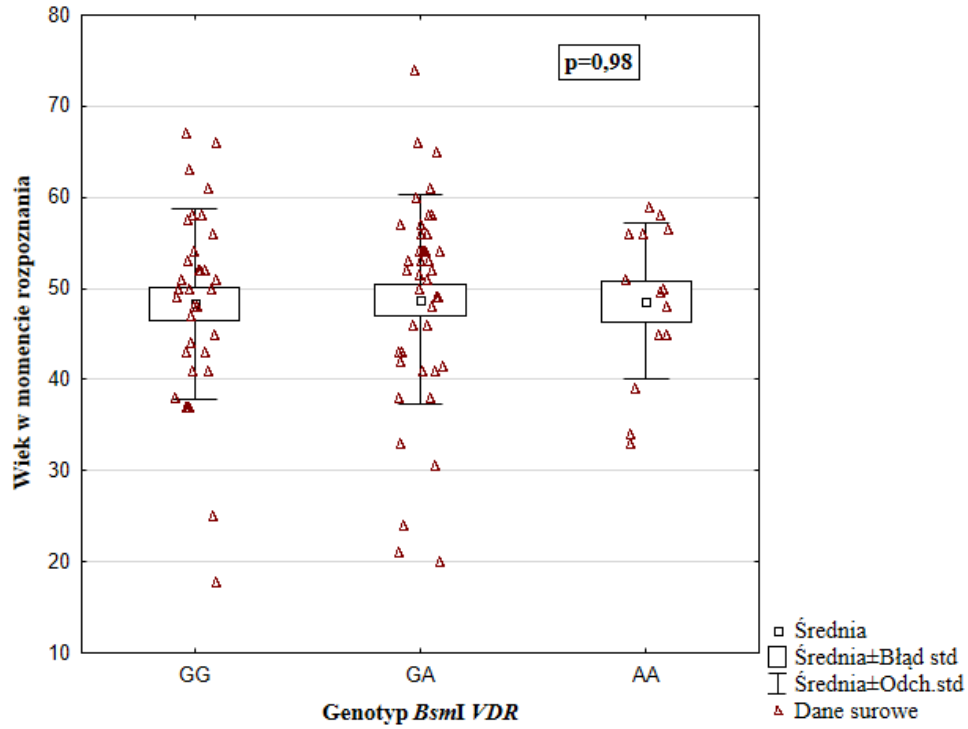
Rycina 24. Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP *Cdx2 VDR*

### 6.6.3. Polimorfizmy *VDR* a wybrane parametry kliniczne u chorych na TAO

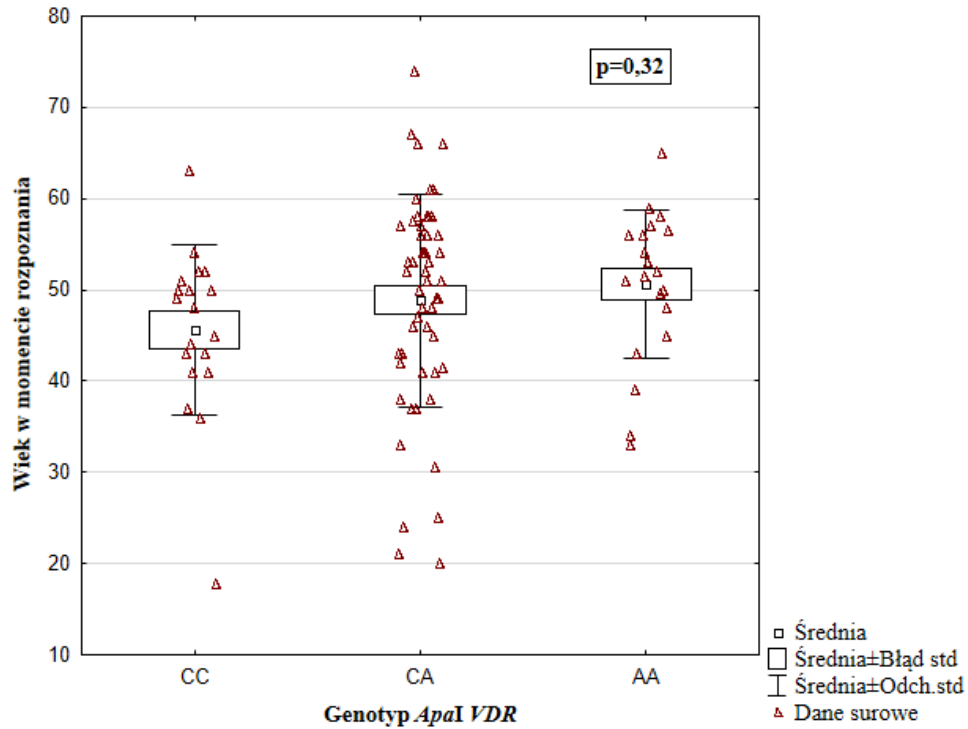
Poddano analizie zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami *VDR* a wiekiem w momencie rozpoznania GD. Wyniki nie potwierdziły jednak, by którykolwiek z badanych SNP wykazywał istotny związek z wiekiem pacjentów w momencie ujawnienia się choroby. Szczegółowe wyniki przedstawiono na rycinach 25-29.



**Rycina 25.** Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP *FokI VDR*

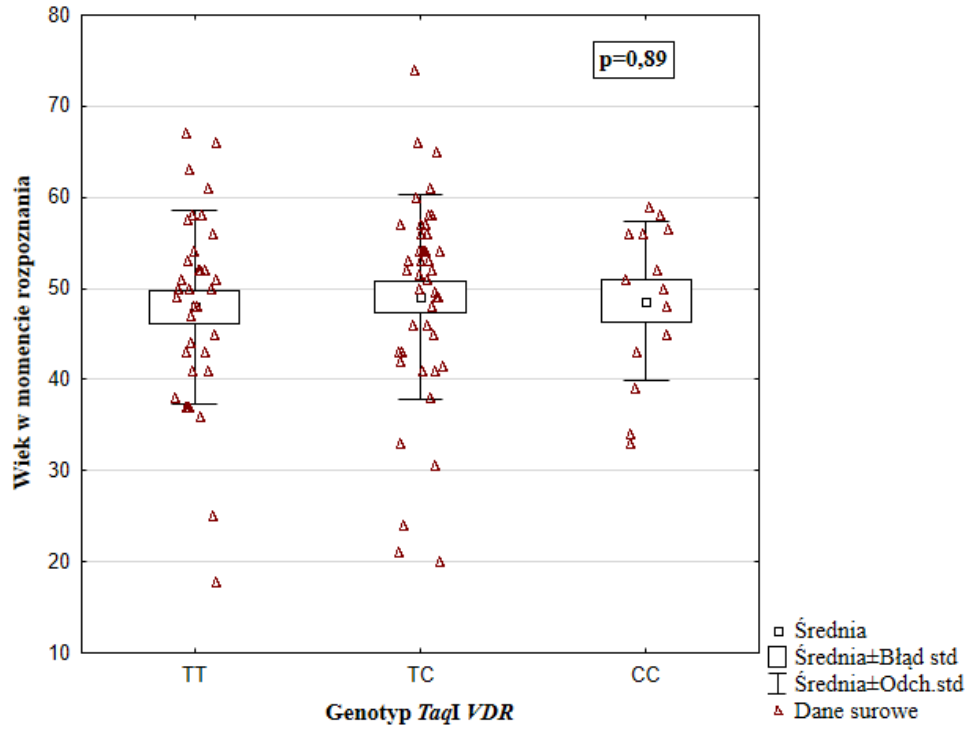


Rycina 26. Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP *BsmI VDR*

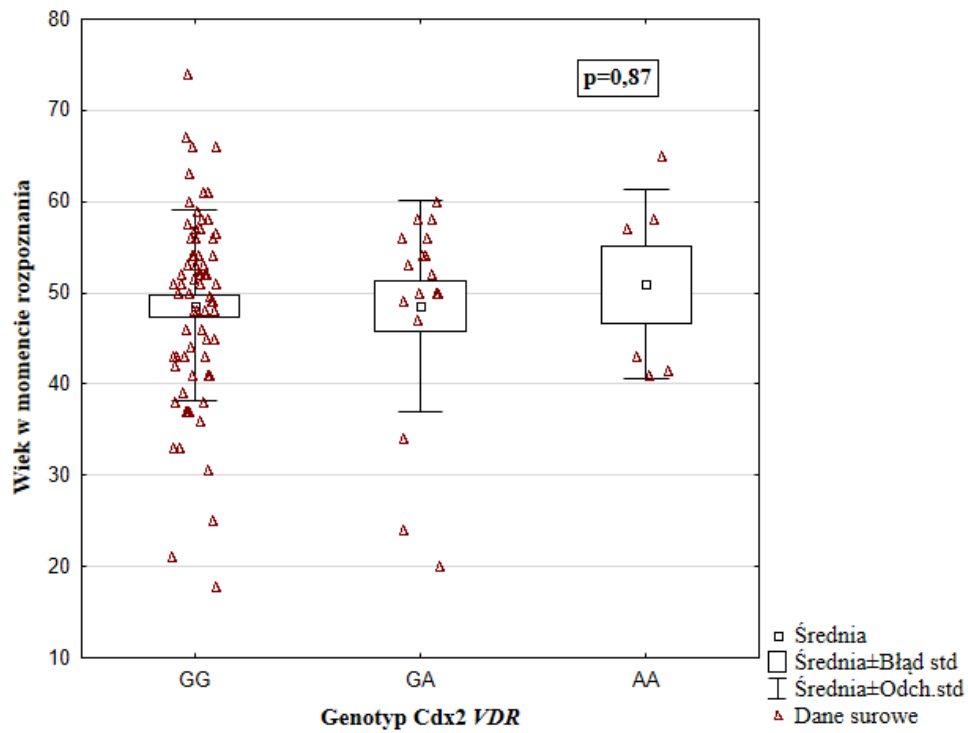


Rycina 27. Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP *ApaI VDR*





Rycina 28. Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP *TaqI VDR*



Rycina 29. Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP *Cdx2 VDR*

Pacjentów z TAO podzielono następnie na dwie podgrupy: TAO A – osoby z TAO rozpoznany jednocześnie ze stwierdzeniem GD lub w ciągu roku od postawienia diagnozy GD – oraz TAO B – pacjenci, u których TAO rozpoznano po ponad roku od zdiagnozowania GD. Analizowano rozkłady genotypów i alleli pięciu badanych polimorfizmów *VDR* w obu podgrupach. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic pomiędzy grupą TAO A a TAO B dla żadnego z analizowanych SNP. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 28.

**Tabela 28.** Częstości genotypów oraz alleli badanych polimorfizmów genu *VDR* w grupie TAO A w porównaniu do grupy TAO B

	<b>TAO A</b> ( n =63) (%)	<b>TAO B</b> ( n =30) (%)	<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>
<b><i>FokI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
CC (FF)	25 (40,32)	9 (30,00)	0,33 (0,16*)	
CT (Ff)	31 (50,00)	15 (50,00)		
TT (ff)	6 (9,68)	6 (20,00)		
<b>Allel</b>				
C (F)	81 (65,32)	33 (55,00)	0,18	1,54 (0,82-2,86)
T (f)	43 (34,68)	27 (45,00)		
<b><i>BsmI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
GG (bb)	22 (36,07)	12 (44,44)	0,69 (0,39*)	
GA (bB)	29 (47,54)	12 (44,44)		
AA (BB)	10 (16,39)	3 (11,11)		
<b>Allel</b>				
G (b)	73 (59,84)	36 (66,67)	0,39	0,74 (0,37-1,47)
A (B)	49 (40,16)	18 (33,33)		
<b><i>ApaI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
CC (aa)	12 (19,35)	7 (23,33)	0,61 (0,37*)	
CA (aA)	34 (54,84)	18 (60,00)		
AA (AA)	16 (25,81)	5 (16,67)		
<b>Allel</b>				
C (a)	58 (46,77)	32 (53,33)	0,40	0,77 (0,42-1,39)
A (A)	66 (53,23)	28 (46,67)		
<b><i>TaqI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
TT (TT)	22 (35,48)	13 (43,33)	0,77 (0,55*)	
TC (Tt)	31 (50,00)	13 (43,33)		
CC (tt)	9 (14,52)	4 (13,33)		
<b>Allel</b>				
T (T)	75 (60,48)	39 (65,00)	0,55	0,82 (0,44-1,54)
C (t)	49 (39,52)	21 (35,00)		
<b><i>Cdx2</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
GG	48 (76,19)	21 (70,00)	0,54** (0,38*)	
GA	12 (19,05)	6 (20,00)		
AA	3 (4,76)	3 (10,00)		
<b>Allel</b>				
G	108 (85,71)	48 (80,00)	0,39***	1,5 (0,67-3,36)
A	18 (14,29)	12 (20,00)		

\* test  $\chi^2$  dla trendu; \*\* test Fishera-Freemana-Haltona; \*\*\* test dokładny Fishera; w pozostałych przypadkach zastosowano test  $\chi^2$

Grupę TAO podzielono także w zależności od punktacji uzyskanej w skali aktywności klinicznej (ang. *Clinical Activity Score* – CAS) w momencie rozpoznania: pierwszą podgrupę stanowili chorzy z CAS w przedziale 3-4, podczas gdy w drugiej podgrupie znaleźli się pacjenci z CAS w przedziale 5-6. Tak utworzone podgrupy porównywano pod względem rozkładu genotypów i alleli badanych polimorfizmów *VDR*. W przypadku żadnego z badanych SNP nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy dwoma podgrupami. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 29.

**Tabela 29.** Częstości genotypów oraz alleli badanych polimorfizmów genu *VDR* w grupach według wartości CAS u pacjentów z TAO

	<b>TAO CAS 3-4</b> (n = 32) (%)	<b>TAO CAS 5-6</b> (n = 40) (%)	<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>
<b><i>FokI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
CC (FF)	13 (40,63)	12 (30,77)	0,67* (0,51**)	
CT (Ff)	15 (46,88)	22 (56,41)		
TT (ff)	4 (12,50)	5 (12,82)		
<b>Allel</b>				
C (F)	41 (64,06)	46 (58,97)	0,54	1,24 (0,64-2,45)
T (f)	23 (35,94)	32 (41,03)		
<b><i>BsmI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
GG (bb)	13 (40,63)	14 (38,89)	0,40* (0,60**)	
GA (bB)	13 (40,63)	19 (52,78)		
AA (BB)	6 (18,75)	3 (8,33)		
<b>Allel</b>				
G (b)	39 (60,94)	47 (65,28)	0,60	0,83 (0,41-1,67)
A (B)	25 (39,06)	25 (34,72)		
<b><i>ApaI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
CC (aa)	7 (21,88)	7 (17,95)	0,63 (0,84**)	
CA (aA)	17 (53,13)	25 (64,10)		
AA (AA)	8 (25,00)	7 (17,95)		
<b>Allel</b>				
C (a)	31 (48,44)	39 (50,00)	0,85	0,94 (0,49-1,86)
A (A)	33 (51,56)	39 (50,00)		
<b><i>TaqI</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
TT (TT)	13 (40,63)	15 (38,46)	0,56* (0,71**)	
TC (Tt)	14 (43,75)	21 (53,85)		
CC (tt)	5 (15,63)	3 (7,69)		
<b>Allel</b>				
T (T)	40 (62,50)	51 (65,38)	0,72	0,88 (0,45-1,75)
C (t)	24 (37,50)	27 (34,62)		
<b><i>Cdx2</i></b>				
<b>Genotyp</b>				
GG	27 (84,38)	30 (75,00)	0,49* (0,54**)	
GA	3 (9,38)	8 (20,00)		
AA	2 (6,25)	2 (5,00)		
<b>Allel</b>				
G	57 (89,06)	68 (85,00)	0,62***	1,44 (0,54-3,69)
A	7 (10,94)	12 (15,00)		

\* test Fishera-Freemana-Haltona; \*\* test  $\chi^2$  dla trendu; \*\*\* test dokładny Fishera; w pozostałych przypadkach zastosowano test  $\chi^2$

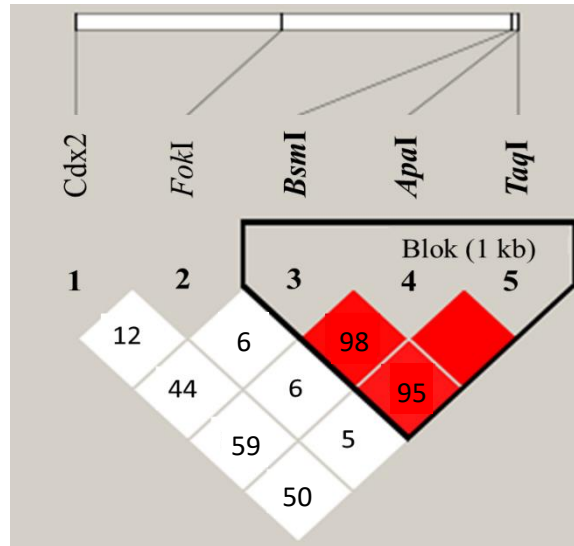
## 6.7. Ocena nierównowagi sprzężeń

LD pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR* była oceniana w grupie kontrolnej, przy użyciu programu Haploview (jak opisano w rozdziale Metody). Najsilniej sprzężone ze sobą były polimorfizmy końca 3' genu *VDR*: *TaqI* i *BsmI*, *TaqI* i *ApaI* oraz *ApaI* i *BsmI*. Najślabszą zależność obserwowano pomiędzy SNP *FokI* a polimorfizmami końca 3'. Szczegółowe wyniki zostały przedstawione w tabeli 30 oraz na rycinie 30.

**Tabela 30.** Nierównowaga sprzężeń pomiędzy wybranymi polimorfizmami genu *VDR*

<i>Locus 1</i>	<i>Locus 2</i>	<b>D' (CI)</b>	<b>LOD</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<i>TaqI</i>	<i>ApaI</i>	1,0 (0,94-1,0)	32,85	0,73
<i>TaqI</i>	<i>BsmI</i>	0,95 (0,89-0,98)	42,13	0,90
<i>TaqI</i>	<i>FokI</i>	0,05 (0,0-0,26)	0,05	0,00
<i>TaqI</i>	<i>Cdx2</i>	0,50 (0,18-0,73)	1,51	0,05
<i>ApaI</i>	<i>BsmI</i>	0,98 (0,9-1,0)	30,17	0,70
<i>ApaI</i>	<i>FokI</i>	0,06 (0,0-0,24)	0,08	0,00
<i>ApaI</i>	<i>Cdx2</i>	0,59 (0,21-0,8)	1,59	0,05
<i>BsmI</i>	<i>FokI</i>	0,06 (0,0-0,26)	0,06	0,00
<i>BsmI</i>	<i>Cdx2</i>	0,44 (0,14-0,68)	1,29	0,04
<i>FokI</i>	<i>Cdx2</i>	0,12 (0,01-0,52)	0,05	0,00

D' – wartość współczynnika D' dla dwóch *loci*  
 CI – przedział ufności  
 LOD – iloraz wiarygodności  
 r<sup>2</sup> – współczynnik korelacji między dwoma *loci*



**Rycina 30.** Nierównowaga sprzężeń pomiędzy wybranymi polimorfizmami genu *VDR* (*FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* i *Cdx2*)

Każdy z kwadratów reprezentuje wartość nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy parą polimorfizmów. Liczby wewnątrz kwadratów wskazują wartość  $100 \times D'$ , kwadrat bez liczby jest równoważny wartości  $100 \times D'$  wynoszącej 100. Silnie sprzężone polimorfizmy *BsmI*, *ApaI* oraz *TaqI* tworzą haploblok (Blok 1). Rycina powstała przy użyciu programu Haploview 4.2.

