

lek. med. Piotr Małecki

**Biochemiczne i genetyczne markery procesów autoimmunizacyjnych
u krewnych osób z chorobą Addisona.**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Marta Fichna

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu



Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2020

Słowa kluczowe:

autoimmunizacja, autoimmunizacyjna choroba Addisona, autoimmunizacyjna choroba tarczycy, *CTLA4*, choroby autoimmunizacyjne, cukrzyca typu 1, krewni, polimorfizm genetyczny, przeciwciała, *PTPN22*

Keywords:

autoimmunity, autoimmune Addison's disease, autoimmune thyroid disease, *CTLA4*, autoimmune diseases, diabetes type 1, protein-tyrosine phosphatase, relatives, genetic polymorphism, antibodies, *PTPN22*

WYKAZ SKRÓTÓW

AAD	–	autoimmunizacyjna choroba Addisona (ang. <i>Autoimmune Addison's Disease</i>)
ACA	–	przeciwciała przeciwko antygenom komórek kory nadnerczy (ang. <i>Adrenocortical Cell Antibodies</i>)
ACTH	–	hormon adrenokortykotropowy (ang. <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>)
a21OH	–	przeciwciała przeciwko 21-hydroksylazie (ang. <i>anti-21-Hydroxylase</i>)
aGAD	–	przeciwciała przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego (ang. <i>anti-Glutamic Acid Decarboxylase</i>)
aIA2	–	przeciwciała przeciwko fosfatazie tyrozynowej (ang. <i>anti-Islet Antigen-2</i>)
AITD	–	autoimmunizacyjna choroba tarczycy (ang. <i>Autoimmune Thyroid Disease</i>)
AMH	–	hormon anty-Müllerowski (ang. <i>anti-Müllerian Hormone</i>)
ANA	–	przeciwciała przeciwjądrowe (ang. <i>Antinuclear Antibodies</i>)
aNALP5	–	przeciwciała przeciwko bogatemu w leucynę białku NACHT (ang. <i>NACHT leucine-rich-repeat protein 5</i>)
APS	–	autoimmunologiczny zespół wielogruzołowy (ang. <i>Autoimmune Polyglandular Syndrome</i>)
aTG	–	przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie (ang. <i>anti-Thyroglobulin</i>)
aTPO	–	przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie (ang. <i>anti-Thyroid peroxidase</i>)
aZnT8	–	przeciwciała przeciwko transporterowi cynkowemu 8 (ang. <i>anti-Zinc Transporter 8</i>)
cAMP	–	cykliczny adenozynomonofosforan (ang. <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
CaSR	–	receptor wrażliwy na wapń (ang. <i>Calcium Sensing Receptor</i>)

CMV	–	wirus cytomegalii (ang. <i>Cytomegalovirus</i>)
CTLA-4	–	antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. <i>Cytotoxic T Cell Antigen 4</i>)
ELISA	–	metoda immunoenzymatyczna (ang. <i>Enzyme-Linked Immunesorbent Assay</i>)
FSH	–	hormon folikulotropowy (ang. <i>Follicle-Stimulating Hormone</i>)
FT3	–	wolna trójjodotyronina (ang. <i>Free Triiodothyronine</i>)
FT4	–	wolna tyroksyna (ang. <i>Free Thyroxine</i>)
GBD	–	choroba Gravesa-Basedowa (ang. <i>Graves-Basedow Disease</i>)
GWAS	–	genomowe badanie asocjacyjne (ang. <i>Genome-Wide Association Study</i>)
HT	–	choroba Hashimoto, autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy (ang. <i>Hashimoto's Thyroiditis</i>)
HLA	–	antygeny ludzkich leukocytów (ang. <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IAA	–	przeciwciała przeciwiinsulinowe (ang. <i>Insulin AutoAntibodies</i>)
ICA	–	przeciwciała przeciwwyspowe (ang. <i>Islet Cell Antibodies</i>)
IFN	–	interferon
IL	–	interleukina
IPEX	–	zespół zaburzenia odporności, poliendokrynopatii i enteropatii sprzężony z chromosomem X (ang. <i>Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy and X-linked inheritance</i>)
LYP	–	fosfataza tyrozynowa limfocytów (ang. <i>Lymphoid Tyrosine Phosphatase</i>)
MEN	–	zespół mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej (ang. <i>Multiple Endocrine Neoplasia</i>)
MHC	–	główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NIS	–	Symporter sodowo-jodowy (ang. <i>Sodium/Iodide Symporter</i>)

NK	–	komórki cytotoksyczne „naturalni zabójcy” (ang. <i>Natural Killers</i>)
OR	–	iloraz szans (ang. <i>Odds Ratio</i>)
PCR	–	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PTPN 22	–	białkowa fosfataza tyrozynowa N22 (ang. <i>Protein Tyrosine Phosphatase type 22</i>)
RR	–	ryzyko względne (ang. <i>Relative Risk</i>)
RIA	–	metoda radioimmunologiczna (ang. <i>RadioImmune Assay</i>)
RZS	–	reumatoidalne zapalenie stawów
SD	–	odchylenie standardowe (ang. <i>Standard Deviation</i>)
SIR	–	standaryzowany współczynnik zapadalności (ang. <i>Standardised Incidence Ratio</i>)
SLE	–	toczeń rumieniowaty układowy (ang. <i>Systemic Lupus Erythromatosus</i>)
SM	–	stwardnienie rozsiane (ang. <i>Sclerosis Multiplex</i>)
SNP	–	polimorfizmy jednonukleotydowe (ang. <i>Single Nucleotide Polymorphism, SNP</i>)
TCR	–	receptor komórek T (ang. <i>T-Cell Receptor</i>)
TGF-β	–	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
Th	–	limfocyty T pomocnicze (ang. <i>T helper</i>)
T1D	–	cukrzyca typu 1 (ang. <i>Type 1 Diabetes</i>)
TNF-α	–	czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)
TRAb	–	przeciwciała przeciwko receptorowi dla tyreotropiny (ang. <i>TSH Receptor Antibodies</i>)

- Treg** – limfocyty T regulatorowe (*ang. T regulatory*)
- TSHR** – receptor dla tyreotropiny (*ang. Thyroid Stimulating Hormone Receptor*)
- TSH** – hormon tyreotropowy (*ang. Thyroid-Stimulating hormone*)
- USG** – badanie ultrasonograficzne
- VZV** – wirus ospy wietrznej i półpaśca (*ang. Varicella Zoster Virus*)

Składam serdecznie podziękowania:

Mojej Promotor, Pani dr hab. n. med. Marcie Fichnie

- za wyrozumiałość, cierpliwość, inspirację naukową oraz wszystkie cenne rady w trakcie przygotowania pracy

Panu prof. dr hab. n. med. Markowi Ruchale

- za okazaną przychylność i wsparcie a przede wszystkim za możliwość przeprowadzenia badań z udziałem pacjentów Kliniki

Pracę dedykuję moim Dzieciom

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW.....	3
SPIS TREŚCI.....	9
SPIS TABEL.....	14
1.0 WSTĘP.....	16
1.1 Autoimmunizacja i mechanizmy regulujące czynność układu odpornościowego.....	16
1.2 Mechanizmy efektorowe.....	17
1.3 Przyczyny chorób autoimmunizacyjnych.....	18
1.4 Podział chorób autoimmunizacyjnych ze względu na umiejscowienie antygeny.....	20
1.5 Choroby autoimmunizacyjne układu dokrewnego.....	21
1.5.1 Choroba Gravesa-Basekowa.....	23
1.5.2 Choroba Hashimoto.....	25
1.5.3 Cukrzyca typu 1.....	26
1.5.4 Choroba Addisona.....	30
1.5.5 Autoimmunizacyjna niedoczynność przysadki.....	34
1.5.6 Limfocytarne zapalenie przysadki.....	34
1.6 Czynniki genetyczne w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych układu dokrewnego.....	36
1.6.1 Wybrane geny związane z autoimmunizacyjnymi chorobami układu dokrewnego.....	38
1.6.1.1 Region HLA.....	38
1.6.1.2 Gen PTPN22.....	40
1.6.1.3 Gen <i>CTLA4</i>	42
1.7. Autoimmunizacja u krewnych chorych z chorobą autoimmunizacyjną.....	44
2.0 ZAŁOŻENIA I CELE BADAŃIA.....	46
3.0 PACJENCI I METODYKA BADAŃ.....	47
3.1 Badanie ankietowe.....	47
3.1.1 Ankietowani pacjenci.....	47
3.1.2 Ankieta badawcza.....	48
3.2 Badania krewnych.....	49

3.2.1	Badane grupy	49
3.2.1.1	Krewni pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona	49
3.2.1.2	Grupy kontrolne	50
3.2.2.	Analizy serologiczne	50
3.2.3	Badania molekularne	52
3.2.3.1	Izolacja DNA.....	52
3.2.3.2	Ocena jakościowa i ilościowa uzyskanego DNA	53
3.2.3.3	Genotypowanie jednonukleotydowych polimorfizmów (ang. <i>Single Nucleotide Polymorphism, SNP</i>) genów <i>PTPN22</i> oraz <i>CTLA4</i>	53
3.2.3.4	Sekwencjonowanie DNA.....	55
3.3	Metody statystyczne	62
4.0	WYNIKI	64
4.1	Badanie ankietowe	64
4.1.1	Ogólna charakterystyka grupy pacjentów z chorobą Addisona	64
4.1.2	Badanie ankietowe grupy pacjentów z chorobą Addisona.....	69
4.2	Badania krewnych pacjentów z chorobą Addisona	74
4.2.1	Ogólna charakterystyka grupy badanej	74
4.2.2	Oznaczenia autoprzeciwciał w surowicy	76
4.2.3	Genotypowanie	83
4.2.3.1	Zgodność z prawem Hardy'ego-Weinberga	83
4.2.3.2	Genotypowanie rs2476601 genu <i>PTPN22</i>	84
4.2.3.3.	Genotypowanie rs231775 genu <i>CTLA4</i>	84
4.3	Genotypy a wyniki oznaczeń autoprzeciwciał w surowicy	85
5.0	DYSKUSJA	88
5.1.	Badanie ankietowe grupy pacjentów z chorobą Addisona	88
5.1.1.	Charakterystyka ankietowanej grupy pacjentów z AAD	88
5.2	Badania krewnych pierwszego stopnia pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona	102
5.2.1	Autoprzeciwciała w surowicy krewnych pacjentów z AAD	102

5.2.2 Polimorfizmy genów <i>PTPN22</i> oraz <i>CTLA4</i> a wyniki oznaczeń autoprzeciwciał w surowicy krewnych pacjentów z AAD	109
6.0 WNIOSKI.....	116
7.0 STRESZCZENIE.....	117
8.0 SUMMARY	121
9.0 PIŚMIENNICTWO.....	124
10. ZAŁĄCZNIK NR 1 – ANKIETA BADAWCZA.....	160
11. OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W POZNANIU	175

SPIS RYCIN

Rycina 1. Model rozwoju zmian patogenetycznych w chorobie Addisona (na podstawie Eisenbarth GS, Gottlieb PA NEJM 2004;350:2068-79)	32
Rycina 2. Amplifikowany do sekwencjonowania fragment genu PTPN22 obejmujący polimorfizm rs2476601.	56
Rycina 3. Amplifikowany do sekwencjonowania fragment genu CTLA4 obejmujący polimorfizm rs231775.	57
Rycina 4. Rozdział markera wielkości GeneRuler 50bp DNA Ladder w 2,5% żelu agarozowym – wielkość wizualizowanych fragmentów DNA (liczba par zasad)	59
Rycina 5. Wynik reakcji PCR dla amplifikacji 215-nukleotydowego fragmentu DNA zawierającego badany polimorfizm rs2476601 genu PTPN22.....	59
Rycina 6. Wynik reakcji PCR dla amplifikacji 168-nukleotydowego fragmentu DNA zawierającego badany polimorfizm rs231775 genu CTLA4.....	60
Rycina 7. Przykładowe wyniki sekwencjonowania badanych polimorfizmów (A) genu PTPN22 oraz (B) genu CTLA4.....	62
Rycina 8. Średni wiek i odchylenie standardowe u mężczyzn i kobiet w momencie rozpoznania choroby Addisona (p=0,0002)	64
Rycina 9. Średni czas trwania choroby Addisona wraz z odchyleniem standardowym u kobiet i u mężczyzn (p=0,086).....	65
Rycina 10. Częstotliwość dodatkowych schorzeń autoimmunizacyjnych u 106 pacjentów z chorobą Addisona, których rodziny ankietowano	66
Rycina 11. Proporcja (%) pacjentów z chorobą Addisona zależnie od łącznej liczby występujących u nich schorzeń autoimmunizacyjnych.....	67
Rycina 12. Liczba przypadków poszczególnych chorób autoimmunizacyjnych u 201 krewnych pacjentów z chorobą Addisona. WZJG – wrzodziejące zapalenie jelita grubego	71
Rycina 13. Liczba pacjentów z chorobą Addisona, u których w rodzinie występowały schorzenia autoimmunizacyjne z podziałem na dotkniętych nimi krewnych	74
Rycina 14. Liczba krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona, u których wykryto odpowiednio 1-5 swoistych autoprzeciwciał w surowicy	78
Rycina 15. Zależność częstości występowania autoprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona od płci probanda. autoAb(+), autoprzeciwciała wykrywane w surowicy; autoAb(-) brak autoprzeciwciał w surowicy	82

Rycina 16. Zależność częstości występowania autoPrzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona od postaci choroby u probanda. autoAb(+), autoPrzeciwciała wykrywane w surowicy; autoAb(-) brak autoPrzeciwciał w surowicy.....83

SPIS TABEL

Tabela 1. Przykłady chorób autoimmunizacyjnych z podziałem na dominujący mechanizm efektorowy	18
Tabela 2. Podział chorób autoimmunizacyjnych ze względu na umiejscowienie antygeny.....	21
Tabela 3. Klasyfikacja autoimmunizacyjnych zespołów wielogruczołowych wg Neufelda i Blizzarda [44] ...	23
Tabela 4. Komercyjnie dostępne sondy TaqMan® SNP Genotyping Assay wykorzystane do genotypowania polimorfizmów genów PTPN22 i CTLA4 metodą PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem technologii TaqMan®	54
Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej dla genotypowania polimorfizmów genów PTPN22 i CTLA4 metodą PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem technologii TaqMan®	55
Tabela 6. Warunki prowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystanej dla genotypowania polimorfizmów genów PTPN22 i CTLA4 z wykorzystaniem technologii TaqMan®	55
Tabela 7. Charakterystyka starterów użytych do amplifikacji fragmentów DNA zawierających badane polimorfizmy genów PTPN22 i CTLA4, celem ich sekwencjonowania i potwierdzenia genotypów ustalonych metodą PCR w czasie rzeczywistym	56
Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów DNA zawierających badane polimorfizmy genów PTPN22 i CTLA4, celem ich sekwencjonowania	57
Tabela 9. Warunki prowadzenia reakcji PCR dla amplifikacji fragmentów DNA zawierających badane polimorfizmy genów <i>PTPN22</i> i <i>CTLA4</i> , celem ich sekwencjonowania	58
Tabela 10. Rozkład liczbowy dodatkowych współistniejących schorzeń autoimmunizacyjnych u 106 badanych pacjentów z chorobą Addisona	66
Tabela 11. Rozkład częstości najpowszechniejszych kombinacji schorzeń autoimmunizacyjnych u 106 badanych pacjentów z chorobą Addisona	68
Tabela 12. Porównanie częstości występowania poszczególnych schorzeń autoimmunizacyjnych u 28 mężczyzn i 78 kobiet z chorobą Addisona	69
Tabela 13. Liczebność krewnych z chorobami autoimmunizacyjnymi wśród rodzin 106 pacjentów z chorobą Addisona	70
Tabela 14. Liczebność pacjentów z chorobą Addisona, u których w rodzinie występowały schorzenia autoimmunizacyjne z podziałem na dotkniętych nimi krewnych	73
Tabela 15. Choroby autoimmunizacyjne rozpoznane w przeszłości w badanej grupie krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona	75
Tabela 16. Porównanie częstości występowania autoprzeciwciał przeciwko specyficznym antygenom nadnerczowym, tarczycowym oraz antygenom komórek beta u krewnych pacjentów z chorobą Addisona oraz u zdrowych kontroli	77

Tabela 17. Kombinacje swoistych autooprzeciwciał wykrywanych w surowicy krewnych pierwszego stopnia osób z chorobą Addisona	79
Tabela 18. Porównanie częstości wstępowania autooprzeciwciał przeciwko specyficznym antygenom nadnerczowym, tarczycowym oraz antygenom komórek beta u krewnych pacjentów z chorobą Addisona z uwzględnieniem płci krewnych	80
Tabela 19. Porównanie częstości wstępowania autooprzeciwciał przeciwko specyficznym antygenom nadnerczowym, tarczycowym oraz antygenom komórek beta u krewnych pacjentów z chorobą Addisona z uwzględnieniem pokrewieństwa	81
Tabela 20. Wartości poziomu istotności p dla zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga wśród badanych krewnych pacjentów z chorobą Addisona oraz w grupie kontrolnej	83
Tabela 21. Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu rs2476601 genu PTPN22 u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona oraz w grupie kontrolnej	84
Tabela 22. Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu rs231775 genu CTLA-4 u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona oraz w grupie kontrolnej	85
Tabela 23. Występowanie swoistych autooprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona względem genotypów polimorfizmu rs2476601 genu PTPN22	86
Tabela 24. Porównanie liczby autooprzeciwciał stwierdzanych w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona zależnie od genotypów polimorfizmu rs2476601 genu PTPN22	86
Tabela 25. Występowanie swoistych autooprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona względem genotypów polimorfizmu rs231775 genu CTLA4	87
Tabela 26. Porównanie liczby autooprzeciwciał stwierdzanych w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona zależnie od genotypów polimorfizmu rs231775 genu CTLA4	87

1.0 WSTĘP

1.1 Autoimmunizacja i mechanizmy regulujące czynność układu odpornościowego

Zgodnie z klasyczną definicją, autoimmunizacja definiowana jest jako nieprawidłowa reakcja immunologiczna organizmu skierowana przeciwko antygenowi lub grupie własnych antygenów gospodarza, która prowadzi zwykle do niszczenia własnych tkanek [1]. Zjawisko to stanowi podstawę rozwoju wielu chorób o poważnym przebiegu klinicznym.

Zapewnienie tolerancji na własne antygeny uzależnione jest od prawidłowego funkcjonowania w organizmie zróżnicowanych mechanizmów regulacyjnych. Mechanizmy te mogą zostać zaburzone zarówno na poziomie centralnym (dotyczącym centralnych narządów limfatycznych) jak i obwodowym. Centralne zapewnienie tolerancji wynika przede wszystkim z klonalnej delecji autoreaktywnych limfocytów T podczas ich dojrzewania w grasicy oraz autoreaktywnych limfocytów B w szpiku kostnym [2,3]. Zaburzenia tego procesu wynikać mogą między innymi ze zmian strukturalnych w grasicy utrudniających bezpośredni kontakt limfocytów T z komórkami prezentującymi antygen jak również z upośledzenia ekspresji autoantygenów w grasicy (np. w przypadku mutacji odpowiednich czynników transkrypcyjnych, jak gen *AIRE*) [4,5]. Mechanizmy centralne bywają zawodne również w odniesieniu do komórek o umiarkowanym i słabym powinowactwie do autoantygenów, którym czasem udaje się uniknąć efektywnej eliminacji i przedostać się do krążenia.

Drugą linią zabezpieczenia przed ekspansją autoreaktywnych limfocytów są obwodowe mechanizmy kształtujące immunotolerancję, takie jak [6-12]:

- aktywna supresja odpowiedzi immunologicznej z udziałem limfocytów regulatorowych T (Treg) o fenotypie CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, które działają za pośrednictwem immunomodulujących cytokin, m. in. IL-10, IL-35, TGF- β ;
- klonalna delecja aktywowanych limfocytów - interakcja cząsteczki FasL na powierzchni komórki prezentującej antygen z przezbłonowym receptorem Fas (CD95) limfocyta, prowadząca do jego apoptozy;
- anergia limfocytów - czynnościowa inaktywacja limfocytów polegająca na blokowaniu drugiego sygnału, który obok interakcji receptora TCR (ang. *T cell receptor*) z cząsteczką głównego układu zgodności tkankowej MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*) na komórce prezentującej antygen, jest konieczny dla aktywacji komórki T;

- sekwestracja anatomiczna ograniczająca dostępność autoantygenów dla układu odpornościowego, np. w przypadku rogówki, mózgu czy jąder;
- sekwestracja molekularna związana z istnieniem w autoantygenach słabszych epitopów, tzw. epitopów ukrytych, które ulegają ekspozycji dla układu odpornościowego jedynie w szczególnych sytuacjach, np. stanu zapalnego podczas infekcji wirusowej.

Zaburzenia obwodowych mechanizmów immunotolerancji, jak zmniejszenie liczby lub dysfunkcja komórek Treg, są potwierdzonym czynnikiem w patogenezie tocznia układowego czy stwardnienia rozsianego [13,14]. Mutacje genu kodującego receptor Fas prowadzą z kolei do wystąpienia autoimmunizacyjnego zespołu limfoproliferacyjnego, w którym zaburzeniach autoimmunizacyjnym towarzyszą limfadenopatia, splenomegalia i hipergammaglobulinemia [15].

1.2 Mechanizmy efektorowe

Bezpośrednie efekty procesu autoimmunizacyjnego na tkanki i narządy wynikają z inicjacji dwóch kluczowych mechanizmów efektorowych - komórkowego oraz humoralnego. Główną rolę w odpowiedzi komórkowej pełnią cytotoksyczne limfocyty T, neutrofile, makrofagi oraz wydzielane przez nie cytokiny. Ich aktywacja zależna jest w znacznej części od limfocytów pomocniczych Th1, wytwarzających m.in. interleukinę-2 oraz interferon gamma, oraz limfocytów Th17, wykazujących ekspresję interleukin 17A, 17F oraz 21. Humoralne mechanizmy efektorowe wynikają w głównej mierze z wytwarzania przeciwciał przez aktywowane limfocyty B, które wielokierunkowo wpływają na kształt odpowiedzi organizmu (od opsonizacji antygenów lub komórek i inicjacji cytotoksyczności komórkowej oraz fagocytozy, poprzez wiązanie się z antygenami błony podstawnej i następczą aktywację układu dopełniacza, do wiązania się z receptorami i ich blokowania lub pobudzania). W modulowaniu odpowiedzi humoralnej centralną rolę odgrywają limfocyty pomocnicze Th2, produkujące cytokiny takie jak IL-4, IL-5, IL-13 [1,16].

Zazwyczaj oba typy mechanizmów efektorowych występują jednocześnie i wzajemnie się uzupełniają, jednak ich znaczenie w poszczególnych chorobach autoimmunizacyjnych jest zróżnicowane. W części chorób dominuje odpowiedź komórkowa np. w chorobie Hashimoto (ang. *Hashimoto's thyroiditis*, HT), cukrzycy typu 1 (ang. *Type 1 Diabetes*, T1D), stwardnieniu rozsianym (ang. *Sclerosis Multiplex*, SM), łysieniu plackowatym czy bielactwie, podczas gdy w innych znacząco większy wpływ na tkanki i narządy odgrywa odpowiedź humoralna, np. w chorobie

Gravesa-Basedowa (ang. *Graves-Basedow Disease*, GBD) miastonii czy toczeniu rumieniowatym układowym (ang. *Systemic Lupus Erythromatosus*, SLE) [1].

Tabela 1. Przykłady chorób autoimmunizacyjnych z podziałem na dominujący mechanizm efektorowy

Przewaga komórkowych mechanizmów efektorowych	Przewaga humoralnych mechanizmów efektorowych
<ul style="list-style-type: none"> • choroba Hashimoto • cukrzyca typu 1 • stwardnienie rozsiane • choroba Addisona • bielactwo 	<ul style="list-style-type: none"> • choroba Gravesa-Basedowa • toczeń rumieniowaty układowy • niedokrwistość autohemolityczna • miastenia • pęcherzyca zwykła

1.3 Przyczyny chorób autoimmunizacyjnych

Etiologia zaburzeń autotolerancji jest wieloczynnikowa i nadal nie w pełni poznana. Za udokumentowane lub potencjalne czynniki przyczyniające się do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych uznaje się liczne czynniki endogenne i egzogenne.

Wśród przyczyn endogennych największe znaczenie przypisywane jest nadal predyspozycji genetycznej. Związek pomiędzy allelami genów układu HLA (ang. *Human Leukocyte Antigen*) kodującymi cząsteczki MHC a występowaniem schorzeń autoimmunizacyjnych potwierdzony został dla wielu chorób autoimmunizacyjnych, m.in. dla zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa (HLA-B27), pęcherzyca zwykłej (HLA-DR4), choroby Addisona (HLA-DR3 i DR4), toczenia rumieniowatego (HLA-DR3), stwardnienia rozsianego (HLA-DR2 i DR3), reumatoidalnego zapalenia stawów (HLA-DR4), cukrzycy typu 1 (HLA-DR3 i DR4), choroby Gravesa-Basedowa (HLA-DR3) czy choroby Hashimoto (HLA-DR 11, DR5) [17-23]. Jak się wydaje, warianty HLA z różnym nasileniem przyczyniają się do indukcji odpowiedzi immunologicznej. Ryzyko względne zwiększonego zachorowania związane z występowaniem poszczególnych alleli HLA waha się od 3- (w przypadku choroby Hashimoto) do nawet 90-krotności (dla zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa) [1]. Poza układem HLA, wpływ na rozwój chorób autoimmunizacyjnych potwierdzony został również dla mutacji i polimorfizmów genów kodujących cytokiny (np. IL-23, IL-1 β , IL-6, TNF- α) oraz białka

układu dopełniacza (C1, C2, C4). Warianty te mogą sprzyjać nasilonej syntezie cytokin, albo zaburzać ich równowagę na korzyść odpowiedzi zależnej od Th1 lub Th2 [24,25].

Odpowiedź immunologiczna, zarówno wrodzona, jak i nabyta, może także podlegać wpływom hormonalnym. Wiele chorób autoimmunizacyjnych, takich jak toczeń układowy rumieniowaty, zespół Sjögrena, czy autoimmunizacyjne choroby tarczycy, występuje istotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn [26]. Oddziaływanie hormonów ujawnia się szczególnie w okresach przemian hormonalnych - w okresie dojrzewania, ciąży czy perimenopauzy. Wiele schorzeń autoimmunizacyjnych ulega remisji w okresie ciąży, ale ich objawy nawracają, często bardziej nasilone, po porodzie. Jak wskazują badania *in vitro* estrogeny w niewielkich stężeniach mają działanie nasilające czynność komórek NK i stymulujące produkcję przeciwciał przez komórki B, podczas gdy ich duże dawki hamują aktywność komórek NK, odpowiedź typu Th1 i wytwarzanie cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α) z jednoczesnym promowaniem odpowiedzi immunologicznej zależnej od Th2 i wydzielania IL-4, IL-10, TGF- β [27]. Efekt estrogenów może również zachodzić na drodze oddziaływań epigenetycznych, jak podejrzewa się m.in. dla kluczowego w rozwoju immunotolerancji genu *AIRE*, którego ekspresja w grasicy jest niższa u kobiet, a region promotorowy ulega metylacji pod wpływem estrogenów [28].

Decydujący wpływ na rozwój choroby autoimmunizacyjnej u osób z predyspozycją genetyczną mają zapewne czynniki środowiskowe (egzogenne). Świadczą o tym m. in. obserwacje wśród bliźniąt monozygotycznych, u których pomimo identycznego garnituru genetycznego, zgodność w zakresie występowania toczenia układowego, stwardnienia rozsianego, czy choroby Gravesa-Basedowa wynosi zaledwie 25-35% [29-31]. Obserwacje kliniczne dokumentują związek pomiędzy rozwojem bądź nasileniem objawów wielu chorób autoimmunizacyjnych a uprzednio przebytą infekcją wirusową, bakteryjną czy też pasożytniczą. Zależność taka wskazywana jest między innymi dla zakażeń wirusem Epsteina-Barr a toczeniem układowym, reumatoidalnym zapaleniem stawów, zespołem Sjögrena, łuszczycą, stwardnieniem rozsianym, chorobą Gravesa-Basedowa; wirusem cytomegalii a toczeniem, czy cukrzycą typu 1; wirusem zapalenia wątroby typu C a chorobą Leśniowskiego-Crohna czy łuszczycą; wirusem Coxackie B a cukrzycą typu 1; Streptococcus gr. A a łuszczycą; Klebsiella pneumoniae a zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa; Mycoplasma spp. a reumatoidalnym zapaleniem stawów, czy chorobą Leśniowskiego-Crohna [32-35]. Indukcja i/lub nasilenie przez drobnoustroje procesu autoimmunizacji wynikać może zarówno z zaburzenia obwodowych mechanizmów tolerancji, mimikry molekularnej (podobieństwo

epitopów bakterii czy wirusa do antygenów gospodarza, które może prowadzić do reakcji krzyżowych z aktywowanymi limfocytami i rozwoju odpowiedzi na własne antygeny), jak i działania cytokin prozapalnych i niszczenia tkanek, które ujawniają autoantygeny niedostępne wcześniej dla układu odpornościowego, np. zlokalizowane wewnątrz komórek [1].

Kształtowanie odpowiedzi immunologicznej zależne jest również od składu flory jelitowej gospodarza, na który wpływa stosowana dieta (w tym probiotyki czy błonnik) jak i przyjmowane leki, stres, czas karmienia piersią czy nawet droga porodu [36,37]. Rozwój autoimmunizacji stymulować mogą również czynniki fizyczne (np. promieniowanie UVB nasilające zmiany skórne w toczniu) oraz chemiczne. Związek pomiędzy kontaktem z farbami do włosów, rozpuszczalnikami organicznymi, dymem tytoniowym a rozwojem autoimmunizacji wykazany został w przypadku choroby Gravesa- Basedowa, choroby Hashimoto, stwardnienia rozsianego czy tocznia układowego [38]. Z kolei leki takie jak hydralazyna czy prokainamid są znanymi induktorami przeciwciał przeciwjądrowych i mogą prowadzić do objawów tocznia. Intrygującym czynnikiem środowiskowym jest witamina D, która za pośrednictwem receptora VDR (ang. *Vitamin D Receptor*), ulegającego ekspresji w monocytach/makrofagach, komórkach dendrytycznych oraz aktywowanych limfocytach T, może modulować zarówno wrodzoną jak i nabytą odpowiedź immunologiczną. W badaniach *in vitro* wykazano jej hamujący efekt na proliferację komórek T, ekspresję cytokin prozapalnych IL-2, IFN gamma, czy TNF alfa, natomiast promujący efekt względem aktywności limfocytów Treg FOXP3+. Niedobór witaminy D opisywano wśród chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów, stwardnieniem rozsianym i cukrzycą typu 1 [39].

1.4 Podział chorób autoimmunizacyjnych ze względu na umiejscowienie antygeny

Umiejscowienie autoantygeny pozwala dokonać klasyfikacji chorób autoimmunizacyjnych na dwie grupy (Ryc. 1):

- choroby swoiste narządowo – jeśli występowanie danego autoantygeny ogranicza się do konkretnego narządu lub typu komórek, dla których ten antygen jest specyficzny, np. insulina w komórkach beta wysp trzustkowych, czy pompa protonowa H⁺/K⁺-ATPazowa w komórkach okładzinowych żołądka. W przypadku gdy układ odpornościowy reaguje z tego typu autoantygenami, rozwijające się schorzenie dotyczy zazwyczaj wybiórczo jednej tkanki czy gruczołu, jak np. cukrzyca typu 1 wynikająca ze zniszczenia komórek beta wysp trzustkowych lub przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka prowadzące do niedokrwistości złośliwej Addisona-Biermera;

- choroby układowe – jeśli antygen występuje powszechnie w organizmie i nie jest swoisty dla danej tkanki, jak np. składniki jądra komórkowego, łącznotkankowe elementy ściany naczyń krwionośnych. Ponieważ tego typu antygeny są rozproszone w całym ustroju, reakcja autoimmunizacyjna skierowana przeciwko nim może prowadzić do rozszanych zmian w wielu tkankach i układach, jak to ma przykładowo miejsce w przebiegu toczenia układowego rumieniowatego, czy innych chorób reumatologicznych [1,40, 41].

Powyższa klasyfikacja jest nieco uproszczona, ponieważ część schorzeń autoimmunizacyjnych (np. wrzodziejące zapalenie jelita grubego, czy zespół Goodpasture’a) znajduje się na pograniczu obu grup, lub po prostu nie jest jeszcze wystarczająco rozpoznana. Podział ten oddaje jednak dobrze różnicę między reakcją autoimmunizacyjną skierowaną wybiórczo przeciwko autoantygenom swoistym dla danego narządu czy tkanki albo przeciw autoantygenom powszechnym w organizmie.

Tabela 2. Podział chorób autoimmunizacyjnych ze względu na umiejscowienie antygeny

Swoiste narządowo choroby autoimmunizacyjne	Układowe choroby autoimmunizacyjne
<ul style="list-style-type: none"> • choroba Hashimoto • choroba Gravesa-Basedowa • niedokrwistość złośliwa • choroba Addisona • cukrzyca typu 1 • miastenia • stwardnienie rozsiane • bielactwo • pęcherzyca zwykła 	<ul style="list-style-type: none"> • wrzodziejące zapalenie jelita grubego • zespół Sjögrena • zapalenie skórno-mięśniowe • twardzina układowa • toczeń układowy rumieniowaty • układowe zapalenie naczyń

1.5 Choroby autoimmunizacyjne układu dokrewnego

Podłoże autoimmunizacyjne wykazano już dla ponad 100 jednostek chorobowych, od powszechnie występujących po bardzo rzadkie, diagnozowane jedynie w wysoko specjalistycznych ośrodkach. Łącznie dotyczą one niemal 7% populacji na świecie a częstość występowania wielu z nich znacząco wzrasta [42, 43]. Autoimmunizacja jest również przyczyną wielu zaburzeń dotyczących gruczołów wydzielania wewnętrznego. Potencjalnie każdy gruczoł

dokrewny może być źródłem autoantygenów indukujących nieuprawnioną odpowiedź immunologiczną. Jak wskazuje Tabela 2 choroby autoimmunizacyjne układu dokrewnego to schorzenia swoiste narządowo. Do grupy tej zaliczamy:

- Autoimmunizacyjną chorobę tarczycy (ang. *Autoimmune Thyroid Disease*, AITD), obejmującą chorobę Gravesa-Basedowa (ang. *Graves-Basedow Disease*, GBD) oraz przewlekłe limfocytowe zapalenie tarczycy, czyli chorobę Hashimoto (ang. *Hashimoto's thyroiditis*, HT) wraz z jej wariantami klinicznymi, np. poporodowym i bezobjawowym zapaleniem tarczycy)
- Cukrzycę typu 1 (ang. *Type 1 Diabetes*, T1D), której dominującą przyczyną jest autoimmunizacyjna reakcja skierowana przeciwko komórkom beta wysp trzustkowych
- Chorobę Addisona, czyli pierwotną niedoczynność kory nadnerczy, która w krajach rozwiniętych ma współcześnie przede wszystkim etiologię autoimmunizacyjną (ang. *Autoimmune Addison's Disease*, AAD)
- Autoimmunizacyjną niedoczynność przytarczyc
- Limfocytarne zapalenie przysadki stanowiące jedną z przyczyn jej niedoczynności
- Pierwotny hipogonadyzm (hipogonadyzm hipergonadotropowy) pochodzenia autoimmunizacyjnego.

Choroby te mogą występować w sposób izolowany, jednak obserwacje kliniczne wskazują na częste współwystępowanie kilku z nich u tego samego pacjenta, co stało się podstawą opracowania opublikowanej w 1980 roku klasyfikacji tzw. autoimmunizacyjnych zespołów wielogruzołowych (ang. *Autoimmune Polyglandular Syndrome*, APS). (Tabela 3) W tych przypadkach dochodzi do rozwoju co najmniej dwóch schorzeń endokrynologicznych o podłożu autoimmunizacyjnym. U osób z APS odnotowano również częstsze występowanie innych chorób autoimmunizacyjnych, m. in.: przewlekłego zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka i niedokrwistości złośliwej, celiakii, autoimmunizacyjnego zapalenia wątroby, bielactwa, łysienia plackowatego, czy miastonii [44].

Tabela 3. Klasyfikacja autoimmunizacyjnych zespołów wieloguczołowych wg Neufelda i Blizzarda [44]

Typ APS	Składowe choroby
APS-1	Przewlekła kandydoza, niedoczynność przytarczyc, autoimmunizacyjna choroba Addisona (konieczna obecność przynajmniej dwóch schorzeń)
APS-2	Autoimmunizacyjna choroba Addisona i/lub autoimmunizacyjna choroba tarczycy i/lub cukrzyca typu 1 (konieczna obecność przynajmniej dwóch schorzeń)
APS-3	Autoimmunizacyjna choroba tarczycy w połączeniu z innymi chorobami autoimmunizacyjnymi (poza chorobą Addisona i schorzeniami typowymi dla APS1)
APS-4	Dwie lub więcej swoistych narządowo chorób autoimmunizacyjnych, których kombinacja nie pasuje do APS typu 1, 2, ani 3

Autoimmunizacyjne zespoły wieloguczołowe stanowią wyzwanie terapeutyczne, ponieważ ich składowe mogą wpływać na siebie nawzajem. Przykładowo rozwój nadczynności tarczycy u pacjenta z istniejącą cukrzycą typu 1 pogarsza kontrolę glikemii, natomiast u osoby z niewydolnością kory nadnerczy nadmiar krążących hormonów tarczycy nasila nerkowy klirens kortyzolu i zwiększa ryzyko przełomu nadnerczowego [45,46]. Jednocześnie, współistnienie u jednej osoby kilku schorzeń o podobnym patomechanizmie świadczy o prawdopodobnym uogólnionym defekcie układu odpornościowego, który wykazuje skłonność do autoagresji.

1.5.1 Choroba Gravesa-Basedowa

Choroba Gravesa-Basedowa to schorzenie autoimmunizacyjne, w którym determinującym autoantygenem jest receptor dla tyreotropiny (TSHR) zlokalizowany na tyreocytach. Stymulacja TSHR przez przeciwciała powoduje zwykle wzmożoną syntezę i wydzielanie hormonów tarczycy oraz objawy nadczynności tego gruczołu. Wystąpienie reakcji krzyżowej przeciwko antygenom występującym w fibroblastach oczodołów i skóry prowadzi do pozatarczycowych objawów choroby (orbitopatia tarczycowa, obrzęk przedgoleniowy) [47]. Wśród czynników wpływających na zwiększone ryzyko rozwoju GBD wskazuje się predyspozycję genetyczną (związaną z polimorfizmami

genów układu zgodności tkankowej HLA-DR3 i HLA-DR4, genów kodujących tyreoglobulinę, *PTPN22*, *CTLA4*, *CD25* i *CD40* oraz receptor tyreotropiny), a także szereg czynników środowiskowych (palenie tytoniu, duże spożycie jodu, niedobór selenu, stres oraz ciążę) [48-51].

Nadczynność tarczycy charakteryzuje się szeregiem objawów klinicznych, takich jak niepokój, drażliwość, bezsenność, wzmożone pocenie się, nietolerancja ciepła, tachykardia, zwiększenie częstości wypróżnień, utrata masy ciała pomimo zachowanego łaknienia, drżenie, osłabienie siły mięśniowej, szczególnie w zakresie dużych mięśni proksymalnych kończyn. Często w obrazie klinicznym dominują objawy związane z nadmiernym pobudzeniem układu sercowo-naczyniowego – nadkomorowe zaburzenia rytmu, zwłaszcza migotanie przedsionków, cechy zastoinowej niewydolności serca, czy nasilenie objawów choroby wieńcowej. Zaawansowana nadczynność tarczycy może prowadzić do zagrażającego życiu przełomu tarczycowego, który objawia się gorączką, ciężką biegunką i żółtaczką, nasileniem zaburzeń ze strony ośrodkowego układu nerwowego od majaczeń aż po drgawki i śpiączkę, oraz zaburzeniami rytmu serca i jego niewydolnością, prowadzącą skrajnie do obrzęku płuc [52]. U niemal połowy pacjentów z GBD występują objawy oczne, które wahają się od nieznacznej retrakcji powiek, poprzez zmiany włóknisto-naciekowe tkanek oczodołu, powodujące wytrzeszcz, dysfunkcję mięśni okoruchowych i podwójne widzenie, oraz zastój żylny i limfatyczny prowadzący do przekrwienia spojówek i obrzęku tkanek oka. Skrajnie, u 3-5% chorych dochodzi do zagrożenia utratą wzroku na skutek owrzodzenia rogówki spowodowanego niedomykalnością powiek lub ucisku nerwu wzrokowego przez zwiększoną objętość tkanek oczodołu [53].

Kluczową rolę w diagnostyce nadczynności tarczycy pełni ocena stężeń hormonów tarczycy w surowicy. W jawnej nadczynności tarczycy stężenia wolnej tyroksyny (fT4) oraz wolnej trójiodotyroniny (fT3) są podwyższone, natomiast stężenie TSH pozostaje w supresji wskutek zahamowania jego wydzielania z przedniego płata przysadki przez wysokie stężenia krążących hormonów tarczycy. Dla rozpoznania GBD jako przyczyny nadczynności tarczycy pomocne jest badanie ultrasonograficzne tarczycy (USG) oraz oznaczenia serologiczne. W obrazie USG tarczycy typowo stwierdzana jest hipoechogeniczność miąższu oraz nasilenie przepływów naczyniowych w gruczole obserwowane w badaniu dopplerowskim. Potwierdzeniem procesu autoimmunizacji jest wykazanie w surowicy przeciwciał przeciwko receptorowi dla TSH (ang. *TSH Receptor Antibodies*, TRAb) [47]. Większość tych przeciwciał pobudza receptor TSH, stymulując cyklazę adenylową i nasilając produkcję cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP), co w konsekwencji prowadzi

do nadczynności tarczycy. Znacznie rzadziej mogą również zdarzyć się przeciwciała TRAb o charakterze blokującym, które nie aktywują syntezy cAMP, ale antagonistycznie utrudniają oddziaływanie receptora z TSH i wywołują objawy niedoczynności gruczołu [54]. Stężenie krążących TRAb (klasa IgG1) koreluje z nasileniem procesu autoimmunizacyjnego oraz wyższym ryzykiem orbitopatii tarczycowej. Utrzymujące się wysokie stężenie TRAb po leczeniu przeciwtarczycowym sugeruje zwiększone ryzyko nawrotu choroby. [55] Wysokie miana tych przeciwciał u kobiet w ciąży wskazują również na zagrożenie wystąpieniem nadczynności tarczycy u rozwijającego płodu i przejściowo u noworodka, ponieważ przeciwciała penetrują przez łożysko i mogą oddziaływać z tarczycą dziecka [56]. U pacjentów z GBD stwierdzane są także podwyższone poziomy przeciwciał przeciwko dwóm antygenom wewnątrzkomórkowym, swoistym dla tyreocytów - tyreoglobulinie (aTg) i peroksydazie (aTPO) (odpowiednio u > 50% i > 80% chorych), które jednak nie odgrywają roli przyczynowej, a są jedynie markerami toczącego się procesu autoimmunizacyjnego dotyczącego tarczycy [57,58].

1.5.2 Choroba Hashimoto

Choroba Hashimoto, określana również jako przewlekłe limfocytarne zapalenie tarczycy, jest zaburzeniem o podłożu autoimmunizacyjnym, prowadzącym do stopniowego uszkodzenia struktury tego gruczołu, czego efektem jest postępujące upośledzenie jego funkcji endokrynnej [59]. W patofizjologii schorzenia dominuje nacieki komórek jednojądrzastych – przede wszystkim limfocytów T i B oraz komórek plazmatycznych – które indukują przewlekły stan zapalny i niszczą aktywną hormonalnie tkankę [60]. Obserwacje wskazują również na udział w patogenezie komórek Th17 (o czym świadczyć może wyższe stężenie IL-17 w surowicy pacjentów z HT, odwrotnie proporcjonalne do resztkowej czynności gruczołu) [61]. Znaczenie może odgrywać też zaburzona proporcja pomiędzy komórkami Th17 a limfocytami Treg, stwierdzana u tych chorych w porównaniu z osobami zdrowymi [62]. Dane eksperymentalne dowodzą także, że w przebiegu HT zaburzeniu ulega nie tylko liczba komórek regulatorowych, ale także ich funkcja supresorowa. [63] Wykładnikami reakcji humoralnej w przebiegu HT są autoprzeciwciała krążące w surowicy, skierowane swoiście przeciwko tyreoperoksydazie i tyreoglobulinie, które wykrywa się odpowiednio u ponad 95% oraz 70-80% pacjentów z tym schorzeniem. Oznaczenie tych przeciwciał stanowi ważny element diagnostyki autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy. Dodatkowo w przebiegu HT stwierdzane bywają przeciwciała przeciw innym autoantygenom tarczycowym,

np. symporterowi sodowo-jodowemu (NIS) oraz pendrynie, czyli białkom biorącym udział w transporcie jodków z krwi do wnętrza tyreocytów i dalej do koloidu pęcherzyków tarczycowych. Przeciwciała te nie są jednak oznaczane w rutynowej diagnostyce serologicznej [64].

Podobnie jak dla innych chorób autoimmunologicznych etiologia HT jest wypadkową predyspozycji genetycznych oraz czynników środowiskowych. Wśród wpływów genetycznych szczególnie istotne znaczenie mają allele HLA-DR3, -B8, DR5 i DR4 [65]. Kolejnym czynnikiem ryzyka HT są polimorfizmy genu *CTLA4* oraz najprawdopodobniej wariant genu *PTPN22* [66,67]. Część badań wskazuje także na związek pomiędzy występowaniem choroby a polimorfizmem genów *IL1RN*, *IL17F*, jak również czynnikiem transkrypcyjnym *STAT3*. Środowiskowy wpływ na częstość występowania HT potwierdzony został dla takich czynników jak nadmierne spożycie jodu, niedobór selenu, stres czy infekcje. Prawdopodobnie dotyczy on również zakażeń wirusowych, którym towarzyszy nasilona synteza interferonu gamma indukującego ekspresję cząsteczek MHC klasy II na komórkach pęcherzykowych tarczycy [68].

Obraz kliniczny HT charakteryzuje się postępującymi objawami typowymi dla niedoczynności tarczycy. Objawom ogólnym (przyrost masy ciała, osłabienie, zmęczenie i zmniejszona tolerancja wysiłku, senność, ogólne spowolnienie, nietolerancja zimna) towarzyszą zmiany skórne (chłonna, sucha i łuszcząca się skóra, szczególnie na łokciach i kolanach, obrzęk podskórny w obrębie powiek i rąk), zaburzenia ze strony układu krążenia (bradykardia, tendencja do wyższego rozkurczowego ciśnienia tętniczego, ciche tony serca; powiększenie sylwetki serca; niskie ciśnienie tętnicze), układu pokarmowego (przewlekłe zaparcia, czasem zaburzenia wchłaniania) oraz zaburzenia miesiączkowania z cyklami bezowulacyjnymi i upośledzenie płodności u kobiet. Ocena hormonalna w przypadku jawnej niedoczynności tarczycy wykazuje obniżone stężenie fT4, a czasem również fT3, przy podwyższonych wartościach TSH w surowicy. W postaci subklinicznej stwierdza się zwiększone stężenie TSH, podczas gdy stężenia fT4 i fT3 są zwykle prawidłowe lub blisko dolnej granicy normy. W obrazowaniu USG charakterystyczna jest niejednorodność i hipoechogeniczność mięszu tarczycy [59].

1.5.3 Cukrzyca typu 1

Cukrzyca typu 1 jest chorobą metaboliczną charakteryzującą się hiperglikemią, której przyczyną jest zniszczenie komórek beta wysp trzustkowych odpowiadających za produkcję insuliny. Stanowi

ona około 10% ogółu zachorowań na cukrzycę [69]. Zapadalność na T1D różni się pomiędzy krajami (najwyższa w populacji fińskiej ok. 55 nowych przypadków / 100 tys. mieszkańców / rok) oraz grupami etnicznymi (najwyższa dla rasy kaukaskiej) [70,71]. Choroba może rozwinąć się w każdym wieku, najczęściej pojawia się jednak u dzieci przed 15 r. ż. Badania epidemiologiczne wskazują na dwa szczyty zachorowań – pomiędzy 4 a 6 r.ż. oraz pomiędzy 10 a 14 r.ż. [72]. Klasyczne objawy cukrzycy typu 1 wynikające z nasilonej hiperglikemii to wielomocz (spowodowany diurezą osmotyczną), wzmożone pragnienie, osłabienie i senność oraz spadek masy ciała. Rozpoznanie cukrzycy potwierdzone jest pomiarem glikemii. Zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego dla rozpoznania cukrzycy wymagane jest stwierdzenie glikemii przygodnej $\geq 200\text{mg/dl}$ ($11,1\text{mmol/l}$) (jeśli występują objawy hiperglikemii) lub dwukrotne stwierdzenie glikemii na czczo $\geq 126\text{mg/dl}$ ($7,0\text{mmol/l}$) albo glikemii w 120 minucie doustnego testu tolerancji glukozy $\geq 200\text{mg/dl}$ ($11,1\text{mmol/l}$) [69]. U chorych na T1D stwierdzone jest ponadto niskie stężenie peptydu C, odzwierciedlające wyczerpanie czynnościowe komórek beta wysp trzustkowych, a często też ketonuria, której pojawienie dowodzi ciężkiego deficytu energetycznego ustroju. Chorzy z cukrzycą typu 1 bezwzględnie wymagają leczenia egzogenną insuliną. Zalecanym modelem leczenia jest intensywna funkcjonalna insulinoterapia przy zastosowaniu wielokrotnych, podskórnych dawek insuliny lub ciągłego podskórnego wlewu insuliny prowadzonego za pomocą osobistej pompy insulinowej. Źle kontrolowana cukrzyca prowadzi do wystąpienia ostrych powikłań hipo- lub hiperglikemicznych (np. cukrzycowej kwasicy ketonowej), które stanowią bezpośrednie zagrożenie dla życia pacjenta. Przewlekły brak właściwej kontroli glikemii prowadzi z kolei do powikłań makro- oraz mikronaczyniowych, takich jak retinopatia, nefropatia i neuropatia, które mogą skutkować niewydolnością ważnych dla życia narządów, jak mięsień sercowy czy nerki [69,72].

Dominującą przyczyną dysfunkcji wewnątrzwydzielniczej trzustki, a w konsekwencji – cukrzycy typu 1, jest proces autoimmunizacyjny, swoiście niszczący komórki beta wysp Langerhansa. Charakterystyczną cechą patomorfologiczną obserwowaną w początkowych, nawet przedklinicznych stadiach choroby jest ich zapalny naciek przez komórki jednojądrzaste, głównie limfocyty [73]. Podobnie jak w przypadku większości innych chorób autoimmunizacyjnych etiopatogeneza T1D jest wynikiem współzależności czynników genetycznych i środowiskowych. Dotychczas zidentyfikowano ponad 60 loci w genomie, które wiążą się z predyspozycją do rozwoju cukrzycy typu 1. Allele układu HLA klasy II są odpowiedzialne za niemal połowę genetycznie uwarunkowanej podatności na T1D, a jej rozwojowi sprzyjają szczególnie HLA-DR3 i -DR4 [74-76].

Silny związek z chorobą wykazują też polimorfizmy genu insuliny (*INS*) oraz *PTPN22*, których obecność zwiększa ryzyko jej wystąpienia około 1,5-krotnie [77]. Większość spośród genów związanych z rozwojem cukrzycy typu 1 odgrywa rolę w odpowiedzi immunologicznej, np. układ HLA, *PTPN22*, *PTPN2*, *IL2RA*, *CTLA4*, *IFIH1*, *CD226*, a część bierze udział w syntezie i metabolizowaniu insuliny (*INS*, *ERBB3*) [78,79].

Na obserwowany w okresie ostatnich lat znaczący wzrost zapadalności na T1D bez wątpienia wpływ mają czynniki środowiskowe. Przeprowadzane oceny wskazują szczególnie na związek pomiędzy występowaniem cukrzycy typu 1 a zakażeniami wirusowymi (w tym głównie powodowanymi przez enterowirusy o potwierdzonym tropizmie do ludzkich komórek wysp trzustkowych), mikroflorą jelitową (mającą wpływ na metabolizm glukozy, lipidów oraz procesy immunologiczne i zapalne), czynnikami dietetycznymi (protekcjna rola karmienia piersią, wczesne spożywanie mleka krowiego, czy produktów zbożowych jako czynników autoimmunizacji), a także masą urodzeniową dziecka i szybkim jej przyrostem w ciągu pierwszych 12-18 miesięcy [80-93]. Jak jest sugerowane, czynniki środowiskowe mogą odpowiadać za promocję tworzenia tzw. neoantygenów na drodze post-translacyjnej modyfikacji białek wysp trzustkowych (np. proinsuliny, chromograniny A czy wyspowego polipeptydu amyloidowego) [94].

Potwierdzeniem autoimmunizacyjnej etiologii cukrzycy typu 1 jest wykazanie obecności w surowicy chorych swoistych autoprzeciwciał przeciwko autoantygenom komórek beta wysp trzustkowych, których miano koreluje z nasileniem procesu destrukcji gruczołu. Pierwotnie badania autoprzeciwciał w surowicy pacjentów z T1D prowadzone były za pomocą metod immunohistochemicznych, a później immunofluorescencyjnych, z wykorzystaniem skrawków tkankowych, co pozwalało jedynie potwierdzić reaktywność przeciwciał skierowaną przeciwko komponentom wysp trzustkowych, jednak bez określania ich swoistości. Współcześnie badania przeciwciał przeciwwyspowych (ang. *Islet Cell Antibodies*, ICA) są nadal wykonywane jako wartościowe uzupełnienie diagnostyki w przypadkach o niejasnej etiologii cukrzycy [95]. Rutynowa diagnostyka serologiczna u chorych na cukrzycę typu 1 obejmuje jednak wykrywanie autoprzeciwciał o dobrze poznanych swoistościach, charakterystycznych dla komórek beta wysp trzustkowych, do których zaliczamy:

- Przeciwciała przeciwiinsulinowe (ang. *Insulin AutoAntibodies*, IAA) - wykrywane w momencie rozpoznania cukrzycy u ok. 50-70% chorych.

Insulina była pierwszym zidentyfikowanym autoantygenem wysp trzustkowych. Swoiste IAA wykrywane są zazwyczaj przed innymi typami przeciwciał, jednocześnie mogą z czasem samoistnie zanikać bez ujawniania się cukrzycy [96, 97]. Badania wskazują, że występują one częściej u chorych z HLA-DR4 i DQ8IAA. [98] IAA wykrywane w surowicy osób zdrowych świadczą o podwyższonym ryzyku cukrzycy typu 1, jednak ich czułość oraz wartość predykcyjna wydają się stosunkowo niskie [99,100].

- Przeciwciała skierowane przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (ang. *anti-Glutamic Acid Decarboxylase*, aGAD) – wykrywane u 30-80% chorych w momencie rozpoznania cukrzycy typu 1 [97].

Dekarboksylaza kwasu glutaminowego jest enzymem odpowiadającym za przekształcanie glutaminianu w kwas gamma-aminomasłowy (GABA). W obrębie ludzkich wysp trzustkowych, szczególnie w komórkach beta, ekspresji ulega izoforma GAD o masie cząsteczkowej 65 kDa [101,102]. Nie potwierdzono jednoznacznie, aby przeciwciała anty-GAD wpływały hamująco na aktywność enzymatyczną dekarboksylazy w przebiegu cukrzycy jednak mają istotne znaczenie markerowe, a ich pojawienie się w surowicy może na kilka lat wyprzedzać wystąpienie objawów klinicznych choroby [103]. Przeciwciała anty-GAD są jednak wykrywane także u 1-4% zdrowej populacji [104].

- Przeciwciała skierowane przeciw fosfatazie tyrozynowej (ang. *anti-Islet Antigen-2*, aIA-2) - wykrywane u ok. 60-80% chorych w momencie diagnozy cukrzycy.

Fosfataza tyrozynowa IA-2, opisana pierwotnie jako tzw. antygen 512 wysp trzustkowych (ICA512), jest przez błonowym białkiem, które ulega ekspresji w komórkach alfa, beta i delta wysp trzustkowych, w przysadce oraz w rdzeniu nadnerczy, gdzie związana jest z ziarnistościami sekrecyjnymi [105,106]. Obecność przeciwciał aIA-2 obserwowano u 1,5-5,6% krewnych pierwszego stopnia chorych z T1D oraz < 1% populacji ogólnej [100, 107]. Analizy prowadzone prospektywnie u osób o podwyższonym ryzyku cukrzycy typu 1 (jak osoby z chorobami autoimmunologicznymi układu dokrewnego, czy rodzeństwo chorych na T1D) wskazują, iż obecność przeciwciał przeciwko IA-2 może prognozować szybsze tempo progresji choroby, sięgające nawet 60% w ciągu 5 lat [108-110]. Szczególnie w połączeniu z oznaczeniami przeciwciał przeciwko transporterowi cynkowemu 8 aIA-2 okazują się czułym wskaźnikiem zagrożenia szybkim rozwojem T1D u krewnych pierwszego

stopnia osób z cukrzycą, umożliwiając prawidłową identyfikację 78% z nich przed wystąpieniem objawów [111].

- Przeciwciała skierowane przeciw transporterowi cynkowemu 8 (ang. anti-Zinc Transporter 8, aZnT8) – wykrywane u ok. 60-80% osób z cukrzycą typu 1.

ZnT8 jest kationowym transporterem, zlokalizowanym w błonie ziarnistości wydzielniczych komórek beta, który konieczny jest dla dojrzewania cząsteczek insuliny [112,113]. Ocena przeciwciał aZnT8 stanowi cenne uzupełnienie diagnostyki serologicznej u pacjentów z cukrzycą typu 1. Badania wskazują, że jest to jedyny typ przeciwciał stwierdzany u 3–5% pacjentów chorujących na T1D, a u 25–30% pacjentów, u których nie występują przeciwciała aGAD, IAA ani aIA-2, wykrywa się właśnie przeciwciała przeciwko transporterowi ZnT8. Kompleksowe oznaczanie miana przeciwciał przeciwko ZnT8, GAD, IA-2 i insulinie zwiększa wskaźnik rozpoznawalności cukrzycy typu 1 do 98% [114]. Przeciwciała aZnT8 okazały się też przydatnym narzędziem predykcyjnym w przewidywaniu T1D u krewnych pacjentów z tą chorobą [111,115, 116].

Przeciwciała swoiste dla komórek beta wysp trzustkowych są praktycznymi narzędziami w diagnostyce cukrzycy typu 1 oraz w markerami umożliwiającymi wczesną identyfikację osób zagrożonych rozwojem tej choroby. Według licznych badań prospektywnych ryzyko zachorowania rośnie wraz z liczbą autoprzeciwciał wykrywalnych w surowicy [117-119].

1.5.4. Choroba Addisona

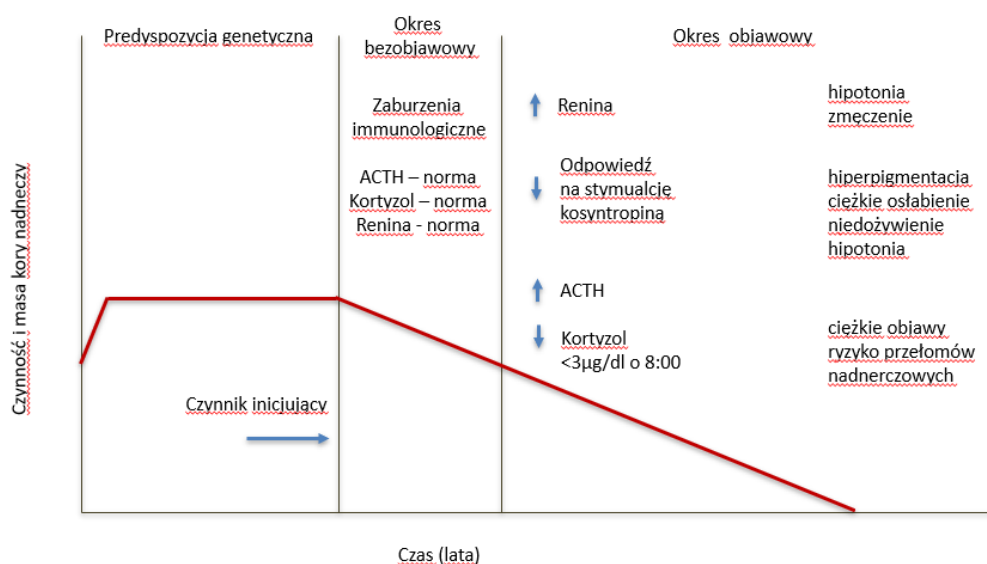
Autoimmunizacyjna choroba Addisona (ang. *Autoimmune Addison's disease*, AAD) to rzadka choroba endokrynologiczna spowodowana uszkodzeniem kory nadnerczy [59]. Częstość występowania AAD określa się na 100-140/100 tys. osób w krajach rozwiniętych [120, 121]. Choroba częściej dotyczy kobiet i może rozwinąć się w każdym wieku, najczęściej jednak jej rozpoznanie przypada na czwartą dekadę życia. Jak wskazują badania, ok. 60-70% przypadków występuje jako składowa autoimmunizacyjnych zespołów wielogruzołowych (APS) [44, 122]. Objawy choroby wynikają z deficytu hormonów kory nadnerczy - mineralokortykosteroidów (hipotonia ortostatyczna, łaknienie soli, hiponatremia, hiperkaliemia, nudności, wymioty), glikokortykosteroidów (zmęczenie, bóle mięśniowo-stawowe, anoreksja, utrata masy ciała, limfocytoza, eozynofilia, tendencja do hipoglikemii i hiperkalcemii) oraz androgenów nadnerczowych (utrata owłosienia płciowego u kobiet, brak energii, obniżenie libido). Specyficznym

objawem obserwowanym u chorych z pierwotną niedoczynnością kory nadnerczy jest hiperpigmentacja skóry i błon śluzowych (ściemnienie skóry szczególnie w bruzdach dłoni, knykciach, bliznach i miejscach podlegających tarceniu oraz w obrębie błon śluzowych jamy ustnej). Brak prawidłowego rozpoznania i adekwatnej substytucji hormonalnej grozi rozwojem przetłomu nadnerczowego, który nieleczony prowadzi do wstrząsu i śmierci pacjenta. W ocenie hormonalnej u pacjentów obserwowane jest obniżone stężenie kortyzolu w surowicy z towarzyszącym znacznie podwyższonym stężeniem hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) w osoczu wywołanym przez brak zwrotnego hamowania jego sekrecji przy niskich poziomach kortyzolemii. W przypadkach wątpliwych rozpoznanie pierwotnej niedoczynności nadnerczy potwierdzić można za pomocą testu stymulacyjnego z analogiem ACTH podanym dożylnie lub domięśniowo. Brak adekwatnej reakcji kory nadnerczy, wyrażający się niedostatecznym wzrostem stężenia kortyzolu w surowicy po stymulacji, dowodzi pierwotnej dysfunkcji gruczołu. Z uwagi na niedobór mineralokortykosteroidów, w przebiegu AAD charakterystyczny jest też wzrost stężenia reniny, albo zwiększona aktywność reninowa osocza [59].

Współcześnie główną przyczyną choroby Addisona jest proces autoimmunizacyjny, odpowiadający za ponad 90% przypadków w krajach rozwiniętych [121]. We wczesnych stadiach AAD w obrębie kory nadnerczy stwierdzane są nacieki komórek jednojądrzastych - limfocytów, komórek plazmatycznych i makrofagów. Wraz z progresją choroby tkanka gruczołowa zastępowana jest stopniowo przez tkankę włóknistą. W patogenezie AAD, podobnie jak dla innych chorób autoimmunizacyjnych, wskazuje się na znaczenie zarówno czynników genetycznych jak i środowiskowych. Najsilniejszy związek z wystąpieniem choroby stwierdzony został dla antygenów HLA-DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 (DR3/DQ2), HLA-DRB1*0404-DQA1*0301-DQB1*0302 (DR4/DQ8). Ryzyko AAD zwiększają także polimorfizmy genów *CTLA4*, *PTPN22*, *CIITA*, *STAT4*, *NLRP1*, *CYP27B1*, *GATA3*, oraz *BACH2* [122-131]. Wśród czynników środowiskowych wystąpienie AAD wiązane bywa z infekcjami wirusowymi, choć nie potwierdzono dotąd patogenetycznego związku z żadną z nich [132].

Proponowany model naturalnego przebiegu choroby sugeruje, że pierwotną przyczyną inicjującą proces autoagresji jest najprawdopodobniej wystąpienie bliżej nieokreślonych czynników środowiskowych u osób z określoną predyspozycją genetyczną. W okresie przedklinicznym wykazanie postępującej autoimmunizacyjnej destrukcji gruczołów możliwe jest niemal wyłącznie na podstawie oceny serologicznej, czyli wykrycia swoistych autoprzeciwciał. Pierwszym objawem

biochemicznym stwierdzanym u chorych jest wzrost aktywności reninowej osocza (zaburzenie czynności warstwy kłębkowatej kory nadnerczy), przy zachowanych normalnych lub nieco obniżonych poziomach aldosteronu w surowicy. Wraz z progresją choroby, procesy autoimmunizacyjne obejmują również warstwę pasmowatą kory nadnerczy, czego objawem jest osłabiona reaktywność nadnerczy w odpowiedzi na stymulację ACTH. W dalszym etapie dochodzi do wzrostu podstawowych osoczowych stężeń ACTH oraz stopniowego obniżania się poziomu kortyzolu w surowicy. W momencie wystąpienia objawów klinicznych choroby zniszczona jest większość tkanki gruczołowej kory nadnerczy [133]



Rycina 1. Model rozwoju zmian patogenetycznych w chorobie Addisona (na podstawie Eisenbarth GS, Gottlieb PA NEJM 2004;350:2068-79)

Potwierdzenie autoimmunizacyjnej etiologii choroby Addisona możliwe jest poprzez wykazanie w surowicy obecności autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom komórek kory nadnerczy. W przeszłości wykrywano jedynie zbiorczo przeciwciała przeciwko frakcji mikrosomalnej wyciągu ludzkiej kory nadnerczy, bez znajomości specyficznych autoantygenów [134]. Były to tzw. przeciwciała przeciwko antygenom komórek kory nadnerczy (ang. *Adrenocortical Cell Antibodies*, ACA), które do dziś bywają oznaczane metodą immunofluorescencji pośredniej na skrawkach ludzkich nadnerczy i są wykrywane u ponad 80% pacjentów z nowo rozpoznaną autoimmunizacyjną chorobą Addisona [135, 136]. W latach 90-tych XX wieku wykazano, iż głównym autoantygenem kory nadnerczy jest 21-hydroksylaza steroidowa, kluczowy enzym steroidogenezy [137-139].

Przeciwciała przeciw 21-hydroksylazie (ang. *anti-21-hydroxylase*, a21OH) są cennym markerem autoimmunizacji, wykrywanym w surowicy ponad 80% pacjentów z istniejącą autoimmunizacyjną chorobą Addisona i niemal u wszystkich osób z jej nowym rozpoznaniem oraz z autoimmunizacją wielogruzołową [121]. Obecność a21OH w surowicy ma także znaczenie predykcyjne i świadczy o podwyższonym ryzyku rozwoju choroby Addisona, zwłaszcza w przypadku ich wysokich stężeń oraz u dzieci [140, 141]. Przeciwciała a21OH mogą pojawiać się w surowicy nawet na kilka lat przed wystąpieniem objawów klinicznych niedoczynności kory nadnerczy. [142]. Ich stężenia korelują pozytywnie z ciężkością upośledzenia czynności kory nadnerczy i wzrastają wraz z postępem jej destrukcji [143]. Współistnienie a21OH z obecnością polimorfizmów zwiększających ryzyko choroby Addisona szczególnie sprzyja jej wystąpieniu [140, 144, 145]. W ostatnich latach we krwi pacjentów z chorobą Addisona wykazano obecność komórek T CD4+ i CD8+ swoistych dla 21-hydroksylazy, a także potwierdzono ich proliferację oraz nasilone wydzielanie interferonu gamma w odpowiedzi na stymulację tym antygenem, a zjawisko to wykazywało związek z haplotypem ryzyka choroby Addisona DRB1*0301-DQ2/DRB1*0404-DQ8 [146]. Dwa inne enzymy steroidogenezy, 17 α -hydroksylaza steroidowa oraz enzym odcinający łańcuch boczny cholesterolu (P450scc) zostały także zidentyfikowane jako autoantygeny nadnerczowe, stymulujące powstawanie swoistych przeciwciał [147, 148]. Autoprzeciwciała przeciwko tym enzymom są wykrywane w 45-80% przypadków APS typu 1 oraz u 73-93% pacjentek z chorobą Addisona współistniejącą z przedwczesną niewydolnością jajników, rzadziej natomiast u chorych z izolowaną autoimmunizacyjną niedoczynnością kory nadnerczy (5-20%) [140, 148, 149]. 17 α -hydroksylaza oraz P450scc ulegają ekspresji zarówno w korze nadnerczy jak i w gonadach, gdzie biorą udział w syntezie hormonów płciowych, mogą zatem stanowić autoantygeny w autoimmunizacyjnej dysfunkcji obu gruczołów. Dane te pozostają w zgodności z wysoką, sięgającą nawet 20%, częstotliwością przedwczesnej menopauzy u pacjentek z chorobą Addisona [150]. Obecność przeciwciał przeciw 17 α -hydroksylazie i/lub P450scc świadczy o dużym ryzyku niewydolności jajników we wczesnym wieku, natomiast dane dotyczące płci męskiej pozostają skąpe i niejednoznaczne. Prospektywne badanie 154 mężczyzn z chorobą Addisona nie potwierdziło, aby obecność przeciwciał przeciwko enzymom steroidogenezy wiązała się z wyższym ryzykiem niewydolności jąder [151]. Przymuszczałyby różnice w markerowym znaczeniu tych autoprzeciwciał między płciami wynikają z faktu, że jądra są miejscem immunologicznie uprzywilejowanym (tzw. bariera krew-jądro) i bardzo rzadko dochodzi do autoimmunizacji w ich obrębie.

1.5.5 Autoimmunizacyjna niedoczynność przytarczyc

Współcześnie niedoczynność przytarczyc jest najczęściej uwarunkowana jatrogenie, jednak część przypadków ma etiologię autoimmunizacyjną. Zaburzenie to może występować jako izolowana jednostka chorobowa, jak również stanowić może jedną ze składowych autoimmunizacyjnego zespołu gruczołowego typu 1 (APS-1) [152]. Kluczowy autoantygen w przypadku tej choroby stanowi receptor wapniowy (ang. *Calcium Sensing Receptor*, CaSR). Częstość występowania przeciwciał przeciwko CaSR określana jest na ok. 50%. Odsetek ten różni się jednak pomiędzy ocenami, zarówno dla postaci izolowanej jak i w APS-1 [153-157]. Nie do końca również potwierdzone jest czy przeciwciała te czynnikiem wywołującym chorobę czy jedynie markerem uszkodzenia tkanek [158]. Badania wykazały również obecność przeciwciał skierowanych przeciwko białku NALP-5 (ang. *NACHT leucine rich repeat Protein-5*), które stwierdza się w pojedynczych przypadkach pacjentów z izolowaną autoimmunizacyjną niedoczynnością przytarczyc oraz u około 1/3 chorych z APS-1 [159].

W obrazie klinicznym u chorych dominują objawy hipokalcemii wynikające z niedoboru parathormonu, takie jak: parestezje w obrębie palców dłoni i stóp oraz wokół ust, bolesne skurcze mięśni kończyn górnych i dolnych oraz twarzy. Przewlekłe występuje uczucie zmęczenia i osłabienia, bóle głowy, zaburzenia nastroju i pamięci, łamliwość włosów, sucha, pogrubiała skóra, łamliwość paznokci czy przebarwienia obrączkowate na szkliwie zębów. Przewlekła hipokalcemia prowadzi do rozwoju nieodwracalnych powikłań, z których najpoważniejsze to zahamowanie wzrostu, opóźnienie rozwoju umysłowego u dzieci i objawy neurologiczne (w tym zaburzenia pozapiramidowe i napady padaczkowe, a nawet zmiany otępienne) wynikające z odkładania się złogów wapnia w OUN. Mogą też pojawiać się powikłania oczne, przede wszystkim zaćma podtorebkowa. Biochemicznie hipokalcemii towarzyszy hiperfosfatemia [59].

1.5.6 Limfocytarne zapalenie przysadki

Limfocytarne zapalenie przysadki jest rzadkim procesem chorobowym, w dużej przewadze dotyczącym kobiet. Często wystąpienie choroby wiąże się z ciążą lub okresem poporodowym [59,160, 161]. Choroba charakteryzuje się zapalnym naciekiem limfocytów i komórek plazmatycznych, który prowadzi do różnego stopnia upośledzenia czynności przysadki. Zmiany naciekowe zazwyczaj obejmują część gruczołową (płat przedni), ale mogą też dotyczyć części

nerwowej przysadki (płat tylny oraz lejek), a nawet podwzgórza. W badaniach obrazowych naciek zapalny przysadki może imitować obraz guza.

Autoantygeny przysadkowe dotychczas nie zostały dobrze zdefiniowane. Rola taka przypisywana była między innymi hormonowi wzrostu, alfa-enolazie, specyficznym czynnikom przysadkowym 1 i 2 a także sekretograninie II, CGI 99 [162-169]. Aktualnie nie są dostępne specyficzne zestawy do rutynowego oznaczania autoprzeciwciał przysadkowych, a ich oznaczenia prowadzi się w ramach prac badawczych za pomocą immunofluorescencji pośredniej czy immunoblottingu [170].

Kliniczne objawy stanu zapalnego okolicy podwzgórzowo-przysadkowej klasycznie dzielone są na te związane z obecnością nacieku zapalnego (ból głowy i zaburzenia pola widzenia) oraz spowodowane upośledzeniem czynności hormonalnej przysadki. W zależności od lokalizacji nacieku zapalnego objawy limfocytarnego zapalenia przysadki związane być mogą z deficytem funkcji wydzielniczej części gruczołowej (niedobory hormonów przedniego płata przysadki) lub części nerwowej przysadki (moczówka prosta). Obserwowane niedobory wydzielnicze mogą dotyczyć większej liczby albo pojedynczych hormonów, np. jedynie ACTH, prowadząc do wtórnej niedoczynności kory nadnerczy. W wielu przypadkach, limfocytarne zapalenie przysadki towarzyszy innym, wcześniej występującym chorobom autoimmunizacyjnym (najczęściej chorobie Hashimoto lub chorobie Gravesa-Basedowa) [59].

1.5.7 Pierwotny hipogonadyzm pochodzenia autoimmunizacyjnego

Proces autoimmunizacyjny stanowi jedną z potencjalnych przyczyn nabytego hipogonadyzmu hipergonadotropowego czyli niewydolności gonad (jajników lub jąder), przebiegającej z wysokimi stężeniami gonadotropin w surowicy [59]. W praktyce, autoimmunizacyjne uszkodzenie jąder jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim, ze względu na naturalne ograniczenie dostępu układu odpornościowego do autoantygenów jądrowych. U kobiet autoimmunizacja jest jedną z przyczyn przedwczesnej menopauzy, czyli zaniku czynności jajników, który objawia się wtórnym brakiem miesiączki przed 40. rokiem życia [171]. Typowo schorzenie diagnozuje się poprzez dwukrotne wykazanie wysokich stężeń hormonu folikulotropowego (FSH) w surowicy, najlepiej w odstępie kilku tygodni. Towarzyszą temu niskie, menopauzalne stężenia estradiolu oraz niskie wartości hormonu anty-Müllerowskiego (AMH) i inhibiny B [59]. AMH jest glikoproteiną syntetyzowaną przez komórki ziarniste pęcherzyków preantralnych i małych pęcherzyków antralnych, dlatego jej obniżone

stężenie odzwierciedla pośrednio spadek liczby czynnych pęcherzyków w jajnikach [172-174]. Autoimmunizacja może odpowiadać za 30-40% przedwczesnej niewydolności jajników i należy ją różnicować m.in. z przyczynami uwarunkowanymi genetycznie, np. zespół łamliwego chromosomu X (premutacja genu *FMR1*), przyspieszoną atrezią pęcherzyków jajnikowych w przebiegu galaktozemii, przyczynami infekcyjnymi (prawdopodobny udział wirusów świnki, CMV, VZV), czy następstwami leczenia onkologicznego (radio- i chemioterapii) [172-174]. Rola autoantygenów przypisywana jest między innymi osłonce przejrzystej/oocytom, komórkom ziarnistym, komórkom tekalnym, ciałku żółtemu jak również wspomnianym już enzymom steroidogenezy: 17α -hydroksylazie i enzymowi odcinającemu łańcuch boczny cholesterolu [149, 175-178]. Niestety wykazanie przyczyny autoimmunizacyjnej w przypadku niewydolności jajników jest trudne, nawet przy użyciu badań biopsyjnych, które nie zawsze wykazują cechy nacieku zapalnego złożonego z mono- oraz limfocytów. Pomocne w diagnostyce autoimmunizacji jest stwierdzenie przeciwciał przeciwko enzymom steroidogenezy i korze nadnerczy [177]. Jak wspomniano powyżej, przedwczesna menopauza na tle autoimmunizacyjnym towarzyszy często chorobie Addisona, a w surowicy pacjentek można wówczas wykazać obecność charakterystycznych autoprzeciwciał [173, 179].

1.6 Czynniki genetyczne w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych układu dokrewnego

Słoność do rodzinnego występowania chorób autoimmunizacyjnych przemawia za znaczącą rolą czynników genetycznych w ich patogenezie. Dowodów potwierdzających taką zależność dostarczają zarówno analizy występowania danego schorzenia wśród krewnych osób chorych w porównaniu z populacją ogólną, jak również porównanie częstości zachorowań u bliźniąt jedno- i dwuzygotycznych. Przykładowo, w cukrzycy typu 1 zgodność zachorowań dla bliźniąt monozygotycznych sięga 30-50%, podczas gdy dla bliźniąt dwuzygotycznych kształtuje się w okolicach 10%. Ryzyko rozwoju tego schorzenia jest również wyższe u rodzeństwa chorych czy też u krewnych osób, które zachorowały we wczesnym dzieciństwie [180]. Jedynie nieliczne, bardzo rzadkie schorzenia autoimmunizacyjne układu dokrewnego wywołane są mutacją pojedynczego genu. Monogenowa droga dziedziczenia potwierdzona została m. in. dla:

- autoimmunologicznego zespołu wielogruzołowego typu 1 (APS typu 1) będącego wynikiem mutacji genu *AIRE* (ang. *Auto-Immune REgulator*), zlokalizowanego na ramieniu długim chromosomu 21 (21q22.3) [181]

Mutacje genu *AIRE*, który ulega ekspresji w komórkach nabłonkowych rdzenia grasicy, upośledzają skuteczność negatywnej selekcji autoreaktywnych komórek T w grasicy. Nowsze dane dowodzą również znaczenia genu *AIRE* w indukowaniu prawidłowej funkcji komórek regulatorowych Treg FOXP3+ [182].

Klinicznie zespół APS typu 1 ujawnia się już w wieku dziecięcym (przewlekła kandydoza skórno-śluzówkowa, niedoczynność przytarczyc i/lub niewydolność kory nadnerczy), a dziedziczony jest autosomalnie recesywnie. Dodatkowo w APS typu 1 mogą występować różnorodne inne zaburzenia autoimmunizacyjne (m.in. zapalenie wątroby, cukrzyca typu 1, autoimmunizacyjna choroba tarczycy, niedokrwistość złośliwa, hipogonadyzm hipergonadotropowy, łysienie plackowate), dysfunkcja śledziony, hipoplazja szkliwa, dystrofia paznokci, czy keratopatia [183]. Zespół jest schorzeniem bardzo rzadkim, najwyższą zapadalność odnotowuje się w populacji fińskiej (1: 25 000) i wśród irańskich Żydów (1: 9 000), podczas gdy np. w Norwegii wynosi ona 1: 80 000 [184]. Współczesna diagnostyka APS typu 1 obejmuje badania molekularne genu *AIRE*, ale także oznaczenia autoprzeciwciał. Obok przeciwciał charakterystycznych dla poszczególnych składowych zespołu, jak a21OH czy aNALP5, w przebiegu APS typu 1 występują również specyficznie przeciwciała przeciw niektórym cytokinom, a w szczególności interferonom typu 1, czyli interferonom omega i alfa, które wykrywalne są u ponad 90% pacjentów [185,186]. Podobnie często stwierdza się obecność przeciwciał skierowanych przeciwko interleukinie-22, czy interleukinom rodziny IL-17 [187]. Sugerowane jest, że badanie autoprzeciwciał może mieć praktyczny aspekt przesiewowy, ponieważ ich wysoka swoistość pozwala na identyfikację nowych przypadków zespołu spośród pacjentów z AAD [188].

- zespołu IPEX (ang. *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy and X-linked inheritance*) będącego skutkiem mutacji genu *FOXP3* (ang. *Forkhead box protein P3*), zlokalizowanego na chromosomie Xp11.23-p13.3

Gen *FOXP3* koduje czynnik transkrypcyjny ulegający ekspresji w limfocytach T CD4+CD25+, konieczny dla ich prawidłowej funkcji immunoregulacyjnej. Zespół IPEX objawia się obfitą biegunką sekrecyjną, bardzo wczesną cukrzycą typu 1, narastającą z wiekiem dysfunkcją tarczycy oraz wypryskiem i anemią hemolityczną [189]. Może również dotyczyć nerek, pod postacią błoniastego zapalenia kłębuszków nerkowych, albo śródmiąższowego zapalenia nerek. Bez leczenia immunosupresyjnego większość chorych umiera w pierwszych latach życia.

W ostatnich latach opisano też pojedyncze przypadki dziedzicznych zespołów autoimmunizacyjnych fenotypowo zbliżonych do IPEX (*ang. IPEX-like*), wywołanych mutacjami genów zaangażowanych w czynność układu immunologicznego, np. *LRBA*, *CTLA4*, *BACH2*, *STAT5b* [189].

Zdecydowana większość chorób autoimmunizacyjnych układu dokrewnego uwarunkowana jest jednak wielogenowo. Znaczenie przypisuje się tu polimorficznym wariantom genów, które poprzez dyskretny wpływ na ich funkcję, mogą sprzyjać lub – przeciwnie- działać ochronnie względem ryzyka autoimmunizacji. Polimorfizm DNA może wynikać zarówno z punktowych zmian w sekwencji nukleotydów jak i z odmiennej liczby powtórzeń krótkiej sekwencji nukleotydowej, albo różnej liczby kopii danego genu. Polimorficzne odmiany genów poprzez zmianę nasilenia ekspresji genów czy też niewielkiego stopnia zmianę struktury białek, mogą modyfikować (zwiększać lub zmniejszać) predyspozycję do rozwoju określonej choroby.

1.6.1 Wybrane geny związane z autoimmunizacyjnymi chorobami układu dokrewnego

1.6.1.1 Region HLA

Najczęściej i najdokładniej opisywanymi wariantami genetycznymi, które związane są z chorobami autoimmunizacyjnymi układu dokrewnego są polimorfizmy głównego układu zgodności tkankowej człowieka – HLA oraz kodowane przez niego glikoproteiny – cząsteczki MHC. Układ HLA, zlokalizowany na ramieniu krótkim chromosomu 6 (6p21.3), obejmuje ponad 4 miliony par zasad i zawiera ponad 100 genów. Produkty genów układu HLA dzielone są cząsteczki klasy I (HLA-A, -B, -C), cząsteczki klasy II (HLA-DP, -DQ, -DR) oraz cząsteczki klasy III. Cząsteczki MHC klasy I występują na powierzchni wszystkich komórek jądrowych, natomiast cząsteczki MHC klasy II występują na komórkach, których rolą jest „profesjonalna” prezentacja antygenów, np. na komórkach dendrytycznych, limfocytach B, makrofagach i komórkach nabłonkowych grasicy. W wyniku aktywacji, wywołanej przykładowo infekcją, cząsteczki MHC klasy II mogą pojawiać się również na innych komórkach np. pobudzonych limfocytach T, komórkach śródbłonna czy nabłonka tarczycy [1]. Uważa się, że duża liczba genów oraz niezwykła obfitość ich alleli występujących w obrębie układu MHC w populacji (opisano ponad 25000 wariantów allelicznych genów HLA klasy I i II) jest elementem procesu selekcji naturalnej człowieka, dokonującej się na skutek działania mikroorganizmów i infekcji przez nie wywoływanych [190]. Niestety, cechy które są korzystne i ewolucyjnie pożądane ze względu na potencjalnie bardziej wydajną ochronę przed czynnikami infekcyjnymi, mogą okazywać się niekorzystne z racji zwiększonego ryzyka autoagresji. Jak się

wydaje związek pomiędzy polimorfizmem układu HLA a ryzykiem występowania chorób autoimmunizacyjnych wynika przede wszystkim ze zróżnicowanej efektywności prezentacji antygeny oraz odmiennej zdolności limfocytów T do rozpoznawania antygeny prezentowanego przez dany allel.

Przykładowo, szacuje się, że allele HLA klasy II odpowiadają za około 30-50% genetycznie uwarunkowanej podatności na cukrzycę typu 1, a jej rozwojowi sprzyjają szczególnie allele HLA -DQ, HLA-DR3 oraz -DR4 (najwyższe ryzyko przypisywane jest haplotypom DR3-DQA1*0501-DQB1*0201 oraz DR4-DQA1*0301-DQB1*0302). Ryzyko rozwoju cukrzycy związane jest także z wariantami allelu DRB1*04 (najwyższe ryzyko dla DRB1*0405, DRB1*040, DRB1*0402, DRB1*0404). Przeciwnie, część polimorfizmów pełni rolę protekcyjną przed zachorowaniem na T1D (np. HLA-DQA1*0102, DQB1*0602, DRB1*0403 czy DQB1*0301). [191-193] Z kolei do rozwoju choroby Addisona predysponują allele DR3 (DRB1 *03)-DQ2(DQA1*0501- DQB1*0201) oraz DR4(DRB1 *04)-DQ8(DQA1 *03-DQB1 *0302). Badania potwierdziły również związek pomiędzy AAD a allelami DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302. Podobnie jak dla T1D, niektóre z polimorfizmów pełnią rolę protekcyjną przed AAD (np. DRB1*0401-DQ8) [194-198].

Część alleli sprzyjających autoimmunizacji jest także wspólna dla wielu schorzeń (np. DQA1 *0501 występuje z większą częstością zarówno u chorych na cukrzycę typu 1, chorobę Gravesa-Basedowa, jak i u pacjentów z chorobą Addisona, natomiast allel DRB1 *0301 wykrywany jest statystycznie częściej u osób z cukrzycą, chorobą Addisona oraz w celiakii [199-200].