## 6.8. Analiza haplotypów

### 6.8.1. Porównanie częstości występowania haplotypów genu *VDR* pomiędzy pacjentami z autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy a grupą kontrolną

Porównywano częstości występowania poszczególnych haplotypów u osób z AITD w stosunku do grupy kontrolnej. Bloki haplotypowe utworzono z silnie sprzężonych polimorfizmów, wykorzystując metodę opisaną przez Gabriel i wsp. (według przedziałów ufności) (Gabriel SB, 2002). W ten sposób skonstruowano bloki składające się z dwóch polimorfizmów *VDR*: *ApaI* i *BsmI*. Analiza tak utworzonych haplotypów była możliwa u 90,30% pacjentów oraz 93,85% spośród zdrowych ochotników. Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej u blisko połowy spośród badanych osób stwierdzono haplotyp CG (w grupie AITD 49,6%, w grupie kontrolnej 50,3%). Częstość występowania tego haplotypu nie różniła się istotnie pomiędzy dwoma badanymi grupami ( $p = 0,85$ ). Na drugim miejscu pod względem częstości występowania, zarówno u chorych na AITD,

jak i wśród osób zdrowych, znajdował się haplotyp AA (odpowiednio 38,0% i 41,0%,  $p = 0,42$ ). Kolejne haplotypy okazały się zdecydowanie rzadsze. W przypadku wariantu AG zauważalna była nieco większa jego częstość u pacjentów z AITD w stosunku do grupy kontrolnej (11,5% vs. 8,2%). Różnica ta nie była jednak istotna statystycznie ( $p = 0,16$ ). Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 31. W przypadku zastosowania innej z metod określania bloków haplotypowych – według solid spine of LD – utworzone zostały haplotypy zawierające trzy sprzężone ze sobą polimorfizmy: *TaqI*, *ApaI* i *BsmI*. W obu badanych grupach najczęstszy był w tym wypadku haplotyp TCG (49,2% w AITD vs. 50,2% w grupie kontrolnej,  $p = 0,79$ ). W dalszej kolejności w obu grupach obserwowano wariant CAA (37,3% w AITD vs. 40,1% w grupie kontrolnej,  $p = 0,45$ ). Trzeci pod względem częstości występowania w obu grupach haplotyp – TAG – nieco częściej obserwowany był u pacjentów z AITD w porównaniu do grupy kontrolnej (10,5% vs. 7,1%,  $p = 0,13$ ). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach poszczególnych haplotypów pomiędzy dwoma analizowanymi grupami. Szczegółowe wyniki zaprezentowano w tabeli 32.

**Tabela 31.** Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z AITD w stosunku do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe według Gabriel i wsp.)

Haplotyp	AITD n = 298 (%)	Grupa kontrolna n = 122 (%)	$\chi^2$	p
<b>CG (ab)</b>	147,8 (49,6)	61,4 (50,3)	0,04	0,85
<b>AA (AB)</b>	113,2 (38,0)	50,0 (41,0)	0,65	0,42
<b>AG (Ab)</b>	34,3 (11,5)	10,0 (8,2)	1,99	0,16
<b>CA (aB)</b>	2,7 (0,9)	0,6 (0,5)	0,36	0,55

AITD – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy



**Tabela 32.** Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z AITD w stosunku do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe według solid spine of LD)

Haplotyp	AITD n = 298 (%)	Grupa kontrolna n = 122 (%)	$\chi^2$	p
<b>TCG (Tab)</b>	146,6 (49,2)	61,2 (50,2)	0,07	0,79
<b>CAA (tAB)</b>	111,2 (37,3)	48,9 (40,1)	0,56	0,45
<b>TAG (TAb)</b>	31,3 (10,5)	8,7 (7,1)	2,32	0,13
<b>CAG (tAb)</b>	2,9 (1,0)	0,3 (1,2)	0,06	0,80

AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy

Uwzględniono haplotypy o częstości  $\geq 1\%$

### 6.8.2. Porównanie częstości występowania haplotypów genu *VDR* pomiędzy pacjentami z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy a grupą kontrolną

Przeprowadzono także analizę haplotypów w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe utworzone zgodnie z metodą według Gabriel i wsp.). Bloki haplotypowe zawierały trzy sprzężone polimorfizmy końca 3': *TaqI*, *ApaI* i *BsmI*. Podobnie jak w przypadku analizy dla całej grupy AITD, także u chorych na AIT najczęściej obserwowano haplotypy TCG oraz CAA, które stanowiły odpowiednio 49,6% i 37,1%. Częstość haplotypów u pacjentów z AIT nie różniła się istotnie w porównaniu do grupy kontrolnej. Szczegółowe wyniki zaprezentowano w tabeli 33.

**Tabela 33.** Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z AIT w stosunku do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe według Gabriel i wsp.)

Haplotyp	AIT n = 192 (%)	Grupa kontrolna n = 122 (%)	$\chi^2$	p
<b>TCG (Tab)</b>	95,2 (49,6)	61,4 (50,3)	0,03	0,87
<b>CAA (tAB)</b>	71,2 (37,1)	48,9 (40,1)	0,54	0,46
<b>TAG (TAb)</b>	18,6 (9,7)	8,5 (7,0)	1,37	0,24
<b>CAG (tAb)</b>	3,1 (1,6)	1,6 (1,3)	0,11	0,74

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy

Uwzględniono haplotypy o częstości  $\geq 1\%$

### 6.8.3. Porównanie częstości występowania haplotypów genu *VDR* pomiędzy pacjentami z orbitopatią tarczycową a grupą kontrolną

Analizę haplotypów w grupie TAO wraz z porównaniem do grupy kontrolnej przeprowadzono analogicznie do tych przedstawionych powyżej (bloki haplotypowe utworzone zgodnie z metodą według Gabriel i wsp.). U chorych z TAO najczęściej obserwowanymi haplotypami, podobnie jak w grupie AIT, były TCG oraz CAA (odpowiednio 48,6% i 37,7%). Trzeci w kolejności, haplotyp TAG, był częstszy wśród pacjentów niż w grupie kontrolnej (11,7% vs. 7,1%). Zauważalna jest w tym przypadku tendencja w kierunku istotności statystycznej ( $p = 0,09$ ). Częstości pozostałych haplotypów nie różniły się istotnie pomiędzy dwiema grupami. Szczegółowe wyniki zaprezentowano w tabeli 34.

**Tabela 34.** Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z TAO w stosunku do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe według Gabriel i wsp.)

Haplotyp	TAO n = 106 (%)	Grupa kontrolna n = 122 (%)	$\chi^2$	p
<b>TCG (Tab)</b>	51,5 (48,6)	61,2 (50,2)	0,12	0,72
<b>CAA (tAB)</b>	40,0 (37,7)	48,9 (40,1)	0,29	0,59
<b>TAG (TAb)</b>	12,4 (11,7)	8,7 (7,1)	2,90	0,09
<b>TCA (TaB)</b>	1,1 (1,0)	0,6 (0,5)	0,33	0,57

TAO – orbitopatia tarczycowa

Uwzględniono haplotypy o częstości  $\geq 1\%$

### 6.8.4. Częstości występowania haplotypów genu *VDR* w grupie z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy w porównaniu do grupy z orbitopatią tarczycową

Porównane zostały ponadto częstości występowania poszczególnych haplotypów pomiędzy grupą AIT a TAO (bloki haplotypowe skonstruowano jak powyżej, według Gabriel i wsp.). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi dwoma podgrupami AITD. Haplotyp CAG był co prawda częstszy w grupie AIT w porównaniu do TAO (1,5% vs. 0,1%), w obu grupach dotyczył jednak niewielkiej części badanych, poza

tym różnica AIT vs. TAO wykazywała w tym przypadku jedynie tendencję w kierunku istotności statystycznej ( $p = 0,10$ ). Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 35.

**Tabela 35.** Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z AIT w stosunku do grupy TAO (bloki haplotypowe według Gabriel i wsp.)

<b>Haplotyp</b>	<b>AIT</b> n = 192 (%)	<b>TAO</b> n = 106 (%)	$\chi^2$	<b>p</b>
<b>TCG (Tab)</b>	95,0 (49,5)	51,4 (48,5)	0,05	0,82
<b>CAA (tAB)</b>	71,4 (37,2)	39,9 (37,6)	0,01	0,92
<b>TAG (Tab)</b>	18,8 (9,8)	12,5 (11,8)	0,54	0,46
<b>CAG (tAb)</b>	2,9 (1,5)	0,1 (0,1)	2,65	0,10
<b>TCA (TaB)</b>	0,6 (0,3)	1,1 (1,0)	1,04	0,31

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy; TAO – orbitopatia tarczycowa  
Uwzględniono haplotypy o częstości  $\geq 1\%$

## 7. Omówienie

Witamina D stała się przedmiotem zainteresowania wielu badaczy ze względu na jej postulowane znaczenie wykraczające poza regulację metabolizmu kostnego i gospodarki wapniowo-fosforanowej. Proponuje się, że działa między innymi jako czynnik immunomodulujący. W związku z tym może ona potencjalnie odgrywać istotną rolę w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych, zapalnych czy nowotworowych (Fang Y, 2005). Jednym z kierunków badań nad witaminą D jest ocena wpływu polimorfizmów genów z nią związanych na ryzyko rozwoju oraz przebieg kliniczny chorób. Głównym obiektem zainteresowania w zakresie czynników genetycznych jest gen receptora VDR, za pośrednictwem którego witamina działa. Charakterystykę dotychczasowych publikacji na temat znaczenia polimorfizmów *VDR* w etiopatogenezie AITD przedstawia tabela 36. Uzyskiwane wyniki nie są jednoznaczne, a formułowanie ostatecznych wniosków na ich podstawie obarczone jest ryzykiem. W badaniach polimorfizmów należy oczywiście brać pod uwagę to, że mogą pojawiać się różnice pomiędzy poszczególnymi publikacjami – częstości genotypów i alleli poszczególnych polimorfizmów mogą różnić się zależnie od przynależności etnicznej czy regionu zamieszkania (Tokita A, 1996; Uitterlinden AG, 2004). Także inne warunki środowiskowe czy tryb życia mogą modyfikować wpływ czynników genetycznych. Nie bez znaczenia są też różnice dotyczące kryteriów włączenia do grupy badanej i kontrolnej, jak i wyłączenia z badania. Co istotne, licznosci grup mogą być zbyt małe, aby wykazać istniejące, ale słabe zależności. W związku z powyższym dalsze badania, prowadzone na możliwie dużych grupach oraz w różnych populacjach, są potrzebne, aby ostatecznie określić znaczenie polimorfizmów *VDR* w etiopatogenezie AITD.

**Tabela 36.** Charakterystyka publikacji na temat znaczenia polimorfizmów genu *VDR* w etiopatogenezie AITD

Autor	Rok	Kraj	Grupa etniczna	Wielkość grupy (badani/kontrola)	Badane SNP	Stwierdzony związek z chorobą (+/-)
<b>AIT</b>						
Lin WY	2006	Chiny	azjatycka	109/90	<i>FokI</i>	+
Ban Y	2001	Japonia	azjatycka	130/150	<i>FokI</i>	+
					<i>BsmI</i>	-
Yazici D	2013	Turcja	kaukaska	111/159	<i>FokI</i>	+
					<i>Apal</i>	-
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	+
Djurovic J	2015	Serbia	kaukaska	44/32	<i>FokI</i>	+
					<i>Apal</i>	-
					<i>TaqI</i>	-
Inoue N	2014	Japonia	azjatycka	116/76	<i>FokI</i>	+
					<i>Apal</i>	-
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	-
Meng S	2015	Chiny	azjatycka	250/301	<i>FokI</i>	-
					<i>Apal</i>	-
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	-
Hong LH	2011	Chiny	azjatycka	84/85	<i>FokI</i>	-
Stefanić M	2008	Chowacja	kaukaska	145/145	<i>Apal</i>	-
					<i>BsmI</i>	+
					<i>TaqI</i>	-
Giovinazzo S	2017	Włochy	kaukaska	100/100	<i>Apal</i>	-
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	-
Guleryuz B	2016	Turcja	kaukaska	136/50	<i>FokI</i>	-
					<i>TaqI</i>	+
<b>GD</b>						
Inoue N	2014	Japonia	azjatycka	139/76	<i>FokI</i>	-
					<i>Apal</i>	+
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	+
Meng S	2015	Chiny	azjatycka	417/301	<i>FokI</i>	-
					<i>Apal</i>	+
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	-
Ramos-Lopez E	2005	Niemcy Polska Serbia	kaukaska	789/764	<i>FokI</i>	+(P, G)
					<i>Apal</i>	-
					<i>BsmI</i>	+(P)
					<i>TaqI</i>	-

Chen RH	2007	Chiny	azjatycka	88/90	<i>FokI</i>	+
Collins JE	2004b	Wielka Brytania	kaukaska	768/864	<i>FokI</i>	-
					<i>ApalI</i>	-
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	-
Ban Y	2000a	Japonia	azjatycka	131/150	<i>FokI</i>	+
Abd El Gawad SS	2011	Egipt	afrykańska	90/55	<i>ApalI</i>	+
					<i>BsmI</i>	+
					<i>TaqI</i>	+
Stefanić M	2005	Chorwacja	kaukaska	110/99	<i>ApalI</i>	+
					<i>BsmI</i>	+
					<i>TaqI</i>	+
Ban Y	2000b	Japonia	azjatycka	180/195	<i>ApalI</i>	+
					<i>BsmI</i>	+
Horst-Sikorska W	2008	Polska	kaukaska	75/163	<i>FokI</i>	-
					<i>ApalI</i>	-
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	-
Planck T	2018	Szwecja	kaukaska	708/1178	<i>FokI</i>	+
					<i>ApalI</i>	-
					<i>BsmI</i>	+
					<i>TaqI</i>	-
<b>AITD</b>						
Maalej A	2008	Tunezja	afrykańska	100/100	<i>FokI</i>	-
					<i>BsmI</i>	-
					<i>TaqI</i>	-
Zarrin R	2018	Iran	azjatycka	121/117	<i>FokI</i>	+
					<i>ApalI</i>	-

AIT – autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy  
TAO – orbitopatia tarczycowa  
AITD – autoimmunizacyjne choroby tarczycy  
P – populacja polska; G – populacja niemiecka

## 7.1. Polimorfizm rs2228570 (*FokI*)

Polimorfizm *FokI* genu *VDR* wydaje się szczególnie atrakcyjnym przedmiotem badań, ponieważ potwierdzono, że zamiana allelu T na C wiąże się ze zmianą na poziomie kodowanego białka. Nie jest to więc polimorfizm cichy, jak niektóre inne spośród badanych, ale substytucja w tej pozycji może bezpośrednio wpływać na działanie receptora i w związku z tym na odpowiedź komórek na witaminę D (Arai H, 1997).

W badanej grupie polskich pacjentów z AITD nie wykazano związku pomiędzy wariantami polimorfizmu *FokI* genu *VDR* a ryzykiem zachorowania na autoimmunizacyjne choroby tarczycy (łącznie AIT i TAO). Na podstawie piśmiennictwa sugerowany jest związek genotypu CC lub allelu C z predyspozycją do rozwoju niektórych chorób autoimmunizacyjnych, w tym AITD (Ban Y, 2000a; Ban Y, 2001; Chen RH, 2007; Djurovic J, 2015; Inoue N, 2014; Lin WY, 2006; Mao S, 2014; Planck T, 2018; Song GG, 2016; Tizaoui K, 2015; Wang G, 2014; Yazici D, 2013; Zarrin R, 2018). Warianty te występowały co prawda w niniejszym badaniu z większą częstością w grupie chorych w porównaniu do grupy kontrolnej, uzyskane wyniki nie potwierdziły jednak, by były to różnice istotne statystycznie. Obserwacja ta jest zgodna z wnioskami płynącymi z opublikowanych metaanaliz, gdzie również nie potwierdzono znaczenia polimorfizmu *FokI VDR* w rozwoju AITD (łącznie AIT i GD) w przypadku populacji kaukaskiej (Feng M, 2013; Gao XR, 2018).

Inaczej jednak prezentują się wyniki metaanalizy z uwzględnieniem wszystkich publikacji z zakresu AITD, niezależnie od przynależności etnicznej badanych – w tym przypadku stwierdzono, że wariant C, homozygota CC lub posiadanie co najmniej jednego allelu C (genotyp CC lub CT), może wiązać się z większym ryzykiem zachorowania na AITD. Obserwacje poczynione dla całej populacji są konsekwencją wyników uzyskiwanych wśród Azjatów, gdzie większość publikacji potwierdza potencjalne znaczenie SNP *FokI VDR* w rozwoju AITD (Feng M, 2013; Gao XR, 2018). Spośród 21 opublikowanych dotychczas prac na temat znaczenia polimorfizmów *VDR* w AITD w 16 oceniano SNP *FokI* genu *VDR*. Większość z nich dotyczyła tylko AIT lub tylko GD, w czterech publikacjach

rozpatrywano także AITD łącznie (Inoue N, 2014; Maalej A, 2008; Meng S, 2015; Zarrin R, 2018).

W grupie z AIT wyniki niniejszego badania również nie potwierdziły wpływu SNP *FokI* na ryzyko zachorowania – warianty C i T badanego polimorfizmu z podobną częstością występowały u pacjentów i wśród zdrowych. W piśmiennictwie można znaleźć 8 publikacji, w których przedstawiono dane na temat SNP *FokI VDR* w grupie AIT – 5 spośród nich przedstawia wyniki dla populacji azjatyckiej, dwie kolejne pochodzą z Turcji, a jedna z Serbii. Niewiele było zatem dotychczas informacji na temat rozkładu genotypów i alleli SNP *FokI* u pacjentów z AIT z Europy. W pięciu publikacjach wykazano związek pomiędzy wariantami SNP *FokI VDR* a AIT (3 z nich to prace dotyczące populacji azjatyckiej, po jednej z Turcji oraz Serbii), podczas gdy przeciwne wyniki uzyskano w pozostałych trzech pracach (dwie z Chin, jedna z Turcji) (Ban Y, 2001; Djurovic J, 2015; Guleryuz B, 2016; Hong LH, 2011; Inoue N, 2014; Lin WY, 2006; Meng S, 2015; Yazici D, 2013). Jak widać, uzyskiwane wyniki były dość niejednorodne nawet w obrębie tych samych grup etnicznych. Próba odpowiedzi na pytanie o znaczenie SNP *FokI VDR* w AIT było zatem przeprowadzenie metaanalizy, tak aby uzyskać większą moc statystyczną. W 2017 roku opublikowano pracę Wanga i wsp., której wyniki wskazywały, że wariant C w analizie alleli oraz homozygota CC (w modelu recesywnym) związane są ze zwiększonym ryzykiem rozwoju AIT dla całej badanej grupy (Wang X, 2017). Analiza w podgrupach według przynależności etnicznej ponownie pokazała jednak, że istotne zależności obserwowane są jedynie w grupie pacjentów z Azji, podczas gdy u chorych na AIT rasy kaukaskiej nie udaje się potwierdzić znaczenia polimorfizmu *FokI* w patogenezie choroby (Wang X, 2017). Również we wspomianej wcześniej metaanalizie z 2018 roku autorstwa Gao i wsp. oceniano wyniki w podgrupie AIT – wykazano tam, że wariant T polimorfizmu jest czynnikiem ochronnym. Warto jednak dodać, że nie wykonano analizy w podziale według pochodzenia etnicznego, poza tym znamienna zależność ujawniła się tylko w analizie alleli (C vs. T) (Gao XR, 2018).