Mapowanie molekularne regionu HLA pozwoliło wykryć w sąsiedztwie rodzinę genów MIC (*ang. MHC class I Chain-related*), spośród których MIC-A prezentuje różną liczbę powtórzeń trinukleotydu GCT w eksonie 5, tzw. polimorfizm mikrosatelitarny. Allel A*5.1 charakteryzuje się pięcioma powtórzeniami GCT oraz insercją dodatkowego nukleotydu, guaniny, co wywołuje przesunięcie ramki odczytu i przedwczesny kodon stop w cząsteczce. Polimorfizm (obecność allelu A5.1) wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wielu zaburzeń autoimmunizacyjnych takich jak: cukrzyca typu 1, choroba Addisona, choroba Graves-Basedowa czy celiakia [201-203].

Ściśle związany z czynnością układu MHC jest też gen *CIITA*, biorący udział w kontroli ekspresji cząsteczek MHC klasy II na powierzchni komórek układu odpornościowego poprzez interakcję z innymi białkami regulatorowymi [204]. Obok schorzeń autoimmunizacyjnych takich jak

reumatoidalne zapalenie stawów, czy stwardnienie rozsiane, polimorfizm w promotorze CIITA jest związany ze zwiększonym ryzykiem choroby Addisona [205, 206].

1.6.1.2 Gen PTPN22

Gen *PTPN22* (ang. *Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 22*) położony jest na ramieniu krótkim chromosomu 1 (1p13.3–13.1). Koduje białkową fosfatazę tyrozynową (ang. *lymphoid tyrosine phosphatase, LYP*), która bierze udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Gen posiada 24 eksony, a kodowane przez niego białko składa się z 807 aminokwasów i lokalizuje się w cytoplazmie. *PTPN22* ulega ekspresji przede wszystkim w grasicy, śledzionie, szpiku kostnym - w limfocytach T oraz innych komórkach hematopoetycznych [207,208].

Fosfataza LYP bierze udział w ograniczaniu spontanicznej aktywacji limfocytów T. Połączenie TCR ze specyficznym antygenem prezentowanym przez cząsteczkę MHC na powierzchni komórek układu odpornościowego prowadzi do jego aktywacji. Kinazy rodziny Src (takie jak Lck i Fyn) fosforylują reszty tyrozynowe w związanych z TCR motywach CD3 i łańcuchach zeta [209]. Fosforylacja ta umożliwia w dalszej kolejności aktywację 70 kDa kinazy białkowej (białko ZAP70), co umożliwia propagację sygnału aktywującego i stymulację ekspresji genów efektorowych odpowiedzi immunologicznej. W komórkach T fosfataza LYP ma działanie defosforylujące m.in. kinazy Lck oraz ZAP70, przez co ogranicza rozprzestrzenianie sygnału aktywacji TCR na wczesnych etapach [210,211]. Fosfataza współpracuje z kinazą Csk, która z kolei fosforyluje inne specyficzne reszty tyrozynowe kinaz Src, wspólnie prowadząc do zmian ich konformacji, a w konsekwencji – inaktywacji [212].

Prawidłowa kontrola nad procesem aktywacji limfocytów jest istotna nie tylko z uwagi na skuteczność mechanizmów obronnych organizmu, ale także dla utrzymania immunotolerancji względem własnych antygenów ustroju i zapobiegania reakcjom z autoagresji. Myszy eksperymentalnie pozbawione genu odpowiadającego ludzkiemu *PTPN22* prezentowały limfadenopatię i splenomegalię, zwiększoną liczbę limfocytów T efektorowych i komórek pamięci oraz wysokie poziomy immunoglobulin, jakkolwiek nie wykazano obecności autoprzeciwciał [213]. Wydaje się, że dopiero *knock-out* tego genu u szczepów myszy ze skłonnością do poszczególnych chorób autoimmunizacyjnych może sprzyjać ujawnianiu się danego schorzenia [214,215].

Polimorficzne warianty genu *PTPN22*, a w szczególności tranzycja cytozyny w tyminę w pozycji 1858 (C1858T, rs2476601), stanowią dobrze poznany czynnik ryzyka schorzeń autoimmunizacyjnych. Polimorfizm rs2476601, zlokalizowany w eksonie 14 genu, skutkuje zamianą argininy na tryptofan w pozycji 620 białka (R620W), w domenie P1 odpowiedzialnej za interakcję fosfatazy LYP z kinazą Csk. Wariant *PTPN22* zawierający tryptofan znacznie słabiej oddziałuje z kinazą, przez co wspólny efekt obu enzymów hamujących reakcję aktywację limfocytu może być osłabiony [208]. Jakkolwiek późniejsze badania czynnościowe nad skutkami substytucji argininy na tryptofan nie przyniosły jednoznacznych rezultatów, aż do danych wskazujących wręcz na nasilenie działania białka powstającego na bazie polimorficznego wariantu genu [214,216,217].

Pierwszym schorzeniem powiązanim z występowaniem polimorfizmu rs2476601 była cukrzyca typu 1, na której przykładzie wykazano częstsze występowanie allelu T rs2476601 wśród chorych w porównaniu ze zdrową populacją kontrolną [218]. Związek ten potwierdzono później w licznych kolejnych analizach, także w populacji polskiej [219-222]. Na podstawie badań w dużej grupie zagrożonych cukrzycą dzieci z Finlandii, kraju o najwyższej zapadalności na cukrzycę typu 1, wskazano że obecność wariantu rs2476601 *PTPN22* wiąże się z ryzykiem pojawiania się kolejnych autooprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom komórek beta i postępowaniem procesu autoimmunizacji [223]. Do dnia dzisiejszego potwierdzono, iż polimorfizm *PTPN22* stanowi również czynnik ryzyka schorzeń takich jak m.in. młodzieńcze idiopatyczne oraz reumatoidalne zapalenie stawów [224,225], toczeń układowy rumieniowaty [226], autoimmunizacyjne choroby tarczycy [227-230], czy bielactwo [231-32]. Mnogość schorzeń związanych z tym polimorfizmem sugeruje, że może on stanowić uogólniony czynnik podatności na rozwój autoimmunizacji [219,228,232]. W wielu schorzeniach tej grupy polimorfizm *PTPN22* jest uznawany za drugi co do znaczenia, po allelach układu HLA, genetyczny czynnik ryzyka. W przypadku autoimmunizacyjnej choroby Addisona związek z rs2476601 potwierdzono w populacji brytyjskiej, norweskiej, a także polskiej [233-236]. Niejednoznaczne dane uzyskano dla populacji niemieckiej, jakkolwiek badana grupa była stosunkowo mało liczna [237].

Obok rs2476601, w obrębie *PTPN22* zidentyfikowano inne jednonukleotydowe polimorfizmy choć ich znaczenie kliniczne pozostaje ograniczone. Uważa się, że obecny w promotorze genu rs2488457 może sprzyjać rozwojowi reumatoidalnego zapalenia stawów, szczególnie w populacjach azjatyckich, gdzie rs2476601 jest praktycznie nieobecny [238]. Z kolei, rs33996649 jest bardzo rzadkim wariantem zmiany sensu, powodującym zamianę Arg263Gln w domenie katalitycznej

fosfatazy i redukcję jej aktywności katalitycznej. Sugeruje się znaczenie ochronne tego polimorfizmu względem rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów i tocznia [239].

1.6.1.3 Gen *CTLA4*

Gen *CTLA4* (ang. *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 2 (2q33.2) koduje cząsteczkę *CTLA4*, zwaną też CD152, ulegającą ekspresji na powierzchni aktywowanych limfocytów T oraz konstytutywnie na limfocytach regulatorowych Treg [240]. Cząsteczka ta należy do nadrodziny immunoglobulin i kompetycyjnie hamuje interakcję cząsteczek CD80 oraz CD86 na komórkach prezentujących antygen z aktywatorową cząsteczką CD28 obecną na limfocycie [240,241]. W ten sposób *CTLA4* przyczynia się do zablokowania aktywacji limfocyta w reakcji na swoisty antygen, rozpoznawany przez receptor TCR [241]. Po stymulacji TCR następuje bardzo szybki wzrost syntezy mRNA dla *CTLA4*, której rolą jest ograniczanie odpowiedzi immunologicznej. Myszy pozbawione odpowiednika genu *CTLA4* rozwijają śmiertelną chorobę limfoproliferacyjną z wielonarządowymi naciekami limfocytów i niszczeniem tkanek, szczególnie mięśnia sercowego i trzustki [242]. Wiedza o fizjologicznym znaczeniu cząsteczki CTLA4 została wykorzystana w praktyce. Monoklonaalne przeciwciała blokujące CTLA4 (ipilimumab) znajdują zastosowanie w stymulacji reakcji odpornościowej przeciwko nowotworom takim jak czerniak złośliwy, czy rak prostaty [243]. Z kolei rekombinowane białko fuzyjne złożone z zewnątrzkomórkowej domeny CTLA4 oraz regionu stałego łańcucha ciężkiego immunoglobuliny IgG1 (abatacept, CTLA4Ig) wiąże kompetycyjnie CD80, ograniczając pobudzenie i ekspansję komórek T, co ma znaczenie w terapii schorzeń autoimmunizacyjnych, głównie reumatoidalnego zapalenia stawów [243,244].

Podjęto, że polimorficzne warianty genu *CTLA4*, poprzez wpływ na ekspresję lub wydajność czynnościową cząsteczki *CTLA4*, mogą w różnym stopniu przyczyniać się do podatności na rozwój schorzeń autoimmunizacyjnych. Najczęściej opisywane polimorfizmy tego genu obejmują rs231775, polegający na tranzykcji adeniny w guaninę w pozycji 49, w eksonie 1 (A49G), a także rs3087243, czyli tranzykcję cytozyny w tyminę w pozycji -318 regionu promotorowego (C318T, znany też jako CT60), oraz mikrosatelitarny polimorfizm (AT)_n w nieulegającym translacji regionie 3' UTR eksonu 4 [245].

Najwięcej danych dotyczących związku z autoimmunizacją opublikowano dla wariantu rs231775, w którym substytucja nukleotydów prowadzi do zamiany treoniny w alaninę w łańcuchu

aminokwasowym białka. W badaniach *ex vivo* komórki T od dawców będących homozygotami GG charakteryzowały się silniejszą odpowiedzią proliferacyjną na stymulację oraz, w zgodzie z powyższym, prezentowały niższy wzrost ekspresji *CTLA4* w porównaniu z limfocytami homozygotycznych nosicieli allelu A [246,247]. Z kolei promotorowy rs3087243 ma wpływać na składanie transkryptu genu *CTLA4*. W przypadku obecności allelu G tego wariantu wykazano istotnie mniejszą liczbę kopii transkryptu rozpuszczalnej formy *sCTLA-4* (pozbawionej eksonu 3, kodującego domenę przezłonową) w stosunku do formy o pełnej długości cząsteczki (eksony 1-4) [248]. Forma rozpuszczalna jest obecna w surowicy i zachowuje zdolność do oddziaływania z cząsteczkami CD80/CD86, a jej zmniejszona ekspresja może powodować ich słabszą blokadę, sprzyjając aktywacji komórek T. Późniejsze analizy nie potwierdziły jednak wpływu rs3087243 na ekspresję obu izoform *CTLA4* [249].

Polimorfizmy *CTLA4* wiążą się z wyższym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 1 [250-253] oraz autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, szczególnie choroby Gravesa-Basedowa [254-261]. Wykazano również ich związek z pierwotną marskością żółciową [262, 263], miastenią [264] i łysieniem plackowatym [265]. Z kolei w odniesieniu do celiakii uzyskiwano rozbieżne dane [252,266,267]. Podobnie w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów, oraz innych systemowych chorób autoimmunologicznych, w których związek z polimorfizmem *CTLA4* wydaje się ograniczony do populacji poza europejskich [268-71]. Analizy wśród pacjentów z autoimmunizacją dotyczącą tarczycy lub komórek beta trzustki wykazały wpływ wariantów *CTLA4* na produkcję autoprzeciwciał oraz kliniczny przebieg choroby, np. rozwój orbitopatii tarczycowej [251,257,261,272]. Podobnie jak polimorfizm *PTPN22*, warianty molekularne *CTLA4* są uznawane za generalny czynnik ryzyka chorób autoimmunizacyjnych – zwraca uwagę ich znaczenie w rozwoju autoimmunizacji wielogruczołowej [273,274]. Opisywano między innymi większą częstotliwość współistnienia autoimmunizacji skierowanej przeciwko antygenom tarczycowym u pacjentów z cukrzycą typu 1 albo celiakią będących nosicielami alleli ryzyka *CTLA4*, co dodatkowo potwierdza iż gen ten jest istotnym czynnikiem w utrzymywaniu immunotolerancji [275,276].

W odniesieniu do choroby Addisona, potwierdzono związek jej występowania z polimorfizmami *CTLA4*, szczególnie rs231775 w eksonie 1 genu, w populacji brytyjskiej, norweskiej i włoskiej, zarówno w przypadkach choroby izolowanej, jak i współistniejącej z innymi [277-279]. Dane niemieckie wykazały związek choroby Addisona z polimorfizmem *CTLA4* jedynie w odniesieniu do nosicieli allelu ryzyka HLA klasy II, DQA1*0501 [279]. Nie udało się natomiast potwierdzić związku

CTLA4 z chorobą wśród pacjentów pochodzenia hiszpańskiego, jakkolwiek grupa badana liczyła jedynie 57 chorych, zatem statystyczna moc tej analizy mogła być niewystarczająca [280].

1.7. Autoimmunizacja u krewnych chorych z chorobą autoimmunizacyjną

Obserwowana od dawna tendencja do kumulowania się schorzeń autoimmunizacyjnych w rodzinach, a także późniejsze dane z badań asocjacyjnych, wskazujące na związek dziedzicznych polimorfizmów genetycznych z występowaniem tej grupy chorób, sugerują że krewni pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi mogą być narażeni na większe ryzyko rozwoju autoimmunizacji. Opublikowane analizy rodzinne potwierdzają taki związek dla niektórych chorób, m. in. :

- stwardnienie rozsiane - zwiększone ryzyko wystąpienia stwardnienia rozsianego, guzkowego zapalenia tętnic, choroby Addisona, choroby Leśniowskiego-Crohna, cukrzycy typu 1, choroby Hashimoto i Graves-Basedowa u krewnych osób chorych [281-83]
- toczenia układowego - zwiększone ryzyko toczenia układowego, pierwotnego zespołu Sjogrena, twardziny układowej, miastonii, reumatoidalnego zapalenia stawów, stwardnienia rozsianego, cukrzycy typu 1 i nieswoistych zapaleń jelit u krewnych osób chorych [284]
- cukrzycy typu 1 - zwiększone ryzyko autoimmunologicznej choroby tarczycy, cukrzycy typu 1, celiakii u krewnych osób chorych [285-87]
- autoimmunologicznej choroby tarczycy - zwiększone ryzyko choroby Addisona, cukrzycy typu 1, niedokrwistości złośliwej, miastonii, toczenia układowego, reumatoidalnego zapalenia stawów u krewnych osób chorych. [288]

W odniesieniu do choroby Addisona dane dotyczące chorób autoimmunizacyjnych wśród członków rodzin są bardzo ograniczone. Jedyna opublikowana próba oszacowania tego problemu miała miejsce niemal pół wieku temu i opierała się na ocenie narządowo-swoistych autoprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia chorych z niewydolnością kory nadnerczy [289]. Przebadano wówczas ponad 200 członków rodzin, jednak analiza była ograniczona do przeciwciał nadnerczowych, tarczycowych i żołądkowych ocenianych testem aglutynacji lub na skrawkach tkanek testem wiązania dopełniacza, który jest mniej czuły i często mniej swoisty w porównaniu ze współcześnie stosowanymi testami opartymi np. o metodę ELISA. Tymczasem osoby z autoimmunizacyjnym uszkodzeniem nadnerczy charakteryzują się wyjątkową skłonnością

do rozwoju innych schorzeń z autoagresji. Częstość współistnienia dodatkowych chorób autoimmunologicznych przekracza u nich 50%, a jeśli brać też pod uwagę postaci subkliniczne chorób, cechujące się obecnością swoistych autoprzeciwciał w surowicy, może nawet sięgać 80% przypadków [290, 291]. Tak silna skłonność do autoimmunizacji świadczy o prawdopodobnym uogólnionym defekcie układu immunologicznego, który może być cechą dziedzicznie dzieloną przez członków rodzin, którzy również mogą rozwijać schorzenia autoimmunizacyjne. Dlatego szczegółowa analiza tego zagadnienia wydała się nie tylko interesującym problemem badawczym, ale również istotną kwestią z punktu widzenia praktycznego. Ustalenie czy osoby z rodzin pacjentów z chorobą Addisona prezentują podwyższone ryzyko autoimmunizacji mogłoby stanowić podstawę dla otoczenia ich np. badaniami przesiewowymi w tym kierunku.

2.0 ZAŁOŻENIA I CELE BADANIA

Celem podjętego badania była ocena częstości występowania biochemicznych i genetycznych markerów procesów autoimmunizacyjnych u krewnych osób z chorobą Addisona, a pośrednio określenie, czy osoby te są istotnie narażone na zwiększone ryzyko rozwoju autoimmunizacji.

Cel ten zamierzono zrealizować poprzez:

- zebranie za pomocą dedykowanej ankiety szczegółowego wywiadu dotyczącego występowania schorzeń autoimmunizacyjnych w rodzinach pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona
- określenie częstości występowania w surowicy krewnych pierwszego stopnia chorych z autoimmunizacyjną chorobą Addisona specyficznych autoprzeciwciał skierowanych przeciw antygenom kory nadnerczy (21-hydroksylazie), tarczycy (tyreoperoksydazie i tyreoglobulinie) oraz komórek beta wysp trzustkowych (dekarboksylazie kwasu glutaminowego, fosfatazie tyrozynowej i transporterowi cynkowemu 8) w porównaniu z grupą kontrolną
- określenie częstości występowania wybranych polimorfizmów genów *PTPN22* oraz *CTLA4* u krewnych pierwszego stopnia osób z autoimmunizacyjną chorobą Addisona oraz wśród zdrowej grupy kontrolnej
- określenie asocjacji wskazanych polimorfizmów z występowaniem autoprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia osób z autoimmunizacyjną chorobą Addisona

3.0 PACJENCI I METODYKA BADAŃ

Badania były podzielone dwa główne etapy:

- I. badanie ankietowe prowadzone wśród osób z autoimmunizacyjną chorobą Addisona, dotyczące schorzeń autoimmunizacyjnych występujących w ich rodzinach;
- II. badania krewnych pierwszego stopnia pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona, obejmujące ocenę kliniczną, badania serologiczne oraz analizy molekularne.

Projekt badania został przedstawiony do oceny Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i uzyskał jej akceptację (Uchwały nr 539/17 oraz nr 39/18, 1051/18 i 379/19, związane z poszerzeniem zespołu badawczego oraz koniecznością modyfikacji tytułu projektu na potrzeby pracy doktorskiej).

Opis prowadzonych badań oraz objętych nimi grup zamieszczono poniżej.

3.1 Badanie ankietowe

3.1.1 Ankietowani pacjenci

Do badania ankietowego kwalifikowano pacjentów chorujących na pierwotną niedoczynność kory nadnerczy spowodowaną procesem autoimmunizacyjnym, którzy pozostają pod opieką Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Chorzy ci mają pełną dokumentację medyczną potwierdzającą niewydolność nadnerczy i są okresowo kontrolowani w Klinice, celem ewentualnych korekt schematu terapii oraz badań w kierunku wykrycia możliwych nowych zaburzeń autoimmunizacyjnych dotyczących innych gruczołów i narządów.

Udział w badaniu proponowano jedynie pacjentom z potwierdzoną autoimmunizacyjną etiologią choroby. Za niewydolność kory nadnerczy o podłożu autoimmunizacyjnym uznawano chorobę z wykazaną obecnością przeciwciał przeciwko 21-hydroksylazie w surowicy pacjenta, z towarzyszącym obrazem małych, zanikowych nadnerczy w obrazowaniu za pomocą tomografii komputerowej i/lub współistnieniem innych zweryfikowanych schorzeń autoimmunizacyjnych.

Kryteria wyłączenia obejmowały:

- pierwotną niedoczynność kory nadnerczy spowodowaną adrenalektomią, np. z powodu obustronnych guzów chromochłonnych w przebiegu zespołu mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej (ang. *Multiple Endocrine Neoplasia*, MEN), gruczliczym

uszkodzeniem nadnerczy, adrenoleukodystrofią sprzężoną z chromosomem X, czy innymi rzadkimi przyczynami; również pacjenci z rozpoznaniem wrodzonym przerostem nadnerczy oraz osoby z autoimmunizacyjnym zespołem wielogruzołowym typu 1 (chorobą o znanym modelu dziedziczenia) byli wyłączeni z badania;

- wtórną niedoczynność kory nadnerczy.

Osoby z powyższymi chorobami nie były kwalifikowane do udziału w projekcie badawczym. Pacjentom spełniającym kryteria kwalifikacyjne badania wyjaśniano jego cele i planowany przebieg, a po uzyskaniu ich pisemnej zgody na udział w projekcie, proszono o wypełnienie ankiety dotyczącej występowania chorób autoimmunizacyjnych w ich rodzinach.

3.1.2 Ankieta badawcza

Ankieta, którą przedstawiano pacjentom, obejmowała 23 choroby autoimmunizacyjne, każda z krótkim opisem oraz miejscem na wskazanie, kto z krewnych cierpi na daną chorobę oraz w jakim wieku została ona stwierdzona (Załącznik nr 1). W ankiecie ujęto autoimmunizacyjne schorzenia układu dokrewnego, a także najczęstsze choroby autoimmunizacyjne typu układowego oraz choroby o tej etiologii dotyczące swoiście innych układów. Na liście znalazły się: choroba Addisona, autoimmunizacyjna choroba tarczycy pod postacią przewlekłego zapalenia tarczycy (choroba Hashimoto) lub choroby Gravesa-Basedowa, cukrzyca typu 1, przedwczesna menopauza, niedoczynność przytarczyc, limfocytarne zapalenie przysadki, bielactwo, łysienie plackowate, łuszczycy, niedokrwistość złośliwa Addisona-Biermera, przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka, celiakia, choroba Leśniowskiego-Crohna lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego, autoimmunologiczne zapalenie wątroby oraz pierwotna marskość żółciowa, reumatoidalne zapalenie stawów, zespół Sjögrena, toczeń rumieniowaty układowy, twardzina układowa, zespół antyfosfolipidowy, stwardnienie rozsiane, samoistna plamica małopłytkowa, a także miastenia.

Ankieta była anonimowa, kodowana numerem, aby identyfikacja chorego i jego rodziny pozostawała niemożliwa dla osób nieuprawnionych. Pacjenci mogli zabrać ankiety do domu i skonsultować się z krewnymi oraz mieli zapewnioną możliwość kontaktu telefonicznego z lekarzem prowadzącym badanie w razie wątpliwości. Wyraźnie podkreślano, aby zgłaszane były jedynie choroby krewnych, które zostały zdiagnozowane przez lekarzy. Do części pacjentów ankiety rozesłano pocztą. Łącznie ankietę otrzymało 148 osób z chorobą Addisona. Wypełnioną ankietę zwróciło 106 pacjentów (71.6%).

3.2 Badania krewnych

W drugim etapie badania krewni pierwszego stopnia pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona byli zapraszani do bezpośredniego udziału w projekcie.

3.2.1 Badane grupy

3.2.1.1 Krewni pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona

Za krewnych pierwszego stopnia uznawano rodziców, rodzeństwo i dzieci osób chorych. Po wstępnym telefonicznym wyjaśnieniu założeń projektu, uczestnicy zgłaszali się do badania w umówionym terminie rano, na czczo, z pełną dostępną dokumentacją medyczną. Dokładnie wyjaśniano im cele i metody badania, celem wyjaśnienia wątpliwości i uzyskania pisemnej zgody na udział w projekcie. Z uwagi na dopuszczony udział w badaniu również dzieci od 12. roku życia, zgodnie z wymogami, zgodę na ich badanie wyrażał opiekun prawny, a w odniesieniu do tych które ukończyły 16. rok życia, także sam małoletni.

Łącznie, w tym etapie badań udział wzięło 113 osób, krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona (68 kobiet i 45 mężczyzn). Ich średni wiek w momencie badania wynosił 34,8 lat, a odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD) 15,4 lat. W badanej grupie było 19 osób przed ukończeniem 18. roku życia - dzieci pacjentów z chorobą Addisona. U wszystkich przeprowadzono wywiad dotyczący chorób o możliwym podłożu autoimmunizacyjnym, aktualnego toku ich diagnostyki i/lub leczenia w oparciu o dostępną dokumentację medyczną. Wykonywano też badanie przedmiotowe z uwzględnieniem objawów właściwych dla schorzeń autoimmunizacyjnych, np. powiększenie tarczycy oceniane palpacyjnie, plamy bielacze, hiperpigmentacja skóry i w błonach śluzowych charakterystyczna dla pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy, łysienie plackowate, czy deformacja stawów typowych dla schorzeń reumatologicznych.

U wszystkich zgłaszających się krewnych wykonywano również badanie ultrasonograficzne tarczycy przy użyciu aparatu Affiniti 70 z sondą liniową o częstotliwości 7,5MHz (Philips, Eindhoven, Holandia). Zamiarem badania było wykrycie lub potwierdzenie (jeśli w wywiadu wynikało wcześniej rozpoznane schorzenie tarczycy) sonograficznych cech charakterystycznych dla autoimmunizacyjnej choroby tarczycy.

Od krewnych pobierano także krew do badań serologicznych oraz molekularnych - łącznie 6 ml krwi, z czego 2 ml krwi na EDTA celem izolacji DNA genomowego oraz ok. 4 ml krwi na skrzep.

Z krwi pobranej na skrzep oddzielano surowicę poprzez wirowanie 4000 obrotów na minutę (ang. *rounds per minute*, rpm) w temperaturze +7°C przez 10 minut (mikrowirówka z chłodzeniem Hettich Micro 220R, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Niemcy). Próbkę surowicy były dzielone na porcje po 60 µl i zamrażane w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczeń autoprzeciwciał. Krew pobrana do probówek z EDTA była również mrożona w temperaturze -20°C do czasu izolacji DNA.

3.2.1.2 Grupy kontrolne

Grupę kontrolną do badań serologicznych stanowiło 143 ochotników rekrutowanych z Poradni Lekarza Rodzinnego, dobranych płcią (89 kobiet i 54 mężczyzn) i wiekiem (średnia 35,4 ± 12,6 lat) względem analizowanych krewnych. Ochotnicy nie byli selekcyonowani ze względu na stan zdrowia, w tym obecność schorzeń autoimmunizacyjnych, ponieważ zamierzano porównać występowanie autoprzeciwciał w surowicy w grupie krewnych pacjentów z AAD z próbą osób pochodzących z populacji.

Z kolei grupę kontrolną do analiz molekularnych stanowiło 393 zdrowych krwiodawców (245 kobiet, 148 mężczyzn). Ich anonimowe próbki krwi uzyskano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Poznaniu, wykorzystując krew pozostałą po badaniach koniecznych dla kwalifikacji krwiodawców. Zgłaszający się do RCKiK ochotnicy są wstępnie kwalifikowani jako krwiodawcy, jeśli wywiad lekarski oraz badanie przedmiotowe nie wskazują m.in. na obecność schorzeń autoimmunizacyjnych, a w dalszej kolejności – jeśli nie ma przeciwwskazań w wynikach ich badań biochemicznych oraz wirusologicznych. Choroby takie, jak m.in. łuszczyca, twardzina, kolagenozy, cukrzyca czy schorzenia tarczycy trwale dyskwalifikują z dawstwa krwi. Dostępne dane kliniczne krwiodawców obejmowały jedynie wiek oraz płeć ochotnika oraz fakt, że dana osoba przeszła pozytywnie kwalifikację medyczną jako krwiodawca. Z próbek krwi uzyskanych od 393 krwiodawców wyizolowano DNA do badań molekularnych, celem porównania częstości występowania polimorficznych wariantów genów u osób zdrowych z krewnymi pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona.

3.2.2. Analizy serologiczne

Analizy obecności autoprzeciwciał w surowicy prowadzono po zebraniu próbek od wszystkich uczestników, za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów diagnostycznych opartych o metodę immunoenzymatyczną (ang. *Enzyme-Linked Immunesorbent Assay*, ELISA) lub w oparciu o znakowanie radioizotopowe ¹²⁵I rekombinowanych ludzkich antygenów lub monoklonalnych przeciwciał (ang. *RadiolImmune Assay*, RIA). Oznaczenia autoprzeciwciał wykonano u 113 krewnych

pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona oraz u 143 ochotników dobranych płcią i wiekiem.

Do każdej z analiz RIA wykorzystywano po 20 μ L surowicy, natomiast do badań metodą ELISA – po 25 μ L w duplikacie. Oznaczenia prowadzono zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producentów poniższych zestawów:

- a) przeciwciała przeciwko 21-hydroksylazie (a21OH) – zestaw 21-Hydroxylase Autoantibody ELISA Kit (RSR Ltd. Cardiff, Wielka Brytania). Dokładność między testami – współczynnik zmienności 4,6–7,3%, dokładność wewnątrz testowa – współczynnik zmienności 2,2–6,2%. Czułość testu 86%, dolna granica detekcji 0,13 U/mL. Wartości referencyjne < 0,4 U/mL.
- b) przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie (aTPO) – zestaw Anti-TPOn RIA, ThermoScientific (BRAHMS GmbH, Hennigsdorf, Niemcy). Dokładność między testami – współczynnik zmienności 2,9–4,5%, dokładność wewnątrz testowa – współczynnik zmienności 3,9–9,1%. Czułość analityczna testu 5,5 U/mL, czułość funkcjonalna badania < 30 U/mL. Wartości referencyjne \leq 60 U/mL.
- c) przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie (aTg) – zestaw Anti-TGn RIA, ThermoScientific (BRAHMS GmbH, Hennigsdorf, Niemcy). Dokładność między testami – współczynnik zmienności 2,0–7,5%, dokładność wewnątrz testowa – współczynnik zmienności 3,1–5,5%. Czułość analityczna testu 5,5 U/mL, czułość funkcjonalna badania < 20 U/mL. Wartości referencyjne \leq 60 U/mL.
- d) przeciwciała przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego (aGADA) – zestaw GAD65 Ab RIA (DRG Instruments GmbH, Marburg, Niemcy). Dokładność między testami – współczynnik zmienności 1,1–5,2%, dokładność wewnątrz testowa – współczynnik zmienności 1,3–10,0%. Czułość i swoistość testu 100%. Czułość funkcjonalna testu 0,7 U/mL. Wartości referencyjne < 1,0 U/mL, wartości graniczne 1,0-2,0 U/mL, wartości dodatnie \geq 2,0 U/mL.
- e) przeciwciała przeciwko transporterowi cynkowemu 8 (aZnTA8) – zestaw Zinc Transporter 8 Autoantibody ELISA Kit (RSR Ltd. Cardiff, Wielka Brytania). Dokładność między testami – współczynnik zmienności 7,5–9,3%, dokładność wewnątrz testowa – współczynnik zmienności 3,5–6,2%. Czułość testu 72%, swoistość 99%. Dolna granica detekcji 1,2 U/mL. Wartości referencyjne < 15 U/mL.
- f) przeciwciała przeciwko fosfatazie tyrozynowej (aIA-2) – zestaw IA2 Ab RIA (DRG Instruments GmbH, Marburg, Niemcy). Dokładność między testami – współczynnik zmienności 1,9–2,9%, dokładność wewnątrz testowa – współczynnik zmienności 2,6–10,4%. Czułość testu 88%,

swoistość testu 95%. Czułość funkcjonalna testu 0,8 U/mL. Wartości referencyjne < 1,0 U/mL, wartości graniczne 1,0-2,0 U/mL, wartości dodatnie \geq 2,0 U/mL.

Badania metodą ELISA wykonano w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Odczyt absorbancji i przeliczenie wyników oznaczeń prowadzono na czytniku płytek ELx808 Absorbance Reader (BioTek, VT, USA) z użyciem oprogramowania Gen5 Microplate Reader and Imager Software. Badania metodą RIA przeprowadzono w Pracowni Izotopowej Centralnego Laboratorium Szpitala Klinicznego nr 5 im. K. Jonschera w Poznaniu, a wyniki odczytywano za pomocą licznika gamma Wallac 1470 Wizard (Perkin Elmer, Turku, Finlandia).

3.2.3 Badania molekularne

Analizy molekularne przeprowadzono w Zakładzie Patologii Molekularnej, Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Badaniu podlegały próbki DNA uzyskanego z leukocytów krwi obwodowej od 112 krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona oraz od 393 zdrowych kontroli.

3.2.3.1 Izolacja DNA

Izolację DNA z leukocytów krwi obwodowej przeprowadzono z użyciem zestawu Gentra Puregene Blood Kit firmy Qiagen (Hilden, Germany), który umożliwia uzyskanie wysokocząsteczkowego (100–200 kb) DNA o dużej czystości i stabilności. DNA izolowano wg instrukcji producenta. Po usunięciu erytrocytów za pomocą RBC Lysis Solution (inkubacja 20 minut w temperaturze pokojowej 20-25°C), pozostałe białe krwinki były odwirowywane 2000 x g przez 3 minuty i podlegały lizie z użyciem detergentu anionowego w obecności stabilizatora DNA, który ogranicza działanie enzymów rozkładających DNA (Cell Lysis Solution – inkubacja 30 minut w temperaturze 37°C). Zanieczyszczenie białkami usuwano poprzez ich wysalanie (Protein Precipitation Solution) i wirowanie 2000 x g przez 5 minut. Następnie genomowe DNA wytrącano z nadsączonego izopropanolem (wirowanie 2000 x g przez 3 minuty), uzyskując jego jasny osad na dnie próbówki. Osad DNA przemywano 70% etanolem (wirowanie 2000 x g przez 1 minutę) i po osuszeniu na powietrzu przez 5 minut, rozpuszczano w buforowanym roztworze zawierającym stabilizator DNA (DNA Hydration Solution, 1 mM EDTA, 10 mM Tris·Cl pH 7,5). Uzyskane próbki inkubowano przez 1 godzinę w łaźni wodnej w 37°C, a następnie pozostawiano przez noc w temperaturze pokojowej.

3.2.3.2 Ocena jakościowa i ilościowa uzyskanego DNA

Czystość oraz stężenie preparatów DNA oceniano następnego dnia za pomocą spektrofotometru NanoDrop™1000 (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) z wykorzystaniem następujących długości fali światła widzialnego:

260nm – maksymalna absorbcja dla DNA

280nm – maksymalna absorbcja dla białek

320nm – wartość właściwa dla absorpcji tła.

Czystość uzyskanych preparatów DNA, wyrażana stosunkiem absorbancji dla fali o długości 260nm i 280nm (A260/A280), mieściła się pomiędzy 1,7-2,0 dowodząc bardzo dobrego stopnia oczyszczenia DNA. Do obliczenia stężenia wyizolowanego DNA posłużyły wartości absorbancji przy 260nm i 280nm po odjęciu wartości tła. Stężenia DNA w przygotowanych preparatach mieściły się w zakresie 110-580 ng/μL.

Oceny jakościowej oczyszczonego DNA dokonywano za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, US) w buforze 0,5x TBE. Bufor TBE rozcieńczano z 10x TBE, przygotowywanego z użyciem 215,6 g Trizma®Base (890mM), 110,1 g kwasu borowego (890mM) oraz 14,89 g EDTA (20mM) dopełnionych do 2000 mL wodą destylowaną, skalibrowanych do pH 8,0. 1% żel agarozowy przygotowano z użyciem 1,0 g agarozy dopełnianej do 100 ml buforem 0,5x TBE. Po rozpuszczeniu i schłodzeniu dodawano 2,5 μl bromku etydyny (10mg/ml). Próbki DNA nakładano na żel po wymieszaniu z buforem obciążającym DNA Gel Loading Dye 6x (Thermo Scientific™ Foster City, CA, USA) oraz wodą w stosunku 2:1:3. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 2 godziny przy napięciu 80V, z użyciem zestawu do elektroforezy horyzontalnej Sub-Cell®GT (BioRad, Hercules, CA, USA), a następnie oceniano w świetle UV wykorzystując system dokumentacji żeli BioDoc-IT System. Zweryfikowane w ten sposób próbki DNA zamrażano i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

3.2.3.3 Genotypowanie jednonukleotydowych polimorfizmów (ang. *Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) genów *PTPN22* oraz *CTLA4*

Ocena polimorficznych wariantów genów *PTPN22* oraz *CTLA4* była prowadzona standardowymi technikami molekularnymi w oparciu o łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), z użyciem komercyjnie dostępnych, specyficznych dla poszczególnych alleli sond typu TaqMan® znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi VIC™ i FAM™ (ThermoFischer Scientific, Applied Biosystems, Foster City, CA). Technologia ta umożliwia

identyfikację alleli za pomocą gotowych testów (TaqMan® SNP Genotyping Assay), które zawierają swoiste startery amplifikujące fragment DNA zawierający badany SNP oraz dwie allelo-specyficzne sondy typu TaqMan®. Sondy są fluorescencyjnie wyznakowanymi oligonukleotydami o sekwencji komplementarnej do fragmentu matrycy DNA bezpośrednio otaczającego dany SNP. Sondy zawierają po dwa barwniki fluorescencyjne – „reporter” zlokalizowany na końcu 5’, zazwyczaj VIC™ lub FAM™, natomiast na końcu 3’ „wygaszacz” (*quencher*), np. TAMRA™. Wygaszacz zlokalizowany niedaleko reportera pochłania emitowany przez reporter sygnał, natomiast w trakcie amplifikacji sonda ulega hydrolizie na skutek 5’-nukleazowej aktywności polimerazy DNA. Reporter i wygaszacz zostają wówczas rozdzielone, a sygnał fluorescencyjny reportera uwalnia się [292]. Emisja sygnału świadczy o obecności tego allelu, dla którego dana sonda jest swoista. Detekcja sygnałów z obu sond dowodzi natomiast heterozygotyczności badanej próby.

Do analizy badanych polimorfizmów genu *PTPN22* oraz *CTLA4* użyto sond typu TaqMan® SNP Genotyping Assay, opisanych w Tabeli 4. Reakcje prowadzono z użyciem zoptymalizowanego buforu HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), który zawiera polimerazę DNA HOT FIREPol®, mieszaninę deoksynukleotydów (dNTPs) oraz jony magnezu w odpowiednim stężeniu (Tabela 5). Do każdej reakcji stosowano po 15ng matrycy DNA, a badanie prowadzono w warunkach termicznych przedstawionych w Tabeli 6.

Tabela 4. Komercyjnie dostępne sondy TaqMan® SNP Genotyping Assay wykorzystane do genotypowania polimorfizmów genów *PTPN22* i *CTLA4* metodą PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem technologii TaqMan®

Gen	Polimorfizm	TaqMan® SNP Genotyping Assay	Amplifikowana sekwencja z locus polimorfizmu [VIC\FAM]
<i>PTPN22</i>	rs2476601	C_16021387_20	ACCACAATAAATGATTCAGGTGTCC[A/G] TACAGGAAGTGGAGGGGGGATTCA
<i>CTLA4</i>	rs231775	C_2415786_20	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT[A/G] CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej dla genotypowania polimorfizmów genów *PTPN22* i *CTLA4* metodą PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem technologii TaqMan®

Odczynnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej	Użyta objętość
40x TaqMan® SNP Genotyping Assay	40x	1x	0,375 µl
HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX)	5x	1x	3,0 µl
H ₂ O	---	---	8,625 µl
matryca DNA	5 ng/µl	15ng/reakcję	3,0 µl
Objętość końcowa			15 µl

Tabela 6. Warunki prowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystanej dla genotypowania polimorfizmów genów *PTPN22* i *CTLA4* z wykorzystaniem technologii TaqMan®

Etap reakcji		Czas trwania	Temperatura
Wstępna denaturacja		15 min	95°C
40 cykli	Denaturacja	15 sek	95°C
	Przyłączenie starterów i synteza nici DNA	60 sek	60°C

3.2.3.4 Sekwencjonowanie DNA

Genotypy wybranych prób wszystkich trzech badanych polimorfizmów potwierdzono za pomocą cyklicznego sekwencjonowania DNA z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych.

Fragmenty genów *PTPN22* i *CTLA4* zawierające badane polimorfizmy były amplifikowane metodą PCR z zastosowaniem starterów zaprojektowanych za pomocą programu Primer 3, dostępnego na stronie internetowej <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> [293] (Tabela 7, Ryciny 2,3). Specyficzność zaprojektowanych starterów sprawdzono *in silico* przy użyciu aplikacji na stronie internetowej UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz, CA, US): <https://genome.ucsc.edu/cgi->

bin/hgPcr. Optymalną temperaturę przyłączania danej pary starterów ustalono przeprowadzając wstępną reakcję PCR w gradiencie temperatur 48-60°C dla każdego amplifikowanego fragmentu DNA. Reakcje amplifikacji badanych fragmentów przeprowadzano w objętości 30µl, z użyciem REDTaq polimerazy DNA oraz mieszaniny dNTPs (oba odczynniki z Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA). Zawartość matrycy DNA w mieszaninie reakcyjnej wahała się pomiędzy 80 a 160ng. Dokładny skład mieszaniny reakcyjnej zaprezentowano w Tabeli 8. Reakcję PCR prowadzano w termocyklerze Tetrad 2 (BioRad, Hercules, Ca, USA) zgodnie z profilem czasowo-temperaturowym przedstawionym w Tabeli 9.

Tabela 7. Charakterystyka starterów użytych do amplifikacji fragmentów DNA zawierających badane polimorfizmy genów *PTPN22* i *CTLA4*, celem ich sekwencjonowania i potwierdzenia genotypów ustalonych metodą PCR w czasie rzeczywistym

Polimorfizm	Sekwencja starterów	Długość produktu PCR	Temp. przyłączania
rs2476601 <i>PTPN22</i>	F: 5'-GATAATGTTGCTTCAACGGAATTT R: 5'-TCACCAGCTTCTCAACCACA	215 pz	61°C
rs231775 <i>CTLA4</i>	F: 5'-CTGAACACCGCTCCCATAAA R: 5'-CCTCCTCCATCTTCATGCTC	168 pz	59°C

F- starter *forward*, R – starter *reverse*, pz – pary zasad

```
CCTAAGAGAATTTATTTTGCTTTTCCTTGAATGAACAAGTGCAACTTTACTGATAATGTTGCTTC
AACGGAATTTAAATATAAATTATGGTAAATTTATATTTAATATTAGAATATAAGAATTCCTTTGGA
TTGTTCTAATTAACAATTGTTACAATATTTTGGACATTTGGATAGCAACTGCTCCAAGGATAGATG
ATGAAATCCCCCTCCACTTCTGTACGGACACCTGAATCATTATTGTGGTTGAGGAAGCTGGTG
AGTACAGTTCAGTAAGTATAAAATAAAGTGTGGGATGGGCATGGTGGCTCATGCCTTTAATTCCAG
CACTTTGGGAAGCTGATGTGTGAGCCTTGAGTTTGAGGAGTTCATTGAGGCCAGGAGTTCAAGAC
TAGCCTGCGCAACATAGTGA
```

Rycina 2. Amplifikowany do sekwencjonowania fragment genu *PTPN22* obejmujący polimorfizm rs2476601. Miejsca przyłączania starterów podkreślono, a lokalizację polimorfizmu wyróżniono kolorem czerwonym.

ATTTCAAAGCTTCAGGATCCTGAAAGGTTTTGCTCTACTTCTCTGAAGACCTGAACACCGCTCCCAT
AAAGCCATGGCTTGCTTGGATTTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT**A**CCAGGACCT
GGCCCTGCACTCTCTGTTTTTCTTCTTTTCATCCCTGTCTTCTGCAAAGGTGAGTGAGACTTTTG
GAGCATGAAGATGGAGGAGGTGTTTCTCTACCTGGGTTTCATT

Rycina 3. Amplifikowany do sekwencjonowania fragment genu *CTLA4* obejmujący polimorfizm rs231775. Miejsca przyłączenia starterów podkreślono, a lokalizację polimorfizmu wyróżniono kolorem czerwonym.

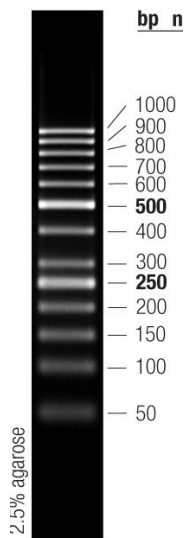
Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów DNA zawierających badane polimorfizmy genów *PTPN22* i *CTLA4*, celem ich sekwencjonowania

Odczynnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie w reakcji	Użyta objętość
H ₂ O	---	---	21,0 µl
Bufor do PCR	10x	1x	3,0 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,6 µl
Starter <i>forward</i> (F)	10 µM	0,4 µM	1,2 µl
Starter <i>reverse</i> (R)	10 µM	0,4 µM	1,2 µl
REDTaq polimeraza DNA	1 U/µl	1 U/reakcję	1,0 µl
matryca DNA	40-80ng/µl	80-160 ng/reakcję	2,0 µl
Objętość końcowa			30 µl

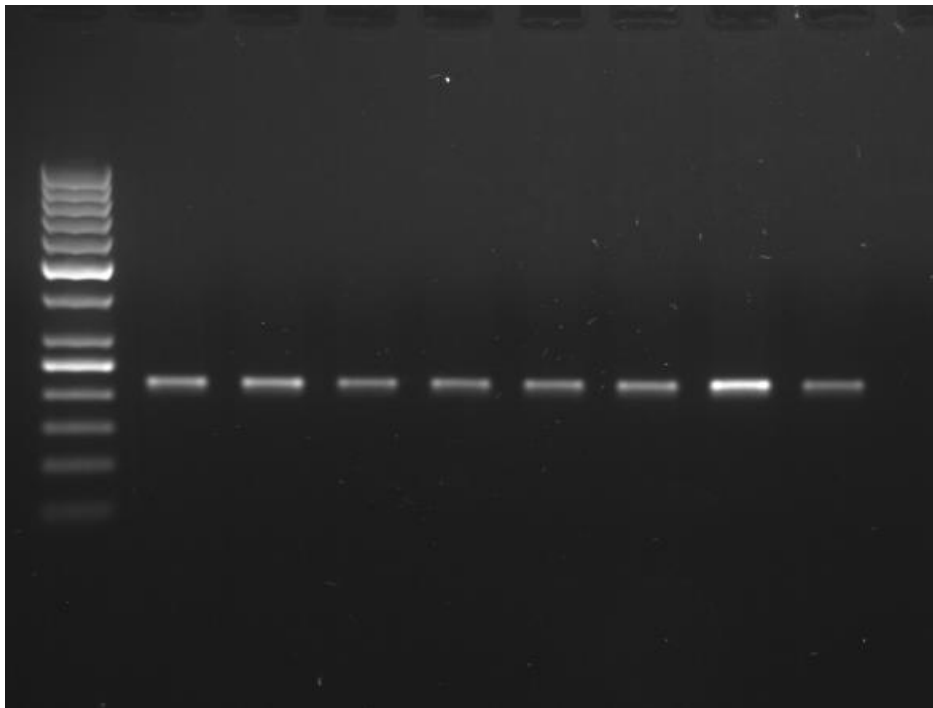
Tabela 9. Warunki prowadzenia reakcji PCR dla amplifikacji fragmentów DNA zawierających badane polimorfizmy genów *PTPN22* i *CTLA4*, celem ich sekwencjonowania

Etap reakcji		Czas trwania	Temperatura
Denaturacja wstępna		5 min	94°C
35 cykli	Denaturacja	30 sek	92°C
	Przyłączanie starterów	40 sek	61°C dla rs2476601 59°C dla rs231775
	Synteza nici DNA	40 sek	72°C
Końcowa elongacja nici DNA		5 min	72°C

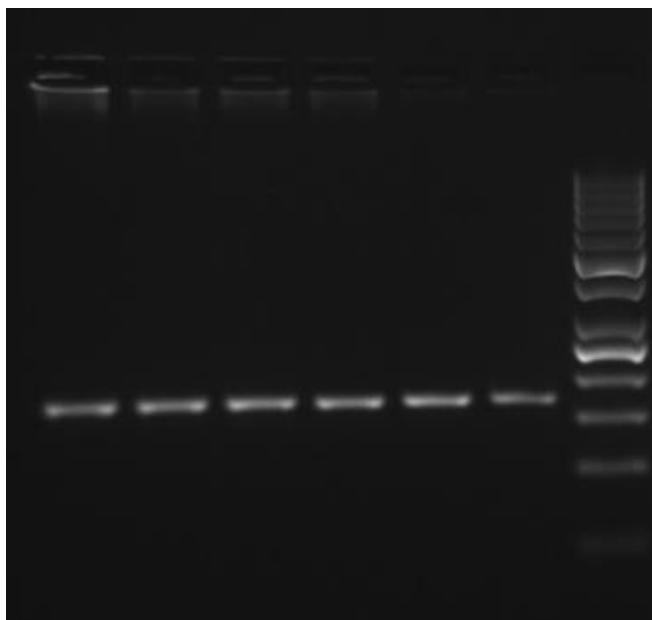
Jakość uzyskanych produktów PCR oceniano na drodze elektroforezy w 2,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (przygotowanie buforu analogiczne jak przy ocenie jakościowej izolowanego DNA, opisanej powyżej). Dzięki zastosowaniu w reakcji amplifikacji REDTaq[®] polimerazy DNA, która jest sprzężona ze stabilnym czerwonym barwnikiem, nie było konieczne dodawanie buforu obciążającego i produkty PCR były nakładane bezpośrednio na żel. Markerem wielkości uzyskanych prążków był Gene Ruler 50bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Foster City, CA) – typowy rozdział w 2,5% agarozie zaprezentowany jest na Rycinie 4. Rozdział elektroforetyczny prowadzono z użyciem zestawu do elektroforezy horyzontalnej Sub-Cell[®]GT (BioRad, Hercules, CA, USA) przez 50-60 minut, przy napięciu 100 Volt. Jego wyniki analizowano w świetle UV, za pomocą systemu dokumentacji żeli BioDoc-ITSystem (Ryciny 5 i 6).



Rycina 4. Rozdział markera wielkości GeneRuler 50bp DNA Ladder w 2,5% żelu agarozowym – wielkość wizualizowanych fragmentów DNA (liczba par zasad)



Rycina 5. Wynik reakcji PCR dla amplifikacji 215-nukleotydowego fragmentu DNA zawierającego badany polimorfizm rs2476601 genu *PTPN22*



Rycina 6. Wynik reakcji PCR dla amplifikacji 168-nukleotydowego fragmentu DNA zawierającego badany polimorfizm rs231775 genu *CTLA4*

Uzyskane produkty PCR były następnie oczyszczane za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy), celem usunięcia starterów, polimerazy, soli, dNTPs oraz pozostałych zanieczyszczeń. Działanie zestawu oparte jest na wiązaniu DNA do złoża krzemionkowego mini-kolumny w warunkach wysokiej siły jonowej. Próbkę jest płukana, a oczyszczony DNA – wymywany za pomocą buforu o niskiej sile jonowej. Tak przygotowany preparat nadaje się do dalszych analiz.

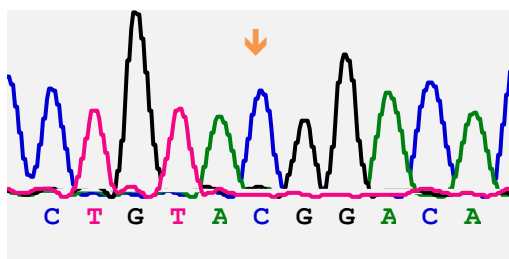
Oczyszczone produkty PCR sekwencjonowano z wykorzystaniem zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Cykliczne sekwencjonowanie DNA jest zmodyfikowaną wersją metody dideoksy Sanger, które opiera się na syntezie komplementarnej nici DNA z zastosowaniem termostabilnej polimerazy DNA oraz krótkiego fragmentu DNA jako startera. Do reakcji dodaje się deoksynukleotydy i dideksynukleotydy (ddNTP), pozbawione grupy hydroksylowej w pozycji 3' rybozy. Przyłączenie dideksynukleotydów do syntetyzowanej nici DNA blokuje dalsze wydłużanie łańcucha polinukleotydowego, ponieważ ddNTP nie mogą tworzyć wiązania fosfodiesterowego z następnym nukleotydem. Podczas reakcji powstaje mieszanina fragmentów różnej długości zakończonych odpowiednio w miejscach występowania adeniny, guaniny, cytozyny, tyminy [294].

Rozdział elektroforetyczny porządkuje fragmenty względem wielkości i umożliwia odczyt sekwencji DNA.

Reakcję sekwencjonowania, jak również rozdział jej produktów na automatycznym sekwenatorze ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer, przeprowadzono komercyjnie w Pracowni Sekwencjonowania DNA firmy Genomed w Warszawie. Przykładowe wyniki sekwencjonowań badanych wariantów prezentuje Rycina 7.

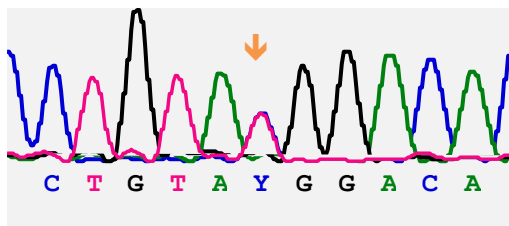
(A) rs2476601 w genie *PTPN22*

homozygota CC

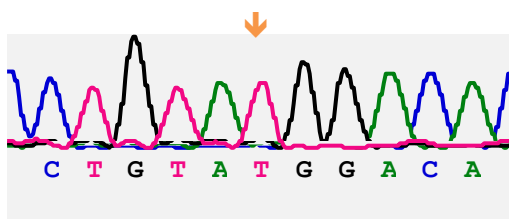


heterozygota CT

(Y = C lub T wg kodów IUPAC, ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

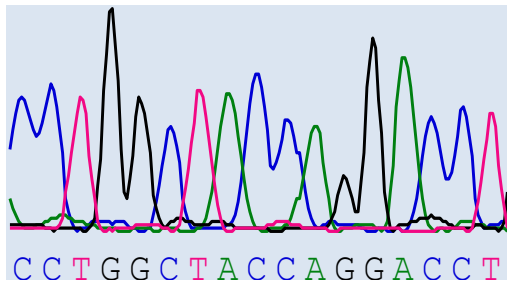


homozygota TT



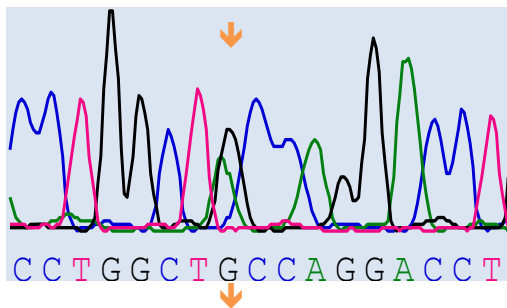
(B) rs231775 w genie *CTLA4*

homozygota AA

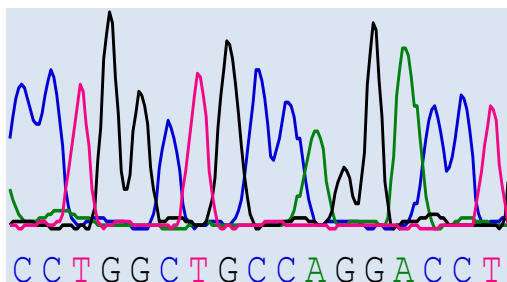


heterozygota AG

(R = A lub G wg kodów IUPAC)



homozygota GG



Rycina 7. Przykładowe wyniki sekwencjonowania badanych polimorfizmów (A) genu *PTPN22* oraz (B) genu *CTLA4*

3.3 Metody statystyczne

Normalność rozkładu badanych zmiennych ciągłych była weryfikowana testem Shapiro-Wilka. Dane spełniające warunki rozkładu normalnego porównywano za pomocą testu t-studenta, natomiast dane, których rozkład nie był normalny, były porównywane z użyciem testu Manna-Whitney'a. W ocenie zależności pomiędzy badanymi zmiennymi ciągłymi posługiwano się testem Pearsona dla

zmiennych zachowujących rozkład normalny oraz korelacją rang Spearmana dla zmiennych o rozkładzie odbiegającym od normalnego.

Zgodność rozkładu genotypów z równowagą Hardy-Weinberga testowano dla obu badanych loci, odrębnie w grupie krewnych oraz zdrowych kontroli. Prawo Hardy-Weinberga dotyczy zależności pomiędzy częstością genotypów danego locus w populacji. Jest ono spełnione dla dużych, swobodnie krzyżujących się populacji, w których proporcje alleli pozostają stałe w kolejnych pokoleniach, zatem nie ma wysokiej częstości mutacji, ani migracji, a badane locus nie podlega naturalnej selekcji [295]. Stwierdzenie istotnych odchyień od równowagi Hardy-Weinberga w grupie poddawanej badaniom polimorfizmów może dowodzić nielosowej selekcji osobników, co pociąga za sobą ryzyko zafałszowania wyników. Oceny zgodności z równowagą Hardy-Weinberga dokonano za pomocą kalkulatora opartego na teście χ^2 , który jest dostępny na stronie internetowej Helmholtz Center Munich (www.helmholtz-muenchen.de). Oceniano, czy istnieje statystycznie znacząca różnica pomiędzy obserwowaną częstością genotypów, a tą wynikającą z częstości alleli. Brak takiej różnicy (wartość $p > 0,05$) przyjmowano jako potwierdzenie zgodności z prawem Hardy-Weinberga.

Dane kategoryczne były porównywane w tabelach kontyngencji 2x2 i 3x2 z użyciem testu χ^2 , a w przypadku niskich liczebności (gdy liczebność oczekiwana wynosiła ≤ 5) – testu dokładnego Fishera. W przypadku stwierdzenia istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami, określano asocjację badanej cechy, np. płci, czy genotypu, z ocenianym stanem klinicznym, np. obecnością autoprzeciwciał w surowicy, za pomocą obliczeń ilorazu szans (OR) z 95% przedziałem ufności (95% CI).

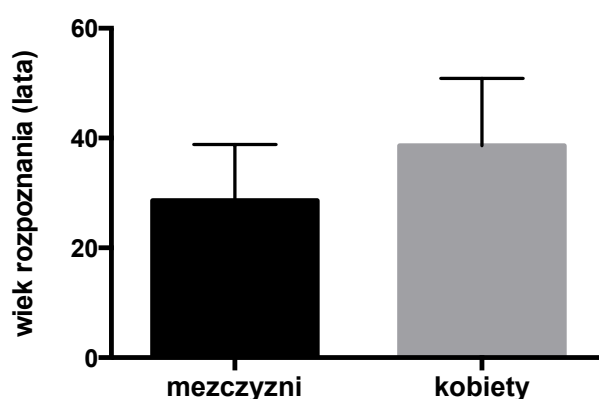
Prezentowane wartości p dotyczą testów dwustronnych, a jako granicę istotności statystycznej przyjęto $p \leq 0,05$. Obliczenia statystyczne, w tym statystyki opisowe oraz testy, wykonano używając programu GraphPad Prism 6.0c. (GraphPad Software, San Diego, CA).

4.0 WYNIKI

4.1 Badanie ankietowe

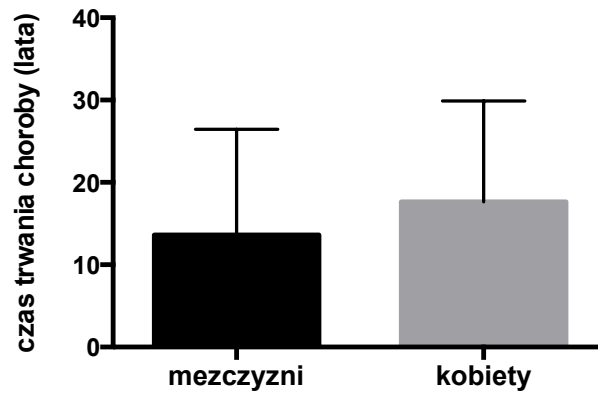
4.1.1 Ogólna charakterystyka grupy pacjentów z chorobą Addisona

W pierwszym etapie badania udział wzięło 106 pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona, którzy wypełnili ankiety dotyczące schorzeń autoimmunizacyjnych występujących w ich rodzinach. Wśród pacjentów było 28 mężczyzn (26,4%) i 78 kobiet (73,6%). Średni wiek chorych wynosił wraz z odchyleniem standardowym $52,6 \pm 14,3$ lat (zakres 21-79 lat). Średni wiek pacjentów w momencie rozpoznania choroby Addisona wynosił $36,0 \pm 12,5$ lat (zakres 2-65 lat) i różnił się istotnie u obu płci (średnio $28,6 \pm 10,2$ lat u mężczyzn i $38,6 \pm 12,3$ lat u kobiet, $p=0,0002$) (Rycina 8).



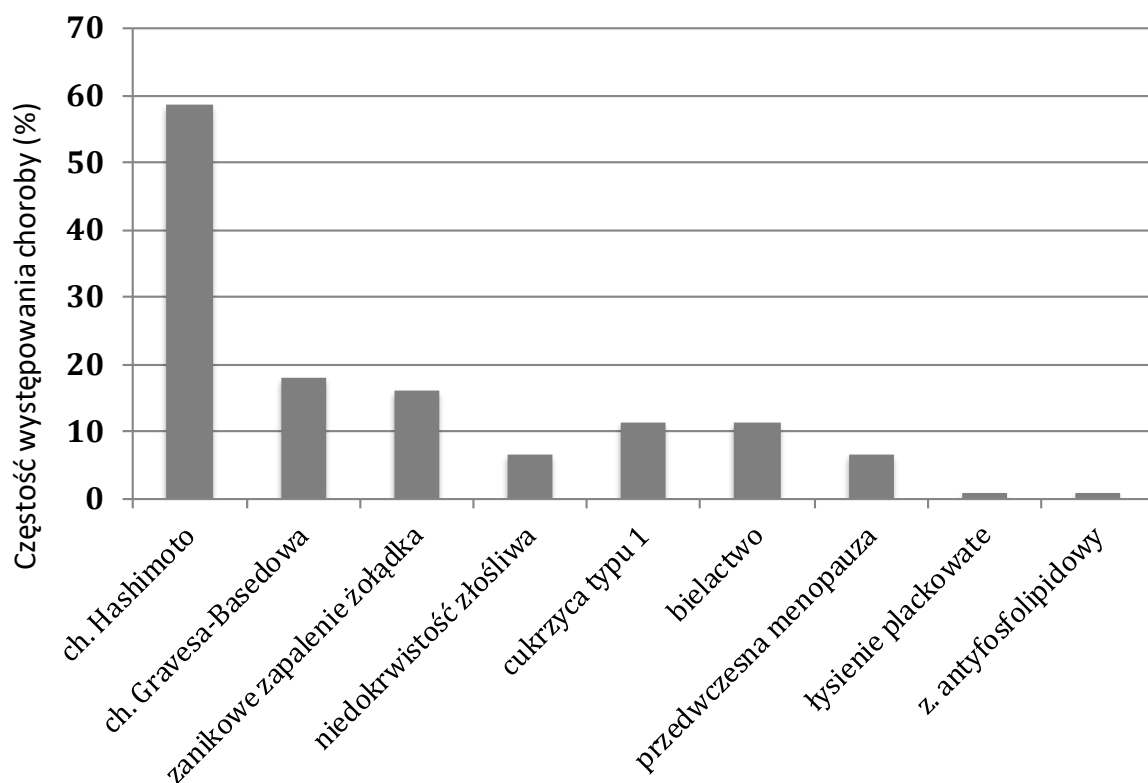
Rycina 8. Średni wiek i odchylenie standardowe u mężczyzn i kobiet w momencie rozpoznania choroby Addisona ($p=0,0002$)

Biorąc pod uwagę datę rozpoznania, badane osoby chorowały od 0 do 52 lat, a średni czas trwania choroby Addisona wynosił $16,6 \pm 12,5$ lat. W tym przypadku różnica między mężczyznami (średnio $13,6 \pm 12,8$ lat) a kobietami ($17,6 \pm 12,3$ lat) nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0,086$) (Rycina 9).



Rycina 9. Średni czas trwania choroby Addisona wraz z odchyleniem standardowym u kobiet i u mężczyzn ($p=0,086$)

Jedynie 17 spośród 106 pacjentów (16,0%) z chorobą Addisona nie prezentowało dodatkowych schorzeń autoimmunizacyjnych. U pozostałych stwierdzono współistnienie innych chorób tej grupy (Rycina 10). Najczęstszym zaburzeniem była autoimmunizacyjna choroba tarczycy, obecna u 81 (76,4%) pacjentów, pod postacią przewlekłego zapalenia tarczycy (choroby Hashimoto) u 62 osób (58,5%) lub choroby Gravesa-Basedowa u 19 osób (17,9%). Siedemnaście osób (16,0%) miało też udokumentowane przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka, z niedokrwistością złośliwą u 7 z nich (6,6%). Po 12 pacjentów (11,3%) chorowało też na cukrzycę typu 1 i bielactwo. U 7 kobiet (6,6%) wystąpiła przedwczesna niewydolność jajników. Łysienie plackowate oraz zespół antyfosfolipidowy rozpoznano u pojedynczych osób.

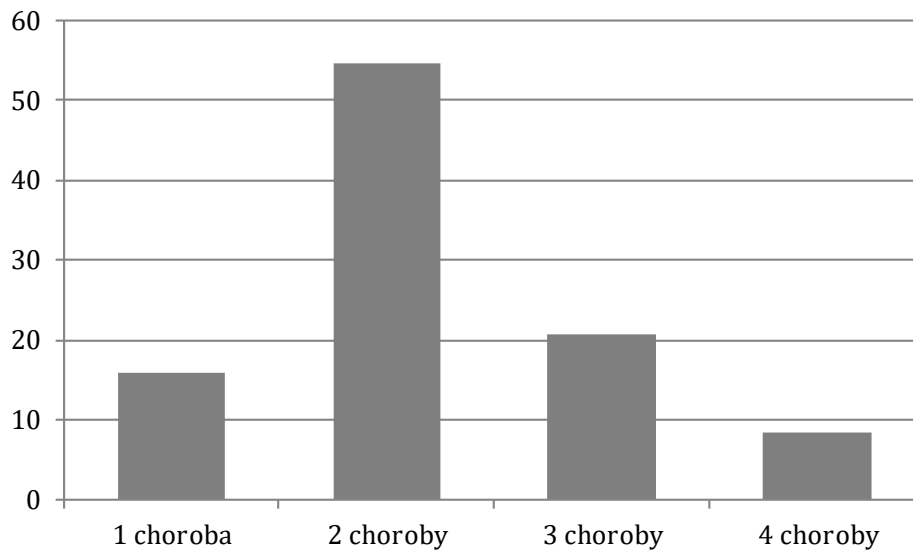


Rycina 10. Częstość występowania dodatkowych schorzeń autoimmunizacyjnych u 106 pacjentów z chorobą Addisona, których rodziny ankietowano

Współistniejące schorzenia autoimmunizacyjne stwierdzono łącznie u 84,0% pacjentów z chorobą Addisona, a ich liczba u poszczególnych osób wahała się od jednego do trzech dodatkowych zaburzeń (Tabela 10, Rycina 11).

Tabela 10. Rozkład liczbowy dodatkowych współistniejących schorzeń autoimmunizacyjnych u 106 badanych pacjentów z chorobą Addisona

Liczba chorób autoimmunizacyjnych	Liczba pacjentów	%
1 – jedynie choroba Addisona	17	16,0
2	58	54,7
3	22	20,8
4	9	8,5



Rycina 11. Proporcja (%) pacjentów z chorobą Addisona zależnie od łącznej liczby występujących u nich schorzeń autoimmunizacyjnych

Najczęstsze obserwowane kombinacje schorzeń autoimmunizacyjnych u pacjentów z chorobą Addisona obejmowały połączenie tej choroby z autoimmunizacją tarczycową - przewlekłym zapaleniem typu Hashimoto, lub rzadziej, chorobą Gravesa-Basedowa. Stosunkowo częstym zestawieniem było współistnienie choroby Addisona z chorobą Hashimoto oraz przewlekłym zanikowym zapaleniem błony śluzowej żołądka i/lub cukrzycą typu 1 i/lub bielactwem. U kobiet do powyższych schorzeń dołączała czasem przedwczesna niewydolność jajników, objawiająca się menopauzą przed 40. rokiem życia. Dane dotyczące częstości najpowszechniejszych kombinacji chorób autoimmunizacyjnych wśród badanych pacjentów zebrano w Tabeli 11.

Tabela 11. Rozkład częstości najpowszechniejszych kombinacji schorzeń autoimmunizacyjnych u 106 badanych pacjentów z chorobą Addisona

Kombinacja chorób	liczba pacjentów	%
AAD + AITD	51	48,1
AAD + HT	37	34,9
AAD + GBD	14	13,2
AAD + HT + V	5	4,7
AAD + HT + ChAG	5	4,7
AAD + HT + POI	5	4,7
AAD + HT + T1D	4	3,8
AAD + GBD + ChAG	3	2,8
AAD + T1D	2	1,9
AAD + HT + T1D + V	2	1,9
AAD + HT + T1D + ChAG	2	1,9
AAD + HT + ChAG + V	2	1,9

AAD, autoimmunizacyjna choroba Addisona; AITD, autoimmunizacyjna choroba tarczycy; HT, zapalenie tarczycy Hashimoto; ChAG, zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka; GBD, choroba Gravesa-Basedowa; T1D, cukrzyca typu 1; POI, przedwczesna niewydolność jajników; V, bielactwo

W przeprowadzonej analizie oceniono także różnice płciowe w zakresie występowania dodatkowych schorzeń autoimmunizacyjnych u pacjentów z chorobą Addisona. U mężczyzn z autoimmunizacyjną niewydolnością kory nadnerczy średnia liczba chorób o tej etiologii wynosiła $1,6 \pm 1,4$, podczas gdy u chorych kobiet stwierdzano średnio $2,2 \pm 1,1$ choroby ($p=0,016$). Porównanie częstości poszczególnych schorzeń u obu płci wykazało istotnie częstsze występowanie autoimmunizacyjnej choroby tarczycy u kobiet niż u mężczyzn ($p=0,001$; OR 4,77; 95% CI 1,82-12,51), za co odpowiada w dużej mierze wyższa częstość przewlekłego zapalenia tarczycy typu Hashimoto u kobiet ($p=0,025$; OR 2,92; 95% CI 1,20-7,11), podczas gdy występowanie choroby Gravesa-Basedowa nie różniło się istotnie u obu płci ($p=0,775$). Również pozostałe oceniane choroby autoimmunizacyjne nie wykazywały różnic występowania związanych z płcią. Szczegółowe dane prezentuje Tabela 12. Uwagę zwraca natomiast fakt, że izolowana postać choroby Addisona,

bez dodatkowych schorzeń autoimmunizacyjnych, stwierdzana była istotnie częściej wśród mężczyzn, niż u kobiet ($p=0,007$). Wskazuje to na statystycznie ponad czterokrotnie mniejsze ryzyko rozwoju autoimmunizacji wielogruzołowej u mężczyzn z autoimmunizacyjną nie doczynnością kory nadnerczy w porównaniu z kobietami dotkniętymi tą chorobą (OR 4,15; 95% CI 1,41-12,23).

Tabela 12. Porównanie częstości występowania poszczególnych schorzeń autoimmunizacyjnych u 28 mężczyzn i 78 kobiet z chorobą Addisona

Choroba autoimmunizacyjna	Mężczyźni (%)	Kobiety (%)	wartość p
autoimmunizacyjna choroba tarczycy	15 (53,6)	66 (84,6)	0,001
• choroba Hashimoto	11 (42,9)	51 (61,1)	0,025
• choroba Gravesa-Basedowa	4 (14,3)	15 (19,2)	0,775
zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka	4 (14,3)	13 (16,7)	1,000
niedokrwistość złośliwa	3 (10,7)	4 (5,1)	0,377
cukrzyca typu 1	5 (17,9)	7 (9,0)	0,294
bielactwo	2 (7,1)	10 (12,8)	0,523
przedwczesna niewydolność jajników /hipogonadizm hipergonadotropowy	0	7 (9,0)	0,188
bez dodatkowych schorzeń autoimmunizacyjnych	9 (32,1)	8 (10,3)	0,007

Oceniono także związek liczby stwierdzonych schorzeń autoimmunizacyjnych u badanych osób z chorobą Addisona z wiekiem w momencie jej rozpoznania. Wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między obu zmiennymi ($r=0,254$; $p=0,009$), wskazującą że im starszy był wiek badanych osób w momencie rozpoznania, tym większa liczba zdiagnozowanych u nich chorób autoimmunizacyjnych. Nie wykryto natomiast statystycznie istotnego związku pomiędzy liczbą schorzeń autoimmunizacyjnych u pacjentów a czasem trwania pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy ($p=0,903$).

4.1.2 Badanie ankietowe grupy pacjentów z chorobą Addisona

Na podstawie uzyskanych wyników ankiet ustalono, że większość pacjentów z chorobą Addisona (78 osób, czyli 73,6%) miała krewnych z chorobami autoimmunizacyjnymi. Jedynie 28 ze 106 ankietowanych osób (26,4%) nie zaznaczyło żadnego z sugerowanych w ankiecie schorzeń

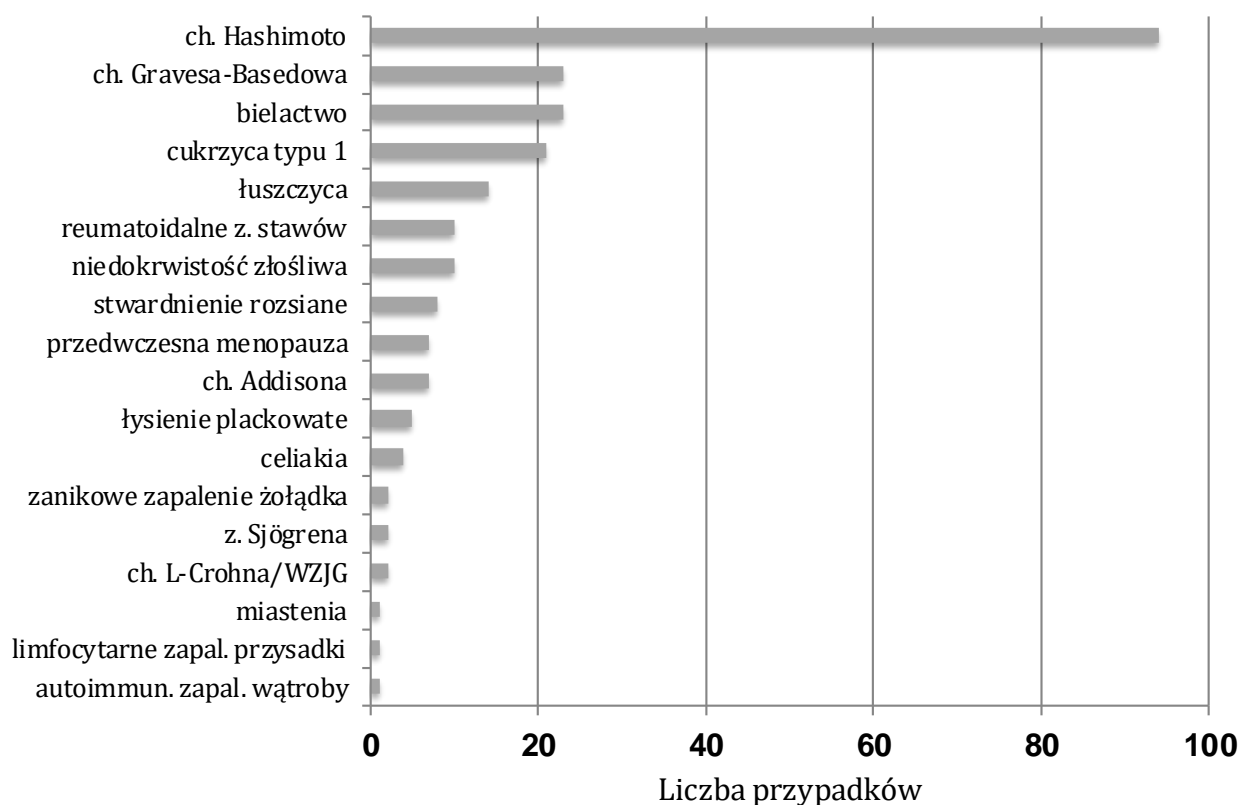
w występujących w ich rodzinie. Badani mieli od 0 do 7 krewnych z chorobami autoimmunizacyjnymi, a średnia ich liczba wynosiła $1,9 \pm 1,7$ chorego w rodzinie (Tabela 13). Najczęściej pacjenci zgłaszali dwie chore osoby (25,5%), jedną chorą osobę (18,9%) lub trzy osoby ze schorzeniami autoimmunizacyjnymi (12,3%) w rodzinie. W dwóch rodzinach (1,9%) choroby autoimmunizacyjne stwierdzono u 6, a w dwóch kolejnych – nawet u 7 osób.

Tabela 13. Liczebność krewnych z chorobami autoimmunizacyjnymi wśród rodzin 106 pacjentów z chorobą Addisona

Liczba chorych krewnych w rodzinie pacjenta	n	%
0	28	26,4
1	20	18,9
2	27	25,5
3	13	12,3
4	8	7,5
5	6	5,7
6	2	1,9
7	2	1,9

łącznie choroby autoimmunizacyjne dotyczyły 201 krewnych pochodzących z 78 rodzin pacjentów z chorobą Addisona. U 201 krewnych stwierdzone zostało łącznie 235 przypadków schorzeń o tej etiologii. Podobnie jak w grupie samych pacjentów z chorobą Addisona, najczęstszą stwierdzaną chorobą była autoimmunizacyjna choroba tarczycy z dużą przewagą choroby Hashimoto w postaci 94 przypadków (Rycina 12). Następne w kolejności były choroba Gravesa-Basedowa oraz bielactwo – po 23 przypadki w rodzinach pacjentów z chorobą Addisona. Często również występowała cukrzyca typu 1 – w ankietach donoszono o 21 krewnych chorujących na to schorzenie. Kolejnymi schorzeniami wykrywanymi w rodzinach osób z chorobą Addisona były łuszczyca (14 przypadków), reumatoidalne zapalenie stawów (10 przypadków) oraz stwardnienie rozsiane (8 przypadków). W odniesieniu do autoimmunizacji dotyczącej błony śluzowej żołądka i jej następstw, pacjenci wskazywali raczej na niedokrwistość złośliwą (10 krewnych), natomiast izolowane zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka (w ankiecie wyraźnie rozróżniane od zapalenia wywołanego

obecnością bakterii *H. pylori*) było stwierdzone u 2 osób. Zarówno sama choroba Addisona, jak i przedwczesna niewydolność jajników zostały rozpoznane u 7 krewnych. Łysienie plackowate stwierdzono u 5 osób z rodzin pacjentów z chorobą Addisona, natomiast celiakię – u 4. Ponadto odnotowano po 2 przypadki nieswoistych zapaleń jelit i zespołu Sjögrena oraz pojedyncze osoby z limfocytarnym zapaleniem przysadki, autoimmunizacyjnym zapaleniem wątroby lub miastenią. U żadnego spośród krewnych 106 pacjentów nie stwierdzono niedoczynności przytarczyc, tocznia rumieniowatego układowego, twardziny układowej, zespołu antyfosfolipidowego, ani samoistnej plamicy małopłytkowej.



Rycina 12. Liczba przypadków poszczególnych chorób autoimmunizacyjnych u 201 krewnych pacjentów z chorobą Addisona. WZJG – wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Biorąc pod uwagę możliwe uwarunkowanie genetyczne obu cech, przeanalizowano potencjalny związek pomiędzy wiekiem zachorowania przez probanda a liczbą krewnych ze schorzeniami autoimmunizacyjnymi, jednak nie udało się wykazać korelacji pomiędzy tymi zmiennymi ($p=0,122$). Z kolei ocena statystyczna zależności pomiędzy liczbą chorób autoimmunizacyjnych

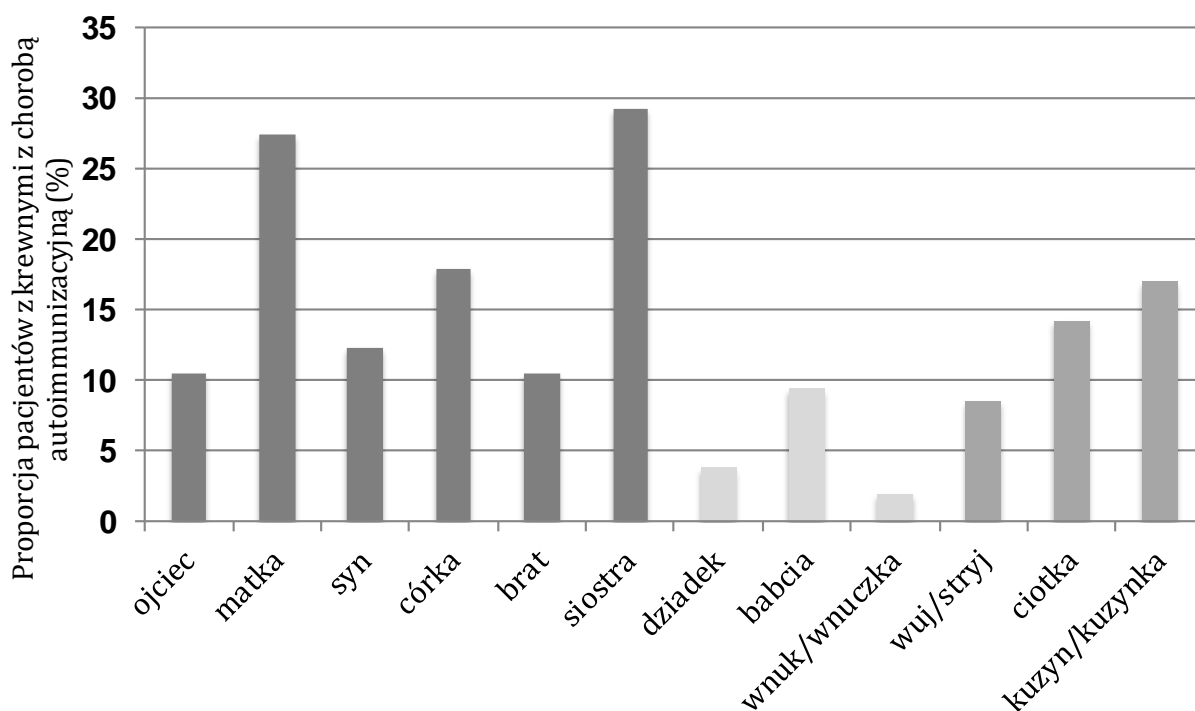
u probanda a liczbą chorych krewnych w jego rodzinie wykazała dodatnią korelację pomiędzy obu danymi ($r=0,241$; $p=0,013$).

Oceniając wynikające z danych ankietowych występowanie schorzeń autoimmunizacyjnych w rodzinach pacjentów z chorobą Addisona, obliczono w jakiej proporcji dotknięci autoimmunizacją krewni należeli do poszczególnych linii pokrewieństwa z probandem. Jako pierwszy stopień pokrewieństwa traktowano rodziców, rodzeństwo i potomstwo osób chorych. Za drugi stopień uznani byli dziadkowie i wnuki pacjentów, natomiast linię boczną (trzeci stopień pokrewieństwa) stanowili ich wujowie/stryjowie, ciotki oraz kuzyni. Krewnych z chorobami autoimmunizacyjnymi w pierwszym stopniu pokrewieństwa miało 71 (67,0%) pacjentów, w drugim stopniu pokrewieństwa – 15 (14,2%) chorych, a w bocznej linii pokrewieństwa – 31 (29,2%) osób (Tabela 14). W badanej grupie choroby autoimmunizacyjne stwierdzane były najczęściej u krewnych pierwszej linii płci żeńskiej, to jest u siostr 29,2% pacjentów, u matek 27,4% pacjentów i u córek 17,9% osób z chorobą Addisona (Tabela 14, Rycina 13). Analiza statystyczna potwierdziła istotną różnicę między proporcją pacjentów z chorobą Addisona, którzy mieli chorych ojców vs. matki ($p=0,002$) oraz braci vs. siostry ($p<0,001$). Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie różnicy w odniesieniu do synów i córek pacjentów ($p=0,250$) oraz krewnych obu płci dalszego stopnia (Tabela 14).

Tabela 14. Liczebność pacjentów z chorobą Addisona, u których w rodzinie występowały schorzenia autoimmunizacyjne z podziałem na dotkniętych nimi krewnych

Pokrewieństwo chorych krewnych	Liczba pacjentów (106)	%	wartość p
Chorzy krewni pierwszego, drugiego oraz trzeciego stopnia łącznie	78	73,6	
Chorzy krewni pierwszego stopnia	71	67,0	
ojciec	11	10,4	0,002
matka	29	27,4	
syn	13	12,3	0,250
córka	19	17,9	
brat	11	10,4	<0,001
siostra	31	29,2	
Chorzy krewni stopnia stopnia	15	14,2	
dziadek	4	3,8	0,165
babcia	10	9,4	
wnuk/wnuczka	2	1,9	
Chorzy krewni trzeciego stopnia	31	29,2	
wuj/stryj	9	8,5	0,193
ciotka	15	14,2	
kuzyni	18	17,0	

Wskazane wartości procentowe nie sumują się do 100% ponieważ wielu spośród pacjentów z chorobą Addisona miało większą liczbę krewnych ze schorzeniami autoimmunizacyjnymi, np. ojca, siostrę i kuzynkę.



Rycina 13. Liczba pacjentów z chorobą Addisona, u których w rodzinie występowały schorzenia autoimmunizacyjne z podziałem na dotkniętych nimi krewnych

4.2 Badania krewnych pacjentów z chorobą Addisona

4.2.1 Ogólna charakterystyka grupy badanej

W bezpośrednim badaniu udział wzięło 113 krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona, pochodzących z 51 rodzin. Wśród badanych krewnych znalazło się 45 (39,8%) mężczyzn i 68 (60,2%) kobiet. Pod względem pokrewieństwa z chorymi, spośród osób badanych było odpowiednio 60 (53,1%) dzieci, 44 (38,9%) rodzeństwa oraz 9 (8,0%) rodziców pacjentów z chorobą Addisona.