W przypadku badanej grupy z TAO różnice w rozkładzie genotypów i alleli w porównaniu do zdrowych ochotników były większe niż w przypadku analizy AIT vs. grupa kontrolna. Warianty CC i CT w dominującym modelu dziedziczenia oraz wariant CC



w modelu addytywnym okazały się być istotnie częstsze wśród chorych, co pozwala uznać je za potencjalne czynniki ryzyka rozwoju choroby. Ponieważ analizowano pacjentów z TAO, a nie z GD, jak w przypadku większości wcześniejszych publikacji, możliwości bezpośredniego porównania uzyskanych wyników do rezultatów innych autorów są ograniczone. W uproszczeniu można jednak przyjąć, że pacjenci z TAO stanowią podgrupę pacjentów z GD, a w związku z tym porównanie do wyników uzyskiwanych w GD wydaje się uzasadnione.

Dotychczas w ośmiu publikacjach prezentowano wyniki mające odpowiedzieć na pytanie o znaczenie SNP *FokI VDR* w GD – cztery z nich dotyczyły Azjatów, kolejne cztery obejmowały różne populacje europejskie (w tym aż dwie publikacje, w których całość lub część grupy badanej stanowili Polacy). W przypadku populacji azjatyckiej dwie publikacje potwierdziły wpływ tego polimorfizmu na ryzyko zachorowania na GD (Ban Y, 2000a; Chen RH, 2007), podczas gdy kolejne dwie dały odwrotne wyniki (Inoue N, 2014; Meng S, 2015). Wśród pacjentów rasy kaukaskiej Collins i wsp. nie stwierdzili istotnych zależności (Collins JE, 2004b). W przypadku kolejnej publikacji dotyczącej Europejczyków – autorstwa Ramos-Lopez i wsp., gdzie analizowano próbki krwi pochodzące z trzech różnych krajów (Polska, Niemcy, Serbia) – wyniki były niejednorodne – u Polaków wariant C mógł być uznany za czynnik ryzyka choroby, podczas gdy wśród Niemców to wariant T wydawał się sprzyjać zachorowaniu, u Serbów istotnych zależności nie stwierdzono (Ramos-Lopez E, 2005). W kolejnej publikacji dotyczącej pacjentów z GD populacji polskiej, mimo że nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stosunku do zdrowych, pojawia się jednak tendencja w kierunku istotności statystycznej ( $p=0,058$ ) (Horst-Sikorska W, 2008). Również najnowsza publikacja na temat SNP *VDR* w GD obejmująca Szwedów wskazuje na wariant C SNP *FokI* jako zwiększający ryzyko zachorowania na GD (Planck T, 2018). Metaanaliza uwzględniająca siedem spośród wymienionych wyżej publikacji nie potwierdziła jednak znaczenia SNP *FokI VDR* jako czynnika ryzyka zachorowania na GD (rozpatrywano wszystkie wyniki łącznie, bez podziału według przynależności etnicznej) (Gao XR, 2018).

Jeśli chodzi o dane dotyczące bezpośrednio chorych na TAO, Meng i wsp. w swojej pracy przedstawili analizę polimorfizmów genu *VDR*, w tym SNP *FokI*, z podziałem GD na

podgrupy z TAO oraz bez TAO. Mimo że allel C występował nieco częściej w grupie z TAO, różnica ta nie była istotna statystycznie (Meng S, 2015). Autorzy nie przedstawili analizy genotypów, nie wykonywano również porównania GD z TAO vs. grupa kontrolna. W publikacji Plancka i wsp. autorzy oceniali wpływ polimorfizmów *VDR* na współwystępowanie TAO w momencie rozpoznania GD, nie stwierdzili jednak, by istniał w tym wypadku związek z SNP *FokI* (Planck T, 2018). Dotychczas uzyskiwane wyniki nie potwierdzają zatem znaczenia SNP *FokI* jako czynnika rozwoju TAO wśród chorych na GD, nie można jednak wykluczyć, że w niektórych populacjach (w tym polskiej) allel C polimorfizmu jest jednym z czynników sprzyjających zachorowaniu na GD, niezależnie od objawów ocznych.

## 7.2. Polimorfizm rs1544410 (*BsmI*)

W badanej grupie polskich pacjentów z AITD nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy genotypami lub allelami SNP *BsmI* genu *VDR* a zachorowaniem na AITD. Wyniki wcześniejszych badań na temat tego polimorfizmu były niejednoznaczne, pojawiały się zarówno rezultaty potwierdzające jego rolę jako czynnika ryzyka zachorowania na AITD, jak i takie, które negowały istnienie tego typu zależności (Ban Y, 2000b; Ban Y, 2001; Collins JE, 2004b; Abd El Gawad SS, 2011; Giovinazzo S, 2017; Horst-Sikorska W, 2008; Inoue N, 2014; Maalej A, 2008; Meng S, 2015; Planck T, 2018; Ramos-Lopez E, 2005; Stefanic M, 2005; Stefanic M, 2008; Yazici D, 2013). W metaanalizie z 2018 roku dotyczącej SNP *VDR* w AITD stwierdzono, że nie wykazuje się istotnych różnic w rozkładzie genotypów i alleli polimorfizmu *BsmI* pomiędzy chorymi a zdrowymi (Gao XR, 2018). Analiza w podgrupach pokazała jednak, że wśród Europejczyków oraz Afrykanów (tylko jedna dostępna publikacja) posiadanie allelu A może działać ochronnie, zmniejszając ryzyko zachorowania. Odwrotnie sytuacja wyglądała wśród Azjatów, gdzie allel A wiązał się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju AITD. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki bliższe są tym obserwowanym dla innych populacji europejskich (z przewagą allelu G wśród chorych), ale różnice między chorymi a zdrowymi ochotnikami nie były na tyle duże, by osiągnąć znamienność statystyczną. Dalsze badania dotyczące różnych populacji mogłyby pozwolić

na ostateczne określenie znaczenia tego SNP w patogenezie AITD. Nie można wykluczyć, że wpływ tego SNP na autoimmunizację przedstawia się odmiennie w różnych grupach etnicznych. Podobne wnioski pojawiały się dla innych chorób autoimmunizacyjnych (Wang G, 2014). Kolejną kwestią, która również wymagałaby dalszych badań, jest precyzyjne określenie mechanizmu, dzięki któremu polimorfizm ten mógłby oddziaływać na ryzyko powstawania chorób autoimmunizacyjnych, gdyż ze względu na lokalizację nie ma on bezpośredniego wpływu na budowę białka receptora VDR.

Wyniki uzyskane w badanej grupie z AIT prezentują się podobnie jak dla całej grupy AITD – mimo pewnej tendencji do rzadszego występowania allelu A u chorych, nie potwierdzono istotnej roli SNP *BsmI* w patogenezie choroby. Obserwacja ta jest zgodna z większością (pięć spośród sześciu) wcześniejszych publikacji w tym zakresie, jak też wnioskami z metaanalizy Wanga i wsp., gdzie również nie było istotnej zależności pomiędzy wariantami SNP *BsmI* VDR a ryzykiem zachorowania na AIT (Ban Y, 2001; Giovinazzo S, 2017; Inoue N, 2014; Meng S, 2015; Wang X, 2017; Yazici D, 2013). Jedynie w badaniach Stefania i wsp. prowadzonych wśród mieszkańców Chorwacji zaobserwowano istotnie rzadsze występowanie homozygoty AA u chorych w porównaniu do zdrowych i w związku z tym sugerowano protekcyjne działanie homozygoty polimorficznej (Stefanic M, 2008).

W prezentowanym badaniu nie wykazano również istotnego wpływu SNP *BsmI* genu VDR na ryzyko rozwoju TAO. Podobnie jak w przypadku wyników dla całej grupy AITD, zauważalna była tendencja w kierunku mniejszej częstości allelu polimorficznego A u chorych. Różnica była jednak zbyt mała, by móc uznać SNP *BsmI* za czynnik genetyczny modyfikujący ryzyko powstania TAO. Zarówno Meng i wsp., jak i Planck i wsp. wskazywali, że nie ma istotnych różnic w rozkładzie genotypów tego SNP zależnie od występowania lub nie objawów ocznych w grupie GD (Meng S, 2015; Planck T, 2018). Wśród wcześniejszych publikacji oceniających związek polimorfizmu *BsmI* z GD wnioski nie były jednoznaczne, choć większa część autorów nie stwierdziła znaczenia tego SNP w rozwoju GD. Prace dotyczące populacji europejskiej wskazywały jednakże na tendencję w kierunku częstszego występowania homozygoty bb (GG) u chorych. W związku z tym potrzebne są kolejne prace, na większych grupach, które byłyby w stanie wykazać nawet

potencjalną słabą zależność. Metaanaliza z 2018 roku nie potwierdziła związku SNP *BsmI VDR* z GD, nie wykonywano jednak stratyfikacji pacjentów z GD pod względem przynależności etnicznej (Gao XR, 2018).

### 7.3. Polimorfizm rs7975232 (*ApaI*)

Wyniki niniejszej pracy nie potwierdziły znaczenia SNP *ApaI VDR* w etiopatogenezie AITD – częstości genotypów i alleli były podobne u chorych i w grupie kontrolnej. Na brak wyraźnego związku wariantów SNP *ApaI* z ryzykiem zachorowania na AITD wskazują także wyniki większości wcześniejszych badań na ten temat, choć pojawiały się, szczególnie wśród Azjatów, odmienne obserwacje (Ban Y, 2010; Abd El Gawad SS, 2011; Inoue N, 2014; Meng S, 2015; Stefanic M, 2005). Metaanaliza Gao XR i wsp., która uwzględnia większość dostępnych obecnie wyników na temat znaczenia SNP *ApaI VDR* w AITD, również wskazuje, że nie ma związku pomiędzy SNP *ApaI* a AITD, zarówno w przypadku uwzględnienia wszystkich grup etnicznych łącznie, jak też w przypadku oddzielnego analizowania populacji kaukaskiej oraz Azjatów (Gao XR, 2018).

W przypadku grupy z AIT nie stwierdzono związku pomiędzy zachorowaniem a wariantami polimorfizmu *ApaI VDR*. Dotychczas polimorfizm ten badany był w sześciu pracach na temat AIT: cztery z nich dotyczyły populacji kaukaskiej, natomiast dwie kolejne obejmowały pacjentów populacji azjatyckiej (Djurovic D, 2013; Giovino S, 2017; Inoue N, 2014; Meng S, 2015; Stefanic M, 2008; Yazici J, 2015). Żadna z tych publikacji nie potwierdziła, aby SNP *ApaI* wpływał na ryzyko zachorowania na AIT. Również podsumowanie wyników tych prac w postaci metaanalizy nie wykazało związku pomiędzy SNP *ApaI VDR* a AIT w żadnym z przyjętych modeli, zarówno w przypadku całej grupy AIT łącznie, jak też w podgrupach w zależności od przynależności etnicznej (populacja kaukaska lub azjatycka) (Gao XR, 2018; Wang X, 2017).

W badanej grupie pacjentów z TAO nie stwierdzono wpływu polimorfizmu *ApaI VDR* na zachorowanie. Częstości genotypów i alleli w grupie TAO były podobne do tych obserwowanych wśród zdrowych, nie ujawniała się żadna istotna tendencja odróżniająca

pacjentów od zdrowych ochotników. Podobnie jak w przypadku poprzednich badanych SNP, jedynie Meng i wsp. i Planck i wsp., analizując polimorfizmy *VDR* w grupie z GD, wzięli pod uwagę kwestię współwystępowania zmian o charakterze TAO. Wniosek był jednak taki, że podgrupy GD z TAO oraz bez TAO nie różniły się istotnie (Meng S, 2015; Planck T, 2018). W związku z tym porównywanie wyników chorych na TAO do wyników uzyskiwanych wśród chorych na GD wydaje się uzasadnione. Wśród opublikowanych dotychczas prac wnioski na temat potencjalnej roli SNP *ApaI* w etiopatogenezie GD są niejednoznaczne. W przypadku populacji azjatyckiej w dwóch pracach allel A lub genotyp AA były częstsze wśród pacjentów (Ban Y, 2000b; Meng S, 2015), podczas gdy w publikacji Inoue i wsp. to genotyp CC lub allel C były sugerowane jako predysponujące do zachorowania (Inoue N, 2014). W innych grupach etnicznych również pojawiły się prace, wskazujące na allel C jako predysponujący do GD (Abd El Gawad SS, 2011; Stefanic M, 2005). Większość publikacji dotyczących rasy kaukaskiej nie potwierdziła jednak wpływu tego polimorfizmu na rozwój choroby (Collins JE, 2004b; Horst-Sikorska W, 2008; Planck T, 2018; Ramos-Lopez E, 2005). W przeprowadzonej przez Gao i wsp. metaanalizie również nie stwierdza się (w żadnym z modeli dziedziczenia), aby SNP *ApaI* był istotnym czynnikiem ryzyka zachorowania na GD (Gao XR, 2018).

#### **7.4. Polimorfizm rs731236 (*TaqI*)**

W badanej grupie polskich pacjentów z AITD nie stwierdzono związku SNP *TaqI* z ryzykiem zachorowania na AITD, pomimo nieznacznie częstszego występowania genotypu TT i allelu T wśród chorych. Wariant T polimorfizmu wskazywany był jako predysponujący do choroby w niektórych spośród wcześniejszych publikacji (Abd El Gawad SS, 2011; Guleryuz B, 2016; Inoue N, 2014; Stefanic M, 2005; Yazici D, 2013), w pozostałych pracach takiej zależności jednak nie potwierdzono. Próba odpowiedzi na pytanie o znaczenie tego SNP w AITD jest metaanaliza z 2018 roku. Gao i wsp. podsumowują, że dla całej grupy AITD stwierdza się istotną zależność pomiędzy badanym polimorfizmem a ryzykiem zachorowania – wariant CC zmniejsza ryzyko rozwoju AITD. W dalszych analizach, z podziałem według przynależności etnicznej, udało się potwierdzić

rolę SNP *TaqI VDR* w etiopatogenezie choroby w populacji azjatyckiej. W przypadku uwzględnienia tylko populacji europejskiej takich istotnych zależności nie znaleziono (Gao XR, 2018). Nie można wykluczyć, że w populacji kaukaskiej wpływ tego polimorfizmu jest mniejszy niż w przypadku Azjatów i konieczna byłaby większa grupa badanych, aby wykazać ten słaby efekt.

Analiza uzyskanych wyników w grupie AIT, podobnie jak dla całej grupy AITD, nie wykazała istotnego wpływu SNP *TaqI VDR* na rozwój choroby. W dwóch wcześniejszych publikacjach z Turcji opisywano, że wariant T polimorfizmu może być czynnikiem ryzyka AIT, z kolei w publikacji z Chorwacji zauważalna jest tendencja w kierunku istotności statystycznej (Guleryuz B, 2016; Stefanic M, 2008; Yazici D, 2013). Pozostałe 5 publikacji – dwie dotyczące populacji azjatyckiej oraz trzy obejmujące przedstawicieli rasy kaukaskiej – nie potwierdziło istnienia istotnych różnic w dystrybucji genotypów i alleli SNP *TaqI* pomiędzy chorymi z AIT a zdrowymi (Djurovic D, 2013; Giovinazzo S, 2017; Inoue N, 2014; Meng S, 2015; Stefanic M, 2008). Wszystkie te wspomniane publikacje zostały uwzględnione w metaanalizie autorstwa Wang a i wsp. Stwierdzono tam, że polimorfizm *TaqI VDR* nie jest w sposób istotny związany z ryzykiem wystąpienia AIT. Również analiza w podgrupach – azjatyckiej oraz kaukaskiej – dała podobne rezultaty (Wang X, 2017). Gao i wsp. stwierdzają z kolei w swojej metaanalizie znamiennej różnicę pomiędzy pacjentami z AIT a kontrolą (w przypadku modelu addytywnego – TT vs. CC) – według nich homozygota CC może chronić przed zachorowaniem (Gao XR, 2018).

Analiza wyników uzyskanych u pacjentów z TAO nie pozwoliła na stwierdzenie roli SNP *TaqI* w warunkowaniu rozwoju choroby. Pojawiają się pewne różnice pomiędzy TAO a kontrolą, ale nie są one znaczące. Wcześniej polimorfizm ten analizowano w grupach chorych na GD (tylko w dwóch przypadkach oceniano związek z rozwojem TAO, co omówiono powyżej). W trzech publikacjach stwierdzono istotną statystycznie różnicę w rozkładzie genotypów i/lub alleli SNP *TaqI VDR* pomiędzy chorymi a kontrolą (Abd El Gawad SS, 2011; Inoue N, 2014; Stefanic M, 2005), w pozostałych pracach obserwacja ta nie została jednak potwierdzona (Collins JE, 2004b; Horst-Sikorska W, 2008; Meng S, 2015; Planck T, 2018; Ramos-Lopez E, 2005). Wobec niejednorodności

uzyskiwanych wyników przeprowadzono metaanalizę uwzględniającą powyższe prace. W publikacji tej autorzy nie stwierdzają jednak istotnego wpływu SNP *TaqI VDR* na rozwój GD w żadnym z analizowanych modeli dziedziczenia (Gao XR, 2018).

## 7.5. Polimorfizm rs11568820 (*Cdx2*)

Allel A, a w szczególności homozygota AA, jak można było się spodziewać w przypadku populacji europejskiej, były znacznie rzadsze w stosunku do wariantu dzikiego – allelu G oraz homozygoty dzikiej. Dotyczyło to zarówno badanych, jak i grupy kontrolnej. Obserwowane w grupie kontrolnej częstości genotypów oraz alleli były porównywalne z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi w badaniach na populacji polskiej (Gromowski T, 2017).

W przypadku całej grupy chorych na AITD (AIT i TAO łącznie) nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy wariantami polimorfizmu *Cdx2 VDR* a występowaniem choroby. Wśród pacjentów z AITD częściej pojawiała się homozygota AA oraz heterozygota, nie były to jednak różnice istotne statystycznie. W analizie AIT vs. kontrola oraz TAO vs. kontrola również nie stwierdza się znamienych statystycznie różnic. Pojawia się jednak pewna tendencja w kierunku nadreprezentacji rzadkiej homozygoty AA w grupie TAO. W niektórych spośród wcześniejszych publikacji homozygota AA była wiązana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka jelita grubego, a nawet większym całkowitym ryzykiem zachorowania na nowotwory (Dai ZM, 2015; Serrano D, 2016). Wskazywano też, że SNP *Cdx2* może wpływać na stężenia cytokin, a wariant AA wiązał się z wyższym stężeniem IL-10 oraz niższą sekrecją TNF- $\alpha$  (Harishankar M, 2017; Ovsyannikova IG, 2010).