Na podstawie wywiadu lekarskiego i dostępnej dokumentacji medycznej wśród badanych krewnych stwierdzono 43 (38,1%) osoby ze znanymi wcześniej chorobami autoimmunizacyjnymi oraz 70 (61,9%) osób dotąd zdrowych. Szczegółowe dane dotyczące rozpoznanych w przeszłości schorzeń autoimmunizacyjnych w tej grupie prezentuje Tabela 15. Najczęstszą zdiagnozowaną jednostką była autoimmunizacyjna choroba tarczycy, występująca u 28,3% badanych. W grupie tej przeważała choroba Hashimoto (20,3% badanych), natomiast choroba Gravesa-Basedowa była rozpoznana u 8,0% krewnych pierwszego stopnia. Po 4 osoby (3,5%) chorowały wcześniej na bielactwo oraz cukrzycę typu 1. Choroba Addisona była w przeszłości zdiagnozowana u 3 osób (1 kobiety

i 2 mężczyzn), będących rodzeństwem chorych probandów. Po 3 osoby chorowały też na przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka z niedokrwistością złośliwą oraz reumatoidalne zapalenie stawów, a dwie na łuszczycę. W badanej grupie krewnych stwierdzono też pojedyncze przypadki tocznia układowego rumieniowatego, łysienia plackowatego oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

Tabela 15. Choroby autoimmunizacyjne rozpoznane w przeszłości w badanej grupie krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona

Choroba	liczba krewnych spośród 113
Choroba Addisona	3 (2,7%)
Autoimmunizacyjna choroba tarczycy	32 (28,3%)
• Choroba Hashimoto	23 (20,3%)
• Choroba Gravesa-Basedowa	9 (8,0%)
Cukrzyca typu 1	4 (3,5%)
Bielactwo	4 (3,5%)
Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka	3 (2,7%)
Reumatoidalne zapalenie stawów	3 (2,7%)
Łuszczycyca	2 (1,8%)
Toczeń układowy rumieniowaty	1 (0,9%)
Łysienie plackowate	1 (0,9%)
Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	1 (0,9%)

U 37 krewnych (32,7%) wykazano w przeszłości istnienie pojedynczego schorzenia autoimmunizacyjnego, u 4 osób (3,5%) – dwóch schorzeń. Trzy i cztery współistniejące choroby autoimmunizacyjne występowały u pojedynczych krewnych.

Badanie uzupełniano następnie o ocenę ultrasonograficzną tarczycy, która nie wykazała istotnych odchyleń u 67 krewnych (59,3%). Obraz charakterystyczny dla autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, z niejednorodną, obniżoną echogenicznością mięszu, stwierdzono u 36 osób (31,6%). Z kolei zmiany ogniskowe w obrębie tarczycy wykryto u 10 krewnych (8,8%).

4.2.2 Oznaczenia autoprzeciwciał w surowicy

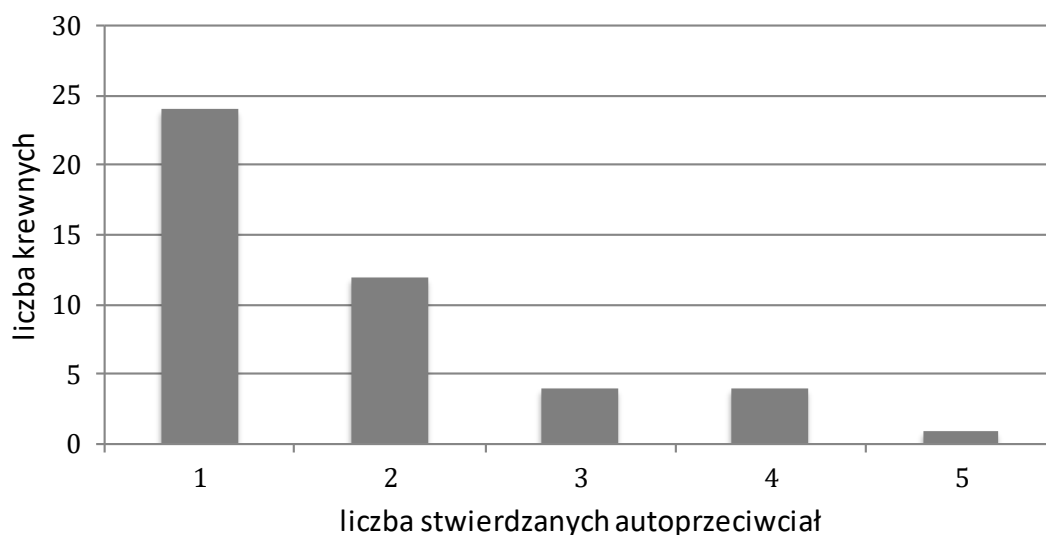
Ocena występowania w surowicy autoprzeciwciał przeciwko specyficznym antygenom nadnerczowym, tarczycowym oraz antygenom komórek beta wysp trzustkowych wykazała, że wszystkie badane swoistości przeciwciał, poza przeciwciałami skierowanymi przeciwko fosfat azie tyrozynowej IA-2 ($p=0,0847$), stwierdzane były istotnie częściej w grupie krewnych pacjentów z chorobą Addisona, niż w grupie kontrolnej (wartości $p<0,05$) (Tabela 16). Przeciwciała przeciwko IA-2 były wykazane jedynie wśród 3 krewnych, nie stwierdzono ich natomiast u żadnej osoby zdrowej. Również przeciwciała skierowane przeciwko 21-hydroksylazie nie zostały wykryte w surowicy żadnej z osób z grupy kontrolnej, jednak stwierdzenie ich u 6,2% krewnych umożliwiło uzyskanie istotności statystycznej ($p=0,003$). Najczęściej stwierdzanymi autoprzeciwciałami były te skierowane przeciw antygenom tarczycowym – tyreoperoksydazie (u 28,3% krewnych i 6,3% kontroli) oraz tyreoglobulinie (u 19,5% krewnych oraz u 2,8% kontroli). Uzyskane wartości ilorazu szans (OR) wskazują, że posiadanie krewnego pierwszego stopnia chorującego na chorobę Addisona jest czynnikiem ryzyka występowania przeciwciał przeciwko 21-hydroksylazie, tyreoperoksydazie, tyreoglobulinie, dekarboksylazie kwasu glutaminowego i transporterowi cynkowemu 8 (Tabela 16). W ocenie zbiorczej posiadanie krewnego pierwszego stopnia chorującego na chorobę Addisona skutkowało ponad siedmiokrotnie wyższym ryzykiem wystąpienia w surowicy jakiegokolwiek spośród badanych autoprzeciwciał (OR 7,22; 95% CI 3,58-14,56; $p<0,0001$).

Tabela 16. Porównanie częstości występowania autoprzeciwciał przeciwko specyficznym antygenom nadnerczowym, tarczycowym oraz antygenom komórek beta u krewnych pacjentów z chorobą Addisona oraz u zdrowych kontroli

przeciwciało	krewni 113	kontrole 143	wartość p	OR	95% CI
a21OH	7 (6,2%)	0	0,003	20,2	1,14 - 358,0
aTPO	32 (28,3%)	9 (6,3%)	<0,0001	5,88	2,67 - 12,95
aTg	22 (19,5%)	4 (2,8%)	<0,0001	8,40	2,80 - 25,19
aGAD	9 (8,0%)	2 (1,4%)	0,013	6,10	1,29 - 28,84
aIA-2	3 (2,6%)	0	0,085	9,09	0,46 - 178,0
aZnT8	8 (7,1%)	1 (0,7%)	0,012	10,90	1,34 - 88,49
jakiegokolwiek autoprzeciwciało	45 (39,8%)	12 (8,4%)	<0,0001	7,22	3,58 - 14,56

a21OH, przeciwciała przeciwko 21-hydroksylazie; aTPO, przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie; aTg, przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie; aGAD, przeciwciała przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego; aIA-2, przeciwciała przeciwko fosfatazie tyrozynowej; aZnT8, przeciwciała przeciwko transporterowi cynkowemu 8

U 68 krewnych (60,2%) osób z chorobą Addisona nie wykryto w surowicy żadnego z ocenianych autoprzeciwciał. U 24 osób (21,2%) stwierdzono obecność jednego z badanych przeciwciał. Byli natomiast krewni, w których surowicy wykazano większą liczbę autoprzeciwciał: 2 przeciwciała u 12 (10,6%) osób, 3 przeciwciała - u 4 (3,5%) osób, 4 przeciwciała - u 4 (3,5%) osób oraz 5 przeciwciał u 1 (0,9%) osoby (Rycina 14).



Rycina 14. Liczba krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona, u których wykryto odpowiednio 1-5 swoistych autoprzeciwciał w surowicy

Kombinacje swoistych autoprzeciwciał wykrywanych w surowicy krewnych pierwszego stopnia osób z chorobą Addisona zaprezentowano w Tabeli 8. Najczęściej stwierdzane było współistnienie obu przeciwciał swoistych dla antygenów tarczycowych – tyreoperoksydazy i tyreoglobuliny – które wykazano u 12 krewnych. aTPO wraz z aTg występowały też u kolejnych pięciu osób razem z innymi dodatkowymi przeciwciałami (Tabela 17). Uwagę zwraca, że przeciwciała przeciwko 21-hydroksylazie, które wykryto łącznie u 7 osób, aż pięciokrotnie pojawiają się u krewnych ze współistniejącymi innymi autoprzeciwciałami. Podobnie przeciwciała przeciwko transporterowi cynkowemu 8, które stwierdzono u 8 krewnych pacjentów z chorobą Addisona, aż sześciokrotnie pojawiają się z towarzyszeniem innych autoprzeciwciał.

Tabela 17. Kombinacje swoistych autoprzeciwciał wykrywanych w surowicy krwi pierwszego stopnia osób z chorobą Addisona

liczba autoprzeciwciał u jednej osoby	kombinacja autoprzeciwciał	liczba osób
2 autoprzeciwciała	aTPO, aTg	12
3 autoprzeciwciała	aTPO, aTg, aIA-2	1
	a21OH, aTPO, aTg	2
	aGAD, aIA-2, aZnT8	1
4 autoprzeciwciała	a21OH, aTPO, aTg, aZnT8	2
	aTPO, aTg, aGAD, aZnT8	1
	a21OH, aTPO, aGAD, aZnT8	1
5 autoprzeciwciał	a21OH, aTPO, aTg, aGAD, aZnT8	1

a21OH, przeciwciała przeciwko 21-hydroksylazie; aTPO, przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie; aTg, przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie; aGAD, przeciwciała przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego; aIA-2, przeciwciała przeciwko fosfatazie tyrozynowej; aZnT8, przeciwciała przeciwko transporterowi cynkowemu 8

Ocena statystyczna występowania autoprzeciwciał w surowicy z podziałem na płeć badanych została przeprowadzona jedynie w grupie krewnych pacjentów z chorobą Addisona, ponieważ w grupie kontrolnej ich obecność wykazano u bardzo nielicznych osób - w odniesieniu do najczęściej wykrywanych przeciwciał aTPO: 6 przypadków na 89 kobiet i 3 przypadki na 54 mężczyzn, a dla pozostałych badanych autoprzeciwciał – pojedyncze przypadki lub całkowity ich brak. Dlatego analizę ostatecznie ograniczono do krewnych pacjentów z chorobą Addisona (Tabela 18). Jedynie w przypadku przeciwciał skierowanych przeciwko tyreoperoksydazie wykazano istotnie częstsze występowanie u kobiet niż u mężczyzn ($p=0,014$), co wskazuje na ponad trzykrotny wzrost ryzyka występowania tych autoprzeciwciał u płci żeńskiej (OR 3,16; 95%CI 1,23-8,12). Wszystkie stwierdzone u krewnych przypadki występowania autoprzeciwciał aIA-2 dotyczyły mężczyzn, jednak różnica między płciami nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ($p=0,061$). Pozostałe badane autoprzeciwciała wykrywane były ze zbliżoną częstotliwością u kobiet oraz u mężczyzn ($p>0,05$).

Tabela 18. Porównanie częstości występowania autoprzeciwciał przeciwko specyficznym antygenom nadnerczowym, tarczycowym oraz antygenom komórek beta u krewnych pacjentów z chorobą Addisona z uwzględnieniem płci krewnych

przeciwciało	krewni płci żeńskiej 68	krewni płci męskiej 45	wartość p
a21OH	4 (5,9%)	3 (6,7%)	1,000
aTPO	25 (36,8%)	7 (15,5%)	0,014
aTg	13 (19,1%)	9 (20,0%)	0,908
aGAD	6 (8,8%)	3 (6,7%)	1,000
aIA-2	0	3 (6,7%)	0,061
aZnT8	5 (7,3%)	3 (6,7%)	1,000
jakiegokolwiek autoprzeciwciało	30 (44,1%)	15 (33,3%)	0,569

a21OH, przeciwciała przeciwko 21-hydroksylazie; aTPO, przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie; aTg, przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie; aGAD, przeciwciała przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego; aIA-2, przeciwciała przeciwko fosfatazie tyrozynowej; aZnT8, przeciwciała przeciwko transporterowi cynkowemu 8

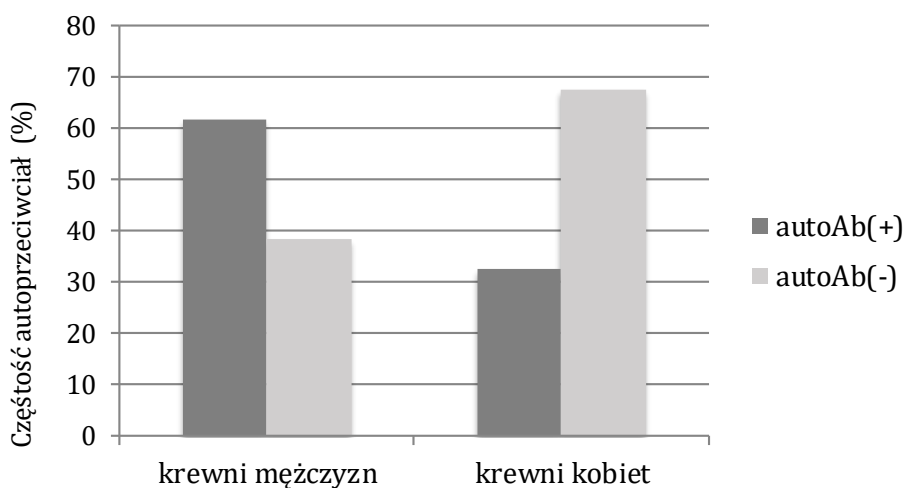
Planowano także ocenę występowania badanych autoprzeciwciał z uwzględnieniem pokrewieństwa względem pacjentów z chorobą Addisona (Tabela 10). Do badania zgłosiła się jednak stosunkowo niewielka liczba rodziców osób chorych. Z tego względu porównanie częstości występowania poszczególnych autoprzeciwciał ograniczono do rodzeństwa (44 osoby) oraz dzieci (60 osób) pacjentów. Analiza nie wykazała jednak istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania przeciwciał skierowanych przeciwko 21-hydroksylazie, tyreoperoksydazie, tyreoglobulinie, dekarboksylazie kwasu glutaminowego, fosfatazie tyrozynowej IA-2, ani transporterowi cynkowemu 8 pomiędzy rodzeństwem a potomstwem osób z chorobą Addisona (wszystkie wartości $p > 0,05$) (Tabela 19).

Tabela 19. Porównanie częstości występowania autoprzeciwciał przeciwko specyficznym antygenom nadnerczowym, tarczycowym oraz antygenom komórek beta u krewnych pacjentów z chorobą Addisona z uwzględnieniem pokrewieństwa

przeciwciało	wszyscy krewni 113	rodzice 9	rodzeństwo 44	dzieci 60	wartość p rodzeństwo vs. dzieci
a21OH	7 (6,2%)	0	3 (6,8%)	4 (6,7%)	1,000
aTPO	32 (28,3%)	2 (22,2%)	16 (36,4%)	14 (23,3%)	0,1473
aTg	22 (19,5%)	3 (33,3%)	8 (18,2%)	11 (18,3%)	0,9842
aGAD	9 (8,0%)	0	5 (11,4%)	4 (6,7%)	0,4888
aIA-2	3 (2,6%)	0	1 (2,3%)	2 (3,3%)	1,000
aZnT8	8 (7,1%)	0	5 (11,4%)	3 (5,0%)	0,2783

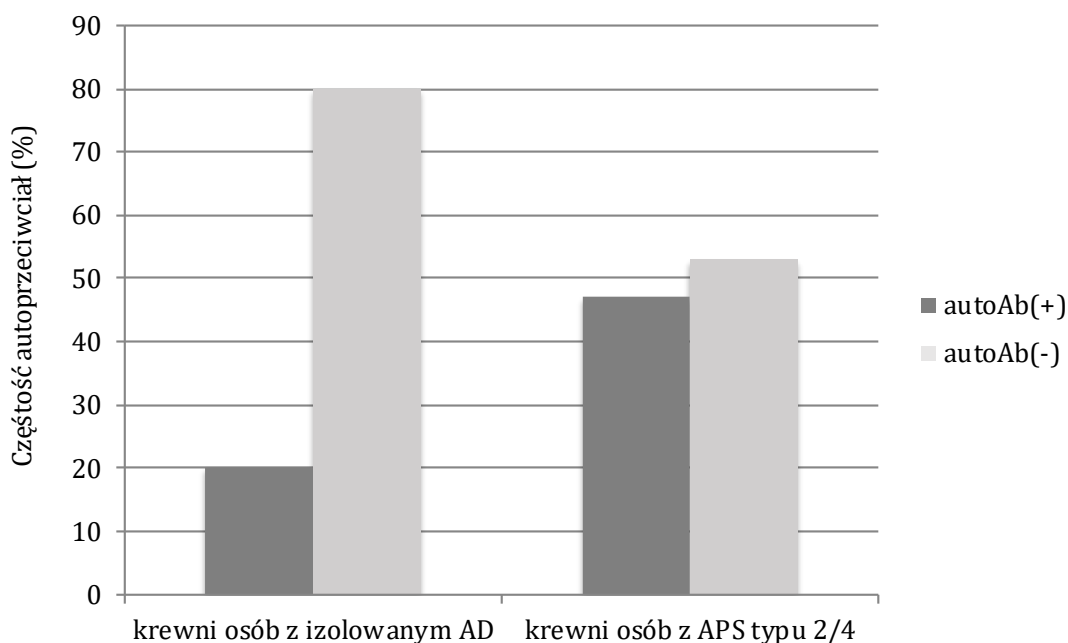
a21OH, przeciwciała przeciwko 21-hydroksylazie; aTPO, przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie; aTg, przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie; aGAD, przeciwciała przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego; aIA-2, przeciwciała przeciwko fosfatazie tyrozynowej; aZnT8, przeciwciała przeciwko transporterowi cynkowemu 8

Zastanawiano się również, czy cechy probanda – pacjenta z chorobą Addisona – mogą mieć związek z ryzykiem autoimmunizacji u jego krewnych (Rycina 15). W tym celu porównano częstość występowania autoprzeciwciał u krewnych kobiet z chorobą Addisona (32,6%) oraz krewnych mężczyzn z tą chorobą (61,5%), stwierdzając istotną statystycznie różnicę ($p=0,008$), wskazującą że krewni pacjentów płci męskiej są znacznie bardziej narażeni na rozwój autoimmunizacji (OR 3,31; 95% CI 1,33-8,23).



Rycina 15. Zależność częstości występowania autoprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona od płci probanda. autoAb(+), autoprzeciwciała wykrywane w surowicy; autoAb(-) brak autoprzeciwciał w surowicy

Dodatkowo sprawdzono, czy częstość występowania autoprzeciwciał różni się u krewnych pacjentów z izolowaną chorobą Addisona oraz krewnych osób z chorobą Addisona będącą składową autoimmunologicznego zespołu wielogruzołowego typu 2 lub 4 (Rycina 16). Autoprzeciwciała były wykrywane w surowicy 6 spośród 30 (20,0%) krewnych osób chorujących jedynie na chorobę Addisona oraz u 39 spośród 83 (47,0%) krewnych pacjentów z APS ($p=0,009$). Wskazuje to na ponad trzykrotny wzrost ryzyka autoimmunizacji u krewnych pacjentów z autoimmunizacją wielogruzołową (OR 3,55; 95%CI 1,31-9,57. Ponadto liczba autoprzeciwciał stwierdzanych u krewnych wykazała dodatnią korelację z liczbą chorób autoimmunizacyjnych rozpoznanych u probanda z chorobą Addisona ($r=0,337$; $p=0,0003$).



Rycina 16. Zależność częstości występowania autoprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona od postaci choroby u probanda. autoAb(+), autoprzeciwciała wykrywane w surowicy; autoAb(-) brak autoprzeciwciał w surowicy

4.2.3 Genotypowanie

4.2.3.1 Zgodność z prawem Hardy'ego-Weinberga

Materiał do badań genetycznych uzyskano od 112 krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona. W zakresie rozkładu analizowanych polimorfizmów genów *PTPN22* oraz *CTLA4* w badanej grupie krewnych oraz wśród zdrowych kontroli nie stwierdzono istotnych statystycznie odchyleń od równowagi Hardy'ego-Weinberga (wartości $p > 0,05$), co dowodzi prawidłowego (losowego) doboru grup do analiz (Tabela 20).

Tabela 20. Wartości poziomu istotności p dla zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga wśród badanych krewnych pacjentów z chorobą Addisona oraz w grupie kontrolnej

Grupa	rs2476601 <i>PTPN22</i>	rs231775 <i>CTLA4</i>
krewni	0,561	0,457
kontrole	0,718	0,612

4.2.3.2 Genotypowanie rs2476601 genu *PTPN22*

Rozkład genotypów polimorfizmu rs2476601 genu *PTPN22* różnił się istotnie pomiędzy grupą krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona oraz grupą kontrolną osób zdrowych ($p=0,017$) (Tabela 21). Częstość zmutowanego allelu T wynosiła 18,7% (42 spośród 224 badanych alleli) w grupie krewnych i jedynie 11,1% (91 spośród 786 ocenianych alleli) u kontroli (OR 1,76; 95% CI 1,18-2,63; $p=0,005$).

Tabela 21. Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu rs2476601 genu *PTPN22* u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona oraz w grupie kontrolnej

	krewni 112	kontrole 393	wartość p
genotypy			
CC	73 (65,2%)	308 (78,4%)	0,017
CT	36 (32,1%)	79 (20,1%)	
TT	3 (2,7%)	6 (1,5%)	
allele			
C	182 (81,3%)	695 (88,4%)	0,005
T	42 (18,7%)	91 (11,1%)	

4.2.3.3. Genotypowanie rs231775 genu *CTLA4*

Analiza rozkładu genotypów wariantu rs231775 genu *CTLA4* wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą krewnych oraz kontrolami ($p=0,008$) (Tabela 22). Zmutowany allel G, wiązany z wyższym ryzykiem schorzeń autoimmunizacyjnych, występował istotnie częściej u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona niż w grupie kontrolnej (48,2% vs. 37,5%; OR 1,55; 95% CI 1,15- 2,09; $p=0,004$).

Tabela 22. Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu rs231775 genu *CTLA-4* u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona oraz w grupie kontrolnej

	krewni 112	kontrole 393	wartość p
genotypy			
AA	32 (28,6%)	151 (38,4%)	0,008
AG	52 (46,4%)	189 (48,1%)	
GG	28 (25,0%)	53 (13,5%)	
allele			
A	116 (51,8%)	491 (62,5%)	0,004
G	108 (48,2%)	295 (37,5%)	

4.3 Genotypy a wyniki oznaczeń auto przeciwciał w surowicy

W dalszym toku badania podjęto próbę określenia, czy polimorfizmy w genach *PTPN22* i *CTLA4* związanych z ryzykiem schorzeń autoimmunizacyjnych mogą wiązać się również z występowaniem specyficznych auto przeciwciał u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona. Z uwagi na niewielkie liczebności w poszczególnych podgrupach oraz fakt, że czynnikiem ryzyka autoimmunizacji jest nosicielstwo zmutowanego allelu, analizy przeprowadzono wg modelu recesywnego, porównującego częstość występowania danych auto przeciwciał u homozygot typu dzikiego oraz nosicieli allelu ryzyka (heterozygot oraz homozygot łącznie).

W odniesieniu do wariantu rs2476601 genu *PTPN22*, nosicielstwo allelu T okazało się czynnikiem ryzyka występowania przeciwciał kierowanych przeciwko 21-hydroksylazie (OR 13,09; 95% CI 1,51-113,2; p=0,007), obu antygenom tarczycowym – tyreoperoksydazie (OR 4,38; 95% CI 1,84-10,45; p=0,001) i tyreoglobulinie (OR 10,51; 95% CI 3,47-31,80; p<0,001), oraz transporterowi cynkowemu ZnT8 (OR 6,45; 95% CI 1,24-33,71; p=0,021). Nie udało się natomiast wykazać związku badanego polimorfizmu *PTPN22* z występowaniem auto przeciwciał anti-GAD ani IA-2 (Tabela 23).

Tabela 23. Występowanie swoistych autoprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona względem genotypów polimorfizmu rs2476601 genu *PTPN22*

	CC (73)	CT+TT (39)	wartość p	OR (95% CI)
a21OH (7)	1 (1,4%)	6 (15,4%)	0,007	13,09 (1,51-113,2)
aTPO (32)	13 (17,8%)	19 (48,7%)	0,001	4,38 (1,84-10,45)
aTg (22)	5 (6,8%)	17 (43,6%)	<0,0001	10,51 (3,47-31,80)
aGAD (9)	5 (6,8%)	4 (10,3%)	0,717	
aIA-2 (3)	3 (4,1%)	0	0,550	
aZnT8 (8)	2 (2,7%)	6 (15,4%)	0,021	6,45 (1,24-33,71)

Porównanie zbiorcze zależności liczby autoprzeciwciał stwierdzanych u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona zależnie od genotypów polimorfizmu rs2476601 genu *PTPN22* wykazało, iż nosiciele allelu T prezentowali niemal czterokrotnie wyższe ryzyko wystąpienia jakichkolwiek autoprzeciwciał w surowicy w porównaniu z homozygotami typu dzikiego (OR 3,96; 95% CI 1,74-9,00; p=0,0008) (Tabela 24). Podobnie, w grupie krewnych z dodatnimi autoprzeciwciałami, obecność allelu T polimorfizmu rs2476601 była czynnikiem ryzyka większej ich liczby, powyżej jednej swoistości wykrywanej w surowicy (OR 10,40; 2,89-37,39; p=0,0002).

Tabela 24. Porównanie liczby autoprzeciwciał stwierdzanych w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona zależnie od genotypów polimorfizmu rs2476601 genu *PTPN22*

	CC (73)	CT+TT (39)	wartość p	OR (95% CI)
brak przeciwciał (67)	52 (71,2%)	15 (38,5%)	0,0008	3,96 (1,74-9,00)
obecne przeciwciała (45)	21 (28,8%)	24 (61,5%)		
• 1 przeciwciało (24)	16 (76,2%)	8 (33,3%)	0,0002	10,40 (2,89-37,39)
• ≥2 przeciwciał (21)	5 (23,8%)	16 (66,7%)		

Z kolei analiza polimorfizmu rs231775 genu *CTLA4* w odniesieniu do częstości występowania autoprzeciwciał u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona nie wykryła związku tego wariantu genetycznego z obecnością któregośkolwiek z badanych przeciwciał (wszystkie wartości $p > 0,05$) (Tabela 25). Ocena zbiorcza, dotycząca obecności jakichkolwiek autoprzeciwciał u nosicieli polimorficznego wariantu rs231775, również nie wykazała związku tego polimorfizmu z autoimmunizacją humoralną przeciwko badanym antygenom (Tabela 26).

Tabela 25. Występowanie swoistych autoprzeciwciał w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona względem genotypów polimorfizmu rs231775 genu *CTLA4*

	AA (32)	AG+GG (80)	wartość p
a21OH (7)	0	7 (8,8%)	0,102
aTPO (32)	8 (25,0%)	24 (30,0%)	0,597
aTg (22)	4 (12,5%)	18 (22,5%)	0,299
aGAD (9)	2 (6,3%)	7 (8,8%)	1,000
aIA-2 (3)	1 (3,1%)	2 (2,5%)	1,000
aZnT8 (8)	2 (6,3%)	6 (7,5%)	1,000

Tabela 26. Porównanie liczby autoprzeciwciał stwierdzanych w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z chorobą Addisona zależnie od genotypów polimorfizmu rs231775 genu *CTLA4*

	AA (32)	AG+GG (80)	wartość p
brak przeciwciał (67)	20 (62,5%)	47 (58,8%)	0,715
obecne przeciwciała (45)	12 (37,5%)	33 (41,2%)	
• 1 przeciwciało (24)	8 (66,7%)	16 (48,5%)	0,280
• ≥ 2 przeciwciała (21)	4 (33,3%)	17 (51,5%)	

5.0 DYSKUSJA

5.1. Badanie ankietowe grupy pacjentów z chorobą Addisona

5.1.1. Charakterystyka ankietowanej grupy pacjentów z AAD

Zamierzeniem prowadzonego projektu badawczego była ocena częstości występowania wybranych biochemicznych i genetycznych markerów autoimmunizacji w zakresie układu dokrewnego u najbliższych krewnych osób z AAD, co pośrednio umożliwiłoby określenie czy osoby te są istotnie narażone na zwiększone ryzyko rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Pierwszym elementem analizy było przeprowadzenie wśród grupy pacjentów z AAD dedykowanej ankiety badawczej, dotyczącej występowania w ich rodzinach schorzeń autoimmunizacyjnych.

Ankietę wypełniła większość (71.6%) chorych, do których zwrócono się z zaproszeniem do udziału w badaniu. W ankietowanej grupie pacjentów z AAD przeważały kobiety (78 kobiet vs. 28 mężczyzn), co jest zgodne z charakterystyką badanej choroby, która istotnie częściej występuje wśród płci żeńskiej. Podobne proporcje rozkładu płci uzyskiwano w badaniach innych kohort pacjentów z AAD, zarówno z północy, jak i południa Europy [290,296-300]. Opublikowana niemal 30 lat temu analiza z innego ośrodka polskiego również wykazała znaczącą przewagę kobiet wśród pacjentów z pierwotną niedoczynnością kory nadnerczy bez podłoża gruźliczego, ani innych schorzeń naciekowych w wywiadzie [301]. Podsumowując, we wszystkich opisywanych dotąd populacjach pacjentów odnotowana była wyższa częstość występowania AAD u kobiet. Zakres stosunku kobiety/mężczyźni wahał się od 1,1 (dane dla bliźniąt z AAD) do 2,3 (pacjenci sklasyfikowani jako APS typu 2) [290, 302]. W badanej przez nas grupie polskich pacjentów z AAD odnotowana została podobna zależność, nawet bardziej wyrażona (stosunek kobiety/mężczyźni 2,7). Dotąd nie ustalono przyczyn większej skłonności płci żeńskiej do rozwoju AAD, jednak podobnie jak w przypadku większości schorzeń autoimmunizacyjnych, które przeważają u kobiet, prawdopodobną rolę odgrywają złożone wpływy hormonalne modulujące czynność układu odpornościowego [303]. Brak jednak wyczerpujących danych na potwierdzenie tej teorii, w szczególności w odniesieniu do AAD, której etiopatogeneza pozostaje w dużej mierze niejasna.

Średni wiek pacjentów w momencie rozpoznania AAD w populacji polskiej ($36,0 \pm 12,5$ lat) był spójny z obserwacjami dotyczącymi innych analizowanych grup z tą chorobą. Najniższy średni wiek rozpoznania niedoczynności kory nadnerczy (14 lat) odnotowany został dla subpopulacji chorych sklasyfikowanych jako APS typu 1 [Betterle 2002]. Jednak u zdecydowanej większości pacjentów AAD rozpoznana została w 4. dekadzie życia [121, 290, 297-300, 304]. Co intrygujące, średni wiek

w momencie rozpoznania AAD w badanej przez nas grupie był statystycznie istotnie wyższy u kobiet niż u mężczyzn ($38,6 \pm 12,3$ vs. $28,6 \pm 10,2$ lat). Podobna różnica wieku w momencie rozpoznania oraz zbliżony jej zakres wykazane zostały we wszystkich doniesieniach, w których zależność ta była przedmiotem oceny – w kohortach pacjentów pochodzących z Portugalii, Włoch i Holandii [290, 299, 300]. Duża analiza populacji szwedzkiej oparta o informacje z narodowych rejestrów (The Swedish Hospital Discharge Register, The Swedish Outpatient Register), w której zidentyfikowano dane ponad 2,5 tysiąca osób z AAD, także potwierdziła istotnie starszy wiek zachorowania kobiet, w porównaniu z mężczyznami [305]. Opublikowane wyniki badań nie wyjaśniają jednak obserwowanych różnic płciowych. Można np. zakładać, że im większe znaczenie w patogenezie czynników genetycznych, tym większe prawdopodobieństwo wcześniejszego rozwoju choroby (czego dobrym przykładem może być dziedziczny jednogenu APS typu 1, który rozpoznawany jest zwykle już u dzieci/młodzieży). Wcześniejsze rozpoznania AAD u mężczyzn świadczyć mogą więc o zróżnicowanej ekspresji genów u obu płci lub też większym znaczeniu związanych z chorobami autoimmunizacyjnymi genotypów układu HLA jak i polimorfizmów innych genów (np. *PTPN22*) właśnie u płci męskiej. Z kolei fakt znacznie późniejszego ujawniania się choroby u kobiet może wskazywać na rolę czynników środowiskowych, w tym np. wewnętrznego mikro-środowiska hormonalnego, które ulega przemianom wraz z wiekiem. W odniesieniu do AAD czynniki środowiskowe pozostają w sferze domysłów, a jedyne sugerowane dotąd związki dotyczą potencjalnego wpływu infekcji w patogenezie autoimmunizacyjnej niedoczynności kory nadnerczy [132].

W kontekście celu obecnego projektu badawczego najistotniejsze wydają się być jednak dane dotyczące współwystępowania dodatkowych chorób autoimmunizacyjnych u osób z AAD. Pierwsza taka, jeszcze nieuświadomiona, obserwacja pojawia się już w opisie objawów u jednego z pierwszych pacjentów z niewydolnością kory nadnerczy, przedstawionym przez Thomasa Addisona w 1855 roku, który stał się podstawą do zdefiniowania nowej jednostki chorobowej [306]. Odnotowane u pacjenta bielactwo stało się z czasem znaczącym klinicznie skórny markerem chorób o podłożu autoimmunizacyjnym [307]. Kolejny opis współwystępowania chorób autoimmunizacyjnych pochodzi z 1926 roku i dotyczy dwojga pacjentów z AAD, u których rozpoznano również limfocytarne zapalenie tarczycy (zespół Schmidta) [308]. W 1931 roku po raz pierwszy przedstawiony został przypadek współwystępowania AAD z cukrzycą i nadczynnością tarczycy (charakterystyczny układ trzech chorób, nazwany później zespołem Carpentera) [309].

Pojawiające się w kolejnych latach opisy dotyczyły już znacząco liczniejszych grup pacjentów z AAD, jak również wskazywały na zróżnicowane kombinacje współistniejących chorób. Najczęściej odnotowywaną towarzyszącą AAD swoistą narządowo chorobą autoimmunizacyjną w badaniach opublikowanych do roku 1996 (łącznie liczba 1240 pacjentów z AAD) była autoimmunizacyjna choroba tarczycy, stwierdzana u 54,7% chorych (choroba Hashimoto do 32%, choroba Gravesa-Basedowa do 22,7%). W dalszej kolejności pod względem częstości odnotowywano przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka, cukrzycę typu 1, niedoczynność przytarczyc, hipogonadyzm oraz łysienie plackowate [121].

Rzeczywiście, AAD charakteryzuje się najwyższą spośród znanych schorzeń autoimmunizacyjnych predyspozycją do współwystępowania chorób o tej etiologii. W analizowanej przez nas grupie pacjentów odnotowana została wysoka częstość innych chorób o charakterze autoimmunizacyjnym, które stwierdzono u 84% ankietowanych. Częstość współistnienia chorób autoimmunizacyjnych w publikacjach opisujących AAD w innych populacjach była zróżnicowana i mieściła się w zakresie od ok. 47-50% (populacja norweska, niemiecka oraz holenderska), poprzez 70% w populacji portugalskiej, do niemal 80% (populacja brytyjska i włoska) chorych z AAD [290, 296, 298, 299, 310]. Obserwowana w populacji polskiej częstość współwystępowania innych schorzeń była zatem wyższa niż dla części innych europejskich grup pacjentów z AAD. Stosunkowo duże zróżnicowanie częstości współwystępowania chorób autoimmunizacyjnych w różnych doniesieniach wynikać może z różnic w przyjętych strategiach badawczych. Niektóre analizy koncentrują się przede wszystkim na chorobach autoimmunizacyjnych układu dokrewnego, inne z kolei obejmują szeroki zakres schorzeń. Znaczenie mają również zastosowane metody zbierania danych o pacjentach. W krajach skandynawskich pochodzą one zwykle z narodowych rejestrów zdrowotnych i oparte są o kody klasyfikacji chorób ICD-10. Grupy są zatem bardzo duże, jednak dopuszczana jest możliwość błędu wynikającego z nieprawidłowości w administracyjnym kodowaniu schorzeń. Podobnie dane z Niemiec czy Wielkiej Brytanii pochodziły z rejestrów tamtejszych ubezpieczycieli zdrowotnych [298, 310]. Z kolei badanie portugalskie opierało się na retrospektywnej analizie informacji medycznej pochodzącej z 12 dużych szpitali na terenie całego kraju, a więc zakres procedur stosowanych w diagnostyce hospitalizowanych pacjentów mógł być różny [300]. Opisywana w obecnym badaniu grupa pacjentów z AAD, podobnie jak największa kohorta włoska z Padwy [290], pochodzi z jednego ośrodka, gdzie od lat prowadzona jest diagnostyka oraz okresowe kontrole kliniczne chorych z pierwotną niedoczynnością kory nadnerczy.

U pacjentów aktywnie poszukuje się współistniejących schorzeń autoimmunizacyjnych, których rozwój może rzutować na wyrównanie hormonalne. Oznaczenia szerokiego spektrum autoprzeciwciał umożliwiają rozpoznanie dołączających się nowych chorób już na etapie subklinicznym [291]. Dzięki temu chorzy są wcześniej diagnozowani, a ich terapia jest odpowiednio modyfikowana. Takie podejście może tłumaczyć, dlaczego nasza grupa pacjentów z AAD charakteryzuje się szczególnie wysoką częstotliwością współwystępowania innych schorzeń autoimmunizacyjnych, na tle publikacji pochodzących z innych krajów.

W wszystkich opisywanych kohortach najczęstszym schorzeniem towarzyszącym AAD jest autoimmunizacyjna choroba tarczycy, której częstość, zależnie od populacji, waha się od 39,9 do 83% [121, 290, 296, 297, 299, 300, 304]. Zgodnie z danymi dla populacji ogólnej, również u osób z AAD przeważa autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy (choroba Hashimoto), które występuje 3-5 razy częściej niż choroba Gravesa-Basedowa. Ponadto przypadki choroby Gravesa-Basedowa są zwykle jednoznacznie klinicznie, poprzez objawy nadczynności tarczycy i/lub zmiany oczne o charakterze orbitopatii, podczas gdy choroba Hashimoto może przez długi czas rozwijać się w sposób subkliniczny, wymagając potwierdzenia za pomocą oznaczeń autoprzeciwciał i obrazowania ultrasonograficznego tarczycy. Dlatego częstość autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy może być niedoszacowana, jeśli opiera się jedynie na podstawie danych z rejestrów.

Rozwój niedoczynności tarczycy może postępować równolegle z autoimmunizacją skierowaną przeciwko komórkom kory nadnerczy. Niedoczynność tarczycy bywa jednak pierwszą chorobą diagnozowaną u pacjentów z APS typu 2-4. Wiąże się z tym pewne ryzyko, ponieważ włączenie substytucji lewotyroksyną u pacjenta z nierozpoznaną, a zatem nieleczoną AAD, może doprowadzić do przełomu nadnerczowego, zagrażającego życiu chorego. Hormony tarczycy nasilają metabolizm kortyzolu, przez co dodatkowo zmniejszają jego dostępność u osób z niewydolną steroidogenezą nadnerczową [311]. Z analogiczną sytuacją mamy do czynienia, kiedy u pacjenta z istniejącą już i leczoną AAD dołącza się nadczynność tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa [312]. W takich przypadkach, obok leczenia nadczynności tarczycy, konieczne jest adekwatne zwiększenie dawek substytucji steroidowej do czasu uzyskania eutyreozy.

Inną niebezpieczną dla pacjentów kombinacją chorób autoimmunizacyjnych układu dokrewnego jest połączenie AAD z cukrzycą typu 1. Podawanie egzogennej insuliny jest jedynym sposobem leczenia chorych z autoimmunizacyjnym zniszczeniem komórek beta trzustki. Nawet przy użyciu nowoczesnych analogów insuliny o zmodyfikowanym działaniu oraz stosując zaawansowane

technicznie metody jej podawania, bardzo trudno jest wiernie odtworzyć równowagę glikemiczną zbliżoną do osób zdrowych. U osób z niedoczynnością kory nadnerczy, które dodatkowo muszą pobierać egzogenne glikokortykosteroidy, uzyskanie wyrównania glikemii jest szczególnie skomplikowane. W momencie absorpcji tabletki hydrokortyzonu, stężenie kortyzolu w surowicy może okresowo wzrastać do stosunkowo wysokich wartości, co nasila insulinooporność, a w konsekwencji pogarsza działanie insuliny. Z kolei okresy bez podaży glikokortykosteroidów, jak np. pora nocna, grożą wystąpieniem ciężkich hipoglikemii, ponieważ przy zdarzających się błędach insulinoterapii, brak jest znaczącego wpływu kontrregulacyjnego kortyzolu i upośledzona jest m.in. glukoneogeneza wątrobowa, natomiast wrażliwość na działanie insuliny wzrasta [313]. Z tego samego powodu, pierwszym objawem AAD dołączającej się w przebiegu cukrzycy typu 1, są zwykle nasilające się epizody hipoglikemii i konieczność redukcji stosowanych dawek insuliny [313, 314].

W grupie chorych, której krewnych badaliśmy, aż 11,3% pacjentów z AAD chorowało także na cukrzycę typu 1. Podobne częstości tej choroby, wahające się między 10 a 17%, odnotowywano także w innych populacjach osób z AAD [290, 296-298, 300, 304, 310]. Cukrzyca typu 1 stanowi zatem częste schorzenie towarzyszące AAD, które znacząco utrudnia skuteczną terapię tych chorych, a nawet może stanowić zagrożenie dla ich życia. Dane z rejestrów szwedzkich pozwoliły ustalić, że połączenie AAD i T1D wiąże się z istotnym wzrostem śmiertelności chorych z powodu komplikacji cukrzycy, a także infekcji, oraz przyczyn sklasyfikowanych jako nieustalone, w porównaniu z osobami chorującymi jedynie na cukrzycę [315].

Siedemnaścioro (16,0%) spośród uczestniczących w obecnej analizie pacjentów z AAD miało udokumentowane przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka, z niedokrwistością złośliwą u 7 z nich (6,6%). Dane na temat częstotliwości tego schorzenia w innych populacjach chorych z AAD są niejednoznaczne, ponieważ część opracowań opiera się jedynie na oznaczeniach autoprzeciwciał, inne rozpoznają chorobę dopiero na etapie niedokrwistości złośliwej, a niektóre z analiz pacjentów z AAD zupełnie pomijają to schorzenie. Zazwyczaj częstość zapalenia zanikowego śluzówki ocenia się na około 10-15%, podczas gdy niedokrwistość rozwija się u 6-7% [290, 296, 297, 300, 302]. Utrudnieniem jest z pewnością fakt, iż nie wszyscy chorzy wyrażają zgodę na badanie gastroscopowe z pobraniem wycinków, umożliwiających wiarygodną ocenę histopatologiczną stanu zapalnego błony śluzowej żołądka. Odmienna może być też czułość różnych metod badań wykrywających obecność autoprzeciwciał przeciwko komórkom okładzinowym żołądka (wiążących

się z pompą protonową, H⁺/K⁺-ATPazą) oraz czynniki wewnętrzny Castle'a [316]. Przeciwciała te są markerem stanu zapalnego błony śluzowej, który z czasem prowadzi do zaburzeń wchłaniania witaminy B12 (kobalaminy) i jej niedoboru (niedokrwistość złośliwa Addisona-Biermera). Dlatego nie każdy przypadek stwierdzenia obecności przeciwciał przeciwko komórkom okładzinowym, czy nawet potwierdzenia zmian histologicznych błony śluzowej, jest równoznaczny z niedoborem kobalaminy. W przypadku rozwoju niedokrwistości choroba wymaga regularnej parenteralnej suplementacji witaminy B12, ponieważ przy jej niedoborze, obok zaburzeń hematologicznych dochodzi też do powikłań neurologicznych. Przewlekłe zmiany zanikowe błony śluzowej trzonu żołądka są zwykle bezobjawowe, jednak z czasem dochodzi do stanu bezkwaśności z następczą hipergastrynemią i zwiększonym ryzykiem hiperplazji komórek enterochromaffinowych i potencjałem rozwoju nowotworów żołądka [317].

Częstym schorzeniem współtowarzyszącym AAD jest również bielactwo (vitiligo), stwierdzane u 11,3% pacjentów biorących udział w naszej ankiecie. Podobnie w innych populacjach pacjentów z autoimmunizacyjną niewydolnością nadnerczy częstość tej dermatozy wahała się między 3 a 14% [296-300, 304]. Schorzenie spowodowane jest zaburzeniem czynności układu odpornościowego. Cytotoksyczne komórki T CD8⁺ atakują melanocyty w skórze, powodując ich apoptozę, co skutkuje pojawianiem się plamistych obszarów depigmentacji skóry [318]. Bielactwo dotyka 1-2% populacji ogólnej i dotyczy wszystkich ras. Jak już wcześniej wspomniano, bielactwo bywa uznawane za skórny marker schorzeń autoimmunizacyjnych [307]. Innym, rzadszym, autoimmunizacyjnym problemem dermatologicznym jest łysienie plackowate (alopecia areata). Zarówno wśród naszych pacjentów z AAD, jak i w danych z innych analiz, opisywano sporadyczne przypadki współistnienia tego schorzenia, z przewagą płci żeńskiej [290, 296, 297]. Znacznie częściej łysienie plackowate pojawia się u osób cierpiących na AAD w obrazie zespołu APS typu 1 [121, 319]. Oba schorzenia skórne nie niosą za sobą istotnych zagrożeń dla życia pacjentów, jednak w znaczący sposób upośledzają samopoczucie i pogarszają komfort psychiczny chorych.

U 7 kobiet (8,9%) z badanej przez nas grupy pacjentów z AAD wystąpiła przedwczesna niewydolność jajników. Wzmożona skłonność do chorób autoimmunizacyjnych sprawia, że osoby z AAD są również bardziej narażone na rozwój hipogonadyzmu hipergonadotropowego o takiej etiologii. Jego częstość w innych populacjach pacjentów z AAD wynosiła ok. 5-13% [290, 296, 297, 298, 300, 310]. Problem dotyka w większym stopniu kobiet, ponieważ gonady męskie należą do miejsc immunologicznie uprzywilejowanych dzięki istnieniu bariery krew-jądro [320]. Dlatego

przypadki hipogonadyzmu hipergonadotropowego u mężczyzn z AAD są znacznie rzadsze i dotyczą przede wszystkim pacjentów z wywiadem obciążonym wcześniejszymi schorzeniami jąder, na skutek infekcji, czy urazów mechanicznych. U kobiet z AAD reakcja układu odpornościowego skierowana przeciwko autoantygenom jajników prowadzić może do przedwczesnej menopauzy, przed 40 rokiem życia. Za etiologią autoimmunizacyjną przemawia limfocytarny naciek rozwijających się pęcherzyków jajnikowych oraz obecność w surowicy autoprzeciwciał skierowane przeciwko enzymom steroidogenezy wspólnym dla syntezy steroidów w korze nadnerczy i gonadach, enzymowi odcinającemu łańcuch boczny cholesterolu oraz 17alfa-hydroksylazie [148, 321]. Przeciwciała te stwierdza się znacznie częściej u pacjentek z APS typu 1, co koreluje z faktem wyższego ryzyka przedwczesnej menopauzy wśród tych chorych [148]. Niestety, brak standaryzowanych, komercyjnie dostępnych zestawów do oznaczeń powyższych autoprzeciwciał utrudnia diagnostykę przesiewową zwiększonego ryzyka niewydolności jajników. Możliwość rutynowych badań w tym kierunku byłaby nieocenionym wsparciem dla młodszych pacjentek z AAD, które planują założenie rodziny.

Intrygującą obserwacją dotyczącą badanej kohorty pacjentów był niemal zupełny brak współistnienia układowych schorzeń autoimmunizacyjnych wśród naszych chorych (zespół antyfosfolipidowy u jednej osoby). Mimo, iż schorzenia takie, jak reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń układowy rumieniowaty, czy zespół Sjögrena wynikają również z zaburzeń czynności układu odpornościowego, który atakuje własne tkanki, dostępne dane literaturowe wykazują, że choroby te są zdecydowanie rzadsze w przebiegu AAD, niż zaburzenia swoiste narządowo [121, 290, 296, 299]. Nieco większą częstość schorzeń reumatologicznych w przebiegu AAD odnotowano jedynie na podstawie danych z ubezpieczalni niemieckich [310]. W przeszłości grupa pacjentów z tutejszego ośrodka została poddana przesiewowej ocenie krążących przeciwciał przeciwjądrowych (ang. *AntiNuclear Antibodies*, ANA). Wysokie miana ANA, wynoszące przynajmniej 1:160, stwierdzono u 10 spośród 80 badanych [291]. U tych osób oceniono panel 15 antygenów jądrowych (RNP, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, centromer B, PCNA, dsDNA, nucleosomes, histones, ribosomal P-protein, AMA-M2), wykazując graniczne lub słabo pozytywne wyniki u 5 chorych oraz silną reaktywność przeciwko Ro-52 wraz z granicznym wynikiem PM-Scl u jednej kobiety [291]. Żaden z powyższych pacjentów nie prezentował objawów charakterystycznych dla schorzeń układowych tkanki łącznej, natomiast wszyscy z nich chorowali na co najmniej dwa narządowo swoiste schorzenia autoimmunizacyjne. Przeciwciała przeciwjądrowe są mało swoiste i mogą być

stwierdzone u chorych z przewlekłymi infekcjami, czy procesami złośliwymi, a nawet u osób zdrowych, szczególnie w starszym wieku [322]. Poza opisami przypadków nie natrafiliśmy na inne opracowanie systematycznie oceniające autoimmunizację skierowaną przeciwko antygenom tkanki łącznej u pacjentów z AAD [323, 324].

Ponad połowa pacjentów biorących udział w badaniu chorowała na dodatkowe zaburzenia autoimmunizacyjne obok AAD, a jedna trzecia miała więcej niż jedną dodatkową chorobę tej grupy (2-4 schorzenia). Zatem u ponad 80% badanych można było rozpoznać APS typu 2 lub 4. W porównaniu z innymi opublikowanymi dotychczas opisami grup pacjentów z AAD jest to wysoka częstość, ale jak wspomniano powyżej, badania wśród naszych chorych są szczególnie wnikliwie i prowadzone od wielu lat. Najczęściej występujące kombinacje schorzeń dodatkowych były takie same jak u pacjentów z innych krajów i obejmowały przede wszystkim połączenie AAD z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy, przede wszystkim pod postacią choroby Hashimoto [290, 296, 297, 298, 300, 310]. Wśród kombinacji złożonych z więcej niż dwóch składowych, dominowały skojarzenia AAD i choroby Hashimoto wraz z przewlekłym zanikowym zapaleniem błony śluzowej żołądka (4,7%), bielactwem (4,7%) lub cukrzycą typu 1 (3,8%). Dodatkowo u kobiet z AAD i HT zaznacza się skłonność do współistnienia przedwczesnej niewydolności jajników (4,7%). Powyższe konfiguracje schorzeń są często spotykane wśród pacjentów z APS 2 i 4. Zgodnie z tendencją do częstszego występowania większości schorzeń autoimmunizacyjnych u kobiet, również średnia liczba dodatkowych chorób tej grupy była w naszym badaniu wyższa u kobiet, niż u mężczyzn z AAD [325, 326]. Szczególnie autoimmunizacyjna choroba tarczycy charakteryzuje się znaczną przewagą zachorowań u płci żeńskiej, co potwierdziła również nasza analiza [327, 328]. Z kolei cukrzyca typu 1 należy do nielicznych chorób autoimmunizacyjnych, dla których ujawnia się przewaga występowania u płci męskiej, choć zwykle niewielkiego stopnia [329]. W naszym badaniu choroba ta procentowo dominowała u mężczyzn, jednak różnica nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0,294$). Płeć męska zdecydowanie przeważała natomiast w odniesieniu do występowania izolowanej formy AAD, która była istotnie rzadsza wśród kobiet w naszej grupie ($p=0,007$). Podobny odwrócony rozkład płci w przypadku izolowanej AAD raportowano w populacji włoskiej, norweskiej i szwedzkiej [290, 296, 297].

Obecna analiza wykazała również dodatnią korelację pomiędzy wiekiem chorych z AAD w momencie rozpoznania choroby a łączną liczbą schorzeń autoimmunizacyjnych, które u nich występowały. Zatem osoby, które zachorowały później, cierpiały statystycznie na więcej chorób.

Prawdopodobnie obserwacja ta jest pochodną wieku chorych – im predysponowani osobnicy byli starsi, tym więcej chorób o etiologii autoimmunizacyjnej zdążyli rozwinąć w czasie swojego życia. Podobnej zależności nie odnotowano dla czasu trwania pierwotnej niedoczynności nadnerczy, tym bardziej, że choroba ta nie zawsze jest pierwszym z ujawniających się schorzeń autoimmunizacyjnych u pacjenta [291].

Podsumowując, charakterystyka grupy 106 pacjentów z AAD ankietowanej w celu oceny występowania schorzeń autoimmunizacyjnych u krewnych pierwszego stopnia, wydaje być spójna z typową charakterystyką chorych z AAD w innych populacjach. Można zatem uznać, że kohorta, z której udziałem przeprowadzono poniższą analizę, stanowi reprezentatywną grupę dla uzyskania odpowiedzi na założenia pracy.

5.1.2 Częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych chorych z AAD

W przeprowadzonym w oparciu o dedykowaną ankietę badaniu, ponad 70% spośród 106 chorych z AAD wskazało wśród swoich krewnych osoby z chorobami autoimmunizacyjnymi. Ze względu na brak wcześniejszych analiz oceniających tę zależność u chorych z AAD, zasadnym wydaje się odniesienie tej wartości do wyników grup chorych z innymi schorzeniami autoimmunizacyjnymi. Choć ogólnie przyjmuje się, że choroba autoimmunizacyjna w rodzinie wiąże się z większym ryzykiem schorzeń o tej etiologii wśród krewnych, nadal mało jest systematycznych badań na ten temat.

Zbliżona do uzyskanej w obecnym projekcie częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych w rodzinie (w rodzinach 72% pacjentów) odnotowana została w populacji dzieci z cukrzycą typu 1 z Finlandii [330]. Wartość tę uzyskano definiując krewnych jako rodziców, rodzeństwo, dziadków, rodzeństwo rodziców oraz ich dzieci, a także rodzeństwo dziadków i ich dzieci. W ograniczonej do rodziców i rodzeństwa dziecka z cukrzycą grupie krewnych, odsetek występowania chorób autoimmunizacyjnych był znacząco niższy (22% rodzin), co wynika zapewne z naturalnie mniejszej liczebności krewnych w rodzinach nuklearnych w porównaniu do całej rodziny chorego. Analiza grupy 98 chorych z cukrzycą typu 1 z Kolumbii wykazała z kolei ponad 3,5-krotnie wyższą częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych (18 schorzeń wskazanych w ankiecie) w rodzinach pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną [331]. Częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych analizowana była również dla chorych ze stwardnieniem

rozszianym (*sclerosis multiplex*, SM). W opublikowanym w 2006 r. amerykańskim badaniu, obejmującym 386 chorych z SM oraz ich 1107 krewnych pierwszego stopnia, choroby autoimmunizacyjne odnotowane zostały u 64% rodzin [332]. Niższa częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych chorych z SM, wynosząca 45,2% , odnotowana została natomiast w analizie chorych z 40 rodzin hiszpańskich [333]. Z kolei podobne opracowanie dla populacji brytyjskiej wykazało 1,7-krotnie wyższą częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych chorych z SM w porównaniu z populacją kontrolną [283]. Odnosząc się do danych europejskich warto zwrócić uwagę również na wyniki badania opartego o dane rejestrowe dla populacji duńskiej [282]. Analiza ponad 10 000 tamtejszych chorych z SM oraz ponad 20 000 ich krewnych wskazała 1,2-krotnie wyższą częstość występowania schorzeń autoimmunizacyjnych (42 analizowane schorzenia) względem populacji ogólnej. Z kolei dane analizujące omawianą zależność w grupie chorych z SLE wskazują na zróżnicowaną częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych, które odnotowywano u krewnych 42 do 72% pacjentów z SLE [334, 335] oraz na 5,7 krotnie wyższą częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych w rodzinach pacjentów z SLE w porównaniu z grupą kontrolną [336]. Analiza kohorty 133 chorych z bielactwem potwierdziła natomiast występowanie chorób autoimmunizacyjnych w rodzinach 35 pacjentów (26,3%) [337].

Spośród wskazywanych przez pacjentów z AAD chorób występujących u ich krewnych zdecydowanie najczęściej wymieniana była autoimmunizacyjna choroba tarczycy (choroba Hashimoto zdiagnozowana w rodzinach 66,7% pacjentów i choroba Gravesa-Basedowa w rodzinach 25,5% z nich). W rodzinach wielu pacjentów odnotowano również częste występowanie chorób takich jak cukrzyca typu 1, bielactwo, łuszczyca oraz reumatoidalne zapalenie stawów. Samą chorobę Addisona wg ankiety rozpoznano u 7 krewnych, spośród których było czworo rodzeństwa badanych pacjentów i troje dalszych krewnych (stryj, kuzynka i wnuk). Podobnie jak dla ogólnej częstości występowania chorób autoimmunizacyjnych wśród krewnych, oceny częstości rodzinnego występowania AAD są bardzo nieliczne. Dwie publikacje dotyczące populacji skandynawskich oparte na analizach danych rejestrowych, wskazują na częstość występowania choroby Addisona u krewnych w zakresie od 6,4% (dane szwedzkie) do 9,7% (dane norweskie) [296, 297]. Odsetki te są więc bliskie odnotowanym w niniejszym projekcie (7 przypadków wśród krewnych 106 ankietowanych pacjentów z AAD).

Więcej danych dotyczących częstości występowania poszczególnych chorób autoimmunizacyjnych u krewnych dostępnych jest dla grup pacjentów z innymi chorobami autoimmunizacyjnymi.

W przytaczanym już badaniu obejmującym populację fińskich dzieci z cukrzycą typu 1 odnotowana została znacząca statystycznie różnica w występowaniu reumatoidalnego zapalenia stawów, które częściej stwierdzano wśród krewnych chorych dzieci niż w rodzinach kontrolnych, podczas gdy celiakia czy autoimmunizacyjna choroba tarczycy nie wykazały statystycznie wyższej częstości w rodzinach chorych z T1D [330]. Podobnie niewielkie badanie polskie obejmujące rodziny 155 dzieci z cukrzycą typu 1 potwierdziło częstsze w porównaniu z grupą kontrolną występowanie u ich krewnych nie tylko T1D, a także reumatoidalnego zapalenia stawów [338]. W opublikowanym w 2009 r. badaniu, Hemminki i wsp. analizowali z kolei związek pomiędzy cukrzycą typu 1 oraz występowaniem chorób autoimmunizacyjnych u rodziców, dzieci oraz rodzeństwa. Prawdopodobieństwo rozwoju cukrzycy typu 1 u dzieci, których rodzice również chorowali na T1D wyrażone jako standaryzowany współczynnik zapadalności (ang. *standardised incidence ratio*, SIR) było ponad 8-krotnie wyższe niż u osób bez cukrzycy w rodzinie [339]. W powyższym badaniu ryzyko cukrzycy typu 1 okazało się zwiększone także w przypadku, gdy u rodziców stwierdzana była inna choroba autoimmunizacyjna. Zależność taką odnotowano m. in. dla choroby Addisona (SIR 2,41), celiakii (SIR 2,73), choroby Gravesa-Basedowa (SIR 1,86), choroby Hashimoto (SIR 2,35), niedokrwistości złośliwej (SIR 3,09), pierwotnej marskości wątroby (SIR 3,63), reumatoidalnego zapalenia stawów (SIR 2,12) oraz toczenia układowego (SIR 2,04). W przypadku chorego na schorzenia autoimmunizacyjne rodzeństwa zwiększone ryzyko cukrzycy typu 1 potwierdzono jedynie dla choroby Addisona, celiakii oraz choroby Gravesa-Basedowa [339].

Podobnie jak w niniejszym projekcie, najczęstszą chorobą autoimmunizacyjną stwierdzaną u krewnych chorych ze stwardnieniem rozsianym było zapalenie tarczycy typu Hashimoto, odnotowane wśród krewnych pierwszego stopnia 3% ze 176 rodzin pacjentów z SM [332]. W dalszej kolejności w analizowanej grupie krewnych odnotowano występowanie łuszczycy, nieswoistych zapaleń jelit oraz reumatoidalnego zapalenia stawów, z których wszystkie występowały w rodzinach 2% chorych. Co interesujące, badacze wykazali również związek pomiędzy częstością występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych a występowaniem dodatkowych schorzeń autoimmunizacyjnych u probanda (OR 3,5, 95% CI 1,6-7,6, $p=0,002$). Obserwacja ta pozostaje w zbieżności z naszymi analizami, w których udało się wykryć zależność między liczbą chorób autoimmunizacyjnych u probanda a liczbą chorych krewnych deklarowanych w jego rodzinie ($r=0,241$; $p=0,013$).

Systematyczna analiza kart informacyjnych kohorty 69 pacjentów z dziecięcą postacią toczenia układowego wykazała z kolei najwyższą częstość występowania u ich krewnych tej samej jednostki chorobowej (21% rodzin), a w dalszej kolejności chorób tarczycy (15% pacjentów SLE), łuszczycy (krewni 6% pacjentów z SLE), mieszanych zaburzeń tkanki łącznej oraz reumatoidalnego zapalenia stawów (przypadku obu chorób krewni 5% pacjentów z SLE) [334]. Podobnie we wspomnianej powyżej grupie 133 chorych z bielactwem, dominującym schorzeniem autoimmunizacyjnym w rodzinach pacjentów okazało się także bielactwo (u 11,3% rodzin), a w dalszej kolejności – reumatoidalne zapalenie stawów, autoimmunizacyjna choroba tarczycy oraz, rzadko spotykane w rodzinnych analizach innych schorzeń autoimmunizacyjnych, łysienie plackowate [337]. Ocena grupy 105 chorych z zespołem Sjögrena oparta o dane rejestrowe ubezpieczyciela Taiwan National Health Insurance potwierdziła zwiększone ryzyko względne (ang. *relative risk*, RR) wystąpienia chorób autoimmunizacyjnych u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z tą chorobą [284]. Najwyższe wartości RR obliczono dla toczenia układowego (RR 6,25), stwardnienia rozsianego (RR 3,38) oraz reumatoidalnego zapalenia stawów (RR 2,95). W przypadku narządowo swoistych chorób autoimmunizacyjnych wartości te były również podwyższone, choć nie przekraczały 2 (cukrzyca typu 1 – RR 1,97, miastenia – RR 1,67) [284].

Wartościowych danych w odniesieniu do rodzinnego występowania chorób autoimmunizacyjnych dostarczają również wyniki opracowane przez konsorcjum naukowe MADGC (Multiple Autoimmune Disease Genetic Consortium), które objęło analizą 265 rodzin z przynajmniej 2 przypadkami dowolnych spośród 9 schorzeń tej grupy (RZS, SLE, T1D, SM, AITD, młodzieńcze zapalenie stawów, nieswoiste zapalenia jelit, łuszczycy lub zespół Sjögrena [233]. W badanej grupie odnotowano 806 członków rodzin z chorobą autoimmunizacyjną (średnio 3,2 osób dotkniętych autoimmunizacją w rodzinie), u których potwierdzono występowanie 907 przypadków ocenianych schorzeń (u 97 osób zdiagnozowano dwie i więcej choroby). W analizowanej populacji zdecydowanie najczęściej odnotowana została autoimmunizacyjna choroba tarczycy, co jest zapewne konsekwencją najwyższej populacyjnej częstości tego schorzenia spośród 9 ocenianych chorób i pozostaje w zgodności ze statystykami w innych populacjach. W dalszej kolejności, wśród krewnych wskazywane było reumatoidalne zapalenie stawów oraz SM i SLE. Jak wykazała dalsza analiza stratyfikowana względem choroby probanda, najczęstszym schorzeniem odnotowanym u rodzeństwa chorych z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy lub toczeniem układowym była właśnie AITD (odpowiednio u rodzeństwa 48% i 43% pacjentów). Natomiast w analizie chorych

z reumatoidalnym zapaleniem stawów, stwardnieniem rozsianym, cukrzycą typu 1 lub łuszczycą, wśród rodzeństwa dominowało występowanie tej samej jednostki chorobowej (odpowiednio, u rodzeństwa 39%, 27%, 33% i 38% chorych).

Odnotowana w projekcie dominacja płci żeńskiej wśród dotkniętych autoimmunizacją krewnych wydaje się spójna z ogólnie wyższą częstością występowania chorób autoimmunizacyjnych wśród kobiet. Jedyna dotychczasowa próba ankietowego oszacowania rozpowszechnienia schorzeń autoimmunizacyjnych wśród krewnych osób z chorobą Addisona została podjęta przez stowarzyszenie samych pacjentów w oparciu o kwestionariusz wypełniany samodzielnie przez chorych z kilku krajów europejskich, jednak pełne dane nigdy nie zostały opublikowane, a jedynie częściowo zaprezentowane na konferencji [340]. Ankiety wypełniło 614 chorych z AAD, oraz 612 kontroli dobranych płcią, wiekiem i miejscem zamieszkania. Badanie wykazało statystycznie istotnie zwiększoną częstość AAD, zaburzeń czynności tarczycy, cukrzycy typu 1, niedoboru witaminy B12 oraz bielactwa w ich rodzinach w porównaniu z grupą kontrolną [340]. Dodatkowo dzięki uzyskanym wynikom potwierdzono wyższą częstość chorób autoimmunizacyjnych u krewnych płci żeńskiej. Różnice płciowe wykazano dla choroby Addisona (częstość występowania AAD 1,7% u matek vs. 0,2% u ojców, 0,9% u babć ze strony matki vs. 0,3% u babć ze strony ojca, 3,4% u sióstr vs. 2,8% u braci, 1,2% u córek vs. 0,8% synów chorych z chorobą Addisona), jak również w odniesieniu do niedoczynności tarczycy (19,2% matek vs. 4,3% ojców, 9,4% sióstr vs. 3,7% braci, 5,8% babć ze strony matki vs. 2% babć ze strony ojca), bielactwa (1,7% matek vs 1,4% ojców, 2,6% sióstr vs 1,1% braci) oraz niedoboru witaminy B12 (5,4% matek vs. 2,8% ojców), 2,6% sióstr vs. 1,4% braci [340]. Znaczącym ograniczeniem dla porównywania naszych wyników z powyższym badaniem jest brak potwierdzenia autoimmunologicznej etiologii pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy w tym ostatnim – ankieta badawcza była rozesłana do wszystkich należących do stowarzyszenia pacjentów z rozpoznaniem niedoczynności kory nadnerczy, niezależnie od jej przyczyny.

Różnice płciowe były również obserwowane w wielu innych badaniach dotyczących schorzeń autoimmunizacyjnych. Ich znacząca dominacja wśród krewnych płci żeńskiej odnotowana była także w przytaczanym już projekcie badawczym grupy MADGC, w którym kobiety stanowiły 82% krewnych dotkniętych autoimmunizacją. Odsetek kobiet wśród chorych krewnych był jednak zróżnicowany dla poszczególnych schorzeń autoimmunizacyjnych – 57% w przypadku cukrzycy typu 1, 66% dla nieswoistych zapaleń jelit, 68% dla łuszczycy, 85% dla stwardnienia rozsianego, 88% dla autoimmunologicznej choroby tarczycy, 89% dla reumatoidalnego zapalenia stawów,

aż po 94% dla zespołu Sjögrena. [233]. Podobna proporcja częstości występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych odnotowana została także dla pacjentów z dziecięcą postacią tocznia układowego - w analizowanej grupie, choroby autoimmunizacyjne w niemal 80% dotyczyły kobiet (38% matka, 17% ciotka, 14% babcia, 10% siostra), a różnice płciowe były najsilniej wyrażone dla tocznia układowego oraz autoimmunizacyjnej choroby tarczycy [334]. Podobnie analiza kohorty pacjentów z bielactwem wykazała częstsze występowanie chorób autoimmunizacyjnych u krewnych w płci żeńskiej (60% chorych krewnych), a przewaga ta była najwyraźniejsza także dla przypadków autoimmunologicznej choroby tarczycy (68% krewnych z AITD) [337].

Podsumowując, uzyskane przez nas w prezentowanym badaniu ankietowym wyniki stanowią pierwszą selektywną próbę oceny częstości chorób autoimmunizacyjnych u krewnych chorych z potwierdzoną autoimmunizacyjną pierwotną niedoczynnością kory nadnerczy. Wysoka ogólna częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych, dominująca częstość występowania wśród tych schorzeń autoimmunologicznej choroby tarczycy oraz szczególna predylekcja do autoimmunizacji wśród krewnych płci żeńskiej wydają się kluczowymi wynikami przeprowadzonej ankiety. Powyższe dane uzasadniają aktywne poszukiwanie wśród członków rodzin pacjentów z AAD, szczególnie wśród krewnych pierwszego stopnia płci żeńskiej, chorób autoimmunizacyjnych, a przede wszystkim autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, która przez długi czas może przebiegać skąpo objawowo, jednocześnie pogarszając profil metaboliczny, status kardiologiczny czy stan psychiczny chorych.

Porównanie naszych obserwacji z innymi grupami pacjentów ze schorzeniami autoimmunizacyjnymi napotyka jednak pewne ograniczenia. Na trudność w interpretacji wyników z różnych badań wpływają również odmienne formy ich opisu w cytowanych publikacjach. Pojawiają się zarówno analizy oceniające częstość występowania choroby u krewnych w odniesieniu do wszystkich odnotowanych chorób autoimmunizacyjnych u krewnych, albo opracowania szacujące częstość występowania choroby u krewnych w odniesieniu do grupy kontrolnej. Część badaczy posługuje się standaryzowanym współczynnikiem, podczas gdy inni określają względne ryzyko zachowania u krewnych [341, 342]. Dodatkowo niektóre z badań skupiają się jedynie na krewnych pierwszego stopnia, natomiast inne analizują szeroko całe rodziny pacjentów z daną chorobą.

Duże zróżnicowanie odnotowanych częstości występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych z poszczególnymi chorobami może wynikać z charakteru samego schorzenia, różnic populacyjnych, ale może też być uwarunkowane metodologicznie. W większości badań zebranie

danych oparte było na rozmowie za pacjentem i wypełnieniu przez lekarza ustrukturyzowanej ankiety badawczej lub też samodzielnym wypełnieniu ankiety przez pacjenta. Pomimo zachowania należytej staranności w tym procesie jest on obciążony subiektywizmem oceny chorego, ograniczeniami jego pamięci, potencjału intelektualnego jak również chęcią zaangażowania się w badanie. Kompletność wypełnienia ankiety, udzielania odpowiedzi zależna jest również od płci chorych (np. większa wiedza o rodzinach u kobiet, większy udział krewnych z chorobami autoimmunizacyjnymi w pierwszej linii pokrewieństwa) a także samej formuły przeprowadzania rozmowy (np. mężczyźni w obecności partnerki przykładają do udzielenia odpowiedzi większą wagę) [343]. Czynniki te są zniwelowane w przypadku przeprowadzania analiz opartych o narodowe lub regionalne rejestry, wykorzystujące zazwyczaj kodowanie według klasyfikacji ICD-10. Praktyka wskazuje jednak, że i ta metoda ma swoje niedoskonałości – choć umożliwia uzyskanie danych populacyjnych w dużej skali, ogranicza ją poprawność kodowania, kolejność nadawania kodów, czy względy administracyjne.

Wymienione ograniczenia metodologiczne badania ankietowego stały się motywacją do przeprowadzenia bardziej precyzyjnej oceny występowania schorzeń autoimmunizacyjnych w rodzinach pacjentów z chorobą Addisona, opartej o bezpośrednie badanie krewnych pierwszego stopnia z wykorzystaniem uznanych markerów serologicznych i genetycznych chorób autoimmunizacyjnych.

5.2 Badania krewnych pierwszego stopnia pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona

5.2.1 Autoprzeciwciała w surowicy krewnych pacjentów z AAD

Jak opisano powyżej, pacjenci z chorobą Addisona wykazują szczególną podatność do rozwoju kolejnych schorzeń autoimmunizacyjnych, które ujawniają się w różnej kolejności i kombinacjach [290, 291, 296]. Ponieważ przynajmniej część tej skłonności uwarunkowana jest genetycznie, wydaje się że również krewni osób z chorobą Addisona mogą stanowić grupę zwiększonego ryzyka i prezentować wyższą częstość schorzeń autoimmunizacyjnych. Problem był dotąd podejmowany w bardzo ograniczonym stopniu, dlatego brak szczegółowych danych na ten temat. Jedyne dotychczasowe opracowanie dotyczące częstości autoimmunizacji w rodzinach pacjentów z AAD powstało ponad pół wieku temu [289]. Autorzy ocenili wówczas występowanie narządowo swoistych autoprzeciwciał w surowicy rodziców oraz rodzeństwa pacjentów chorujących na AAD. Badanie było jednak ograniczone do przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom kory

nadnerczy, tarczycy oraz żołądka, które oceniano za pomocą testów aglutynacji i wiązania dopełniacza, znacznie mniej czułych i często mniej specyficznych od stosowanych współcześnie metod analitycznych [289]. Nasze badanie miało na celu uwspółcześnienie tych danych posługując się informacjami z dokumentacji medycznej krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD, a także poprzez ocenę występowania specyficznych autoprzeciwciał w ich surowicy z użyciem nowoczesnych testów.

Skłonność do autoimmunizacji wydaje się być w znacznej mierze zależna od tła genetycznego, sprzyjającego dysfunkcji układu odpornościowego [326, 344, 345]. Czynniki genetyczne są dziedziczne, a zatem mogą oddziaływać u wielu członków rodziny, prowadząc do kumulacji schorzeń autoimmunizacyjnych u krewnych. Zgodnie z tym założeniem, choroby autoimmunizacyjne były faktycznie rozpoznane u znacznej liczby krewnych pacjentów z chorobą Addisona biorących udział w obecnym projekcie badawczym i dotyczyły ponad 38% członków rodzin. Ta proporcja istotnie przewyższa szacunkową chorobowość związaną z chorobami autoimmunizacyjnymi w populacji ogólnej, która według danych z piśmiennictwa oscyluje między 3,2% a 9,4% zależnie od metodologii przyjętej w badaniu, ocenianej populacji oraz liczby branych pod uwagę schorzeń [325, 328, 346].

Najczęściej stwierdzaną chorobą autoimmunizacyjną u krewnych pacjentów z AAD była AITD. Łącznie, biorąc pod uwagę zarówno zapalenie tarczycy typu Hashimoto, jak i chorobę Gravesa-Basedowa, autoimmunizacja tarczycowa rozpoznana była u 28,3% krewnych pierwszego stopnia. Dane z dokumentacji medycznej w dużej mierze pokrywały się z wynikami badania ultrasonograficznego tarczycy wykonywanego jako część obecnego projektu. Obraz charakterystyczny dla AITD wykryto u 31,6% badanej grupy. Brak jest polskich danych epidemiologicznych, jednak szacunki z innych populacji kaukaskich z terenów o wystarczającym zaopatrzeniu w jod wskazują, że częstość występowania choroby Hashimoto może wynosić około 5% u kobiet i poniżej 2% mężczyzn, z tendencją do wzrostu zapadalności u kobiet wraz z wiekiem [327, 346, 347]. Nadczynność tarczycy rozpoznawana jest u 0,3-2,0% Europejczyków pochodzenia kaukaskiego, z czego około dwie trzecie przypadków spowodowane jest chorobą Gravesa-Basedowa [347]. Analiza 179 rodzin niemieckich potwierdziła kumulację AITD u dzieci i rodzeństwa chorych – ryzyko choroby Hashimoto rosło u nich odpowiednio 32 i 21 razy, natomiast zagrożenie chorobą Gravesa-Basedowa było około 7-krotnie wyższe niż w populacji ogólnej [348]. Opierając się o zebrane przez nas dane, choroba Addisona wydaje się być podobnym jak w populacji niemieckiej czynnikiem ryzyka AITD u bliskich członków rodzin pacjentów.

Innymi stosunkowo częstymi schorzeniami autoimmunizacyjnymi w badanej grupie krewnych pacjentów z AAD była cukrzyca typu 1 oraz bielactwo, które występowały z częstością 3,5% każde. Częstość T1D w populacji ogólnej jest w dużej mierze uwarunkowana etnicznie, ze znacznymi różnicami geograficznymi [349]. W Polsce szacuje się ją na nieco poniżej 0,5% [350]. Częstość występowania bielactwa na świecie waha się między 0,4 a 2,0% [351]. Obie choroby występowały zatem znacząco częściej wśród badanych krewnych osób chorujących z powodu AAD. Nieco rzadziej stwierdzanymi chorobami było zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka z niedokrwistością złośliwą, reumatoidalne zapalenie stawów oraz choroba Addisona – każdą wcześniej z nich wykryto u 2,7% badanej przez nas grupy krewnych, podczas gdy w populacji ogólnej występują one u mniej niż 1% [297, 310, 352]. Zatem również w odniesieniu do tych rzadkich schorzeń, osoby z rodzin pacjentów z AAD wydają się populacją o zwiększonym ryzyku zachorowania. Dane z rejestrów szwedzkich i norweskich potwierdzają rodzinną kumulację autoimmunizacyjnej choroby Addisona, która dotyka 6,4-9,7% krewnych probandów [108,296].

Sześćcioro spośród badanych przez nas krewnych (5,3%) było obciążonych więcej niż jednym schorzeniem autoimmunizacyjnym, co tym bardziej dowodzi szczególnej rodzinnej predylekcji do autoimmunizacji. Należy także pamiętać, że informacje na temat chorobowości krewnych uzyskane na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej mogły nie być kompletne. Niektórzy uczestnicy badania zgłaszali, że w przeszłości podejrzewano u nich zaburzenie autoimmunizacyjne, które nie było jednak dalej diagnozowane. Zatem uzyskane przez nas dane, oparte jedynie na przypadkach potwierdzonych dokumentacją medyczną, mogą nie oddawać w pełnym stopniu kumulacji schorzeń autoimmunizacyjnych wśród krewnych pacjentów z AAD.

Choroby autoimmunizacyjne są wynikiem dysfunkcji układu odpornościowego, który ujawnia patologiczną reaktywność skierowaną przeciwko własnym antygenom ustroju [353]. W większości przypadków reakcje te wywołują zapalny naciek tkanek i narządów docelowych, prowadząc do ich stopniowego niszczenia i, w konsekwencji, upośledzonej funkcji. Autoimmunizacyjne choroby układu dokrewnego zazwyczaj rozwijają się miesiącami a nawet latami i, z wyjątkiem choroby Gravesa-Basedowa, powodują niewydolność zajętych gruczołów. W okresie przedklinicznym w surowicy krwi pojawiają się przeciwciała skierowane przeciw autoantygenom, będące wyrazem zaburzenia immunotolerancji i markerem toczącego się procesu autoimmunizacyjnego [121]. Krążące tkankowo swoiste autoprzeciwciała zwykle poprzedzają kliniczny początek chorób, takich jak T1D, AITD czy AAD [141, 354-358]. Prospektywne badania wśród predysponowanych populacji,

np. osób z wcześniej istniejącymi schorzeniami autoimmunizacyjnymi albo u krewnych dotkniętych nimi pacjentów, potwierdzają że autoprzeciwciała wykrywane w surowicy stanowią wiarygodne wskaźniki zagrożenia chorobami autoimmunizacyjnymi układu dokrewnego [141, 142, 354, 355, 357, 359]. Obecne badanie zostało zaprojektowane celem obiektywnej oceny częstości występowania autoprzeciwciał kierowanych swoiście przeciwko gruczołom wydzielania wewnętrznego u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD.

Analiza wykazała, iż wszystkie badane autoprzeciwciała poza aIA-2 okazały się istotnie częstsze u krewnych osób z AAD w porównaniu z grupą kontrolną. Wśród 143 badanych kontroli nie wykryto przeciwciał aIA-2 ani a21OH. Jednakże aIA-2 stwierdzono jedynie u 3 męskich krewnych, co było niewystarczającą liczbą dla uzyskania statystycznej istotności. aIA-2 stwierdza się u 44-86% pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1, częściej wśród dzieci i młodzieży [360-362]. Obserwuje się je u mniej niż 1% populacji ogólnej oraz u 1,5-5,6% krewnych pierwszego stopnia pacjentów z T1D [110, 361]. Według niektórych badań aIA-2 mogą stanowić przydatny wskaźnik szybszego postępu choroby u osób z grupy ryzyka cukrzycy [138, 360].

Przeciwciała przeciwko enzymowi steroidogenezy, 21-hydroksylazie, są wysoce swoiste dla autoimmunizacyjnej niedoczynności kory nadnerczy. Wykrywa się je u 72-87% chorych i praktycznie u wszystkich pacjentów z nowo zdiagnozowaną AAD [290, 296, 363, 364]. Ich częstość w populacji ogólnej jest znacznie poniżej 1% [364-366] i wzrasta do 1,4-3% u osób z innymi schorzeniami autoimmunizacyjnymi, szczególnie T1D i AITD [145, 367, 368]. Wyniki oznaczeń a21OH cechują się wysoką zgodnością z wynikami analiz przeciwciał przeciwko antygenom kory nadnerczy, ocenianymi z użyciem skrawków tkankowych w oparciu o technikę immunofluorescencji pośredniej, jednak badania z wykorzystaniem nowoczesnych, dostępnych komercyjnie testów są mniej kłopotliwe technicznie [145, 363, 364]. Jednocześnie a21OH są cennymi wykładnikami zagrożenia AAD, szczególnie u dzieci, choć progresja do klinicznie jawnej niewydolności kory nadnerczy może potrwać nawet kilka lat [145, 357-359, 367]. W analizowanej obecnie grupie, troje spośród siedmiorga a21OH-pozytywnych krewnych miało już rozpoznaną AAD, podczas gdy pozostała czwórka pozostawała bezobjawowa w momencie badania. Warto podkreślić, że poza jedną osobą wszyscy oni prezentowali również reakcję autoimmunizacyjną skierowaną przeciw antygenom tarczycowym, a dwoje z nich chorowało również na cukrzycę typu 1. Podjęta wiele lat temu analiza przeciwciał w surowicy krewnych z AAD wykazała zwiększoną częstość występowania przeciwciał przeciwko antygenom nadnerczowym u rodziców (11,1% vs. 4,2%) oraz rodzeństwa (3,0% vs. 1,4%)

pacjentów z APS typu 2 w porównaniu z grupą kontrolną, jakkolwiek stwierdzone różnice nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej [289]. Badanie to polegało na ocenie przeciwciał przeciwko frakcji mikrosomalnej kory nadnerczy, która umożliwiła wykrycie autoprzeciwciał jedynie u 58,6% osób z chorobą Addisona, zatem czułość tej metody była z pewnością niższa niż współcześnie stosowanych testów [289]. Trudno też porównywać dane w zakresie specyficzności stosowanych dawniej i obecnie metod.

Krążące przeciwciała przeciwarczycowe, aTPO i aTg, były najczęstszym znaleziskiem serologicznym wśród krewnych pacjentów z AAD w naszym badaniu, także występując wspólnie. Przeciwciała te, charakterystyczne dla AITD, są wykrywalne zarówno w chorobie Hashimoto (aTPO w ponad 90% przypadków, a aTg u około 70%), jak i w chorobie Gravesa-Basedowa (aTPO nawet u 60% chorych, natomiast aTg u około 40%) [52]. Ich częstość w populacjach bez deficytu jodu waha się pomiędzy 5 a 18%, z tendencją wzrostową u starszych kobiet [30]. aTPO i aTg są dość często stwierdzane u osób cierpiących z powodu innych schorzeń autoimmunizacyjnych układu dokrewnego, jak T1D i AAD [290, 291, 369]. Ponadto ze zwiększoną częstotliwością wykazuje się ich obecność u pacjentów z autoimmunizacją układową, np. RZS, czy SLE, które nierzadko współistnieją z AITD [370]. Oba przeciwciała przeciwarczycowe są czułymi markerami AITD, szczególnie choroby Hashimoto, nawet w jej stadiach przedklinicznych. Prospektywna analiza niemal 2500 krewnych pierwszego stopnia pacjentów z T1D dowiodła, że całkowite ryzyko rozwoju przeciwciał aTPO przed 20. rokiem życia przekracza u nich 10% [105].

W naszym badaniu aTPO były jedynymi autoprzeciwciałami, które wykazały statystyczną różnicę w występowaniu u obu płci, z ponad dwukrotną przewagą płci żeńskiej. Obserwacja ta pozostaje w zgodności z istotnie wyższą częstością AITD u kobiet, którą potwierdza się we wszystkich populacjach [327, 347, 349]. Uwarunkowanych płcią różnic nie wykazaliśmy natomiast względem aGAD i aZnT8, przeciwciał swoistych dla komórek beta wysp trzustkowych. Jakkolwiek oba przeciwciała również występują istotnie częściej u krewnych osób z AAD (odpowiednio u 8,0% i 7,1% członków rodzin), niż u kontroli (odpowiednio u 1,4% i 0,7% badanych). Według wcześniejszych badań aGAD stwierdza się u 67-84% chorych z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 oraz u 1-4% populacji ogólnej [371-374]. Zwraca także uwagę fakt, że aGAD wykrywane są w surowicy 54-63% rodzeństwa dzieci z T1D, a ich wysokie miana, podobnie jak młodszy wiek oraz predysponujące genotypy HLA klasy II, wskazują na wysokie ryzyko rozwoju kolejnych przeciwciał typowych dla T1D, co stanowi zastępczy wykładnik progresji choroby [375, 376]. Z kolei częstość

występowania aGAD w przebiegu AITD ocenia się na 2,0-6,0% w chorobie Hashimoto oraz 7,2-12,0% w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa [368, 374, 377, 378]. Wcześniejsze badanie w grupie pacjentów z AAD pozostających pod opieką Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UMP wykazało obecność aGAD u 20% chorych [378]. Podobną ich częstość, a tym samym zwiększone ryzyko T1D, opisywano wśród pacjentów z autoimmunizacyjną niedoczynnością kory nadnerczy pochodzących z Norwegii i Włoch [290, 296]. Choć stwierdzone rzadziej niż aGAD, ZnT8 również okazały się częstym znaleziskiem u osób z AAD – stwierdzano je u 8,5% chorych [114]. Przeciwciała te wykrywa się u 60-80% pacjentów z nowym rozpoznaniem T1D, natomiast u mniej niż 2% zdrowych kontroli [113]. Ponadto aZnT8 uważane są za przydatne narzędzie predykcyjne cukrzycy w odniesieniu do krewnych pierwszego stopnia pacjentów z T1D [379, 380]. Podsumowując, stosunkowo wysoka częstość występowania autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom komórek beta u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD sugeruje zwiększone ryzyko rozwoju T1D w tej populacji, jakkolwiek brak jest dotąd badań prospektywnych, które mogłyby je potwierdzić. Intrygująco, aZnT8 w naszej analizie były zazwyczaj stwierdzane w kombinacji z różnymi autoprzeciwciałami. Podobne obserwacje dotyczyły wykrywania aZnT8 u pacjentów z AAD, u których przeciwciała te stwierdzano tylko razem z innymi autoprzeciwciałami [114]. Ponadto, istnieją dane wskazujące, że wykazanie aZnT8 u dorosłych z nowo rozpoznaną cukrzycą o podłożu autoimmunizacyjnym, wiąże się z obecnością oraz wyższymi mianami aTPO, czyli może stanowić pośredni wskaźnik ryzyka współistnienia AITD [373]. Dlatego, choć aZnT8 są swoistym markerem reakcji autoimmunizacyjnej skierowanej przeciwko komórkom beta wysp trzustkowych, wydają się również wskazywać na zwiększone zagrożenie schorzeniami wielogruzołowymi, które zagrażają pacjentom z autoimmunizacją. Rzeczywiście, dwa i więcej autoprzeciwciał stwierdziliśmy w surowicy niemal jednej piątej (18,6%) członków rodzin osób z chorobą Addisona. Poza klasyczną kombinacją aTPO i aTg, typową dla AITD, rzadziej występujące a21OH oraz aZnT8 również często współistniały z innymi autoprzeciwciałami. Obecność wielu autoprzeciwciał stanowi kolejny dowód szczególnej skłonności do autoimmunizacji u krewnych pierwszego stopnia pacjentów cierpiących na AAD.