Ponieważ brak jest wcześniejszych publikacji dotyczących roli SNP *Cdx2* w AITD, celowa wydaje się analiza wyników na temat znaczenia tego polimorfizmu w innych chorobach autoimmunizacyjnych, gdyż wiele genetycznych czynników ryzyka jest wspólnych dla całej tej grupy chorób. Przegląd piśmiennictwa pozwala na znalezienie kilku publikacji, które oprócz najczęściej analizowanych polimorfizmów *VDR* (*FokI*, *BsmI*, *ApaI*,

*TaqI*) badały także częstości genotypów i alleli SNP Cdx2. Trzy z nich dotyczyły cukrzycy typu 1 – we wszystkich tych pracach SNP Cdx2 okazał się jednak nie mieć istotnego związku z zachorowaniem (Cooper JD, 2011; Frederiksen B, 2013; Kocabaş A, 2010). W publikacjach na temat bielactwa oraz łuszczyca to genotyp GG pojawiał się nieznacznie częściej u chorych, były to jednak różnice zbyt małe, by osiągnąć znamienność statystyczną (Aydingöz IE, 2012; Zhou X, 2014). Dickinson i wsp. w pracy z 2009 roku stwierdzają z kolei, że allel G może być czynnikiem ryzyka rozwoju stwardnienia rozsianego u osób z małą ekspozycją na słońce w dzieciństwie (Dickinson JL, 2009). Podobnie w pracy obejmującej pacjentów z małopłytkowością samoistną, również to genotyp GG okazał się być częstszy wśród chorych niż u zdrowych (Yesil S, 2017). Wyniki te mogłyby sugerować, że to raczej mniej aktywny wariant G może potencjalnie wiązać się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju autoimmunizacji. Ogólnie rzecz biorąc, publikacje te, łącznie z naszymi wynikami, prowadzą jednak do wniosku, że choć polimorfizm Cdx2 może prawdopodobnie wpływać na układ immunologiczny, to nie ma dotychczas podstaw, by uważać, że jest istotnym czynnikiem determinującym rozwój chorób autoimmunizacyjnych. Z pewnością jednak temat ten wymaga dalszych badań.

## **7.6. Różnice w rozkładzie genotypów i alleli badanych polimorfizmów pomiędzy grupą z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy a chorymi z orbitopatią tarczycową**

Choć choroby zaliczane do grupy AITD mają wiele wspólnych czynników etiologicznych, tak środowiskowych, jak i genetycznych, niektóre z nich mogą być swoiste dla AIT, GD lub TAO. Sam niedobór witaminy D wiązany jest zarówno z AIT, jak i GD (Wang J, 2015; Xu MY, 2015). W przypadku polimorfizmów genu *VDR* możliwe jest istnienie różnic pomiędzy AIT i GD, co można wnioskować chociażby na podstawie wyników metaanaliz dotyczących SNP *VDR* w AITD, gdzie w przypadku stratyfikacji według jednostki chorobowej nieco inne wyniki uzyskiwano dla AIT i GD (Gao XR, 2018). Niewiele jest natomiast badań, gdzie bezpośrednio porównywano obie choroby zaliczane do



AITD. Inoue i wsp. wskazują, że istotne statystycznie różnice w analizie AIT vs. GD obserwowano w przypadku rozkładu genotypów SNP *TaqI VDR* oraz rozkładu genotypów i alleli SNP *FokI VDR* (Inoue N, 2014). W przypadku SNP *TaqI* homozygota TT była częstsza w GD niż w AIT, a odwrotna sytuacja dotyczyła heterozygoty. W przypadku drugiego z polimorfizmów – *FokI* – genotyp CC oraz allel C zamiennie częściej występowały w AIT w stosunku do GD. Nasze wyniki dotyczące SNP *FokI VDR* również wskazały, że są różnice w rozkładzie genotypów pomiędzy dwoma grupami chorych, jednak to genotyp TT zamiennie częściej obserwowano u chorych na AIT w porównaniu do TAO. Ponieważ polimorfizm *FokI* może mieć wpływ na proporcję pomiędzy poszczególnymi cytokinami oraz równowagę limfocytów Th1/Th2, mógłby prawdopodobnie w ten sposób wpływać na manifestację kliniczną AITD (Van Etten E, 2007). Niezgodność pomiędzy uzyskanymi wynikami a obserwacją Inoue i wsp., jak też brak podobnych obserwacji w publikacji Menga i wsp. nie pozwalają jednak na formułowanie daleko idących wniosków w tym zakresie. W przypadku SNP *TaqI* różnice pomiędzy AIT i TAO były natomiast w niniejszej pracy niewielkie. W publikacji Menga i wsp. częstości genotypów i alleli badanych SNP genu *VDR* nie różniły się znacząco (Meng S, 2015).

W prezentowanej pracy obserwowano różnicę pomiędzy AIT i TAO także w przypadku SNP *Cdx2 VDR* – homozygota polimorficzna była zamiennie częstsza w grupie TAO w porównaniu do AIT, podczas gdy heterozygota częściej pojawiała się u chorych na AIT. Również ten polimorfizm może prawdopodobnie wpływać na układ immunologiczny, w tym wzajemne proporcje pomiędzy cytokinami. Zanim jednak zaczniesz się szczegółowo rozważać te kwestie, konieczne byłoby potwierdzenie występowania różnic w zakresie SNP *Cdx2 VDR* pomiędzy chorobami zaliczanymi do AITD także na innych grupach badanych.

## **7.7. Zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami *VDR* a wybranymi parametrami klinicznymi u chorych na autoimmunizacyjne choroby tarczycy**

Obraz ultrasonograficzny autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy jest dość charakterystyczny – obejmuje przede wszystkim obniżoną, zazwyczaj niejednorodną echogeniczność mięszu (Pedersen OM, 2000). Obraz taki jest efektem między innymi obfitego nacieku limfocytarnego. Hipoechogeniczność mięszu najczęściej jest rozlana, rzadziej obserwuje się ogniskowe występowanie tego rodzaju zmian. Inną cechą dość często obserwowaną w AIT jest mikroguzkowa budowa gruczołu (Yeh HC, 1996). Także obecność zmian ogniskowych jest powszechna w tarczycy osób z AIT. Według piśmiennictwa częstość ich występowania waha się od 28 do nawet 60% (Erdogan M, 2009; Pishdad P, 2017). Niemniej jednak nawet 23% z nich mogą stanowić tak zwane pseudoguzki (Takashima S, 1992). Objętość tarczycy może być zarówno zwiększona, co manifestuje się jako wole, prawidłowa, jak też obniżona. Potencjalny wpływ witaminy D na obraz ultrasonograficzny tarczycy chorych na AIT mógłby być wynikiem oddziaływania na zjawiska immunologiczne zachodzące w tarczycy oraz nasilenie procesów apoptozy (Łacka K, 2012). Nie można wykluczyć też bezpośredniego oddziaływania  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na tyreocyty, które wykazują ekspresję *VDR* (Krysiak R, 2017).

W badanej podgrupie pacjentów z AIT zmiany ogniskowe w tarczycy były bardzo częste (55/98 pacjentów, 56,12%). Cecha ta nie okazała się być jednak związana z badanymi polimorfizmami genu *VDR*. W innych opublikowanych pracach dotyczących SNP *VDR* w AITD nie analizowano tego typu zależności. Można za to znaleźć pracę, w której badano zależność pomiędzy SNP *VDR* a ryzykiem raka tarczycy – Penna-Martinez i wsp. stwierdzili, że genotyp FF SNP *FokI VDR* oraz genotyp AA SNP *ApaI VDR* mogą być czynnikami chroniącymi przed rozwojem raka pęcherzykowego tarczycy. Badane polimorfizmy (*FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*) *VDR* nie były jednak związane z zachorowaniem na najczęstszy typ raka tarczycy – raka brodawkowego (Penna-Martinez M, 2009). Choć w publikacji Aboelnaga i wsp. sugerują potencjalną rolę niedoboru witaminy D w etiopatogenezie wola wieloguzkowego, wpływ stężenia witaminy D na występowanie łagodnych zmian

ogniskowych w tarczycy (guzek pojedynczy, wole wieloguzkowe) również nie został dotychczas dokładnie określony (Aboelnaga MM, 2016). Z pewnością konieczne byłyby dalsze badania, aby jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy samo stężenie witaminy D lub też czynniki genetyczne związane z witaminą D mogą wpływać na tendencję do tworzenia się zmian ogniskowych w gruczole tarczowym.

Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki pokazały, że dwa spośród badanych SNP *VDR* (*BsmI* oraz *ApaI*) wykazują związek z objętością tarczycy. Genotyp AA SNP *ApaI VDR*, który co prawda występował u chorych z podobną częstością co u zdrowych, związany był wśród pacjentów z AIT z większą objętością tarczycy w porównaniu do pozostałych dwóch genotypów (pomimo podobnego czasu trwania choroby i proporcji kobiet do mężczyzn we wszystkich podgrupach). W przypadku SNP *BsmI* genotyp GG wiązał się z kolei z mniejszą objętością tarczycy w porównaniu do wariantu z przynajmniej jednym allelem A. Wśród wcześniejszych publikacji na temat SNP *VDR* w AITD dwukrotnie oceniano zależność pomiędzy wariantami polimorfizmów tego genu a wielkością wola (ocena kliniczna, bez pomiaru objętości tarczycy w USG), nie potwierdzając jednak istnienia znamienego związku (Inoue N, 2014; Meng S, 2015). Obie publikacje dotyczyły pacjentów z AITD, w obu przypadkach nie przedstawiano też szczegółowych danych, podsumowując jedynie, że nie stwierdzono zależności pomiędzy badanymi SNP *VDR* a wielkością wola. W związku z tym obserwacja, która sugeruje, że warianty polimorficzne *VDR* mogą wpływać na objętość tarczycy u chorych na AIT, wymaga potwierdzenia na większej grupie badanych oraz w innych populacjach. Należałoby również wyjaśnić ewentualny mechanizm patogenetyczny takiej zależności. Póki co również wpływ samej witaminy D na objętość tarczycy nie został zbyt dobrze sprawdzony, chociaż już w publikacji z 2013 roku Bozkurt i wsp. wskazywali, że istnieje korelacja pomiędzy stężeniem witaminy D a objętością gruczołu tarczowego (Bozkurt NC, 2013). W jednej z prac opisano zmniejszone unaczynienie miększu tarczycy u pacjentów z AIT z towarzyszącym niedoborem witaminy D w porównaniu do grupy chorych z prawidłowym jej stężeniem, co może być czynnikiem nasilającym destrukcję tyreocytów. Obserwacja ta może być tłumaczona wpływem niedoboru witaminy D na funkcję śródbłonna naczyń (Nalbant A, 2017).

Do czynników wpływających na objętość tarczycy należą poza tymi najlepiej znanymi, jak wiek, płeć, BMI, także takie czynniki jak palenie papierosów czy spożycie jodu. Badania pokazują, że rola czynników genetycznych jest także duża (Hansen PS, 2004). Kwestia objętości gruczołu tarczowego w przebiegu AIT oraz czynniki ją determinujące budzą pewne wątpliwości i nie zostało to dotychczas w pełni wyjaśnione. U chorych na AIT wykazano, że występowanie podwyższonego stężenia przeciwciał przeciw-tarczycowych związane jest z większą objętością gruczołu tarczowego, choć kwestia korelacji pomiędzy ich stężeniem a objętością tarczycy nie jest jednoznaczna (Rotondi M, 2014; Willms A, 2013). Niektórzy autorzy sugerowali istnienie kilku podtypów AIT, między innymi pierwotnej zanikowej postaci niedoczynności tarczycy oraz przerostowej niedoczynności autoimmunizacyjnej (postać z wolem) (Davies TF, 2003). Inne koncepcje skupiały się na tym, że objętość tarczycy może spadać wraz z czasem trwania choroby, a podtyp atroficzny to schyłkowa postać AIT. Ostatecznie jednak żadna z tych wersji wydaje się nie mieć potwierdzenia. U chorych na AIT obserwuje się całą rozpiętość możliwych objętości gruczołu tarczowego, z tym że skrajne wartości – atrofia lub wole – pojawiają się częściej niż wśród zdrowych (Carlé A, 2009). Nie można jednak wykluczyć, że poprzez modulujący wpływ na układ immunologiczny SNP *VDR* byłyby w stanie zmienić proporcje pomiędzy zachodzącymi w przebiegu AIT procesami chorobowymi i wpływać na nasilenie apoptozy, włóknienia itp. Sama witamina D postrzegana jest zazwyczaj, jako czynnik proapoptotyczny – taki efekt wywołuje chociażby w przypadku oddziaływania na komórki nowotworowe. Pojawiają się jednak doniesienia, że w niektórych sytuacjach może ona działać ochronnie na komórki i hamować apoptozę, co obserwowano także na prawidłowych tyreocytach (Umar M, 2018; Wang SH, 1999). Należy oczywiście pamiętać, że objętość tarczycy zależna jest także od takich czynników, jak masa ciała, dieta itd., które nie zostały uwzględnione w niniejszej analizie, dlatego w połączeniu ze stosunkowo niewielką liczbą badanych, wnioski powinny być bardzo ostrożne.

Czynniki genetyczne w większym stopniu determinują ryzyko rozwoju AITD, w tym AIT, niż zmienne środowiskowe, co udowodniły badania bliźniąt (Brix TH, 2012). Wydaje się, że rola genów w porównaniu do środowiska ujawnia się tym silniej, im niższy jest wiek zachorowania (Tomer Y, 2007). Również obraz kliniczny niektórych chorób może być nieco inny, zależnie od wieku w momencie zachorowania. W przypadku AIT chorobę rozpoznaje

się zwykle pomiędzy trzydziestym a pięćdziesiątym rokiem życia. Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki nie wykazały, aby badane SNP genu *VDR* wpływały istotnie na wiek ujawnienia się choroby. Dla całej grupy AIT średni wiek w momencie rozpoznania choroby wynosił 47,33 (SD 13,49) lat, a różnice pomiędzy podgrupami utworzonymi według genotypów poszczególnych SNP *VDR* nie były statystycznie znamienne. We wcześniejszej pracy na temat polimorfizmów *VDR* w AITD Inoue i wsp. dzielili pacjentów z AIT na tych z chorobą łagodną – chorzy z AIT, którzy pozostają w eutyreozy bez konieczności leczenia lewotyroksyną pomimo wieku > 50 roku życia oraz na grupę z ciężkim przebiegiem – osoby, które przed 50. rokiem życia rozwinęły AIT wymagającą leczenia substytucyjnego lewotyroksyną. Autorzy nie wykazali, aby obie grupy różniły się pod względem częstości genotypów lub alleli polimorfizmów *FokI*, *BsmI*, *ApaI* czy *TaqI* *VDR*. Co prawda nie można wprost porównywać obu obserwacji, ale w pracy Inoue obie grupy, poza samym faktem leczenia lewotyroksyną, różniły się istotnie pod względem wieku w momencie rozpoznania (odpowiednio 37,2 lat w grupie z ciężkim AIT oraz 59,0 lat w grupie z łagodnym AIT) (Inoue N, 2014). Wpływ tych czterech najpopularniejszych SNP *VDR* na wiek w momencie rozpoznania AITD (łącznie AIT i GD) analizowano także w publikacji Menga i wsp. Tym razem pacjentów podzielono na tych, u których choroby rozwinęły się < 18 roku życia oraz grupę, gdzie rozpoznanie postawiono w wieku dorosłym. Ponownie jednak nie stwierdzono, aby warianty polimorficzne genu *VDR* miały wpływ na analizowany parametr (Meng S, 2015). Również wśród publikacji na temat polimorfizmów *VDR* w GD można znaleźć podobne próby oceny zależności pomiędzy czasem wystąpienia choroby a wariantami polimorficznymi *VDR* – Stefanic i wsp. w publikacji z 2005 roku stwierdzili, że częstości genotypów SNP *ApaI*, *TaqI* i *BsmI* nie różniły się w podgrupach według wieku rozpoznania (Stefanic M, 2005). Wszystkie te powyższe obserwacje, łącznie z prezentowanymi wynikami, pozwalają stwierdzić, że polimorfizmy *VDR* nie mają prawdopodobnie wpływu na wiek ujawnienia się AITD.

Orbitopatia tarczycowa, jak to zostało omówione we wstępie, towarzyszy części przypadków GD. Może się ona ujawnić w tym samym czasie co GD (około 75%) lub też dopiero po pewnym czasie od zdiagnozowania GD (około 15% przypadków – po ponad 12 miesiącach od GD), rzadko rozpoznanie TAO poprzedza ujawnienie się nadczynności

tarczycy i postawienie diagnozy GD (10% – w ciągu 12 miesięcy poprzedzających rozpoznanie GD) (Reddy SV, 2014). Rozpoznanie TAO już w momencie zdiagnozowania GD można uznać za wykładnik większego nasilenia procesu chorobowego. Na ryzyko wystąpienia objawów ocznych u osób z GD mogą mieć wpływ czynniki środowiskowe, w szczególności palenie papierosów. Również niewyrównana czynność hormonalna tarczycy oraz leczenie z zastosowaniem jodu promieniotwórczego uznawane są za czynnik ryzyka. Ryzyko wystąpienia TAO lub cięższego jej przebiegu związane jest też z płcią (gorszy przebieg u mężczyzn), wiekiem oraz przynależnością etniczną chorego (Lee JH, 2010). Dalszych badań wymaga określenie znaczenia czynników genetycznych.

W badanej grupie pacjenci z TAO podzieleni zostali na dwie podgrupy, w zależności od tego, czy orbitopatia była obserwowana już w momencie rozpoznania GD, czy też pojawiła się dopiero w trakcie trwania GD. Okazało się jednak, że obie te podgrupy nie różniły się istotnie pod względem rozkładu genotypów i alleli badanych polimorfizmów *VDR*. W przypadku większości wcześniejszych prac na temat znaczenia SNP *VDR* w GD niewiele miejsca poświęcano kwestii zmian ocznych, jedynie w dwóch publikacjach autorzy dzielą pacjentów na tych z TAO w przebiegu GD oraz chorych bez objawów ocznych. W obu publikacjach nie stwierdza się jednak istotnych różnic pomiędzy podgrupami, co mogłoby sugerować, że wystąpienie orbitopatii u chorych z GD nie jest związane z genem *VDR* (Meng S, 2015; Planck T, 2018). Niewiele jest także piśmiennictwa, gdzie ocenia się wpływ samej witaminy D na ryzyko pojawienia się zmian o charakterze orbitopatii w przebiegu GD. Lahooti i wsp. wskazuje, że wśród pacjentów z TAO częściej obserwowano niedobór witaminy D w porównaniu do grupy z GD bez zmian ocznych (Lahooti H, 2014). Podobne obserwacje można było znaleźć wśród doniesień zjazdowych (Sheriba N, 2016). Wciąż jednak brakuje dużych opracowań potwierdzających taką zależność.

## **7.8. Ocena nierównowagi sprzężeń oraz analiza haplotypów**

W kilku wcześniejszych publikacjach na temat znaczenia polimorfizmów *VDR* w etiopatogenezie AITD oceniano sprzężenia pomiędzy poszczególnymi SNP, najczęściej

wskazując na najsilniejszą LD pomiędzy polimorfizmami końca 3' (*BsmI*, *ApaI* i *TaqI*), przy jednoczesnej niewielkiej LD pomiędzy SNP *FokI* a SNP końca 3'. Ponieważ praca badała jednocześnie dodatkowy polimorfizm *VDR* – *Cdx2*, a także aby ocenić stopień LD pomiędzy poszczególnymi *loci* w populacji polskiej (wcześniejsze publikacje różniły się między sobą pod względem stopnia LD pomiędzy polimorfizmami genu *VDR*), wykonano analizę LD pomiędzy badanymi SNP genu *VDR* w grupie osób zdrowych. Zgodnie z przewidywaniami, najsilniej sprzężone były ze sobą polimorfizmy końca 3' (w szczególności *ApaI* i *TaqI*, a także *BsmI* i *ApaI*). Tymczasem SNP *FokI* *VDR* był niezależny od polimorfizmów w tej lokalizacji. SNP *Cdx2* również nie wykazywał silnego sprzężenia z pozostałymi badanymi polimorfizmami. W związku z tym można wyróżnić trzy klastry w obrębie genu *VDR*. Wartości LD były podstawą do skonstruowania bloku haplotypowego (co szczegółowo przedstawiono w kolejnych akapitach). Również wcześniejsze publikacje wskazywały na występowanie największego stopnia LD pomiędzy trzema polimorfizmami końca 3' (Collins JE, 2004b; Ramos-Lopez E, 2005), chociaż dokładne wartości *D'* dla poszczególnych par polimorfizmów różniły się w zależności od badanej grupy. Dostrzegalne są pewne różnice w tym zakresie w zależności od przynależności etnicznej.