Intrygujące nowe spostrzeżenie z naszych danych polega na wykazaniu znacznie zwiększonej częstości występowania autoprzeciwciał u krewnych mężczyzn z chorobą Addisona niż w rodzinach chorych kobiet oraz u krewnych pacjentów z AAD występującym w ramach autoimmunizacji wielogruzołowej w porównaniu z członkami rodzin osób z izolowaną AAD.

Obserwacje te wydają się dowodzić znaczenia czynników dziedzicznych w podatności do rozwoju autoimmunizacji. Choć AAD, podobnie jak większość schorzeń autoimmunizacyjnych, występuje częściej wśród kobiet, mężczyźni prezentują znacznie wcześniejszy wiek początku choroby [290, 291, 299, 305, 381]. Schorzenia uwarunkowane monogenowo, jak np. APS typu 1, zazwyczaj ujawniają się w znacznie wcześniejszym wieku niż choroby o złożonej etiologii. Cecha ta może sugerować zatem większy wpływ czynników genetycznych na rozwój choroby u mężczyzn, niż u kobiet, które np. poprzez wahania hormonalne, mogą z kolei w większym stopniu podlegać czynnikom środowiskowym. Co ciekawe, analogiczne obserwacje dotyczą przekazywania T1D w rodzinach – większe ryzyko choroby stwierdzono u dzieci chorych mężczyzn, niż chorych kobiet [382]. Podobnie przypadki autoimmunizacji wielogruzołowej mogą być wywołane specyficzną kombinacją genetycznie uwarunkowanych drobnych zaburzeń immunologicznych, które w połączeniu z nierozpoznanymi dotąd czynnikami spustowymi ze środowiska, przyczyniają się do patologicznej reaktywności układu odpornościowego. Co istotne, liczba autooprzeciwciał w surowicy krewnych była pozytywnie skorelowana z liczbą schorzeń autoimmunizacyjnych u probanda, co dostarcza kolejnego argumentu przemawiającego za silną genetyczną skłonnością do zaburzeń czynności układu immunologicznego, przekazywaną w obrębie rodziny.

Wyniki obecnego badania wskazują na konieczność dalszych badań patomechanizmów immunogenetycznych leżących u podstaw autoimmunizacji w układzie dokrewnym. Nasza analiza nie jest jednak wolna od ograniczeń, a jej główną słabość stanowi liczba przebadanych krewnych. Szczególnie dotyczy to niewielkiej liczby zrekrutowanych rodziców pacjentów z AD, która miała umożliwić przeprowadzenie porównań z innymi członkami rodzin. Średni wiek probandów w chwili badania wynosił $52,7 \pm 13,9$ lat (zakres 24-78). Wielu rodziców pacjentów już nie żyło lub zamieszkiwało w dużej odległości, a osoby starsze mogły nie godzić się na udział w badaniu ze względów zdrowotnych. Jakkolwiek szczególną siłą obecnej analizy jest bardzo dobrze udokumentowane indywidualne dane jego uczestników, co znacząco zmniejsza ryzyko błędów klasyfikacyjnych, które stanowią zagrożenie np. w dużych badaniach opartych o narodowe rejestry różnych schorzeń. Niestety, właśnie z powodu braku takich rejestrów, nie ma też pełnych danych epidemiologicznych dotyczących występowania autoimmunizacyjnych chorób układu dokrewnego w Polsce. Dlatego częstość występowania autooprzeciwciał w surowicy badanych krewnych zmuszeni byliśmy porównać z dobraną wiekiem i płcią grupą kontrolną rekrutowaną spośród podopiecznych

praktyki lekarza rodzinnego, którzy odwiedzali swojego lekarza z różnych powodów, obejmujących zarówno choroby jak i profilaktykę.

Pomimo niedoskonałości obecne badanie daje istotny wgląd w rodzinne obciążenie autoimmunizacją u krewnych osób z AAD, nawet w przypadkach skąpoobjawowych. Jest to pierwsza systematyczna analiza tego typu, przeprowadzona w oparciu o współczesne, wystandaryzowane metody analityczne. Jej wyniki wskazują na istotnie zwiększone ryzyko autoimmunizacji w zakresie układu dokrewnego, zwłaszcza zagrożenie rozwojem AITD, u krewnych pierwszego stopnia, szczególnie płci żeńskiej, pacjentów z AAD. Członkowie rodzin chorych mężczyzn, jak i osób z autoimmunizacją wielogruzołową są szczególnie narażeni na rozwój swoistych narządowo autoprzeciwciał. Dlatego u tych osób wskazane byłyby badania przesiewowe w kierunku pojawiania się tych przeciwciał, a po ich stwierdzeniu – obserwacja względem występowania objawów odpowiednich chorób układu dokrewnego. Może to mieć bardzo istotne znaczenie w odniesieniu do schorzeń, których początek wiąże się często ze znacznymi zaburzeniami metabolicznymi, mogącymi nawet zagrażać życiu, takimi jak kwasica ketonowa przebiegu w T1D, czy przetłom nadnerczowy w AAD.

5.2.2 Polimorfizmy genów *PTPN22* oraz *CTLA4* a wyniki oznaczeń autoprzeciwciał w surowicy krewnych pacjentów z AAD

Poza niezwykle rzadkimi zespołami uwarunkowanymi jednogenowo, jak APS typu 1 czy IPEX, autoimmunizacyjna choroba Addisona jest obecnie uznawana za tzw. schorzenie złożone (ang. *complex disease*), którego etiologia obejmuje wieloskładową genetyczną skłonność do rozwoju choroby oraz nakładające się nieznane czynniki spustowe ze środowiska [381]. Obserwowany od dawna wysoki stopień zgodności wśród bliźniąt monozygotycznych dotkniętych tą chorobą potwierdza rolę genetyki w jej patomechanizmie [302, 383]. Dotąd opisano związek wariantów kilkunastu genów z występowaniem choroby Addisona. Należą tu przede wszystkim allele układu HLA klasy II, głównie DR3(DRB1*03)-DQ2(DQA1*0501-DQB1*0201) oraz DR4(DRB1*04)-DQ8(DQA1*03-DQB1*0302), szczególnie występujące w kombinacji heterozygotycznej (DR3-DQ2/DR4-DQ8), spotykanej u 49-67% chorych oraz u około 1% zdrowej populacji [304, 357]. Czynnikiem ryzyka choroby Addisona okazał się być również allel A*5.1 genu MIC-A [203, 384]. Z uwagi na rzadkie występowanie AAD [120, 121], nie było dotąd możliwe przeprowadzenie wiarygodnej analizy o typie badania asocjacyjnego całego genomu (ang. *Genome-Wide Association*

Study, GWAS). Zebranie tysiąca i więcej próbek od pacjentów pochodzących z jednej populacji jest praktycznie niemożliwe, natomiast materiał genetyczny uzyskany od pacjentów z kilku różnych populacji europejskich charakteryzował się zbyt dużą heterogennością, aby można było dokonać rzetelnych analiz statystycznych [129]. Z kolei poszukiwania genów kandydatów, czynnościowo związanych z działaniem układu immunologicznego, umożliwiły ustalenie związku choroby Addisona z polimorfizmami genów takich jak *CLEC16A*, *CYP27B1*, *FCRL3*, *PTPN22*, *NLRP1*, *PDL1*, *CTLA4*, *STAT4* oraz *BACH2* [129, 131, 381]. Choć allele podatności są stosunkowo rzadkie w populacji, tzw. współczynnik odziedziczalności szacowany dla AAD wynosi 0,97 (95% CI 0,88–0,99), wskazując na znaczenie czynników genetycznych w występowaniu tej choroby [302]. Odziedziczalność (ang. *heritability*) pozwala określić udział zmienności genetycznej w całkowitej zmienności fenotypowej w populacji [385]. Współczynnik odziedziczalności w innych autoimmunizacyjnych schorzeniach układu dokrewnego jest nieco niższy i waha się od 0,73–0,79 dla AITD do 0,72–0,88 dla T1D [31, 386–388].

Część polimorfizmów genetycznych, które sprzyjają rozwojowi autoimmunizacji jest wspólna dla większej liczby schorzeń o tej etiologii. Przykładowo allele klasy II HLA, MIC-A5.1, jak również polimorfizmy genów *PTPN22*, *CTLA4* czy *BACH2* wykazują związek z występowaniem zarówno AAD, jak i AITD czy T1D [131,385]. Jednocześnie u osób z chorobami autoimmunizacyjnymi zaznacza się tendencja do współwystępowania dwóch czy nawet większej liczby zaburzeń tej grupy, co znalazło odzwierciedlenie w klasyfikacji APS. Koincydencja kilku schorzeń jest tradycyjnie uznawana za czynnik utrudniający badania asocjacyjne, ponieważ domieszka w grupie osób badanych, pacjentów z dodatkową chorobą autoimmunizacyjną może teoretycznie być przyczyną wyników fałszywie pozytywnych, jeśli związek z danym polimorfizmem będzie w rzeczywistości dotyczył tej drugiej choroby. Dlatego w wielu badaniach kładziono nacisk na skuteczne oddzielenie możliwego wpływu innych schorzeń poprzez uważną selekcję analizowanych próbek [123]. Tymczasem, jeśli wziąć pod uwagę, że te same warianty genetyczne mogą predysponować do różnych schorzeń autoimmunizacyjnych, być może ich tło molekularne jest w dużej mierze wspólne, podczas gdy np. o tkance docelowej patologicznej reakcji układu odpornościowego decydują inne dodatkowe czynniki genetyczne, albo wpływy środowiskowe. Można by zatem rozpatrywać tę grupę chorób łącznie, czego dowodzą badania w zakresie APS (z wyłączeniem APS typu 1). Większość genetycznej skłonności do rozwoju autoimmunizacji wielogruzołowej wydaje się być związana z allelami HLA klasy II, które są tożsame z tymi, predysponującymi do cukrzycy typu 1 [389,390]. Natomiast

polimorfizmy genów *PTPN22* i *CTLA4* zostały wręcz zaproponowane jako narzędzia wspomagające przewidywanie rozwoju autoimmunizacji wielogruzołowej u osób z rozpoznanymi pojedynczymi schorzeniami autoimmunizacyjnymi i u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z APS [49].

Wobec powyższego uznaliśmy, że warto przeanalizować związek potwierdzonych genetycznych czynników ryzyka AAD, AITD i T1D, jakimi są polimorfizmy genów *PTPN22* oraz *CTLA4*, z występowaniem autooprzeciwciał swoistych dla kory nadnerczy, tarczycy i komórek beta wysp trzustkowych w surowicy krewnych pierwszego stopnia pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona. Do badania wybraliśmy warianty rs2476601 genu *PTPN22* oraz rs231775 genu *CTLA4*. Pierwszy z nich wykazywał asocjację z AAD w populacji brytyjskiej, norweskiej, a także polskiej [18, 234, 236]. Polimorfizm ten stanowi również czynnik ryzyka autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, w obu jej postaciach klinicznych [228-230, 234,]. Ponadto allel ryzyka T rs2476601 był stwierdzany z istotnie większą częstością wśród pacjentów z cukrzycą typu 1 pochodzących z różnych populacji, w tym polskiej [218-223]. Locus *PTPN22* jest związane nie tylko z występowaniem cukrzycy, ale też ze zwiększonym ryzykiem pojawiania się kolejnych/licznych autooprzeciwciał przeciwko antygenom komórek beta, a zatem z postępem autoimmunizacji [224, 391].

W naszej analizie rozkład genotypów i alleli polimorfizmu rs2476601 genu *PTPN22* różnił się istotnie pomiędzy grupą krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD oraz grupą kontrolną osób zdrowych. Allel ryzyka autoimmunizacji T był statystycznie istotnie częstszy w grupie krewnych, niż u zdrowych kontroli, pośrednio sugerując że grupa ta jest również w większym stopniu zagrożona rozwojem schorzeń autoimmunizacyjnych. Rzeczywiście, nosicielstwo allelu T wariantu rs2476601 genu *PTPN22* okazało się istotnym statystycznie czynnikiem ryzyka występowania przeciwciał kierowanych przeciwko 21-hydroksylazie, tyreoperoksydazie, tyreoglobulinie oraz transporterowi cynkowemu 8. Nie udało się natomiast wykazać związku badanego polimorfizmu *PTPN22* z występowaniem autooprzeciwciał aGAD ani aIA-2. Ponadto, obecność allelu T wiązała się z czterokrotnym zwiększeniem prawdopodobieństwa wystąpienia jakichkolwiek autooprzeciwciał w surowicy porównaniu z homozygotami typu dzikiego (OR 3,96; 95% CI 1,744-9,000; p=0,0008). Z kolei wśród krewnych z dodatnimi autooprzeciwciałami, stwierdzenie obecności allelu T rs2476601 było znaczącym czynnikiem ich obecności w większej liczbie (OR 10,40; 2,893-37,39; p=0,0002), czyli sprzyjało także autoimmunizacji wielogruzołowej.

Dotychczasowe analizy związku polimorfizmu *PTPN22* z występowaniem specyficznych autooprzeciwciał dotyczyły przede wszystkim pacjentów z cukrzycą typu 1. Związek ten był

wielokrotnie potwierdzany i według badania niemal tysiąca rodzin pochodzących z Francji, Danii i USA, nie jest uzależniony od obecności autoprzeciwciał skierowanych przeciwko innym gruczołom, czy współwystępowania dodatkowych schorzeń autoimmunizacyjnych, choć częstość allelu T była istotnie wyższa u pacjentów z wywiadem rodzinnym obciążonym schorzeniami autoimmunizacyjnymi [392]. W dużej, liczącej ponad 6000 osób, wieloetnicznej grupie chorych z T1D wykazano natomiast związek rs2476601 z obecnością w surowicy aTPO oraz a21OH, a także przeciwciał przeciwko komórkom okładzinowym żołądka [393]. Co ciekawe, allel T okazał się mieć znaczenie ochronne względem występowania aIA-2, nie wykazał związku z aGAD, natomiast aZnT8 i aTg nie były w tym badaniu oceniane [393]. Wśród pacjentów z T1D pochodzących z Danii, wariant *PTPN22* był istotnie związany z występowaniem aGAD, szczególnie u pacjentów z długotrwałą cukrzycą, natomiast asocjacja tego locus z aIA-2 była marginalna [392]. Podobnie w dużej kohorcie dzieci i młodych chorych szwedzkich, u których związek rs2476601 z występowaniem T1D był statystycznie istotniejszy wśród osób z dodatnimi aGAD w porównaniu z grupą chorych bez tych przeciwciał, choć siła tej asocjacji słabła wraz ze wzrostem ryzyka cukrzycy wynikającym z obecności sprzyjających alleli HLA [394]. Analogiczne badanie w odniesieniu do aIA-2 nie wykazywało takiej zależności, choć dane dotyczące tych przeciwciał nie były pełne, a zatem badana grupa – mniej liczna [394]. Związek pomiędzy allelem T polimorfizmu *PTPN22* a wysokimi mianami aGAD w nowo rozpoznanej cukrzycy potwierdzono też wśród włoskich dorosłych, natomiast nie wykazano go wśród pediatrycznych pacjentów w populacji niemieckiej, jakkolwiek badanie to było stosunkowo mało liczebne [395, 396]. Przeciwnie, duże badanie brytyjskie oparte o banki próbek od pacjentów z T1D nie potwierdziło związku polimorfizmu *PTPN22* z występowaniem przeciwciał aGAD [397].

Z kolei w fińskiej grupie osób zdrowych ocenianych prospektywnie pod względem ryzyka rozwoju cukrzycy stwierdzono związek pomiędzy rs2476601 a pojawianiem się aGAD w surowicy, szczególnie u osób z wywiadem rodzinnym obciążonym T1D [398]. Wśród brazylijskich nosicieli allelu ryzyka T, zarówno osób z T1D jak i zdrowych, potwierdzono wyższą częstość aGAD, podczas gdy nie udało się wykazać takiej zależności dla innych przeciwciał skierowanych przeciwko autoantygenom komórek beta, ani 21-hydroksylazie [399]. W przeciwieństwie do aGAD, odkryte stosunkowo niedawno aZnT8 nie były na razie obiektem tak dużej liczby badań. W niewielkiej analizie z wieloetnicznej populacji brazylijskiej wykazano ich związek z polimorfizmem *PTPN22* zarówno u chorych z T1D jak i u krewnych pierwszego stopnia [400]. Wcześniejsze badanie w dużej grupie brytyjskiej oraz

w mniejszej grupie chorych niemieckich nie potwierdziło związku *PTPN22* z autoimmunizacją tarczycową [275, 396]. Natomiast wg nowszych danych brytyjskich, wariant *PTPN22* ma istotny związek z występowaniem aTPO u pacjentów cierpiących z powodu T1D [397]. Z kolei analiza brazylijska, obejmująca w zdecydowanej większości osoby pochodzenia europejskiego, wykazała związek rs2476601 z występowaniem aTg [399]. Polimorfizm genu *PTPN22* nie był dotąd oceniany pod względem związku z występowaniem autoprzeciwciał wśród pacjentów z chorobą Addisona, ani tym bardziej u ich krewnych.

Wyniki naszej analizy różnią się od cytowanych powyżej danych przede wszystkim z powodu braku związku między występowaniem aGAD a polimorfizmem rs2476641 genu *PTPN22* w badanej przez nas grupie. Większość dotychczasowych analiz potwierdziła tę relację, jakkolwiek ocenie podlegali przede wszystkim pacjenci z T1D, u których te autoprzeciwciała są bardzo częstym znaleziskiem [392, 394, 395]. Nie można wykluczyć, iż brak istotnego statystycznie związku rs2476601 z występowaniem przeciwciał aGAD oraz aIA-2 w naszej grupie krewnych wynikał po prostu z jej niewielkiej liczebności, która okazała się niewystarczająca dla wykazania istotnej statystycznie asocjacji. Szczególnie pojedyncze wykryte przypadki nosicielstwa aIA-2 nie były dość liczne dla w pełni wiarygodnych analiz. W grupie badanych krewnych polimorfizm *PTPN22* okazał się jednak istotnym czynnikiem ryzyka występowania przeciwciał skierowanych przeciwko 21-hydroksylazie, tyreoperoksydazie, tyreoglobulinie oraz transporterowi cynkowemu 8. Jest to pierwsza obserwacja tego typu, wskazująca na znaczenie wariantu rs2476601 genu *PTPN22* dla przekazywanej dziedzicznie skłonności do autoimmunizacji dotyczącej układu dokrewnego. Jego rolę dodatkowo potwierdza wykazanie związku allelu ryzyka autoimmunizacji T z występowaniem większej liczby autoprzeciwciał u danej osoby. Dlatego polimorfizm ten może mieć potencjalne znaczenie prognostyczne w ocenie ryzyka autoimmunizacji w rodzinach osób z AAD.

Drugim polimorfizmem ocenianym pod kątem związku z występowaniem autoprzeciwciał w surowicy krewnych pacjentów z chorobą Addisona był rs231775 w genie *CTLA4*. Wariant ten polega na zamianie adeniny w guaninę w pozycji 49, w eksonie 1 (A49G) genu. Został wybrany do analizy u krewnych ponieważ w kilku populacjach europejskich potwierdzono jego związek z chorobą Addisona [277-279]. Wariant ten wiąże się też ze zwiększonym ryzykiem rozwoju T1D [250-252]. W populacji japońskiej chorych wykazano jego związek z obecnością przeciwciał aIA-2 i wyższymi mianami aGAD [251, 401]. Z kolei wyniki belgijskie, a więc z populacji europejskiej, nie potwierdziły zależności między genotypami rs231775 a występowaniem aGAD czy aIA-2 [402].

Istnieje także stosunkowo dużo danych literaturowych na poparcie asocjacji rs231775 z występowaniem AITD, zwłaszcza choroby Gravesa-Basedowa [256-258, 261, 403]. Warianty *CTLA4* mogą wiązać się z syntezą autoprzeciwciał przeciw receptorowi dla TSH, jak również z klinicznym przebiegiem choroby, w postaci zwiększonego ryzyka orbitopatii tarczycowej czy większej szansy remisji [257, 261, 304]. Niewielkie badanie w polskiej grupie dzieci z chorobą Hashimoto oraz chorobą Gravesa-Basedowa wykazało istotny związek allelu ryzyka G polimorfizmu rs231775 z wyższymi stężeniami krążących autoprzeciwciał aTPO oraz aTg [261]. Podobne wyniki uzyskano dla choroby Hashimoto oraz jej odmiany, jaką jest poporodowe zapalenie tarczycy analizując inny wariant *CTLA4*, rs3087243 (CT60) w populacji słoweńskiej [272]. Z kolei dane z dużych kohort pacjentów obciążonych T1D, którzy wykazują naturalną predyspozycję do rozwoju AITD, są sprzeczne w zakresie związku pomiędzy obecnością aTPO a polimorfizmem *CTLA4* [237, 396]. Warianty molekularne *CTLA4* wiąże się również z ryzykiem autoimmunizacji wielogruzołowej [273, 274, 276]. Nie wykazano jednak wpływu rs231775 na stężenia krążących a21OH u pacjentów z AAD [278]. Podobnie w naszym badaniu, choć zmutowany allel G rs231775, wiązany z wyższym ryzykiem schorzeń autoimmunizacyjnych, występował istotnie częściej u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD niż w grupie kontrolnej, nie udało się stwierdzić jego związku z występowaniem któregośkolwiek z analizowanych autoprzeciwciał. Być może powodem jest tu stosunkowo mała grupa badana, albo fakt, że prawdziwym wariantem przyczynowym, który odpowiada za skłonność do reakcji autoimmunologicznych jest inny polimorfizm w tym locus, jak np. rs3087243 w regionie promotorowym *CTLA4* czy mikrosatelitarny polimorfizm (AT)_n w nieulegającym translacji regionie 3'UTR eksonu 4 [245]. *CTLA4* lokalizuje się na ramieniu długim chromosomu 2 (2q33.2), w regionie obejmującym przynajmniej trzy geny o znaczeniu dla czynności układu odpornościowego: CD28 i *CTLA4* oraz ICOS (ang. *Inducible CO-Stimulator*). Wszystkie z nich należą do rodziny receptorów powierzchniowych, zaangażowanych w stymulację limfocytów T. Z tego względu część badań asocjacyjnych dotyczących autoimmunizacji obejmowała cały region, z oceną licznych zawartych tam polimorfizmów, jakkolwiek próby zawężenia tego obszaru zazwyczaj wskazywały jednak na warianty *CTLA4* jako najsilniej związane ze schorzeniami układu dokrewnego [257, 404, 405]. Ponieważ wszystkie powyższe polimorfizmy lokalizują się stosunkowo blisko siebie, rzadko dochodzi między nimi do rekombinacji, a zatem allele dziedziczą się wspólnie i w populacji występują razem częściej, niż można by oczekiwać w warunkach ich niezależnej segregacji [406]. Wobec tego zjawiska, zwanego nierównowagą sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*), często trudno jednoznacznie wskazać wariant bezpośrednio przyczynowo związany z występowaniem schorzenia.

Konieczne są często badania funkcjonalne, zazwyczaj oparte na doświadczeniach *in vitro*, które mają wykazać znaczenie danej jednonukleotydowej zmiany w sekwencji DNA np. dla poziomu ekspresji, albo czynności badanego białka. Predyspozycją genetyczną do autoimmunizacji wynikającą z polimorfizmu rs231775 genu *CTLA4* powinna z pewnością być przedmiotem dalszych analiz tego typu.

W podsumowaniu tej części badań należy podkreślić silny związek polimorfizmu rs2476601 genu *PTPN22* z występowaniem autoprzeciwciał u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona. Badania molekularne oceniające obecność tego wariantu mogłyby stanowić element panelu przesiewowego dla członków rodzin osób z chorobami autoimmunizacyjnymi układu dokrewnego, szczególnie krewnych pacjentów płci męskiej oraz chorych z APS. Należy pamiętać, że obecność polimorficznych wariantów genów stanowi jedynie o zwiększonej podatności dla rozwoju choroby, a stwierdzenie autoprzeciwciał w surowicy, choć świadczy o toczącym się procesie autoimmunizacyjnym, również nie przesądza jeszcze o chorobie. Jednak większa liczba stwierdzonych wariantów genetycznych sprzyjających autoimmunizacji, a tym bardziej wykrycie obecności kilku autoprzeciwciał skierowanych przeciwko danemu gruczołowi, stanowią wykładniki bardzo znacznego ryzyka zachorowania, nawet w niedalekiej przyszłości, ponieważ świadczą o dużej intensywności procesu autoimmunizacyjnego. W ten sposób możliwa byłaby wczesna identyfikacja osób obarczonych szczególnym ryzykiem tej grupy schorzeń. W przyszłości, wraz z postępem wiedzy na temat patomechanizmów indukujących reakcje autoimmunizacji, można by wykorzystać te dane do działań prewencyjnych, zapobiegających rozwojowi objawów choroby, już na jej etapach przedklinicznych.

6.0 WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Wskazane jest aktywne poszukiwanie (ukierunkowany wywiad wsparty ankietą) wśród członków rodzin pacjentów z AAD chorób autoimmunizacyjnych, a przede wszystkim autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, szczególnie wśród krewnych pierwszego stopnia płci żeńskiej.
2. Celowym jest objęcie krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD przesiewowymi oznaczeniami autoprzeciwciał zwłaszcza, gdy proband jest obciążony dodatkowymi chorobami autoimmunizacyjnymi i/lub jest mężczyzną, gdyż wtedy ryzyko autoimmunizacji skierowanej przeciwko antygenom kory nadnerczy, tarczycy lub komórek beta wysp trzustkowych jest szczególnie zwiększone.
3. W rodzinnym występowaniu chorób autoimmunizacyjnych ma znaczenie predyspozycja genetyczna, na co wskazuje częstsze występowanie alleli ryzyka polimorfizmów rs2476601 genu *PTPN22* i rs231775 genu *CTLA4* wśród krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD, niż w populacji ogólnej.
4. Polimorfizm rs2476601 genu *PTPN22* może mieć znaczenie prognostyczne w ocenie ryzyka autoimmunizacji w rodzinach osób z AAD, gdyż okazuje się istotnie związany z występowaniem w surowicy krewnych pierwszego stopnia autoprzeciwciał przeciwko 21-hydroksylazie, tyreoperoksydazie, tyreoglobulinie oraz transporterowi cynkowemu 8.
5. Predyspozycja genetyczna do autoimmunizacji w zakresie układu dokrewnego, wynikająca z polimorfizmu rs231775 genu *CTLA4* powinna być przedmiotem dalszych analiz funkcjonalnych, gdyż nie wykazuje związku z obecnością autoprzeciwciał przeciw antygenom kory nadnerczy, tarczycy lub komórek beta wysp trzustkowych.

7.0 STRESZCZENIE

U pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona (AAD) obserwowana jest tendencja do współwystępowania różnych schorzeń autoimmunizacyjnych. Przeprowadzone wśród rodzin osób z chorobą Gravesa-Basedowa (GD), cukrzycą typu 1 (T1D) i bielactwem analizy epidemiologiczne wykazały natomiast zwiększoną częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych u ich krewnych. Według dostępnych danych, jedyna analiza częstości występowania narządowo-swoistych przeciwciał w rodzinach chorych z AAD przeprowadzona została ponad pół wieku temu, z wykorzystaniem ówczasie dostępnych metod diagnostycznych. Dlatego też, celem niniejszego projektu była wszechstronna ocena tego problemu i uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy również krewni chorych z AAD mają zwiększone ryzyko rozwoju autoimmunizacji. Cel ten realizowany był w kilkustopniowym projekcie badawczym, obejmującym badanie ankietowe dotyczące występowania chorób autoimmunizacyjnych u krewnych chorych z AAD oraz ocenę biochemicznych i genetycznych markerów ryzyka autoimmunizacji u krewnych pierwszego stopnia osób z AAD.

Dedykowana ankieta badawcza przeprowadzona została u 106 chorych z AAD i dotyczyła występowania 23 głównych schorzeń autoimmunizacyjnych u krewnych, co pozwoliło na ogólną ocenę rozpowszechnienia tych chorób w ich rodzinach. Następnie, u 113 krewnych pierwszego stopnia chorych z AAD (9 rodziców, 44 rodzeństwa i 60 dzieci z 51 rodzin) dokonywana była ocena występowania w surowicy swoistych przeciwciał przeciwko 21-hydroksylazie (α 21OH), tyreoperoksydazie (α TPO), tyreoglobulinie (α Tg), dekarboksylazie kwasu glutaminowego (α GAD), fosfatazie tyrozynowej (α I_A-2) oraz transporterowi cynkowemu 8 (α ZnT8) z wykorzystaniem metody radioimmunologicznej (RIA) oraz immunoenzymatycznej (ELISA). Uzyskane wyniki porównywano z grupą kontrolną 143 ochotników dobranych płcią i wiekiem względem grupy krewnych pacjentów z AAD. W kolejnym etapie przeprowadzona została analiza częstości występowania jednonukleotydowych polimorfizmów genów o potwierdzonym związku z autoimmunizacją - *PTPN22* (rs2476601) oraz *CTLA4* (rs231775). Ocena ta, wykonana za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym, z użyciem swoistych sond TaqMan[®], objęła grupę 112 krewnych pierwszego stopnia chorych z AAD oraz grupę kontrolną 393 zdrowych osób. W końcowym etapie, oceniano asocjację pomiędzy występowaniem badanych polimorfizmów a obecnością swoistych przeciwciał w surowicy krewnych. Protokół badania zaakceptowany został przez Komisję Bioetyczną

Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą zgodę na udział w projekcie.

U większości (84%) z ankietowanych chorych z AAD stwierdzono występowanie autoimmunizacyjnego zespołu poligruczołowego typu 2 lub 4, tzn. współwystępowanie co najmniej dwóch schorzeń autoimmunizacyjnych. Najczęściej obserwowaną kombinacją schorzeń była AAD wraz z chorobą Hashimoto (HT) (39,4%) lub GD (13,2%), a u części chorych występowały dodatkowe też choroby autoimmunizacyjne, np. zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka z niedokrwistością złośliwą, T1D, bielactwo, przedwczesna niewydolność jajników. W przeprowadzonym badaniu ankietowym 78 (73,6%) pacjentów potwierdziło obecność schorzeń autoimmunizacyjnych w swoich rodzinach. Ankietowani wskazali łącznie 201 krewnych z co najmniej jedną chorobą autoimmunizacyjną, choć w niektórych rodzinach stwierdzano nawet do 6-7 chorych krewnych. Łącznie, w badaniu ankietowym zidentyfikowano 235 przypadki chorób autoimmunizacyjnych, obejmujące 94 osoby z HT, 23 osoby z GD, 23 z bielactwem, 21 z T1D, 14 z łuszczycą, 10 z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) oraz 8 ze stwardnieniem rozsianym. AAD oraz przedwczesne niewydolność jajników odnotowane zostały u 7 krewnych każde. Schorzenia autoimmunizacyjne występowały częściej u kobiet niż mężczyzn, szczególnie w pierwszej linii pokrewieństwa, tzn. u matek i sióstr probandów.

Druga część projektu objęła grupę 113 krewnych pierwszego stopnia chorych z AAD, u których zebrany został szczegółowy wywiad medyczny oraz przeprowadzone zostało badanie przedmiotowe. W grupie tej odnotowano występowanie chorób autoimmunizacyjnych u 43 (38,1%) krewnych, włączając 6 krewnych z więcej niż jednym schorzeniem. HT rozpoznana została u 20,3%, GD u 8%, bielactwo i T1D u 3,5% krewnych a AAD, RZS oraz zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka z niedokrwistością złośliwą u 2,7% krewnych każde. Odnotowano także pojedyncze przypadki innych chorób autoimmunizacyjnych. Od badanej grupy osób pobrano próbki krwi w celu przeprowadzenia dalszych ocen serologicznych i genetycznych. Jak wykazały analizy, wszystkie badane przeciwciała, za wyjątkiem aIA-2 ($p=0,085$), występowały znacząco częściej w grupie krewnych chorych z AAD w porównaniu z grupą kontrolną ($p<0,05$). Przeciwciała a21OH wykryte zostały u 6,2%, aTPO u 28,3%, aTg u 19,%, aGAD u 8,0%, a ZnT8 u 7,1% krewnych pierwszego stopnia chorych z AAD. Obecność dwóch lub więcej przeciwciał stwierdzona została u 18,6% krewnych. Nie wykazano znamienych różnic w częstości występowania przeciwciał pomiędzy rodzeństwem a dziećmi pacjentów z AAD. Znacząca różnica w częstości występowania odnotowana została

jedynie dla przeciwciał aTPO, których obecność stwierdzana była częściej u krewnych w linii żeńskiej ($p=0,014$; OR 3,16; 95%CI 1,227-8,121). Obecność przeciwciał wykazywana była częściej u krewnych mężczyzn z AAD ($p=0,008$; OR 3,31; 95% CI 1,33-8,23) oraz w rodzinach chorych z autoimmunizacyjnym zespołem wielogruzołowym ($p=0,009$; OR 3,55; 95%CI 1,31-9,57). Co więcej, liczba przeciwciał obserwowana u krewnych wykazywała dodatnią korelację z liczbą chorób autoimmunizacyjnych u probandów ($r=0,337$; $p=0,0003$).

W końcowej części projektu przeprowadzone zostały analizy genetyczne. Związane z ryzykiem autoimmunizacji allele T wariantu rs2476601 genu *PTPN22* stwierdzone zostały znacząco częściej ($p=0,005$) wśród krewnych chorych z AAD (18,7%) w porównaniu z grupą kontrolną (11,1%) dając wynik OR 1,76 (95% CI 1,18-2,36). Allel ryzyka autoimmunizacji G polimorfizmu rs231775 *CTLA4* stwierdzono u 48,2% krewnych w porównaniu do 37,5% w grupie zdrowych osób ($p=0,004$, OR 1,55; 95% CI 1,15-2,09). Asocjacja pomiędzy obecnością swoistych przeciwciał a występowaniem polimorfizmu potwierdzona została jedynie dla rs2476601 genu *PTPN22*. Nosicielstwo allelu T było czynnikiem ryzyka występowania przeciwciał a21OH (OR 13,09; 95% CI 1,51-113,2; $p=0,007$), aTPO (OR 4,38; 95% CI 1,84-10,45; $p=0,001$), aTg (OR 10,51; 95% CI 3,47-31,80; $p<0,001$) oraz aZnT8 (OR 6,45; 95% CI 1,24-33,71; $p=0,021$). Obecność allelu T wiązała się także z istotnie zwiększonym prawdopodobieństwem stwierdzenia co najmniej 1 przeciwciała u krewnych chorych z AAD (OR 10,40; 2,89-37,39; $p=0,0002$). Przeciwnie, nie wykazano takiego związku pomiędzy występowaniem polimorfizmu genu *CTLA4* a obecnością badanych autoprzeciwciał w surowicy krewnych osób z AAD.

Głównym ograniczeniem naszej analizy jest stosunkowo niewielka liczba uczestniczących w nim krewnych chorych z AAD. Niemniej jednak, wyniki badania dają wartościowy obraz rozpowszechnienia autoimmunizacji w rodzinach pacjentów z AAD. Uzyskane dane dowodzą zwiększonego ryzyka wystąpienia autoimmunizacji w układzie endokrynnym, a szczególnie dotyczącej tarczycy. Wczesna identyfikacja AAD lub T1D w okresie przedklinicznym może zapobiec zagrażającym życiu zaburzeniom metabolicznym związanym z początkiem tych chorób, a w przyszłości prawdopodobnie pozwoli na wdrożenie środków zapobiegających lub przynajmniej opóźniających rozwój choroby u predysponowanych osób przez rozwinięciem objawów klinicznych.

Uzyskane w niniejszym projekcie badawczym obserwacje pozwalają na postawienie kilku wniosków:

1. Wskazane jest aktywne poszukiwanie wśród członków rodzin pacjentów z AAD chorób autoimmunizacyjnych, a przede wszystkim autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, szczególnie wśród krewnych pierwszego stopnia płci żeńskiej.
2. Celowym jest objęcie krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD przesiewowymi oznaczeniami autoprzeciwciał zwłaszcza, gdy proband jest obciążony dodatkowymi chorobami autoimmunizacyjnymi i/lub jest mężczyzną, gdyż wtedy ryzyko autoimmunizacji skierowanej przeciwko antygenom kory nadnerczy, tarczycy lub komórek beta wysp trzustkowych jest szczególnie zwiększone.
3. W rodzinnym występowaniu chorób autoimmunizacyjnych ma znaczenie predyspozycja genetyczna, na co wskazuje częstsze występowanie alleli ryzyka polimorfizmów rs2476601 genu *PTPN22* i rs231775 genu *CTLA4* wśród krewnych pierwszego stopnia pacjentów z AAD niż w populacji ogólnej.
4. Polimorfizm rs2476601 genu *PTPN22* może mieć potencjalne znaczenie prognostyczne w ocenie ryzyka autoimmunizacji w rodzinach osób z AAD, gdyż okazuje się być istotnie związany z występowaniem w surowicy krewnych pierwszego stopnia autoprzeciwciał przeciwko 21-hydroksylazie, tyreoperoksydazie, tyreoglobulinie oraz transporterowi cynkowemu 8.
5. Predyspozycją genetyczną do autoimmunizacji w zakresie układu dokrewnego, wynikającą z polimorfizmu rs231775 genu *CTLA4* powinna być przedmiotem dalszych analiz funkcjonalnych, gdyż nie wykazuje związku z obecnością autoprzeciwciał przeciw antygenom kory nadnerczy, tarczycy lub komórek beta wysp trzustkowych.

8.0 SUMMARY

Autoimmune conditions tend to cluster in subjects with autoimmune Addison's disease (AAD). Epidemiological analyses in families with Graves' disease (GD), type 1 diabetes (T1D), and vitiligo confirm increased frequency of the autoimmune disorders in the relatives of the affected subjects. To the best of our knowledge, a unique analysis of the prevalence of the organ-specific serum autoantibodies in AAD families was performed half a century ago, using formerly approved methods. Parents and siblings of the AAD patients revealed increased prevalence of anti-thyroid microsomal antibodies, while difference in anti-adrenal antibody frequency did not reach statistical significance. Therefore, the purpose of the current project was to comprehensively investigate if the relatives of individuals suffering from AAD are at increased risk of autoimmunity. This aim was achieved in a multi-step study, comprising a questionnaire-based family survey, followed by evaluation of the biochemical and genetic markers of the autoimmune risk in first-degree relatives.

In a dedicated survey 106 AAD patients collected family history with regard to 23 major autoimmune disorders to provide general insight into the autoimmune disease burden in their families. Then, specific serum autoantibodies against 21-hydroxylase (a21OH), thyroid peroxidase (aTPO), thyroglobulin (aTg), glutamic acid decarboxylase (aGAD), tyrosine phosphatase (aIA-2) and zinc transporter 8 (aZnT8) were evaluated using RIA and ELISA assays in a cohort of 113 first-degree relatives (9 parents, 44 siblings, and 60 offspring from 51 families) of patients with AAD and compared with 143 sex- and age-matched volunteers. Later on, the frequency of single nucleotide polymorphisms in autoimmunity-related genes *PTPN22* (rs2476601) and *CTLA4* (rs231775) was assessed by real-time PCR and allele-specific TaqMan[®] probes in 112 first-degree relatives and 393 healthy controls. Finally, the association of the studied polymorphisms with the presence of serum autoantibodies was examined. The study protocol was approved by the ethical board at Poznan University of Medical Sciences and all participants gave their informed consent.

The majority (84%) of the interviewed patients with AAD suffered from autoimmune polyendocrine syndrome type 2 or 4, i.e. at least two coexisting autoimmune conditions. A combination of AAD and Hashimoto's thyroiditis (HT) (39.4%) or GD (13.2%) was the most common, although several patients presented additional autoimmune disorders, i.e. chronic atrophic gastritis with pernicious anaemia, T1D, vitiligo, premature ovarian insufficiency. In the survey part of the study 78 (73,6%) patients confirmed the presence of the autoimmune disorders among their relatives. They indicated 201 relatives suffering from at least one autoimmune disease, however, in some families there were

up to 6-7 affected individuals. Overall, 235 cases of the autoimmune disorders were identified by in the survey, including 94 subjects with HT, 23 with GD and 23 with vitiligo, 21 with T1D, 14 with psoriasis, 10 with rheumatoid arthritis, and 8 with multiple sclerosis. AAD and premature ovarian failure were reported each in 7 relatives. Autoimmune disorders were more frequent in female relatives than among males, especially in first-degree relatives, i.e. mothers and sisters of probands.

In the second part of the study 113 first-degree relatives supplied their medical documentation and underwent physical examination. At the time of the study 43 (38,1%) relatives already suffered from an autoimmune disorder, including 6 individuals with multiple diseases. HT had been diagnosed in 20.3% relatives, GD in 8.0%, vitiligo and T1D in 3.5%, whereas AAD, RA and atrophic gastritis with pernicious anaemia in 2.7%. Single cases of other autoimmune conditions were registered.

Subsequently, blood samples were taken from the examined relatives. All studied antibodies except for aIA-2 ($p=0.085$), were significantly more frequent in AAD relatives than in controls ($p<0.05$). a21OH were detected in 6.2% relatives, aTPO in 28.3%, aTg in 19.5%, aGAD in 8.0%, and aZnT8 in 7.1%. Two and more autoantibodies were detected in 18.6% subjects. An investigation of serum autoantibodies in family members with regard to their relationship did not reveal significant differences between siblings and offspring. Significant gender difference was revealed only for aTPO, more common in female relatives ($p=0.014$; OR 3.16; 95%CI 1.227-8.121). Circulating autoantibodies were found more frequently in the relatives of affected males ($p=0.008$; OR 3.31; 95% CI 1.33-8.23), and in family members of patients with polyendocrine autoimmunity ($p=0.009$; OR 3.55; 95%CI 1.31-9.57). Furthermore, the number of serum autoantibodies found in the relatives was positively correlated with the number of the autoimmune disorders in probands ($r=0.337$; $p=0.0003$).