Poza oceną wpływu pojedynczych polimorfizmów genów kandydujących na ryzyko rozwoju choroby, w przypadku jednoczesnego oznaczenia większej ilości SNP, możliwa jest także analiza częstości występowania poszczególnych bloków haplotypowych (obszarów genomu o niskim stopniu rekombinacji) u chorych w porównaniu do zdrowych (Eisenbarth I, 2001; Gabriel SB, 2002; Reich DE, 2001). Podejście takie przez niektórych autorów jest w badaniach asocjacyjnych preferowane – w ten sposób można uchwycić efekty wynikające z interakcji kilku *loci*, wyższa jest także zazwyczaj moc testów statystycznych, w porównaniu do analizy pojedynczych SNP (Clark AG, 2004). W obrębie genu *VDR* istnieje kilka bloków haplotypowych, a największy z nich obejmuje kodony od 4 do 9 i sięga aż do sekwencji 3'UTR (co zostało omówione we wstępie, dane dotyczą populacji europejskiej) (Feng Y, 2005). Wykazano, że jest on miarodajnie reprezentowany poprzez określenie wariantów trzech polimorfizmów: rs731236 (*TaqI*)-rs7975232 (*ApaI*)-rs1544410 (*BsmI*).

W przypadku badanej grupy polskich pacjentów zauważalna była pewna tendencja w kierunku częstszego występowania haplotypu TAb wśród chorych (zarówno w analizie całej grupy AITD, jak i w podgrupach AIT i TAO). Różnice te nie były jednak istotne statystycznie. Dodatkowo haplotyp ten był znacznie rzadszy od dwóch dominujących wariantów (Tab oraz tAB) zarówno u pacjentów, jak i zdrowych ochotników, więc jego potencjalna rola w rozwoju choroby nie byłaby zbyt duża. W kilku spośród wcześniejszych publikacji także wykonywano analizę haplotypów. W pracy Stefanica i wsp. z 2008 roku udało się wykazać istotną zależność pomiędzy haplotypami *VDR* a rozwojem AIT. Podobnie jak w badanej grupie pochodzenia polskiego, także wśród Chorwatów (zarówno w grupie chorych, jak i wśród zdrowych) najczęściej obserwowano haplotypy Tab i tAB, z tym że wariant Tab istotnie częstszy był wśród chorych w porównaniu do zdrowych. Wariant TaB był za to znamienne rzadziej obserwowany u chorych, dlatego też został uznany za czynnik ochronny w populacji chorwackiej. Jego znaczenie wydaje się jednak niewielkie ze względu na ogólną niską częstość występowania (Stefanić M, 2008). W publikacji Giovinazzo i wsp. również przeanalizowano częstości występowania haplotypów utworzonych na podstawie SNP *TaqI-ApaI-BsmI* u chorych na AIT populacji europejskiej, nie stwierdzono jednak istotnych różnic pomiędzy pacjentami a zdrowymi (Giovinazzo S, 2017).

Analizowano również częstości haplotypów *TaqI-ApaI-BsmI* u chorych z GD populacji kaukaskiej. Ramos-Lopez i wsp. badali pacjentów pochodzących z trzech różnych krajów – Niemiec, Serbii i Polski. Ponownie okazało się, że tak u chorych, jak i zdrowych dominują dwa warianty: Tab i tAB, choć ich częstości różnią się wśród poszczególnych narodowości. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy pacjentami a zdrowymi w podgrupie niemieckiej oraz serbskiej. Inaczej było w przypadku populacji polskiej, gdzie haplotyp Tab okazał się być istotnie częstszy w grupie z GD w porównaniu do grupy kontrolnej, co mogłoby sugerować, że wariant ten wiąże się z podwyższonym ryzykiem zachorowania w populacji polskiej (Ramos-Lopez E, 2005). Nie można wykluczyć, że te odmiennie od uzyskanych w niniejszej publikacji rezultaty wynikają z nieco innych kryteriów włączenia do grupy badanej (GD vs. TAO w przebiegu GD). Jednakże Horst-Sikorska i wsp. również analizowali częstości występowania haplotypów *TaqI-ApaI-BsmI* u polskich chorych na GD i nie stwierdzili znamienych różnic pomiędzy pacjentami a kontrolą, co jest



bliższe wynikom uzyskanym w prezentowanej pracy. W przypadku populacji azjatyckiej Meng i wsp. skonstruowali bloki haplotypowe złożone z dwóch spośród trzech omawianych SNP: *ApaI-BsmI*. Okazało się jednak, że zarówno w grupie AIT, jak i GD poszczególne warianty występowały z podobną częstością co w grupie kontrolnej. We wszystkich podgrupach zdecydowanie przeważał haplotyp CG (> 70%). Inaczej niż w wynikach uzyskanych w niniejszej pracy, haplotyp AA był tam natomiast obserwowany niezbyt często (około 5% wobec blisko 40% w grupie opisywanej w niniejszej pracy). Jak widać, uzyskane dotychczas wyniki nie pozwalają na jednoznaczne wyróżnienie wariantu haplotypowego, który predysponowałby do zachorowania na AITD. Część autorów dotychczasowych publikacji na temat SNP *VDR* w AITD, pomimo oznaczenia wariantów polimorfizmów *TaqI*, *ApaI* oraz *BsmI*, nie zdecydowała się na wykonanie analizy haplotypów.

## 7.9. Ograniczenia badania

W badaniach kliniczno-kontrolnych (ang. *case-control study*), które mają na celu ocenę zależności pomiędzy polimorfizmami genów, a predyspozycją do rozwoju chorób wieloczynnikowych istnieją pewne wspólne ograniczenia. Istotnym problemem jest przede wszystkim dobór odpowiedniej grupy badanej oraz grupy kontrolnej. Rozpoznanie AITD (zarówno AIT, jak i TAO) wśród badanych w niniejszej pracy osób wydaje się być dobrze potwierdzone (diagnostyka biochemiczna oraz obrazowa). Podobnie w grupie kontrolnej, choroby tarczycy wykluczano nie tylko na podstawie wywiadu, ale także badań dodatkowych. Dużo trudniejsze było natomiast rzetelne wykluczenie wśród badanych innych chorób w przypadku których postulowany jest związek z polimorfizmami *VDR*. W tym zakresie opierano się jedynie na zebraniu wywiadu oraz ocenie dostępnej dokumentacji medycznej. Nie można jednak wykluczyć współistnienia wśród uczestników badania innych, dotychczas nierozpoznanych chorób. Może mieć to wpływ na uzyskiwane wyniki, szczególnie biorąc pod uwagę, że związek z SNP *VDR* sugerowano również w przypadku wielu powszechnie występujących chorób, między innymi cukrzycy typu 2 czy nadciśnienia tętniczego (Wang L, 2013; Yu F, 2016). Pewnym problemem może być też to, że średni wiek w grupie

kontrolnej był niższy niż wśród pacjentów z AITD. Zwiększa to prawdopodobieństwo, że w grupie kontrolnej znalazły się osoby, które w momencie włączenia do badania nie wykazywały nieprawidłowości w zakresie czynności hormonalnej oraz struktury tarczycy, ale mogą wykazywać predyspozycję do AITD i być może zachorują w przyszłości.

Innym trudnością w przypadku badań asocjacyjnych genów kandydujących (w tym badań typu *case-control study*) jest znalezienie odpowiedniej liczby osób do badanej grupy. Większa liczba pacjentów oraz zdrowych ochotników stanowiących grupę kontrolną pozwala uzyskać wyższą moc statystyczną. Jednocześnie jednak kwestie finansowe oraz ograniczony czas prowadzenia badania może utrudniać zebranie licznych grup, szczególnie w przypadku rzadko występujących chorób. W niniejszej pracy problem ten pojawiał się głównie w przypadku grupy TAO, gdyż kwalifikowano osoby z umiarkowaną lub ciężką postacią orbitopatii w przebiegu GD, stanowiące niewielką część wszystkich chorych z GD. Stąd też ostatecznie włączono do grupy TAO 108 osób, co jest liczbą mniejszą w porównaniu do niektórych wcześniejszych publikacji dotyczących pacjentów z GD.

Należy zauważyć, że stwierdzane w niniejszej pracy zależności pomiędzy polimorfizmami *VDR*, a ryzykiem rozwoju AITD lub przebiegiem tych chorób nie są silnymi zależnościami. Za istotną statystycznie przyjęto wartość  $p < 0,05$ . W pracy nie stosowano korekty dla wielokrotnych porównań, spośród których najlepiej znana jest poprawka Bonferroniego. Użycie poprawki Bonferroniego uważane jest za podejście konserwatywne i może utrudniać wykazanie słabszych zależności. W piśmiennictwie znaleźć można różne opinie na temat stosowania tego typu metod korekcji dla wielokrotnych porównań w przypadku badań genetycznych (Daly AK, 2001). Szczególnie w przypadku, gdy badane polimorfizmy uważane są za funkcjonalne, istnieje biologiczne uzasadnienie zależności proponowanych w hipotezie badawczej oraz analizowane są jednorodne grupy, wydaje się, że to bardziej liberalne podejście jest dopuszczalne.

## 8. Wnioski

1. W grupie pacjentów z orbitopatią Gravesa wykazano, że może występować zależność pomiędzy wariantami polimorfizmu *FokI VDR* a zwiększonym ryzykiem zachorowania (allel C, dominujący model dziedziczenia). W przypadku pozostałych badanych polimorfizmów nie wykazano związku z ryzykiem zachorowania na orbitopatię Gravesa.

Nie wykazano wpływu badanych polimorfizmów genu *VDR* (SNP *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, *Cdx2*) na ryzyko zachorowania na autoimmunizacyjne choroby tarczycy (rozpatrywane łącznie autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy oraz orbitopatia Gravesa) wśród badanych przedstawicieli rasy kaukaskiej narodowości polskiej.

Wśród badanych przedstawicieli rasy kaukaskiej narodowości polskiej nie wykazano wpływu badanych polimorfizmów genu *VDR* na ryzyko zachorowania na autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy.

2. W przypadku dwóch spośród badanych polimorfizmów *VDR* (*FokI* i *Cdx2*) zaobserwowano występowanie znamienych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy pacjentami z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy a grupą z orbitopatią Gravesa. Może to sugerować wpływ polimorfizmów *VDR* na manifestację kliniczną autoimmunizacyjnych chorób tarczycy.
3. W przypadku dwóch spośród badanych polimorfizmów *VDR* – *BsmI* i *ApaI* – stwierdzono zależność pomiędzy genotypami tych polimorfizmów a objętością gruczołu tarczowego u chorych na autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy. Nie stwierdzono wpływu badanych polimorfizmów *VDR* na inne analizowane parametry kliniczne w grupie chorych na autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy.
4. Nie stwierdzono wpływu badanych polimorfizmów *VDR* na analizowane parametry kliniczne w grupie z orbitopatią Gravesa.

## 9. Streszczenie

Autoimmunizacyjne choroby tarczycy (AITD), do których zalicza się autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy, chorobę Gravesa-Basedowa oraz orbitopatię Gravesa, należą do najczęstszych chorób w codziennej praktyce endokrynologicznej. AITD są chorobami o złożonej etiologii – rozwijają się u osób predysponowanych genetycznie (dziedziczenie wielogenowe), które dodatkowo narażone są na działanie środowiskowych czynników ryzyka. Problemem pozostaje jednak to, że wiele spośród tych czynników (tak genetycznych, jak i środowiskowych) oraz wzajemne interakcje między nimi wciąż pozostają nie w pełni poznane. W ostatnich latach zwrócono uwagę na modulujący wpływ witaminy D na działanie układu immunologicznego oraz możliwy związek pomiędzy niedoborem 25(OH)D a występowaniem chorób autoimmunizacyjnych. Biosynteza i metabolizm witaminy D regulowane są poprzez enzymy o charakterze hydroksylaz, a aktywna postać witaminy – 1,25(OH)<sub>2</sub>D – działa poprzez receptor VDR. W związku z tym również polimorfizmy genów kodujących te białka mogą potencjalnie wpływać na ryzyko zachorowania na AITD. Najwięcej miejsca poświęcono dotychczas badaniom nad znaczeniem polimorfizmów genu *VDR* w etiopatogenezie AITD. Oceniano głównie wpływ czterech polimorfizmów (SNP) *VDR*: rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*ApaI*) oraz rs731236 (*TaqI*). Uzyskiwane wyniki są niejednoznaczne, istnieją publikacje potwierdzające wpływ poszczególnych SNP w etiopatogenezie AIT lub GD, jak też prace, które nie potwierdzają ich znaczenia. Wydaje się ponadto, że zależności pomiędzy SNP *VDR* a ryzykiem rozwoju AITD mogą kształtować się odmiennie wśród różnych grup etnicznych. Poza czterema najczęściej badanymi polimorfizmami *VDR* istnieje też wiele innych SNP w obrębie tego genu, a część z nich to tak zwane polimorfizmy funkcjonalne. Do takich funkcjonalnych polimorfizmów zaliczyć można SNP rs11568820 (*Cdx2*). Istnieją ponadto doniesienia na temat wpływu SNP *Cdx2* na działanie układu immunologicznego. Polimorfizm *Cdx2* genu *VDR* nie był dotychczas badany w AITD.

W związku z tym **celem pacy** była ocena częstości genotypów i alleli pięciu wybranych polimorfizmów genu *VDR* (rs2228570, rs1544410, rs731236, rs7975232 oraz rs11568820) u chorych na AITD (AIT i orbitopatię tarczycową – TAO) w porównaniu do zdrowych ochotników, aby odpowiedzieć na pytanie o znaczenie SNP *VDR* w etiopatogenezie AITD. Porównywano także częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów *VDR* pomiędzy grupą AIT a grupą TAO. Dodatkowym celem była ocena zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR* a wybranymi parametrami przebiegu klinicznego AIT oraz TAO (między innymi wiek w momencie rozpoznania choroby, objętość gruczołu tarczowego w AIT, współistnienie zmian ogniskowych w obrębie tarczycy u chorych na AIT).

Do badania włączono grupę 330 niespokrewnionych pacjentów z AITD (222 z AIT, 108 z TAO) oraz 130 zdrowych ochotników populacji kaukaskiej narodowości polskiej. W celu oceny wybranych polimorfizmów stosowano metodę PCR-RFLP lub real-time PCR z wykorzystaniem sond molekularnych.

**Wyniki:** Porównując grupę TAO do osób zdrowych, wykazano, że w przypadku SNP *FokI VDR* homozygota CC oraz heterozygota były częstsze w grupie chorych z orbitopatią (36,79% i 50,94%) niż w grupie kontrolnej (29,23% i 48,46%). Istotną statystycznie różnicę pomiędzy tymi grupami stwierdzano w przypadku przyjęcia dominującego modelu dziedziczenia ( $p = 0,04$ ). Różnica w częstościach alleli SNP *FokI VDR* pomiędzy TAO a kontrolą była na granicy istotności statystycznej ( $p = 0,05$ ). W przypadku SNP *Cdx2 VDR* widoczna była tendencja w kierunku częstszego występowania homozygoty AA wśród pacjentów z TAO w stosunku do grupy kontrolnej (6,60% vs. 1,68%;  $p = 0,09$ ). Rozkłady genotypów i alleli pozostałych badanych polimorfizmów nie różniły się istotnie pomiędzy TAO a grupą kontrolną. W przypadku żadnego z badanych SNP nie wykazano natomiast istotnych różnic w rozkładzie genotypów i częstościach alleli pomiędzy całą grupą AITD a grupą kontrolną. Nie stwierdzono również istotnych różnic pomiędzy AIT a kontrolą.

W przypadku SNP *FokI* genotyp CC i heterozygota częściej występowały w grupie TAO (36,79% i 50,94%) w porównaniu do AIT (32,43% i 44,14%), co wiązało się z istotną statystycznie różnicą stwierdzaną w przypadku przyjęcia dominującego modelu

dziedziczenia ( $p = 0,02$ ). Rozkład genotypów SNP *Cdx2 VDR* również różnił się znamienne pomiędzy grupą AIT a TAO ( $p = 0,02$ ): homozygota polimorficzna AA była częstsza u chorych z orbitopatią (6,60% vs. 1,20%), a heterozygotę obserwowano częściej u chorych na AIT (27,71% vs. 18,87%). W przypadku pozostałych badanych SNP nie stwierdzano znamiennych różnic pomiędzy dwiema grupami chorych.

Zauważono także, że objętość tarczycy u chorych na AIT różniła się znamienne, zależnie od genotypów polimorfizmów *BsmI* ( $p = 0,03$ ) i *ApaI* ( $p = 0,04$ ). Posiadacze dwóch alleli G SNP *BsmI* mieli mniejszą objętość tarczycy w stosunków do pozostałych genotypów tego polimorfizmu, a homozygota AA SNP *ApaI* wiązała się z większą objętością tarczycy w stosunku do pozostałych wariantów. W przypadku innych analizowanych parametrów klinicznych (wiek w momencie rozpoznania AIT lub GD; czas pomiędzy wystąpieniem GD a rozpoznaniem TAO; współistnienie zmian ogniskowych w tarczycy u chorych na AIT; aktywność kliniczna orbitopatii w momencie rozpoznania TAO) nie wykazano związku z badanymi polimorfizmami.

**Wnioski:** U pacjentów z TAO znamienne częściej w porównaniu do grupy kontrolnej obserwowano genotyp CC oraz heterozygotę polimorfizmu *FokI VDR*, co może sugerować, że wariant z przynajmniej jednym allelem C jest czynnikiem ryzyka rozwoju TAO. W badanej grupie osób rasy kaukaskiej narodowości polskiej nie stwierdzono natomiast istotnych zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR* a ryzykiem zachorowania na AITD (AIT i TAO łącznie) oraz AIT.

Nie można wykluczyć wpływu polimorfizmów genu *VDR* na obraz kliniczny AITD. W przypadku SNP *FokI* i *Cdx2* genu *VDR* zaobserwowano występowanie znamiennych różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy pacjentami z AIT a grupą z TAO. Stwierdzono także zależność pomiędzy genotypami SNP *ApaI* i *BsmI VDR* a objętością gruczołu tarczowego u chorych na AIT. Obserwacje te wymagają z pewnością potwierdzenia. Potrzeba też dalszych badań, by odpowiedzieć, jak duże jest praktyczne znaczenie obserwowanych zależności.

## 10. Abstract

Autoimmune thyroid diseases (AITD), including autoimmune thyroiditis (AIT), Graves' disease (GD) and Graves' orbitopathy (also called thyroid associated orbitopathy – TAO), are among the most common endocrine disorders. AITD are complex diseases that develop as a result of an interaction between genetic predisposition (polygenetic inheritance) and exposure to different environmental triggers. However, many of these environmental and genetic factors or their reciprocal interactions are still not well understood. Vitamin D deficiency was proposed as an environmental risk factor of AITD when the immunomodulatory function of the vitamin was described. Biosynthesis and metabolism of vitamin D are dependent on hydroxylase enzymatic activity. The active form of vitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) act through the vitamin D receptor (VDR). That is why it is expected that polymorphisms of genes associated with vitamin D may also influence the risk of AITD. Among these genetic factors, *VDR* gene has been most extensively studied, with the focus on four single nucleotide polymorphisms (SNPs): rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*ApaI*) and rs731236 (*TaqI*). Unfortunately, the obtained results are equivocal. Some studies have confirmed the role of *VDR* SNPs in the pathogenesis of AIT or GD, while others have not shown the association. There are also other SNPs in the *VDR* gene that have not yet been studied for their association with AITD. Some of these SNPs were found generally functional. One of them is rs11568820 (*Cdx2*) *VDR* SNP that was described to influence the immune system.

Therefore, the aim of the study was to assess genotype distributions and allele frequencies of five *VDR* SNPs (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236, and rs11568820) in Polish Caucasian AITD (AIT and TAO) patients in comparison to healthy volunteers, to explain the *VDR* gene role in AITD pathogenesis. Genotype and allele frequencies of studied SNPs between AIT and TAO were also compared. A secondary aim of the study was to assess the relationship between studied SNPs and selected clinical features

of AIT and TAO (e.g., age at disease onset, thyroid volume of AIT patients, thyroid nodules coexistence).

330 unrelated AITD patients (222 with AIT and 108 with TAO) and 130 control subjects, both of Polish Caucasian origin, were enrolled in the study. *VDR* polymorphisms were studied by PCR-RFLP or real-time PCR with molecular probes.

**Results:** In TAO vs. controls analysis, CC homozygote and heterozygote of *FokI* SNP were more frequent in patients (36.79% and 50.94%) comparing to controls (29.23% and 48.46%) - the difference between two groups was statistically significant in dominant inheritance model ( $p = 0.04$ ). Allelic  $p$ -value was of borderline significance ( $p = 0.05$ ). In the case of *Cdx2* *VDR* SNP, TAO vs. control analysis showed that AA homozygote was more frequent in patients than in controls (6.60% vs. 1.68%), although not significantly ( $p = 0.09$ ). Other studied SNPs did not differ significantly between TAO and controls. When comparing genotype distributions and allele frequencies of five studied *VDR* SNPs between AITD group and controls, no statistically significant differences were observed. Similarly, no differences were observed between AIT and controls.

In the case of *FokI* *VDR* SNP, CC and CT genotypes were more frequent in TAO (36.79% and 50.94%) comparing to AIT (32.43% and 44.14%). The difference was statistically significant in dominant inheritance model ( $p = 0.02$ ). Genotype distributions of *Cdx2* SNP also differed significantly between AIT and TAO ( $p = 0.02$ ) – AA homozygote was more frequent in TAO than in AIT (6.60% vs. 1.20%), while heterozygote AG was observed more frequently in AIT comparing to TAO (27.71% vs. 18.87%). In the case of other studied SNPs, no significant difference between AIT and TAO was found.

Thyroid volume of AIT patients differed significantly depending on *BsmI* and *ApaI* genotypes ( $p = 0.03$  and  $p = 0.04$ , respectively). In case of *BsmI* SNP, GG homozygotes had significantly lower thyroid volume comparing to other genotypes. On the other hand, AA homozygotes of *ApaI* SNP presented with thyroid volume higher than heterozygotes and CC homozygotes. Other analyzed clinical features of AITDs (age at onset of AIT or GD;



the time between GD and TAO diagnosis; thyroid nodule coexistence in AIT; clinical activity score in TAO) were not associated with *VDR* SNPs.

**Conclusions:** In the TAO group, CC homozygote and CT heterozygote of *FokI VDR* SNP were significantly more frequent comparing to controls, what may suggest that this polymorphism is a risk factor determining TAO development. No significant relationship between studied *VDR* SNPs and the risk of AITD or AIT was found in this group of Polish Caucasians.

Some influence of *VDR* SNPs on the clinical manifestation of AITD cannot be excluded. Genotype distributions of *FokI* and *Cdx2 VDR* SNPs differed between AIT and TAO. Moreover, there was a relationship between *BsmI* and *ApaI VDR* SNPs and thyroid volume in AIT. Further studies are needed to confirm these observations.

## 11. Bibliografia

1. Abd El Gawad SS, Abdul Samee ER, Metwali AA, Abd El Gawad MS. Vitamin D receptor gene polymorphism and its association with 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with Graves disease in an Egyptian population: a pilot study. *Endocr Pract* 2012; 18(2):132-139
2. Aboelnaga MM, Elshafei MM, Elsayed E. Vitamin D status in Egyptian euthyroid multinodular non-toxic goiter patients and its correlation with TSH levels. *Endocrinol Nutr* 2016; 63(8): 380-386
3. Aghini Lombardi F, Fiore E, Tonacchera M, Antonangeli L i wsp. The effect of voluntary iodine prophylaxis in a small rural community: the Pescopagano survey 15 years later. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 1031-1039
4. Akeno N, Smith EP, Stefan M, Huber AK i wsp. IFN- $\alpha$  mediates the development of autoimmunity by both direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms. *J Immunol* 2011; 186: 4693-4706
5. Andreoli L, Dall'Ara F, Piantoni S, Zanola A i wsp. A 24-month prospective study on the efficacy and safety of two different monthly regimens of vitamin D supplementation in pre-menopausal women with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2015; 24: 499-506
6. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev* 2015; 14: 174-180
7. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H i wsp. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997; 12(6): 915-921
8. Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H i wsp. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1256-1264
9. Aranow C, Kamen DL, Dall'Era M, Massarotti EM i wsp. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effect of vitamin D3 on the interferon signature in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 1848-1857
10. Asvold BO, Bjoro T, Nilsen TI, Vatten LJ. Tobacco smoking and thyroid function: a population-based study. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1428-1432
11. Aydınöz IE, Bingül I, Dođru-Abbasođlu S, Vural P, Uysal M. Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in vitiligo. *Dermatology* 2012; 224(4): 361-368
12. Azrielant S, Shoenfeld Y. Vitamin D and the immune system. *Isr Med Assoc J* 2017; 19(8): 510-511
13. Bae SC, Lee YH. Association between Vitamin D level and/or deficiency, and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2018; 64(1): 7-13

14. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10: 482-496
15. Bai YH, Lu H, Hong D, Lin CC i wsp. Vitamin D receptor gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a systematic meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1672-1679
16. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM i wsp. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(10): 3294-3298
17. Ban Y, Ban Y, Taniyama M, Katagiri T. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism in Japanese patients with Graves' disease. *Thyroid* 2000a; 10(5): 375-380
18. Ban Y, Greenberg DA, Concepcion E, Skrabanek L i wsp. Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(25): 15119-15124
19. Ban Y, Taniyama M, Ban Y. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with Graves' disease in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2000b; 85(12): 4639-4643
20. Ban Y, Taniyama M, Ban Y. Vitamin D receptor gene polymorphisms in Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid* 2001; 11(6): 607-608
21. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Skrabanek L i wsp. Multiple SNPs in intron 41 of thyroglobulin gene are associated with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *PLoS One* 2012; 7(5): e37501
22. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M, Ban Y. Association of a C/T single-nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the CD40 gene with Graves' disease in Japanese. *Thyroid* 2006; 16: 443-446
23. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M, Ban Y. Association of a thyroglobulin gene polymorphism with Hashimoto's thyroiditis in the Japanese population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61(2): 263-268
24. Ban Y, Tozaki T, Tobe T, Ban Y i wsp. The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. *J Autoimmun* 2007; 28: 201-207
25. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF i wsp. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; 195: 603-616
26. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21(2): 263-265
27. Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Seki N, Płoski R i wsp. Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Hum Immunol* 2004; 65(6): 632-639

28. Belguith-Maalej S, Hadj Kacem H, Rebai A, Mnif M i wsp. Thyroglobulin polymorphisms in Tunisian patients with autoimmune thyroid diseases (AITD). *Immunobiology* 2008; 213(7): 577-583
29. Belin RM, Astor BC, Powe NR, Ladenson PW. Smoke exposure is associated with a lower prevalence of serum thyroid autoantibodies and thyrotropin concentration elevation and a higher prevalence of mild thyrotropin concentration suppression in the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 6077-6086
30. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 2014; 21(3): 319-329
31. Bishop GA, Hostager BS. The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(3-4): 297-309
32. Bizzaro G, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases: facts and unresolved questions. *Immunol Res* 2015; 61(1-2): 46-52
33. Blackard J, Kong L, Huber A, Tomer Y. Hepatitis C virus infection of a thyroid cell line: implications for pathogenesis of HCV an thyroiditis. *Thyroid* 2012; 23: 863-870
34. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL i wsp. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167(9): 4974-4980
35. Bossowski A, Borysewicz-Sańczyk H, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Zasim A i wsp. Analysis of chosen polymorphisms in FoxP3 gene in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2014; 47(6): 395-400
36. Bozkurt NC, Karbek B, Ucan B, Sahin M i wsp. The association between severity of vitamin D deficiency and Hashimoto's thyroiditis. *Endocr Pract* 2013; 19(3): 479-484
37. Brand OJ, Lowe CE, Heward JM, Franklyn JA i wsp. Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 66(4): 508-512
38. Braun J, Donner H, Siegmund T, Walfish PG i wsp. CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Tissue antigens* 1998; 51: 563-566
39. Brix TH, Hansen PS, Hegedus L, Wenzel BE. Too early to dismiss *Yersinia enterocolitica* infection in the aetiology of Graves' disease: evidence from a twin case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 69: 491-496
40. Brix TH, Hegedüs L. Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76: 457-464
41. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedus L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 930-934
42. Brix TH, Kyvik KO, Hegedüs L. A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(2): 536-539
43. Burch HB, Wartofsky L. Graves' Ophthalmopathy: current concepts regarding pathogenesis and management. *Endocr Rev* 1993; 14: 747-793

44. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr* 1998; 128 (1): 68-72
45. Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr* 2000; 130 (11): 2648-2652
46. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)<sub>2</sub>D regulation of T cells. *Nutrients* 2015; 7(4): 3011-3021
47. Carlberg C. Vitamin D genomics: from in vitro to in vivo. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 250
48. Carlé A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H i wsp. Graves' hyperthyroidism and moderate alcohol consumption: evidence for disease prevention. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 79: 111-119
49. Carlé A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H i wsp. Smoking cessation is followed by a sharp but transient rise in the incidence of overt autoimmune hypothyroidism – a population-based, case–control study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77: 764-772
50. Carlé A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H i wsp. Thyroid volume in hypothyroidism due to autoimmune disease follows a unimodal distribution: evidence against primary thyroid atrophy and autoimmune thyroiditis being distinct diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(3): 833-839
51. Carling T, Rastad J, Akerström G, Westin G. Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone mRNA levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2255-2259
52. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev* 2014; 13(4-5): 391-397
53. Chen J, Bruce D, Cantorna MT. Vitamin D receptor expression controls proliferation of naive CD8<sup>+</sup> T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal inflammation. *BMC Immunol* 2014; 15: 6
54. Chen RH, Chang CT, Chen HY, Chen WC i wsp. Association between vitamin-D receptor gene FokI polymorphism and Graves' disease among Taiwanese Chinese. *J Clin Lab Anal* 2007; 21(3): 173-177
55. Chen RH, Chang CT, Chen WC, Tsai CH, Tsai FJ. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Hashimoto's thyroiditis patients. *J Clin Lab Anal* 2006; 20(6): 260-265
56. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY i wsp. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; 179: 1634-1647
57. Clark AG. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol* 2004; 27(4): 321-333
58. Collins JE, Heward JM, Howson JM, Foxall H i wsp. Common allelic variants of exons 10, 12, and 33 of the thyroglobulin gene are not associated with autoimmune thyroid disease in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 2004a; 89(12): 6336-6339

59. Collins JE, Heward JM, Nithiyananthan R, Nejentsev S i wsp. Lack of association of the vitamin D receptor gene with Graves' disease in UK Caucasians. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004b; 60(5): 618-624
60. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H i wsp. Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; 60(5): 1624-1631
61. Coussens A, Timms PM, Boucher BJ, Venton TR i wsp. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits matrix metalloproteinases induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 2009; 127: 539-548
62. Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10529-10534
63. Dai ZM, Fei YL, Zhang WG, Liu J i wsp. Association of vitamin D receptor Cdx-2 polymorphism with cancer risk: a meta-analysis. *Medicine* 2015; 94(33): e1370
64. Daly AK, Day CP. Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52(5): 489-499
65. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 23-33
66. Davies TF. Ord-Hashimoto's disease: renaming a common disorder-again. *Thyroid* 2003; 13(4): 317
67. Dechairo BM, Zabaneh D, Collins J, Brand O i wsp. Association of the TSHR gene with Graves' disease: the first disease specific locus. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 1223-1230
68. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(Suppl 6): 1689S-1696S
69. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology* 2011; 134: 123-139
70. Dickinson JL, Perera DI, van der Mei AF, Ponsonby AL, Polanowski AM. Past environmental sun exposure and risk of multiple sclerosis: a role for the Cdx-2 Vitamin D receptor variant in this interaction. *Multiple Sclerosis* 2009; 15(5): 563-570
71. Disanto G, Chaplin G, Morahan JM, Giovannoni G i wsp. Month of birth, vitamin D and risk of immune mediated disease: a case control study. *BMC Med* 2012; 10: 69
72. Djurovic J, Stojkovic O, Ozdemir O, Silan F i wsp. Association between FokI, ApaI and TaqI RFLP polymorphisms in VDR gene and Hashimoto's thyroiditis: preliminary data from female patients in Serbia. *Int J Immunogenet* 2015; 42(3): 190-194
73. Dobrakowski P, Bogocz M, Cholewa K, Rajchel M i wsp. Month of birth and level of insolation as risk factors for multiple sclerosis in Poland. *PLoS One* 2017; 12(4): e0175156
74. Dolman PJ. Grading severity and activity in thyroid eye disease. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2018; 34: 34-40

75. Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J i wsp. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 143-146
76. Duan S, Lv Z, Fan X, Wang L i wsp. Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Lett* 2014; 570: 108-113
77. Effraimidis G, Tijssen JG, Brosschot JF, Wiersinga WM. Involvement of stress in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a prospective study. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37: 1191-1198
78. Effraimidis G, Tijssen JG, Strieder TG, Wiersinga WM. No causal relationship between *Yersinia enterocolitica* infection and autoimmune thyroid disease: evidence from a prospective study. *Clin Exp Immunol* 2011; 165: 38-43
79. Effraimidis G, Wiersinga WM. Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol* 2014; 170(6): 241-252
80. Eisenbarth I, Striebel AM, Moschgath E, Vogel W, Assum G. Long-range sequence composition mirrors linkage disequilibrium pattern in a 1.13 Mb region of human chromosome 22. *Hum Mol Genet* 2001; 10(24): 2833-2839
81. Ellman P, Anderson KH. Calciferol in tuberculous peritonitis with disseminated tuberculosis. *Br Med J* 1948; 1(4547): 394
82. Erdogan M, Erdem N, Cetinkalp S, Ozgen AG i wsp. Demographic, clinical, laboratory, ultrasonographic, and cytological features of patients with Hashimoto's thyroiditis: results of a university hospital of 769 patients in Turkey. *Endocrine* 2009; 36(3):486-490
83. Everts B, Pearce EJ. Metabolic control of dendritic cell activation and function: recent advances and clinical implications. *Front Immunol* 2014; 5: 203
84. Falgarone G, Heshmati HM, Cohen R, Reach G. Role of emotional stress in the pathophysiology of Graves. *Eur J Endocrinol* 2013; 168: 13-18
85. Fang Y, Li Y, Zeng J, Wang J i wsp. Genetic association of Fc receptor-like glycoprotein with susceptibility to Graves' disease in a Chinese Han population. *Immunobiology* 2016; 221(1): 56-62
86. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M i wsp. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 2005; 77(5): 807-823
87. Fang Y, van Meurs JB, Bergink AP, Hofman A i wsp. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res* 2003; 18(9): 1632-1641
88. Feng M, Li H, Chen SF, Li WF, Zhang FB. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocrine* 2013; 43(2): 318-326
89. Feng R, Li Y, Li G, Li Z i wsp. Lower serum 25 (OH) D concentrations in type 1 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2015; 108(3): e71-75
90. Ferrari SM, Fallahi P, Galetta F, Citi E i wsp. Thyroid disorders induced by checkpoint inhibitors. *Rev Endocr Metab Disord* 2018; 19(4): 325-333

91. Fournier C, Gepner P, Sadouk M, Charreire J. In vivo beneficial effects of cyclosporine A and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 54: 53-63
92. Frederiksen B, Liu E, Romanos J, Steck AK i wsp. Investigation of the vitamin D receptor gene (VDR) and its interaction with protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 gene (PTPN2) on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 133: 51-57
93. Friedrich N, Schwarz S, Thonack J, John U i wsp. Association between parity and autoimmune thyroiditis in a general female population. *Autoimmunity* 2008; 41: 174-180
94. Fujii A, Inoue N, Watanabe M, Kawakami C i wsp. TSHR gene polymorphisms in the enhancer regions are most strongly associated with the development of Graves' disease, especially intractable disease, and of Hashimoto's disease. *Thyroid* 2017; 27(1): 111-119
95. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM i wsp. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296(5576): 2225-2229
96. Gao XR, Yu YG. Meta-analysis of the association between vitamin D receptor polymorphisms and the risk of autoimmune thyroid disease. *Int J Endocrinol* 2018; 2846943
97. Gartner R, Gasnier BC, Dietrich JW, Krebs B, Angstwurm MW. Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1687-1691
98. Giovinazzo S, Vicchio TM, Certo R, Alibrandi A i wsp. Vitamin D receptor gene polymorphisms/haplotypes and serum 25(OH)D<sub>3</sub> levels in Hashimoto's thyroiditis. *Endocrine* 2017; 55(2): 599-606
99. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *FASEB J* 2005; 19: 1067-1077
100. Gopinath K, Danda D. Supplementation of 1,25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> in patients with treatment naive early rheumatoid arthritis: a randomised controlled trial. *Int J Rheum Dis* 2011; 14: 332-339
101. Gough SC, Simmonds MJ. The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Curr Genomics* 2007; 8: 453-465
102. Gromowski T, Gapska P, Scott RJ, Kąklewski K i wsp. Serum 25(OH)D concentration, common variants of the VDR gene and lung cancer occurrence. *Int J Cancer* 2017; 141(2): 336-341
103. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML i wsp. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1850-1855



104. Grundberg E, Lau EM, Pastinen T, Kindmark A i wsp. Vitamin D receptor 3' haplotypes are unequally expressed in primary human bone cells and associated with increased fracture risk: the MrOS Study in Sweden and Hong Kong. *J Bone Miner Res* 2007; 22(6): 832-840
105. Guarneri F, Carlotta D, Saraceno G, Trimarchi F, Benvenega S. Bioinformatics support the possible triggering of autoimmune thyroid diseases by *Yersinia enterocolitica* outer membrane proteins homologous to the human thyrotropin receptor. *Thyroid* 2011; 21: 1283-1284
106. Guleryuz B, Akin F, Ata MT, Dalyanoglu MM, Turgut S. Vitamin-D Receptor (VDR) gene polymorphisms (TaqI, FokI) in Turkish patients with Hashimoto's thyroiditis: Relationship to the levels of Vit-D and cytokines. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2016; 16(2): 131-139
107. Guy M, Lowe LC, Bretherton-Watt D, Mansi JL i wsp. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5472-5481
108. Hammerstad SS, Jahnsen FL, Tauriainen S, Hyoty H i wsp. Inflammation and increased myxovirus resistance protein A expression in thyroid tissue in the early stages of Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid* 2013; 23: 334-341
109. Hansen KE, Bartels CM, Gangnon RE, Jones AN, Gogineni J. An evaluation of high-dose vitamin D for rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2014; 20: 112-114
110. Hansen PS, Brix TH, Bennedbaek FN, Bonnema SJ i wsp. Genetic and environmental causes of individual differences in thyroid size: a study of healthy Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5): 2071-2077
111. Hansen PS, Brix TH, Iachine I, Kyvik KO, Hegedus L. The relative importance of genetic and environmental effects for the early stages of thyroid autoimmunity: a study of healthy Danish twins. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 29-38
112. Harishankar M, Selvaraj P. Influence of Cdx2 and TaqI gene variants on Vitamin D3 modulated intracellular chemokine positive T-Cell subsets in pulmonary tuberculosis. *Clin Ther* 2017; 39(5): 946-957
113. Harishankar M, Selvaraj P. Regulatory role of Cdx-2 and Taq I polymorphism of vitamin D receptor gene on chemokine expression in pulmonary tuberculosis. *Hum Immunol* 2016; 77: 498-505
114. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1043-1048
115. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116(8): 2062-2072
116. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH i wsp. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(2): 489-499

117. Holmøy T, Torkildsen Ø, Myhr KM, Løken-Amsrud KI. Vitamin D supplementation and monitoring in multiple sclerosis: who, when and wherefore. *Acta Neurol Scand* 2012; (Suppl 195): 63-69
118. Hong LH. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and Hashimoto's thyroiditis. *Medical Information* 2011; 2: 2963-2964
119. Horst-Sikorska W, Ignaszak-Szczepaniak M, Marcinkowska M, Kaczmarek M i wsp. Association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density in young women with Graves' disease. *Acta Biochim Pol* 2008; 55(2): 371-380
120. Houcken J, Degenhart C, Bender K, König J i wsp. PTPN22 and CTLA-4 Polymorphisms Are Associated With Polyglandular Autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103(5): 1977-1984
121. Huber AK, Jacobson EM, Jazdzewski K, Concepcion ES, Tomer Y. Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 93(3): 1077-1081
122. Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2660-2671
123. Ingles SA, Haile RW, Henderson BE, Kolonel LN i wsp. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 93-98
124. Inoue N, Watanabe M, Ishido N, Katsumata Y i wsp. The functional polymorphisms of VDR, GC and CYP2R1 are involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2014; 178(2): 262-269
125. Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R i wsp. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2010; 162(3): 402-406
126. Iqbal MUN, Khan TA, Maqbool SA. Vitamin D receptor Cdx-2 polymorphism and premenopausal breast cancer risk in southern Pakistani patients. *PLoS One* 2015; 10(3): e0122657
127. Iqbal MUN, Khan TA. Association between Vitamin D receptor (Cdx2, Fok1, Bsm1, Apa1, Bgl1, Taq1, and Poly (A)) gene polymorphism and breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol* 2017; 39(10): 1010428317731280
128. Ishaq HM, Mohammad IS, Guo H, Shahzad M i wsp. Molecular estimation of alteration in intestinal microbial composition in Hashimoto's thyroiditis patients. *Biomed Pharmacother* 2017; 95: 865-874
129. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 223-243
130. Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene

- translation: a case for translational pathophysiology. *Endocrinology* 2005; 146(6): 2684-2691
131. Jacobson EM, Huber A, Tomer Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. *J Autoimmun* 2008; 30(1-2): 58-62
  132. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y i wsp. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009; 183(9): 5458-5467
  133. Jin GX, Zhou YY, Yu L, Bi YX. Correlation between single nucleotide polymorphism of FCRL-3 gene and Graves' disease in Han population of northern Anhui province, China. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(8): 12624-12630
  134. Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, Gaffen SL i wsp. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 3653-3669
  135. Jung JH, Song GG, Kim JH, Choi SJ. Association of interleukin 10 gene polymorphisms with autoimmune thyroid disease: meta-analysis. *Scand J Immunol* 2016; 84(5): 272-277
  136. Jurecka-Lubieniecka B, Bednarczuk T, Ploski R, Krajewska J i wsp. Differences in gene-gene interactions in Graves' disease patients stratified by age of onset. *PLoS One* 2016; 11(3): e0150307
  137. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD i wsp. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoform influences transcriptional activity by modulation interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 401-420
  138. Kahn HS, Morgan TM, Case LD, Dabelea D i wsp. Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care* 2009; 32 (11): 2010-2015
  139. Kamizono S, Hiromatsu Y, Seki N, Bednarczuk T i wsp. A polymorphism of the 5' flanking region of tumour necrosis factor alpha gene is associated with thyroid-associated ophthalmopathy in Japanese. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 52(6): 759-764
  140. Karanikas G, Schuetz M, Kontur S, Duan H i wsp. No immunological benefit of selenium in consecutive patients with autoimmune thyroiditis. *Thyroid* 2008; 18: 7-12
  141. Kawakami-Tani T, Fukawa E, Tanaka H, Abe Y, Makino I. Effect of a alpha-hydroxyvitamin D3 on serum levels of thyroid hormones in hyperthyroidism patients with untreated Graves' disease. *Metabolism* 1997; 46: 1184-1188
  142. Kendall-Taylor P, Perros P. Clinical presentation of thyroid associated orbitopathy. *Thyroid* 1998; 8(5): 427-428
  143. Khadzkou K, Buchwald P, Westin G, Dralle H, Akerström G. 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor expression in papillary thyroid carcinoma. *J Histochem Cytochem* 2006; 54(3): 355-361
  144. Khalilzadeh O, Anvari M, Esteghamati A, Mahmoudi M i wsp. Graves' ophthalmopathy and gene polymorphisms in interleukin-1alpha, interleukin-1beta,

- interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist. *Clin Exp Ophthalmol* 2009; 37: 614-619
145. Khalilzadeh O, Noshad S, Rashidi A, Amirzargar A. Graves' orbitopathy: a review of immunogenetics. *Curr Genomics* 2011; 12(8): 564-575
  146. Kibirige D, Luzinda K, Ssekitoleko R. Spectrum of lithium induced thyroid abnormalities: a current perspective. *Thyroid Res* 2013; 6(1): 3
  147. Kim TY, Park YJ, Hwang JK, Song JY i wsp. A C/T polymorphism in the 5'-untranslated region of the CD40 gene is associated with Graves' disease in Koreans. *Thyroid* 2003; 13: 919-925
  148. Kocabaş A, Karagüzel G, Imir N, Yavuzer U, Akçurin S. Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to disease and bone mineral density in Turkish patients with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2010; 23(12): 1289-1297
  149. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB i wsp. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet* 2005; 37(5): 478-485
  150. Koeffler HP, Amatruda T, Ikekawa N, Kobayashi Y, DeLuca HF. Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its fluorinated analogues. *Cancer Res* 1984; 44: 5624-5628
  151. Korf H, Wenes M, Stijlemans B, Takiishi T i wsp. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology* 2012; 217(12): 1292-1300
  152. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 46: 551-554
  153. Krassas GE, Tziomalos K, Pontikides N, Lewy H, Laron Z. Seasonality of month of birth of patients with Graves' and Hashimoto's diseases differ from that in the general population. *Eur J Endocrinol* 2007; 156(6): 631-636
  154. Krysiak R, Szkróbka W, Okopień B. The effect of vitamin D on thyroid autoimmunity in levothyroxine-treated women with Hashimoto's thyroiditis and normal vitamin D status. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2017; 125(4): 229-233
  155. Kuryłowicz A, Kula D, Ploski R, Skorka A i wsp. Association of CD40 gene polymorphism (C-1T) with susceptibility and phenotype of Graves' disease. *Thyroid* 2005; 15: 1119-1124
  156. Łącka K, Maciejewski A. Rola procesu apoptozy w etiopatogenezie autoimmunologicznego zapalenia tarczycy. *Pol Merkur Lekarski* 2012; 32(188): 87-92
  157. Łącka K, Maciejewski A. Współczesne poglądy na temat etiopatogenezy autoimmunologicznego zapalenia tarczycy (choroby Hashimoto). *Pol Merkur Lekarski* 2011; 30(176): 132-138
  158. Łącka K, Paradowska-Gorycka A, Maciejewski A, Kramer L i wsp. Interleukin 1 beta (IL 1 beta) gene polymorphisms (SNP-511 and SNP+3953) in Hashimoto's thyroiditis among the Polish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014; 122(9): 544-547

159. Łącka K, Szeliga A. Significance of selenium in thyroid physiology and pathology. *Pol Merkur Lekarski* 2015; 38(228): 348-353
160. Lahooti H, Wise B, Tjiang H, Champion B, Wall J. Vitamin D deficiency may be a risk factor for ophthalmopathy in patients with Graves' hyperthyroidism but not Hashimoto's thyroiditis. *Ophthalmol Res An Int J* 2014; 2(1): 10-17
161. Latrofa F, Fiore E, Rago T, Antonangeli L i wsp. Iodine contributes to thyroid autoimmunity in humans by unmasking a cryptic epitope on thyroglobulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 1768-1774
162. Lee HJ, Li CW, Hammerstad SS, Stefan M, Tomer Y. Immunogenetics of autoimmune thyroid diseases: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2015; 64: 82-90
163. Lee JH, Lee SY, Yoon JS. Risk factors associated with the severity of thyroid-associated orbitopathy in Korean patients. *Korean J Ophthalmol* 2010; 24(5): 267-273
164. Lee S, Kim BJ, Lee CH, Lee WS. Increased prevalence of vitamin D deficiency in patients with alopecia areata: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; 32(7): 1214-1221
165. Lee YH, Bae SC. Vitamin D level in rheumatoid arthritis and its correlation with the disease activity: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34(5): 827-833
166. Lee YH, Gyu Song G. Vitamin D receptor FokI, BsmI, TaqI, ApaI, and EcoRV polymorphisms and susceptibility to melanoma: a meta-analysis. *J BUON* 2015; 20(1): 235-243
167. Lemire JM. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 599-602
168. Lepez T, Vandewoestyne M, Hussain S, van Nieuwerburgh F i wsp. Fetal microchimeric cells in blood of women with an autoimmune thyroid disease. *PLoS One* 2011; 6: e29646
169. Lin WY, Wan L, Tsai CH, Chen RH i wsp. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with risk of Hashimoto's thyroiditis in Chinese patients in Taiwan. *J Clin Lab Anal* 2006; 20(3): 109-112
170. Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, Wallace DJ, Koeffler HP. Vitamin D 3 and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clin Immunol* 2001; 99(1): 82-93
171. Liu C, Lu M, Xia X, Wang J i wsp. Correlation of serum vitamin D level with type 1 diabetes mellitus in children: a meta-analysis. *Nutr Hosp* 2015; 32(4): 1591-1594
172. Liu L, Wu HQ, Wang Q, Zhu YF i wsp. Association between thyroid stimulating hormone receptor gene intron polymorphisms and autoimmune thyroid disease in a Chinese Han population. *Endocr J* 2012; 59(8): 717-723
173. Liu S, Cai H, Cheng W, Zhang H i wsp. Association of VDR polymorphisms (Taq I and Bsm I) with prostate cancer: a new meta-analysis. *J Int Med Res* 2017; 45(1): 3-10
174. Lu C, Yang J, Yu W, Li D i wsp. Association between 25(OH)D level, ultraviolet exposure, geographical location, and inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10(7): e0132036

175. Luo L, Cai B, Liu F, Hu X, Wang L. Association of Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor 22 (PTPN22) C1858T gene polymorphism with susceptibility to autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocr J* 2012; 59(5): 439-445
176. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE i wsp. Vitamin D receptor gene polymorphisms and epithelial ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2566-2571
177. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190: 372-373
178. Maalej A, Petit-Teixeira E, Chabchoub G, Hamad MB i wsp. Lack of association of VDR gene polymorphisms with thyroid autoimmune disorders: familial and case/control studies. *J Clin Immunol* 2008; 28(1): 21-25
179. Maciejewski A, Wójcicka M, Roszak M, Losy J, Łącka K. Assessment of vitamin D level in autoimmune thyroiditis patients and a control group in the Polish population. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24(5): 801-806
180. Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003; 89(5): 922-932
181. Mao S, Huang S. Association between vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2014; 34(3): 381-388
182. Marcocci M, Kahaly GJ, Krassas GE, Bartalena L i wsp. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N Engl J Med* 2011; 364: 1920-1931
183. Margolis RN, Christakos S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. An update. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192: 208-214
184. McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 1922; 53: 293-312
185. McLeod DS, Cooper DS, Ladenson PW, Whiteman DC, Jordan SJ. Race/Ethnicity and the prevalence of thyrotoxicosis in young Americans. *Thyroid* 2015; 25(6): 621-628
186. Meng S, He ST, Jiang WJ, Xiao L i wsp. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid diseases in a Chinese Han population: Role of vitamin D receptor gene polymorphisms. *Ann Endocrinol (Paris)* 2015; 76(6): 684-689
187. Mi YY, Chen YZ, Chen J, Zhang LF i wsp. Updated analysis of vitamin D receptor gene FokI polymorphism and prostate cancer susceptibility. *Arch Med Sci* 2016; 13(6): 1449-1458
188. Mirhosseini N, Brunel L, Muscogiuri G, Kimball S. Physiological serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with improved thyroidfunction-observations from a community-based program. *Endocrine* 2017; 58(3): 563-573
189. Mizwicki MT, Norman AW. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal* 2009; 2(75): re4

190. Mori K, Nakagawa Y, Ozaki H. Does the gut microbiota trigger Hashimoto's thyroiditis? *Discov Med* 2012; 14: 321-326
191. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ i wsp. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284 -287
192. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6665-6669
193. Nalbant A, Aydin A, Karacan A, Onmez A i wsp. Association of vitamin D insufficiency/deficiency with thyroid artery Doppler ultrasonography in patients with Hashimoto thyroiditis. *Med Sci* 2017; 33(2): 295-299
194. Negro R, Greco G, Mangieri T, Pezzarossa A i wsp. The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1263-1268
195. Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, Howson JM i wsp. Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 2709-2712
196. Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism* 2002; 51(3): 356-359
197. Ovsyannikova IG, Dhiman N, Haralambieva IH, Vierkant RA i wsp. Rubella vaccine-induced cellular immunity: evidence of associations with polymorphisms in the Toll-like, vitamin A and D receptors, and innate immune response genes. *Hum Genet* 2010; 127(2): 207-221
198. Owen CJ, Kelly H, Eden JA, Merriman ME i wsp. Analysis of the Fc receptor-like-3 (FCRL3) locus in Caucasians with autoimmune disorders suggests a complex pattern of disease association. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3): 1106-1111
199. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C i wsp. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron* 2000; 85(1): 86-91
200. Pazderska A, Fichna M, Mitchell AL, Napier CM i wsp. Impact of month of birth on the risk of development of autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(11): 4214-4218
201. Pedersen IB, Knudsen N, Carle A, Vejbjerg P i wsp. A cautious iodization program 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: 120-126
202. Pedersen IB, Laurberg P, Knudsen N, Jorgensen T i wsp. An increased incidence of overt hypothyroidism after iodine fortification of salt in Denmark: a prospective population study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3122-3127
203. Pedersen OM, Aardal NP, Larssen TB, Varhaug JE i wsp. The value of ultrasonography in predicting autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2000; 10: 251-259
204. Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hirsch N i wsp. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 2009; 19(6): 623-628

205. Petri M, Bello KJ, Fang H, Magder LS. Vitamin D in systemic lupus erythematosus: modest association with disease activity and the urine protein-to-creatinine ratio. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 1865-1871
206. Pichler J, Gerstmayr M, Szépfalusi Z, Urbanek R i wsp. 1 alpha,25(OH)2D3 inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatr Res* 2002; 52(1): 12-18
207. Pike JW, Meyer MB, Benkusky NA, Lee SM i wsp. Genomic determinants of vitamin D-regulated gene expression. *Vitam Horm* 2015; 100: 21-44
208. Pishdad P, Pishdad GR, Tavana S, Pishdad R, Jalli R. Thyroid ultrasonography in differentiation between Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Biomed Phys Eng* 2017; 7(1): 21-26
209. Planck T, Shahida B, Malm J, Manjer J. Vitamin D in Graves disease: Levels, correlation with laboratory and clinical parameters, and genetics. *Eur Thyroid J* 2017; 7(1): 27-33
210. Ploski R, Brand OJ, Jurecka-Lubieniecka B, Franaszczyk M i wsp. Thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) intron 1 variants are major risk factors for Graves' disease in three European Caucasian cohorts. *PLoS One* 2010; 5: e15512
211. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients* 2013; 5(7): 2502-2521
212. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ i wsp. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res* 2010; 20(10): 1352-1360
213. Ramos-Lopez E, Kuryłowicz A, Bednarczuk T i wsp. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. *Thyroid* 2005; 15(10): 1125-1130
214. Reddy SV, Jain A, Yadav SB, Sharma K, Bhatia E. Prevalence of Graves' ophthalmopathy in patients with Graves' disease presenting to a referral centre in north India. *Indian J Med Res* 2014; 139(1): 99-104
215. Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J i wsp. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 2001; 411(6834): 199-204
216. Rigby WF, Stacy T, Fanger MW. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Clin Invest* 1984; 74(4): 1451-1455
217. Ringold DA, Nicoloff JT, Kesler M, Davis H i wsp. Further evidence for a strong genetic influence on the development of autoimmune thyroid disease: the California twin study. *Thyroid* 2002; 12(8): 647-653
218. Rizzo M, Rossi RT, Bonaffini O, Scisca C i wsp. Increased annual frequency of Hashimoto's thyroiditis between years 1988 and 2007 at a cytological unit of Sicily. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010; 71: 525-534
219. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol* 2009; 169(4): 505-514



220. Rotondi M, de Martinis L, Coperchini F, Pignatti P i wsp. Serum negative autoimmune thyroiditis displays a milder clinical picture compared with classic Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 2014; 171(1): 31-36
221. Sadeghian M, Saneei P, Siassi F, Esmailzadeh A. Vitamin D status in relation to Crohn's disease: Meta-analysis of observational studies. *Nutrition* 2016; 32(5): 505-514
222. Sahin OA, Goksen D, Ozpinar A, Serdar M, Onay H. Association of vitamin D receptor polymorphisms and type 1 diabetes susceptibility in children: a meta-analysis. *Endocr Connect* 2017; 6(3): 159-171
223. Salesi M, Farajzadegan Z. Efficacy of vitamin D in patients with active rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy. *Rheumatol Int* 2012; 32: 2129-2133
224. Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyarani M, Narayanan PR. Regulatory region polymorphisms of vitamin D receptor gene in pulmonary tuberculosis patients and normal healthy subjects of south India. *Int J Immunogenet* 2008; 35(3): 251-254
225. Serrano D, Gnagnarella P, Raimondi S, Gandini S. Meta-analysis on vitamin D receptor and cancer risk: focus on the role of TaqI, ApaI, and Cdx-2 polymorphisms. *Eur J Cancer Prev* 2016; 25(1): 85-96
226. Shen L, Zhuang QS, Ji HF. Assessment of vitamin D levels in type 1 and type 2 diabetes patients: Results from metaanalysis. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60(5): 1059-1067
227. Sheriba N, Abushady MM, Abdelsalam MM, Eliwa TF, Almasr MS. Vitamin D levels in Graves' disease with and without exophthalmos: a case-control study. 18th European Congress of Endocrinology. Monachium, Niemcy. 28-31 maja 2016
228. Simmonds MJ, Howson JM, Heward JM, Carr-Smith J i wsp. A novel and major association of HLA-C in Graves' disease that eclipses the classical HLA-DRB1 effect. *Hum Mol Genet* 2007; 16(18): 2149-2153
229. Simmonds MJ, Kavvoura FK, Brand OJ, Newby PR i wsp. Skewed X chromosome inactivation and female preponderance in autoimmune thyroid disease: an association study and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 127-131
230. Simsek Y, Cakır I, Yetmis M, Dizdar OS i wsp. Effects of Vitamin D treatment on thyroid autoimmunity. *J Res Med Sci* 2016; 21: 85
231. Sloka S, Silva C, Wang J, Yong VW. Predominance of Th2 polarization by vitamin D through a STAT6 dependent mechanism. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 56
232. Song GG, Bae SC, Lee YH. Vitamin D receptor FokI, BsmI, and TaqI polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Z Rheumatol* 2016; 75(3): 322-329
233. Song ZY, Liu W, Xue LQ, Pan CM i wsp. Dense mapping of IL2RA shows no association with Graves' disease in Chinese Han population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 79(2): 267-274
234. Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. *J Immunol* 2002; 168(3): 1181-1189

235. Stefan M, Faustino LC. Genetics of thyroid-stimulating hormone receptor – relevance for autoimmune thyroid disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017; 8: 57
236. Stefanić M, Karner I, Glavas-Obrovac L, Papić S i wsp. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with susceptibility to Graves' disease in Eastern Croatian population: case-control study. *Croat Med J* 2005; 46(4): 639-646
237. Stefanić M, Papić S, Suver M, Glavas-Obrovac L, Karner I. Association of vitamin D receptor gene 3'-variants with Hashimoto's thyroiditis in the Croatian population. *Int J Immunogenet* 2008; 35(2): 125-131
238. Stewart N, Simpson S Jr, van der Mei I, Ponsonby AL i wsp. Interferon- $\beta$  and serum 25-hydroxyvitamin D interact to modulate relapse risk in MS. *Neurology* 2012; 79: 254-260
239. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF i wsp. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 2008; 358: 2355-2365
240. Takashima S, Matsuzuka F, Nagareda T, Tomiyama N, Kozuka T. Thyroid nodules associated with Hashimoto's thyroiditis: assessment with US. *Radiology* 1992; 185: 125-130
241. Teng W, Shan Z, Teng X, Guan H i wsp. Effect of iodine intake on thyroid diseases in China. *N Engl J Med* 2006; 354(26): 2783-2793
242. Terrier B, Derian N, Schoindre Y, Chacara W i wsp. Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation. *Arthritis Res Ther* 2012; 14: R221
243. Tizaoui K, Hamzaoui K. Association between VDR polymorphisms and rheumatoid arthritis disease: Systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Immunobiology* 2015; 220(6):807-16.
244. Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T i wsp. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1003-1009
245. Tomer Y, Concepcion E, Greenberg DA. A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. *Thyroid* 2002; 12: 1129-1135
246. Tomer Y, Davies TF. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr Rev* 2003; 24: 694-717
247. Tomer Y, Hasham A, Davies TF, Stefan M i wsp. Fine mapping of loci linked to autoimmune thyroid disease identifies novel susceptibility genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(1): E144-152
248. Tomer Y, Menconi F, Davies TF, Barbesino G i wsp. Dissecting genetic heterogeneity in autoimmune thyroid diseases by subset analysis. *J Autoimmun* 2007; 29: 69–77
249. Tomer Y. Hepatitis C and interferon induced thyroiditis. *J Autoimmun* 2010; 34(3): J322-J326
250. Toubi E, Shoenfeld Y. The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity* 2004; 37: 457-464

251. Trochoutsou AI, Kloukina V, Samitas K, Xanthou G. Vitamin-D in the immune system: genomic and non-genomic actions. *Mini Rev Med Chem* 2015; 15(11): 953-963
252. Tu Y, Fan G, Zeng T, Cai X, Kong W. Association between polymorphism within interleukin related genes and Graves' disease: a meta-analysis of 22 case-control studies. *Oncotarget* 2017; 8(58): 98993-99002
253. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D i wsp. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1977; 7(6): 481-493
254. Tunbridge WM, Vanderpump MP. Population screening for autoimmune thyroid disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29: 239-253
255. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J i wsp. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506-511
256. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338(2): 143-156
257. Umar M, Sastry KS, Chouchane AI. Role of vitamin D beyond the skeletal function: A review of the molecular and clinical studies. *Int J Mol Sci* 2018; 19(6): E1618
258. Upala S, Sanguankeo A. Low 25-hydroxyvitamin D levels are associated with vitiligo: a systematic review and meta-analysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2016; 32(4): 181-90
259. Vahabi Anaraki P, Aminorroaya A, Amini M, Momeni F i wsp. Effect of Vitamin D deficiency treatment on thyroid function and autoimmunity markers in Hashimoto's thyroiditis: A double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *J Res Med Sci* 2017; 22: 103
260. Valdés S, Maldonado-Araque C, Lago-Sampedro A, Lillo JA i wsp. Population-Based National Prevalence of Thyroid Dysfunction in Spain and Associated Factors: Di@bet.es Study. *Thyroid* 2017; 27(2): 156-166
261. Van Etten E, Branisteanu DD, Overbergh L, Bouillon R i wsp. Combination of a 1,25-dihydroxyvitamin D3 analog and a bisphosphonate prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and preserves bone. *Bone* 2003; 32(4): 397-404
262. Van Etten E, Stoffels K, Gysemans C, Mathieu C, Overbergh L. Regulation of vitamin D homeostasis: implications for the immune system. *Nutr Rev* 2008; 66(10 Suppl 2): S125-S134
263. Van Etten E, Verlinden L, Giuliotti A, Ramos-Lopez E i wsp. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol* 2007; 37(2): 395-405
264. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D i wsp. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43: 55-68
265. Vanderpump MP. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 2011; 99: 39-51
266. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ i wsp. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11): 5862-5865

267. Verbeek W, Gombart AF, Shiohara M, Campbell M, Koeffler HP. Vitamin D receptor: no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the Taq I restriction enzyme polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238(1): 77-80
268. Vestergaard P. Smoking and thyroid disorders – a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2002; 146(2): 153-161
269. Wang B, Shao X, Song R, Xu D, Zhang JA. The emerging role of epigenetics in autoimmune thyroid diseases. *Front Immunol* 2017; 8: 396
270. Wang C, Crapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1997; 26: 189-218
271. Wang G, Zhang Q, Xu N, Xu K i wsp. Associations between two polymorphisms (FokI and BsmI) of vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus in Asian population: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9(3): e89325
272. Wang J, Lv S, Chen G, Gao C i wsp. Meta-analysis of the association between vitamin D and autoimmune thyroid disease. *Nutrients* 2015; 7(4): 2485-2498
273. Wang L, Ma J, Manson JE, Buring JE i wsp. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of hypertension in men. *Eur J Nutr* 2013; 52(7): 1771-1779
274. Wang S, Wu Y, Zuo Z, Zhao Y, Wang K. The effect of vitamin D supplementation on thyroid autoantibody levels in the treatment of autoimmune thyroiditis: a systematic review and a meta-analysis. *Endocrine* 2018; 59(3): 499-505
275. Wang SH, Koenig RJ, Giordano TJ, Myc A i wsp. Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 up-regulates Bcl-2 expression and protects normal human thyrocytes from programmed cell death. *Endocrinology* 1999; 140(4): 1649-1656
276. Wang X, Cheng W, Ma Y, Zhu J. Vitamin D receptor gene FokI but not TaqI, ApaI, BsmI polymorphism is associated with Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Sci Rep* 2017; 7: 41540
277. Weetman AP. Immune reconstitution syndrome and the thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23(6): 693-702
278. Wiersinga WM, Bartalena L. Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2002; 12(10): 855-860
279. Wiersinga WM. Clinical Relevance of Environmental Factors in the Pathogenesis of Autoimmune Thyroid Disease. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2016; 31(2): 213-222
280. Willms A, Bieler D, Wieler H, Willms D i wsp. Correlation between sonography and antibody activity in patients with Hashimoto thyroiditis. *J Ultrasound Med* 2013; 32(11): 1979-1986
281. Wong KH, Rong SS, Chong KK, Young AL i wsp. Genetic associations of interleukin-related genes with Graves' ophthalmopathy: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015; 5: 16672
282. Xu H, Li S, Qiu JQ, Gao XL i wsp. The VDR gene FokI polymorphism and ovarian cancer risk. *Tumour Biol* 2013; 34(6): 3309-3316

283. Xu MY, Cao B, Yin J, Wang DF i wsp. Vitamin D and Graves' disease: a meta-analysis update. *Nutrients* 2015; 7(5): 3813-3827
284. Yamamoto H, Miyamoto K, Li B, Taketani Y i wsp. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 240-247
285. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 41-45
286. Yang J, Qin Q, Yan N, Zhu YF i wsp. CD40 C/T(-1) and CTLA-4 A/G(49) SNPs are associated with autoimmune thyroid diseases in the Chinese population. *Endocrine* 2012; 41(1): 111-115
287. Yazici D, Yavuz D, Tarcin O, Sancak S i wsp. Vitamin D receptor gene ApaI, TaqI, FokI and BsmI polymorphisms in a group of Turkish patients with Hashimoto's thyroiditis. *Minerva Endocrinol* 2013; 38(2): 195-201
288. Yeh HC, Futterweit W, Gilbert P. Micronodulation: ultrasonographic sign of Hashimoto thyroiditis. *J Ultrasound Med* 1996; 15(12): 813-819
289. Yesil S, Tanyildiz HG, Tekgunduz SA, Toprak S i wsp. Vitamin D receptor polymorphisms in immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Int* 2017; 59(6): 682-685
290. Yin X, Latif R, Bahn R, Davies TF. Genetic profiling in Graves' disease: further evidence for lack of a distinct genetic contribution to Graves' orbitopathy. *Thyroid* 2012; 22(7): 730-735
291. Yu F, Cui LL, Li X, Wang CJ i wsp. The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr* 2016; 25(3): 614-624
292. Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Yang CS i wsp. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe* 2009; 6(3): 231-243
293. Zarrin R, Bagheri M, Mehdizadeh A, Ayremlou P, Faghfour AH. The association of FokI and ApaI polymorphisms in vitamin D receptor gene with autoimmune thyroid diseases in the northwest of Iran. *Med J Islam Repub Iran* 2018; 32: 4
294. Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys* 2003; 417(1): 77-80
295. Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW. Enhancers located within two introns of the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Endocrinol* 2006; 20(6): 1231-1247
296. Zhang YJ, Zhang L, Chen SY, Yang GJ i wsp. Association between VDR polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Neurol Sci* 2018; 39(2): 225-234
297. Zhao F, Feng J, Li J, Zhao L i wsp. Alterations of the gut microbiota in Hashimoto's thyroiditis patients. *Thyroid* 2018; 28(2): 175-186

298. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT i wsp. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 2007; 445(7130): 936-940
299. Zhou X, Xu LD, Li YZ. The association of polymorphisms of the vitamin D receptor gene with psoriasis in the Han population of northeastern China. *J Dermatol Sci* 2014; 73(1): 63-66
300. Zhu Y, Mahon BD, Froicu M, Cantorna MT. Calcium and 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 target the TNF-alpha pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 2005; 35 (1): 217-224
301. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 2008; 93: 512-517

## 12. Spis tabel i rycin

<b>Tabela 1.</b> Charakterystyka grup pacjentów (AIT i TAO) oraz grupy kontrolnej .....	43
<b>Tabela 2.</b> Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genu <i>VDR</i> .....	48
<b>Tabela 3.</b> Warunki reakcji PCR dla polimorfizmu <i>Cdx2</i> genu <i>VDR</i> .....	57
<b>Tabela 4.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>FokI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej .....	62
<b>Tabela 5.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>FokI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej .....	63
<b>Tabela 6.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>FokI</i> genu <i>VDR</i> w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej .....	64
<b>Tabela 7.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>FokI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO.....	65
<b>Tabela 8.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>BsmI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej .....	67
<b>Tabela 9.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>BsmI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej .....	68
<b>Tabela 10.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>BsmI</i> genu <i>VDR</i> w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej .....	69
<b>Tabela 11.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>BsmI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO.....	69
<b>Tabela 12.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>ApaI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej .....	71
<b>Tabela 13.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>ApaI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej .....	72
<b>Tabela 14.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>ApaI</i> genu <i>VDR</i> w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej .....	73
<b>Tabela 15.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>ApaI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO.....	74
<b>Tabela 16.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>TaqI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej .....	75
<b>Tabela 17.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>TaqI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej .....	76
<b>Tabela 18.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>TaqI</i> genu <i>VDR</i> w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej .....	77
<b>Tabela 19.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>TaqI</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO.....	78
<b>Tabela 20.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>Cdx2</i> genu <i>VDR</i> w grupie AITD w porównaniu do grupy kontrolnej .....	81

<b>Tabela 21.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>Cdx2</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy kontrolnej .....	82
<b>Tabela 22.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>Cdx2</i> genu <i>VDR</i> w grupie TAO w porównaniu do grupy kontrolnej .....	83
<b>Tabela 23.</b> Częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu <i>Cdx2</i> genu <i>VDR</i> w grupie AIT w porównaniu do grupy TAO.....	84
<b>Tabela 24.</b> Charakterystyka podgrup AIT ze zmianami ogniskowymi oraz AIT bez zmian ogniskowych.....	85
<b>Tabela 25.</b> Częstości genotypów oraz alleli wybranych polimorfizmów genu <i>VDR</i> w grupie AIT ze zmianami ogniskowymi w porównaniu do AIT bez zmian ogniskowych .....	86
<b>Tabela 26.</b> Porównanie podgrup pacjentów z AIT utworzonych według genotypów SNP <i>BsmI VDR</i> .....	91
<b>Tabela 27.</b> Porównanie podgrup pacjentów z AIT utworzonych według genotypów SNP <i>ApaI VDR</i> .....	91
<b>Tabela 28.</b> Częstości genotypów oraz alleli badanych polimorfizmów genu <i>VDR</i> w grupie TAO A w porównaniu do grupy TAO B.....	99
<b>Tabela 29.</b> Częstości genotypów oraz alleli badanych polimorfizmów genu <i>VDR</i> w grupach według wartości CAS u pacjentów z TAO.....	101
<b>Tabela 30.</b> Nierównowaga sprzężeń pomiędzy wybranymi polimorfizmami genu <i>VDR</i> .	102
<b>Tabela 31.</b> Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z AITD w stosunku do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe według Gabriel i wsp.).....	104
<b>Tabela 32.</b> Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z AITD w stosunku do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe według solid spine of LD) .....	105
<b>Tabela 33.</b> Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z AIT w stosunku do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe według Gabriel i wsp.).....	105
<b>Tabela 34.</b> Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z TAO w stosunku do grupy kontrolnej (bloki haplotypowe według Gabriel i wsp.).....	106
<b>Tabela 35.</b> Porównanie częstości haplotypów u pacjentów z AIT w stosunku do grupy TAO (bloki haplotypowe według Gabriel i wsp.) .....	107
<b>Tabela 36.</b> Charakterystyka publikacji na temat znaczenia polimorfizmów genu <i>VDR</i> w etiopatogenezie AITD.....	109
<b>Rycina 1.</b> Metabolizm witaminy D.....	22
<b>Rycina 2.</b> Budowa genu <i>VDR</i> .....	24
<b>Rycina 3.</b> Rozkład płci w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.....	43
<b>Rycina 4.</b> Produkt reakcji PCR dla polimorfizmu <i>FokI VDR</i> .....	49
<b>Rycina 5.</b> Produkt reakcji PCR dla polimorfizmu <i>BsmI VDR</i> .....	49
<b>Rycina 6.</b> Produkt reakcji PCR dla polimorfizmów <i>TaqI</i> oraz <i>ApaI VDR</i> .....	49
<b>Rycina 7.</b> Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem <i>FokI</i> .....	60
<b>Rycina 8.</b> Sekwencjonowanie fragmentu genu <i>VDR</i> zawierającego polimorfizm <i>FokI</i> .....	61
<b>Rycina 9.</b> Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem <i>BsmI</i> .....	65
<b>Rycina 10.</b> Sekwencjonowanie fragmentu genu <i>VDR</i> zawierającego polimorfizm <i>BsmI</i> ...	66



<b>Rycina 11.</b> Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem <i>ApaI</i> .....	70
<b>Rycina 12.</b> Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia enzymem <i>TaqI</i> .....	74
<b>Rycina 13.</b> Wykres krzywych amplifikacyjnych uzyskanych w reakcji real-time PCR – SNP <i>Cdx2</i> genu <i>VDR</i> .....	79
<b>Rycina 14.</b> Sekwencjonowanie fragmentu genu <i>VDR</i> zawierającego polimorfizm <i>Cdx2</i> ... 80	
<b>Rycina 15.</b> Zależność pomiędzy genotypami SNP <i>BsmI</i> genu <i>VDR</i> a objętością tarczycy u chorych na AIT .....	88
<b>Rycina 16.</b> Zależność pomiędzy genotypami SNP <i>ApaI</i> genu <i>VDR</i> a objętością tarczycy u chorych na AIT .....	88
<b>Rycina 17.</b> Zależność pomiędzy genotypami SNP <i>FokI</i> genu <i>VDR</i> a objętością tarczycy u chorych na AIT .....	89
<b>Rycina 18.</b> Zależność pomiędzy genotypami SNP <i>TaqI</i> genu <i>VDR</i> a objętością tarczycy u chorych na AIT .....	89
<b>Rycina 19.</b> Zależność pomiędzy genotypami SNP <i>Cdx2</i> genu <i>VDR</i> a objętością tarczycy u chorych na AIT .....	90
<b>Rycina 20.</b> Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP <i>FokI</i> <i>VDR</i> .....	92
<b>Rycina 21.</b> Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP <i>BsmI</i> <i>VDR</i> .....	93
<b>Rycina 22.</b> Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP <i>ApaI</i> <i>VDR</i> .....	93
<b>Rycina 23.</b> Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP <i>TaqI</i> <i>VDR</i> .....	94
<b>Rycina 24.</b> Wiek w momencie rozpoznania AIT w zależności od genotypów SNP <i>Cdx2</i> <i>VDR</i> .....	94
<b>Rycina 25.</b> Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP <i>FokI</i> <i>VDR</i> .....	95
<b>Rycina 26.</b> Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP <i>BsmI</i> <i>VDR</i> .....	96
<b>Rycina 27.</b> Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP <i>ApaI</i> <i>VDR</i> .....	96
<b>Rycina 28.</b> Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP <i>TaqI</i> <i>VDR</i> .....	97
<b>Rycina 29.</b> Wiek w momencie rozpoznania GD w zależności od genotypów SNP <i>Cdx2</i> <i>VDR</i> .....	97
<b>Rycina 30.</b> Nierównowaga sprzężeń pomiędzy wybranymi polimorfizmami genu <i>VDR</i> ( <i>FokI</i> , <i>BsmI</i> , <i>ApaI</i> , <i>TaqI</i> i <i>Cdx2</i> ).....	103



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 443/17

*Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.*

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 06 kwietnia 2017 r.**

**rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu:**

**Prof. dr hab. Katarzyna Łącka**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób  
Wewnętrznych UM w Poznaniu**

**Główny badacz: lek. med. Adam Maciejewski**

**Członkowie zespołu**

**badawczego: dr Michał Kowalczyk**

**Temat badań:**

**„Polimorfizmy genu kodującego receptor witaminy D (VDR), a ryzyko występowania i przebieg kliniczny autoimmunizacyjnych chorób tarczycy”.**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu poprawek wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na zmianie tematu badawczego z „Polimorfizmy genu kodującego receptor witaminy D (VDR), a ryzyko występowania i przebieg kliniczny autoimmunologicznych chorób tarczycy w populacji polskiej” na powyższy, zgodnie z Anekssem nr 1 z dnia 06.04.2017r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 443/15 z dnia 06.05.2015r.**

**Metodyka pozostaje bez zmian.**

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr 143/17 z dnia 06.04.2017r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wisniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czartoria 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
6.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
7.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
8.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
12.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	-----
13.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	-----
14.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, 61-111 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	