Finally, molecular analyses were performed. The autoimmunity-associated T allele of the *PTPN22* rs2476601 variant was significantly more frequent ($p=0.005$) among the relatives of the AAD patients (18.7%) than in controls (11.1%), yielding an OR of 1.76 (95% CI 1.18-2.36). The mutant G allele of the *CTLA4* rs231775 was found in 48.2% of the relatives compared to its 37.5% prevalence in healthy controls ($p=0.004$, OR 1.55; 95% CI 1.15- 2.09). However, only rs2476601 revealed an association with the presence of serum autoantibodies. The T allele appeared to be a risk factor for a21OH (OR 13.09; 95% CI 1.51-113.2; $p=0.007$), aTPO (OR 4.38; 95% CI 1.84-10.45; $p=0.001$), aTg (OR 10.51; 95% CI 3.47-31.80; $p<0.001$), and aZnT8 (OR 6.45; 95% CI 1.24-33.71; $p=0.021$). Furthermore, the presence of the T allele was associated with detection of more than one

circulating autoantibody in the AAD relatives (OR 10.40; 2.89-37.39; $p=0.0002$). On the contrary, no significant association of the *CTLA4* variant with the presence of specific autoantibodies was identified.

The major weakness of our analysis consists of the limited number of the studied relatives. Nevertheless, the study gives a valuable insight into the burden of autoimmunity in the families of patients suffering from AAD. Our findings provide evidence of increased risk for the endocrine autoimmunity, especially thyroid disease, in this group. Efficient detection of preclinical stages of AAD or T1D may prevent life-threatening crisis at disease onset and in future will probably enable preventive or disease delaying measures before the development of the clinical symptoms in susceptible individuals. Altogether, the current study allows drawing some meaningful conclusions:

1. An active search for autoimmune disorders, especially autoimmune thyroid disease, is recommended among the family members of patient suffering from AAD, especially in first-degree female relatives.
2. It seems reasonable to recommend autoantibody screening in first-degree relatives of patients with AAD, especially if the proband suffers from several autoimmune conditions and/or is a male, as in these cases the risk of autoimmunity directed against antigens of the adrenal cortex, thyroid or pancreatic islets beta cells is particularly elevated.
3. Genetic predisposition implicated in familial incidence of the autoimmune disorders, is supported by increased frequency of the risk alleles at *PTPN22* rs2476601 and *CTLA4* rs231775 in first-degree relatives of the AAD patients compared to the general population.
4. *PTPN22* polymorphism rs2476601 is a potential prognostic marker in evaluation of the autoimmunity risk in families of the AAD patients as it appears to be associated with the presence of serum autoantibodies against 21-hydroxylase, thyroid peroxidase, thyroglobulin, and zinc transporter 8 in first-degree relatives.
5. Genetic susceptibility for autoimmune disorders connected with polymorphism rs231775 of the *CTLA4* gene warrants further functional investigation since it does not seem to be associated with the presence of circulating autoantibodies against adrenal cortex, thyroid, and pancreatic beta cell antigens.

9.0 PIŚMIENNICTWO

1. Gołąb J, Jakubisiak M, Lasek W, Stokłosa T. Immunologia Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2017.
2. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17(5):281-294.
3. Bluestone JA, Bour-Jordan H, Cheng M, et al. T cells in the control of organ-specific autoimmunity. *J Clin Invest.* 2015 ;125(6):2250-60.
4. Yang SH, Gao CY, Li L, Chang C, et al. The molecular basis of immune regulation in autoimmunity. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(1):43-67.
5. Proekt I, Miller CN, Lionakis MS, et al. Insights into immune tolerance from AIRE deficiency. *Curr Opin Immunol.* 2017;49:71-78.
6. Khan U, Ghazanfar H. T Lymphocytes and Autoimmunity. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;341:125-168
7. Green DR1, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev.* 2003;193:70-81.
8. Sercarz E, Raja-Gabaglia C. Etiology of autoimmune disease: how T cells escape self-tolerance. *Methods Mol Biol.* 2007;380:271-83.
9. Wilczynski JR, Radwan M, Kalinka J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci.* 2008 ;13:2266-74.
10. Fife BT, Bluestone JA Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev.* 2008;224:166-82.
11. Mackern-Oberti JP, Llanos C, Vega F, et al. Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2015; 14(2):127-39.
12. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 2015 Feb;45(2):344-55.
13. Latinne D, Fiasse R. New insights into the cellular immunology of the intestine in relation to the pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg.* 2006 Oct-Dec;69(4):393-405.
14. Negrini S, Fenoglio D, Parodi A, et al. Phenotypic Alterations Involved in CD8+ Treg Impairment in Systemic Sclerosis *Front Immunol.* 2017;8:18.
15. Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 2011; 118(22): 5741-51.

16. Fietta P, Delsante G. The effector T helper cell triade. *Riv Biol.* 2009;102(1):61-74.
17. Bowness P. HLA-B27. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:29-48.
18. Skinningsrud B, Lie BA, Lavant E, et al. Multiple loci in the HLA complex are associated with Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(10):E1703-8.
19. Teruel M1, Alarcón-Riquelme ME. Genetics of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an update. *Curr Opin Rheumatol.* 2016;28(5):506-14.
20. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2016;36(2):115-27.
21. Kim K, Bang SY, Lee HS, et al Update on the genetic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(1):13-24.
22. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015 Nov;64:101-12.
23. Lee HJ, Li CW, Hammerstad SS, Stefan M, Tomer Y. Immunogenetics of autoimmune thyroid diseases: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:82-90.
24. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, et al The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(9):585-600.
25. Lai Y, Dong C. Therapeutic antibodies that target inflammatory cytokines in autoimmune diseases. *Int Immunol.* 2016;28(4):181-8.
26. Desai MK, Brinton RD. Autoimmune disease in women: endocrine transition and risk across the lifespan. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 10: 265.
27. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 2007; 28(5): 521-74.
28. Dragin N, Bismuth J, Cizeron-Clairac G, et al. Estrogen-mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune diseases. *J Clin Invest* 2016; 126 (4): 1525-37.
29. Kuusisto H, Kaprio J, Kinnunen E, et al. Concordance and heritability of multiple sclerosis in Finland: study on a nationwide series of twins. *Eur J Neurol* 2008; 15(10): 1106-10.
30. Grennan DM, Parfitt A, Manolios N, et al. Family and twin studies in systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1997; 13(2): 93-8.
31. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, et al. 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(2): 930-4.
32. Nielsen PR, Kragstrup TW, Deleuran BW, et al. Infections as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2016;74:176-181.

33. Shukla SK, Singh G, Ahmad S, et al. Infections, genetic and environmental factors in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases *Microb Pathog*. 2018;116:279-288.
34. Draborg AH, Duus K, Houen G. Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013; 535738.
35. Green J, Casabonne D, Newton R. Coxsackie B virus serology and Type 1 diabetes mellitus: a systematic review of published case-control studies. *Diabet Med*. 2004;21(6):507-14.
36. Vieira SM, Pagovich OE, Kriegel MA. Diet, microbiota and autoimmune diseases. *Lupus*. 2014;23(6):518-26
37. Köhling HL, Plummer SF, Marchesi JR, et al. The microbiota and autoimmunity: Their role in thyroid autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2017;183:63-74
38. Smyk D, Rigopoulou EI, Bizzaro N, et al. Hair dyes as a risk for autoimmunity: from systemic lupus erythematosus to primary biliary cirrhosis. *Auto Immun Highlights*. 2012; 13;4(1):1-9
39. Yang CY, Leung PSC, Adamopoulos IE, et al. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013; 45(2): 217-226
40. Lehuen A, Marshak-Rothstein A. Organ-specific and systemic autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol*. 2013 Dec;25(6):667-9.
41. Wang L, Wang FS, Gershwin ME Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*. 2015;278(4):369-95.
42. Lerner, Jeremias, Matthias. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease*, 2015, Vol. 3, No. 4, 151-155
43. American Autoimmune Related Diseases Association: <https://www.aarda.org/news-information/statistics/> - dostęp 11/2019
44. Neufeld M, Blizzard RM. Polyglandular autoimmune diseases. W: Pinchera A, Doniach D, Fenzi GF, Baschieri L. eds. *Symposium on autoimmune aspects of endocrine disorders*. 1980 New York: Academic Press; 357-65.
45. Nederstigt C, Uitbeijerse BS, Janssen LGM, et al. Associated auto-immune disease in type 1 diabetes patients: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2019;180(2):135-144
46. Karl M, Onumah BM, Cole J, et al. L. Hypocortisolemia in Graves hyperthyroidism. *Endocr Pract*. 2009;15(3):220-4.
47. Kahalya GJ, Bartalenab L., Hegedüs L., et al. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves Hyperthyroidism *Eur Thyroid J* 2018;7:167–186

48. Inaba H, De Groot LJ, Akamizu T: Thyrotropin receptor epitope and human leukocyte antigen in Graves' disease. *Front Endocrinol* 2016;7:120
49. Houcken J, Degenhart C, Bender K, et al. PTPN22 and CTLA-4 Polymorphisms Are Associated With Polyglandular Autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(5):1977-1984
50. Pawlowski P, Grubczak K, Kostecki J, et al. J Decreased Frequencies of Peripheral Blood CD4+CD25+CD127-Foxp3+ in Patients with Graves' Disease and Graves' Orbitopathy: Enhancing Effect of Insulin Growth Factor-1 on Treg Cells. *Horm Metab Res.* 2017;49(3):185-191
51. Ferrari SM, Fallahi P, Antonelli A, et al. Environmental Issues in Thyroid Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Mar 20;8:50.
52. Burch HB, Wartofsky L. Life-threatening thyrotoxicosis. Thyroid storm. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993; 22(2): 263-77.
53. Bartalena L, Baldeschi L, Dickson AJ, et al. Consensus statement of the European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of Graves' orbitopathy. *Thyroid* 2008; 18(3): 333-46
54. Furmaniak J, Sanders J, Rees Smith B. Blocking type TSH receptor antibodies. *Auto Immun Highlights* 2012; 4(1): 11-26.
55. Barbesino G, Tomer Y. Clinical review: Clinical utility of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(6): 2247-55.
56. Hirsch D, Levy S, Nadler V, et al. Pregnancy outcomes in women with severe hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2013;169(3):313-20
57. de Carvalho G, Perez C, Ward L. The clinical use of thyroid function tests. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2013; 57:193–204.
58. Fröhlich E and Wahl R Thyroid Autoimmunity: Role of Anti-thyroid Antibodies in Thyroid and Extra-Thyroidal Diseases. *Front. Immunol.* 2017; 8:521.
59. Wojciech Zgliczyński Wielka interna - endokrynologia (Część 1,2) Medical Tribune Polska Wydawnictwo Warszawa 2012, wyd.1
60. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med.* 2003; 348 (26): 2646-55.
61. Li D, Cai W, Gu R, et al. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. *Clin Immunol* 2013; 149(3): 411-20.
62. Bossowski A, Moniuszko M, Idźkowska E, et al. Decreased proportions of CD4+IL17+/CD4+CD25+CD127- and CD4+IL17+/CD4+CD25+CD127-FoxP3+ T cells in children with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2016; 49(5): 320-8.

63. Marazuela M, Garcia-Lopez MA, Figueroa-Vega N, et al. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9): 3639-46.
64. Czarnocka B. Thyroperoxidase, thyroglobulin, Na(+)/I(-) symporter, pendrin in thyroid autoimmunity. *Front Biosci (Landmark Ed.)* 2011; 16: 783-802.
65. Simmonds MJ, Gough SC. Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond. *Clin Exp Immunol* 2004; 136(1): 1-10.
66. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(8): 3162-70.
67. Rydzewska M, Goralczyk A, Goscik J, et al. A. Analysis of chosen polymorphisms rs2476601 a/G - PTPN22, rs1990760 C/T - IFIH1, rs179247 a/G - TSHR in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases in children. *Autoimmunity* 2018; 51(4): 183-190.
68. Khoury EL, Pereira L, Greenspan FS. Induction of HLA-DR expression on thyroid follicular cells by cytomegalovirus infection in vitro. Evidence for a dual mechanism of induction. *Am J Pathol* 1991; 138(5): 1209-23.
69. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2019 Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Praktyczna* 2019, tom5, nr 1
70. Harjutsalo V, Sund R, Knip M, et al. Incidence of type 1 diabetes in Finland *JAMA*. 2013;310(4):427-8.
71. Lado JJ, Lipman TH. Racial and Ethnic Disparities in the Incidence, Treatment, and Outcomes of Youth with Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45(2):453-61.
72. Dariusz Moczulski *Wielka interna - Diabetologia*. Medical Tribune Polska Wydawnictwo Warszawa 2010, wyd.1
73. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1965; 14(10): 619-33.
74. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: a comprehensive review. *J Autoimmun* 2015; 64: 101-12.
75. Risch N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 1987; 40: 1-14.
76. Rotter JJ, Anderson CE, Rubin R, et al. HLA genotypic study of insulin-dependent diabetes the excess of DR3/DR4 heterozygotes allows rejection of the recessive hypothesis. *Diabetes* 1983; 32: 169-74.

77. Polychronakos C, Li Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet* 2011; 12(11): 781-92.
78. Kaur S, Mirza AH, Brorsson CA, et al. Hvidoere International Study Group. The genetic and regulatory architecture of ERBB3-type 1 diabetes susceptibility locus. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;419:83-91.
79. Johnson SR, McGown I, Oppermann U, et al. A novel INS mutation in a family with maturity-onset diabetes of the young: Variable insulin secretion and putative mechanisms. *Pediatr Diabetes*. 2018;19(5):905-909.
80. Coppieters KT, Wiberg A, Tracy SM, et al. Immunology in the clinic review series: focus on type 1 diabetes and viruses: the role of viruses in type 1 diabetes: a difficult dilemma. *Clin Exp Immunol*. 2012; 168:5–11.
81. Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin Exp Immunol*. 2012; 168:12–23.
82. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008; 455:1109–13.
83. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*. 2011; 12:5–9.
84. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013; 504:451–55.
85. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*. 2003; 290:1713–20.
86. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, et al. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA*. 2003; 290:1721–28.
87. Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J. for the ABIS-study group. Dietary risk factors for the emergence of type 1 diabetes-related autoantibodies in 2 1/2 year-old Swedish children. *Br J Nutr*. 2006; 95:603–08.
88. Virtanen SM, Nevalainen J, Kronberg-Kippilä C, et al. Food consumption and advanced β cell autoimmunity in young children with HLA-conferred susceptibility to type 1 diabetes: a nested case-control design. *Am J Clin Nutr*. 2012; 95:471–78
89. Verge CF, Howard NJ, Irwig L, et al. Environmental factors in childhood IDDM A population-based, case-control study. *Diabetes Care*. 1994; 17:1381–89.

90. Harder T, Roepke K, Diller N, et al. Birth weight, early weight gain, and subsequent risk of type 1 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2009; 169:1428–36.
91. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(11):635-650
92. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, et al. Birthweight and the risk of childhood-onset type diabetes: a meta-analysis of observational studies using individual patient data. *Diabetologia.* 2010; 53:641–51.
93. Johansson C, Samuelsson U, Ludvigsson J. A high weight gain early in life is associated with an increased risk of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1994; 37:91–94.
94. Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet.* 2016; 387(10035): 2340–2348
95. Andersson C, Kolomodin M, Ivarsson SA, et al. Better Diabetes Diagnosis Study Group. Islet cell antibodies (ICA) identify autoimmunity in children with new onset diabetes mellitus negative for other islet cell antibodies. *Pediatr Diabetes* 2014; 15(5): 336-44.
96. Sabbah E, Savola K, Kulmala P, et al. Disease-associated autoantibodies and HLA-DQB1 genotypes in children with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 78-83.
97. Long AE, Gillespie KM, Rokni S, et al. Rising Incidence of Type 1 Diabetes Is Associated With Altered Immunophenotype at Diagnosis *Diabetes* 61:683–686, 2012
98. Graham J, Hagopian WA, Kockum I, et al. Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes* 51:1346 –1355, 2002
99. Kimpimäki T, Kulmala P, Savola K, et al. Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4572-9.
100. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest* 1998; 101: 327-36.
101. Yu L, Boulware DC, Beam CA, Hutton JC, et al. Type 1 Diabetes TrialNet Study Group. Zinc transporter-8 autoantibodies improve prediction of type 1 diabetes in relatives positive for the standard biochemical autoantibodies. *Diabetes Care* 2012; 35(6): 1213-8.
102. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin

- dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347: 151-6.
103. Kaufamn DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, et al. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 89: 283-92.
 104. Björk E, Velloso LA, Kämpe O, et al. GAD autoantibodies in IDDM, stiff-man syndrome, and autoimmune polyendocrine syndrome type I recognize different epitopes. *Diabetes* 1994; 43: 161-5.
 105. Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, et al. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest* 1995; 95: 1505-11.
 106. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, et al. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 1994; 152: 3183-8.
 107. Solimena M, Dirx R Jr, Hermel JM, et al. ICA 512, an autoantigen of type 1 diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J* 1996; 15: 2102-14.
 108. Gorus FK, Goubert P, Semakula C, et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-antibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia* 1997; 40: 95-9.
 109. Christie MR, Genovese S, Casidy D, et al. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 1994; 43: 1254-9.
 110. Decochez K, De Leeuw IH, Keymeulen B, et al. Belgian Diabetes Registry. IA-2 autoantibodies predict impending type I diabetes in siblings of patients. *Diabetologia* 2002; 45: 1658-66.
 111. Gorus FK, Balti EV, Vermeulen I, et al. Belgian Diabetes Registry. Screening for insulinoma antigen 2 and zinc transporter 8 autoantibodies: a cost-effective and age-independent strategy to identify rapid progressors to clinical onset among relatives of type 1 diabetic patients. *Clin Exp Immunol* 2013; 171(1): 82-90.
 112. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, et al. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004; 53(9), 2330-1337.
 113. Nicolson TJ, Bellomo EA, Wijesekara N, et al. Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes* 2009; 58(9), 2070-2083.

114. Wenzlau JM, Juhl, K, Yu K , et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104(43), 17040-17045.
115. Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, et al. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* 2009; 52(9), 1881-1888.
116. Lounici Boudiaf A, Bouziane D, Smara M, et al. Could ZnT8 antibodies replace ICA, GAD, IA2 and insulin antibodies in the diagnosis of type 1 diabetes? *Curr Res Transl Med.* 2018;66(1):1-7
117. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996; 45: 926-33.
118. Till AM, Kenk H, Rjasanowski I, et. Autoantibody-defined risk for Type 1 diabetes mellitus in a general population of schoolchildren: results of the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study after 18 years. *Diabet Med.* 2015; 32(8): 1008-16.
119. Yu L, Boulware DC, Beam CA, et al. Type 1 Diabetes TrialNet Study Group. Zinc transporter-8 autoantibodies improve prediction of type 1 diabetes in relatives positive for the standard biochemical autoantibodies. *Diabetes Care* 2012; 35(6): 1213-8.
120. Erichsen MM, Løvås K, Fougner KJ. et al. Normal overall mortality rate in Addison's disease, but young patients are at risk of premature death. *Eur J Endocrinol* 2009; 160: 233-237.
121. Betterle C, Dal Pra C, Mantero F, et al.. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocr Rev.* 2002;23(3):327-64.
122. Husebye E, Lovas K. Pathogenesis of primary adrenal insufficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23: 147-157.
123. Eriksson D, et al. Extended exome sequencing identifies BACH2as a novel major risk locus for Addison's disease. *J Intern Med* 2016;280:595–608.
124. Yu L, et al. DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:328–35.
125. Baker PR, et al. Haplotype analysis discriminates genetic risk for DR3-associated endocrine autoimmunity and helps define extreme risk for Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:E263–70.

126. Wolff AS, et al. CTLA-4 as a genetic determinant in autoimmune Addison's disease. *Genes Immun* 2015;16:430–6.
127. Skinningsrud B, et al. Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. *Eur J Hum Genet* 2008;16:977–82.
128. Skinningsrud B, et al. Polymorphisms in CLEC16A and CIITA at 16p13 are associated with primary adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3310–7.
129. Mitchell AL, et al. Association of autoimmune Addison's disease with alleles of STAT4 and GATA3 in European cohorts. *PLoS One* 2014;9:e88991.
130. Fichna M, et al. Association of the CYP27B1 C(-1260)A polymorphism with autoimmune Addison's disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;118:544–9.
131. Pazderska A et al. A variant in the BACH2 gene is associated with susceptibility to autoimmune Addison's Disease in humans *J Clin Endocrinol Metab*, 101 (2016), pp. 3865-3869.
132. Hellesen, Bratland The potential role for infections in the pathogenesis of autoimmune Addison's disease. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(1):52-63.
133. Aaron W. Michels & Peter A. Gottlieb Autoimmune polyglandular syndromes *Nature Reviews Endocrinology* volume 6, pages270–277(2010)
134. Kosowicz J, Gryczynska M, Bottazzo GF. A radioimmunoassay for the detection of adrenal autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 1986; 63(3), 671–679.
135. Betterle C, Volpato M, Pedini B, et al. Adrenal-cortex autoantibodies and steroid-producing cells autoantibodies in patients with Addison's disease: comparison of immunofluorescence and immunoprecipitation assays. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 618-22.
136. Falorni A, Laureti S, De Bellis A, et al. SIE Addison Study Group. Italian Addison network study: update of diagnostics criteria for the etiological classification of primary adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1598-604.
137. Baumann-Antczak A, Wedlock N, Bednarek J, et al. J. Autoimmune Addison's disease and 21-hydroxylase. *Lancet* 1992; 340: 429-30.

138. Bednarek J, Furmaniak J, Wedlock N, et al. Steroid 21-hydroxylase is a major autoantigen involved in adult onset autoimmune Addison's disease. *FEBS Lett* 1992; 309: 51-5.
139. Winqvist O, Karlsson FA, Kämpe O. 21-Hydroxylase, a major autoantigen in idiopathic Addison's disease. *Lancet* 1992; 339: 1559-62.
140. Betterle C, Volpato M, Rees Smith B, et al. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: markers of low progression to clinical Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(3): 932-38.
141. Betterle C, Volpato M, Rees Smith B, et al. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in children with organ-specific autoimmune diseases: markers of high progression to clinical Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(3): 939-42.
142. Naletto L, Frigo A, Ceccato F, et al. The natural history of autoimmune Addison's disease from the detection of autoantibodies to development of the disease: a long follow-up study on 143 patients. *Eur J Endocrinol* 2019. pii: EJE-18-0313.R3.
143. Laureti S, De Bellis A, Muccitelli VI, et al. Levels of adrenocortical autoantibodies correlate with the degree of adrenal dysfunction in subjects with preclinical Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(10): 3507-11.
144. Yu L, Brewer KW, Gates S, et al. DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(1): 328-35.
145. Barker JM, Ide A, Hostetler C, et al. Endocrine and immunogenetic testing in individuals with type 1 diabetes and 21-hydroxylase autoantibodies: Addison's disease in a high-risk population. *J Clin Endocrinol* 2005; 90(1): 128-34.
146. Bratland E, Skinningsrud B, Undlien DE, et al. T cell responses to steroid cytochrome P450 21-hydroxylase in patients with autoimmune primary adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(12): 5117-24.
147. Krohn K, Uibo R, Aavik E, et al. Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17 alpha-hydroxylase. *Lancet* 1992; 339: 770-3.

148. Chen S, Sawicka J, Betterle C, et al. Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1871-6.
149. Dal Pra C, Chen S, Furmaniak J, et al. Autoantibodies to steroidogenic enzymes in patients with and without Addison's disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 565-70.
150. Reato G, Morlin L, Chen S, et al. Premature ovarian failure in patients with autoimmune Addison's disease: clinical, genetic, and immunological evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(8): E1255-61.
151. Dalla Costa M, Bonanni G, Masiero S, et al. Gonadal function in males with autoimmune Addison's disease and autoantibodies to steroidogenic enzymes. *Clin Exp Immunol* 2014; 176(3): 373-9
152. Eisenbarth GS, Gottlieb PA. Autoimmune polyendocrine syndromes. *New Engl J Med*. 2004; 350:2068–2079.
153. Li Y, Song YH, Rais N, et al. Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism. *J Clin Invest*. 1996; 97:910–914.
154. Brown EM. Anti-parathyroid and anti-calcium sensing receptor antibodies in autoimmune hypoparathyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2009; 38:437–445.
155. Goswami R, Brown EM, Kochupillai N, et al. Prevalence of calcium sensing receptor autoantibodies in patients with sporadic idiopathic hypoparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2004; 150(1): 9-18.
156. Tomar N, Gupta N, Goswami R. Calcium-sensing receptor autoantibodies and idiopathic hypoparathyroidism. *J Clin endocrinol Metab* 2013; 98(9): 3884-91.
157. Kemp EH, Habibullah M, Kluger N, Rabki A, Sandhu HK, Krohn KJ, Weetman AP. Prevalence and clinical associations of calcium-sensing receptor and NALP5 autoantibodies in Finnish APECED patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(3): 1064-71.
158. Brown EM. Anti-parathyroid and anti-calcium sensing receptor antibodies in autoimmune hypoparathyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2009; 38:437–445.

159. Tomar N, Kaushal E, Das M, et al. Prevalence and significance of NALP5 autoantibodies in patients with idiopathic hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(4): 1219-26.
160. Caturegli P, Newschaffer C, Olivi A, et al. NR. Autoimmune hypophysitis. *Endocr Rev*. 2005;26:599–614.
161. Landek-Salgado MA, Gutenberg A, Lupi I, et al. Pregnancy, postpartum autoimmune thyroiditis, and autoimmune hypophysitis: intimate relationships. *Autoimmun Rev*. 2010;9:153–7.
162. Takao T, Nanamiya W, Matsumoto R, et al. Antipituitary antibodies in patients with lymphocytic hypophysitis. *Horm Res*. 2001;55:288–92.
163. Tanaka S, Tatsumi KI, Kimura M, et al. Detection of autoantibodies against the pituitary-specific proteins in patients with lymphocytic hypophysitis. *Eur J Endocrinol*. 2002;147:767–75.
164. Tanaka S, Tatsumi KI, Takano T, et al. Anti-alpha-enolase antibodies in pituitary disease. *Endocr J*. 2003;50:697–702.
165. O'Dwyer DT, Clifton V, Hall A, et al. Pituitary autoantibodies in lymphocytic hypophysitis target both gamma- and alpha-enolase - a link with pregnancy? *Arch Physiol Biochem*. 2002;110:94–8.
166. Bensing S, Hulting AL, Hoog A, et al. Lymphocytic hypophysitis: report of two biopsy-proven cases and one suspected case with pituitary autoantibodies. *J Endocrinol Invest*. 2007;30:153–62.
167. Lupi I, Broman KW, Tzou SC, et al. Novel autoantigens in autoimmune hypophysitis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69:269–78.
168. Smith CJ, Bensing S, Burns C, Robinson PJ, et al. Identification of TPIT and other novel autoantigens in lymphocytic hypophysitis: immunoscreening of a pituitary cDNA library and development of immunoprecipitation assays. *Eur J Endocrinol*. 2012;166:391–8.
169. Falorni A, Minarelli V, Bartoloni E, et al. Diagnosis and classification of autoimmune hypophysitis. *Autoimmun Rev*. 2014;13:412–6.
170. Gut P, Czarnywojtek A, Ziemnicka K, et al. Incidence of pituitary autoantibodies in idiopathic diabetes insipidus. *Centr Eur J Immunol* 2018; 43(4): 428-433.

171. Wolff AS, Erichsen MM, Meager A, et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 in Norway: phenotypic variation, autoantibodies, and novel mutations in the autoimmune regulator gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(2):595–603.
172. Altuntas CZ, Johnson MJ, Tuohy VK Autoimmune targeted disruption of the pituitary-ovarian axis causes premature ovarian failure *J Immunol*, 177 (2006), pp. 1988-1996
173. La Marca A, Brozzetti A, Sighinolfi G, et al. Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010;22(4):277-82.
174. Conway GS, Kaltsas G, Patel A, et al. Characterisation of idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 1996; 65(2): 337-341.
175. Schatz DA, Winter WE. Autoimmune polyglandular syndrome. II: clinical syndrome and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002; 31(2):339–52.
176. Pasoto, SG, Viana VST, Mendonca, BB, et al. Anti-corpus luteum antibody: A novel serological marker for ovarian dysfunction in systemic lupus erythematosus? *Journal of Rheumatology* 1999; 26 (5): 1087-1093.
177. Haller-Kikkatalo K, Salumets A, Uibo R. Review on autoimmune reactions in female infertility: antibodies to follicle stimulating hormone. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:1–15.
178. Euthymiopoulou, K, Aletras, AJ, Ravazoula P, et al. *Rheumatol Int* 2007; 27: 1149.
179. Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss *J Autoimmun* 2012;38: J266-J274.
180. Steck AK, Rewers MJ Genetics of Type 1 Diabetes *Clin Chem.* 2011; 57(2): 176–185.
181. Orlova EM, Sozaeva LS, Kareva MA et al. Expanding the Phenotypic and Genotypic Landscape of Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(9):3546-3556.
182. Malchow S, Leventhal DS., Nishi S, et al. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science* 2013; 339(6124): 1219-24.

183. Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, et al. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* 1990; 322(26): 1829-36.
184. Myhre AG, Halonen M, Eskelin P, et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS1) in Norway. *Clin Endocrinol* 2001; 54(2): 211-17.
185. Meager A, Visvalingam K, Peterson P, et al. Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med*. 2006; 3:e289.
186. Meloni A, Fucas M, Cetani F, et al. Autoantibodies against type I interferons as an additional diagnostic criterion for autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(11): 4389-97.
187. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med*. 2010; 207(2): 299-308.
188. Eriksson D, Dalin F, Eriksson GN, et al. Cytokine Autoantibody Screening in the Swedish Addison Registry Identifies Patients With Undiagnosed APS1. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103(1): 179-86.
189. Gambinieri E, Ciullini Mannurita S, et al. Clinical, Immunological, and Molecular Heterogeneity of 173 Patients With the Phenotype of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked (IPEX) Syndrome. *Front Immunol* 2018; 9: 2411.
190. <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>
191. Noble JA, Valdes AM, Cook M, et al. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: Molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet*. 1996;59:1134-48.
192. Erlich H, Valdes AM, Noble J, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 2008;57:1084-92.

193. Pugliese A, Gianani R, Moromisato R, et al. HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes*. 1995;44:608–13.
194. Maclaren, N. K. & Riley, W. J. Inherited susceptibility to autoimmune Addison's disease is linked to human leukocyte antigens-DR3 and/or DR4, except when associated with type I autoimmune polyglandular syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, 455–459 (1986).
195. Boehm BO, et al. The HLA-DQ beta non-Asp-57 allele: a predictor of future insulin-dependent diabetes mellitus in patients with autoimmune Addison's disease. *Tissue Antigens* 37, 130–132 1991.
196. Huang W, et al. Although DR3-DQB1*0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1*0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2559–2563; 1996.
197. Yu L, et al. DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 328–335 (1999).
198. Myhre AG, Undlien DE, Løvås K, et al. Autoimmune adrenocortical failure in Norway autoantibodies and human leukocyte antigen class II associations related to clinical features. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87, 618–623.
199. Messaoui A, Tenoutasse S, Van der Auwera B, et al. Autoimmune Thyroid, Celiac and Addison's Diseases Related to HLA-DQ Types in Young Patients with Type 1 Diabetes in Belgium *Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, 2012, 2, 70-73.
200. Yu L, Brewer KW, Gates S, et al. DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(1):328-35.
201. González S, Rodrigo L, López-Vázquez A, et al. Association of MHC class I related gene B (MICB) to celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2004 Apr;99(4):676-80.
202. Bilbao JR, Martín-Pagola A, Calvo B, et al. Contribution of MIC-A polymorphism to type 1 diabetes mellitus in Basques. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Apr;958:321-4.

203. Gambelunghe G, Falorni A, Ghaderi M, et al. Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3701-7.
204. Reith W, Leibund Gut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(10): 793-806.
205. Ghaderi M, Gambelunghe G, Tortoioli C, et al. MHC2TA single nucleotide polymorphism and genetic risk for autoimmune adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(10): 4107-11.
206. Skinningsrud B, Husebye ES, Pearce SH, et al. Polymorphisms in CLEC16A and CIITA at 16p13 are associated with primary adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(9): 3310-7.
207. Cloutier JF, Veillette A. Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *EMBO* 1996; 15(18): 4909-18.
208. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 330-7.
209. Salmond RJ, Filby A, Quareshi I, et al.. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* 2009; 228(1): 9-22.
210. Cloutier JF, Veillette A. Cooperative Inhibition of T-Cell Antigen Receptor Signaling by a Complex between a Kinase and a Phosphatase. *J Exp Med* 1999; 189: 111–121.
211. Wu J, Katrekar A, Honigberg LA, et al. Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. *J Biol Chem* 2006; 281(16): 11002-10.
212. Bergman M, Mustelin T, Oetken C, et al. The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *EMBO J* 1992; 11: 2919-24.
213. Hasegawa K, Martin F, Huang G et al. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science* 2004; 303:685-9.

214. Zikherman J, Hermiston M, Steiner D, et al. PTPN22 deficiency cooperates with the CD45 E613R allele to break tolerance on a non-autoimmune background. *J Immunol* 2009; 182(7): 4093-106.
215. Lin X, Pelletier S, Gingras S, et al.. CRISPR-Cas9-Mediated Modification of the NOD Mouse Genome With Ptpn22R619W Mutation Increases Autoimmune Diabetes. *Diabetes* 2016; 65(8): 2134-8.
216. Vang T, Congia M, Macis MD, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 2005; 37: 1317-9.
217. Aarnisalo J, Treszl A, Svec P, et al. Reduced CD4+T cell activation in children with type 1 diabetes carrying the PTPN22/Lyp 620Trp variant. *J Autoimmun* 2008; 31(1): 13-21.
218. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 2004; 36: 337-8.
219. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004; 53: 3020-3.
220. Zhernakova A, Eerligh P, Wijmenga C, et al. Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population. *Genes Immun* 2005; 6(6): 459-61.
221. Steck AK, Liu SY, McFann K, et al. Association of the PTPN22/LYP gene with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2006; 7(5): 274-8.
222. Fichna M, Żurawek M, Januszkiewicz-Lewandowska D, et al. PTPN22, PDCD1 and CYP27B1 polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Polish patients. *Int J Immunogenet* 2010; 37(5): 367-72.
- 223 Okruszko A, Szepietowska B, Wawrusiewicz-Kurylonek N, et al. HLA-DR, HLA-DQB1 and PTPN22 gene polymorphism: association with age at onset for autoimmune diabetes. *Arch Med Sci* 2012; 8(5): 874-8.

224. Hermann R, Lipponen K, Kiviniemi M, et al. Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes. *Diabetologia* 2006; 49(6): 1198-208.
225. Hinks A, Worthington J, Thomson W. The association of PTPN22 with rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxf)* 2006; 45: 365-8.
226. Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 51(1): 219-24.
227. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 505-7.
228. Dultz G, Matheis N, Dittmar M, et al. The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes. *Thyroid* 2009; 19(2): 143-8.
229. Skórka A, Bednarczuk T, Bar-Andziak E, et al. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dose -dependent correlation with age of onset. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62: 679-82.
230. Luo L, Cai B, Liu F, et al. 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): 439-45.
231. Canton I, Akhtar S, Gavalas NG, et al. A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. *Genes Immun* 2005; 6: 584-7.
232. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, et al. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *N Engl J Med*. 2010; 362(18): 1686-97.
233. Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associated with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet* 2005; 561-71.

234. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, et al. 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): 5862-5.
235. Skinningsrud B, Husebye ES, Gervin K, et al. Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 977-82.
236. Roycroft M, Fichna M, McDonald D, et al. The tryptophan 620 allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22 gene) predisposes to autoimmune Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 70(3): 358-62.
237. Kahles H, Ramos-Lopez E, Lange B, et al. Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. *Eur J Endocrinol* 2005; 153(6): 895-9.
238. Huang JJ, Qiu YR, Li HX, et al. A PTPN22 promoter polymorphism -1123G>C is associated with RA pathogenesis in Chinese. *Rheumatol Int* 2012; 32(3): 767-71.
239. Orru V, Tsai SJ, Rueda B, et al. A loss-of-function variant of PTPN22 is associated with reduced risk of systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2009; 18(3): 569-79.
240. Dariavach P, Mattei MG, Golstain P, et al. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 1988; 18(12): 1901-05.
241. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1(5): 405-13.
242. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3(5): 541-7.
243. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 2018; 131(1): 58-67.
244. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 1992; 257(5071): 792-5.

245. Kavvoura FK, Ioannidis JP. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005; 162(1): 3-16.
246. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, et al. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 2000; 165(11):6606-11.
247. Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002; 54(1): 1-8.
248. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506-11.
249. Mayans S, Lackovic K, Nyholm C, et al. CT60 genotype does not affect CTLA-4 isoform expression despite association to T1D and AITD in northern Sweden. *BMC Medical Genetics* 2007; 8: 3.
250. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* 1996; 5(7): 1075-80.
251. Abe T, Takino H, Yamasaki H, et al. CTLA4 gene polymorphism correlates with the mode of onset and presence of ICA512 Ab in Japanese type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin pract* 1999. 46(2): 169-75.
252. Zhernakova A, Eerligh P, Barrera P, et al. CTLA4 is differentially associated with autoimmune diseases in the Dutch population. *Hum Genet* 2005; 118(1): 58-66.
253. Chen Z, Fei M, Fu D, et al. Association between cytotoxic T lymphocyte antigen-4 polymorphism and type 1 diabetes: a meta-analysis. *Gene* 2013; 516(2): 262-70.
254. Vaidya B, Imrie H, Perros P, et al. The cytotoxic T lymphocyte antigen-4 is a major Graves' disease locus. *Hum Mol Genet* 1999; 8(7): 1195-9.

255. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, et al. Association of a CTLA-4 3' untranslated region (CT60) single nucleotide polymorphism with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *Autoimmunity* 2005; 38(2): 151-3.
256. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(8): 3162-70.
257. Pawlak-Adamska E, Frydecka I, Bolanowski M, et al. CD28/CTLA-4/ICOS haplotypes confers susceptibility to Graves' disease and modulates clinical phenotype of disease. *Endocrine* 2017; 55(1): 186-199.
258. Lombardi A, Menconi F, Greenberg D, et al. Dissecting the Genetic Susceptibility to Graves' Disease in a Cohort of Patients of Italian Origin. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016; 7:21.
259. Donner H, Braun J, Seidl C, et al. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(12): 4130-2.
260. Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, et al.. Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. *Thyroid* 2002; 12(1): 3-6.
261. Pastuszak-Lewandowska D, Domańska D, Rudzińska M, et al. CTLA-4 polymorphisms (+49 A/G and -318 C/T) are important genetic determinants of AITD susceptibility and predisposition to high levels of thyroid autoantibodies in Polish children - preliminary study. *Acta Biochim Pol* 2013; 60(4): 641-6.
262. Agarwal K, Jones DE, Daly AK, et al. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 32(4): 538-41.
263. Miyake Y, Ikeda F, Takaki A, et al.. +49A/G polymorphism of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene in type 1 autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: A meta-analysis. *Hepatol Res* 2011; 41(2): 151-9.
264. Renton AE, Pliner HA, Provenzano C, et al. A genome-wide association study of myasthenia gravis. *JAMA Neurol* 2015; 72(4): 396-404.

265. Megiorni F, Mora B, Maxia C, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) +49AG and CT60 gene polymorphisms in Alopecia Areata: a case-control association study in the Italian population. *Arch Dermatol Res* 2013; 305(7): 665-70.
266. King AL, Moodie SJ, Fraser JS, et al.. Coeliac disease: investigation of proposed causal variants in the CTLA4 gene region. *Eur J Immunogenet* 2003; 30(6): 427-32.
267. Hunt KA, McGovern DP, Kumar PJ, et al. A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(4): 440-4.
268. Barton A, Jury F, Eyre S, et al. Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(3): 748-52.
269. Munoz-Valle JF, Valle Y, Padilla-Gutierrez JR, et al. 49A>G CTLA-4 polymorphism is associated with rheumatoid arthritis in Mexican population. *Clin Chim Acta* 2010; 411(9-10): 725-8.
270. Tang MJ, Zhou ZB. Association of the CTLA-4 +49A/G polymorphism with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Mol Biol Rep* 2013; 40(3): 2627-31.
271. Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, et al. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40(6): 662-7.
272. Zaletel K, Krhin B, Gaberscek S, et al. The influence of the exon 1 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene on thyroid antibody production in patients with newly diagnosed Graves' disease. *Thyroid* 2002; 12(5): 373-6.
273. Dultz G, Matheis N, Dittmar M, et al. CTLA-4 CT60 polymorphism in thyroid and polyglandular autoimmunity. *Horm Metab Res* 2009; 41(6): 426-9.
274. Houcken J, Degenhart C, Bender K, et al. PTPN22 and CTLA-4 Polymorphisms Are Associated With Polyglandular Autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103(5): 1977-84.
275. Howson JM, Dunger DB, Nutland S, et al. A type 1 diabetes subgroup with a female bias is characterised by failure in tolerance to thyroid peroxidase at an early age and a strong association with the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene. *Diabetologia* 2007; 50(4): 741-6.

276. Tolone C, Cirillo G, Papparella A, et al. A common CTLA4 polymorphism confers susceptibility to autoimmune thyroid disease in celiac children. *Dig Liver Dis* 2009; 41(6): 385-9.
277. Vaidya B, Imrie H, Geatch DR, et al. Association analysis of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) and autoimmune regulator-1 (AIRE-1) genes in sporadic autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol* 2000; 85(2): 688-91.
278. Brozzetti A, Mrzotti S, Tortoioli C, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 Ala17 polymorphism is a genetic marker of autoimmune adrenal insufficiency: Italian association study and meta-analysis of European studies. *Eur J Endocrinol* 2010; 162(2): 361-9.
279. Wolff AS, Mitchell AL, Cordel HJ, et al. CTLA-4 as a genetic determinant in autoimmune Addison's disease. *Genes Immun* 2015; 16(6): 430-6.
280. Perez de Nanclares G, Martin-Pagola A, Ramon Bilbao J, et al. No evidence of association of CTLA4 polymorphisms with Addison's disease. *Autoimmunity* 2004; 37(6-7): 453-6.
281. Nielsen NM, Westergaard T, Frisch M, et al. Type 1 diabetes and multiple sclerosis: A Danish population-based cohort study. *Arch neurol* 2006; 63:1001-4.
282. Nielsen NM, Frisch M, Rostgaard K, et al. Autoimmune diseases in patients with multiple sclerosis and their first-degree relatives: a nationwide cohort study in Denmark. *Mult Scler* 2008; 14:823-9.
283. Broadley SA, Deans J, Sawcer SJ, et al. Autoimmune disease in first-degree relatives of patients with multiple sclerosis. A UK survey. *Brain*. 2000;123 (Pt 6):1102-11.
284. Kuo CF, Grainge MJ, Valdes AM, et al. Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families. *JAMA Intern Med*. 2015;175(9):1518-26.
285. Anaya JM, Castiblanco J, Tobón GJ, et al. Familial clustering of autoimmune diseases in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Autoimmun*. 2006;26(3):208-14.
286. Parkkola A, Härkönen T, Ryhänen SJ, et al. Extended family history of autoimmune diseases and phenotype and genotype of children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(2):171-8

287. Bottazzo GF, Mann JI, Thorogood M, et al. Autoimmunity in juvenile diabetics and their families. *Br Med J*. 1978;2(6131):165-8.
288. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. The epidemiology of Graves' disease: evidence of a genetic and an environmental contribution. *J Autoimmun*. 2010;34(3):J307-13.
289. Spinner MW, Blizzard RM, Childs B. Clinical and genetic heterogeneity in idiopathic Addison's disease and hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1968;28(6):795-804.
290. Betterle C, Scarpa R, Garelli S, et al. Addison's disease: a survey on 633 patients in Padova. *Eur J Endocrinol*. 2013 Oct 21;169(6):773-84.
291. Fichna M, Fichna P, Gryczyńska M, et al. Screening for associated autoimmune disorders in Polish patients with Addison's disease. *Endocrine*. 2010;37(2):349-60.
292. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999; 14(5-6): 143-9.
293. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 – new capabilities and interfaces *Nucleic Acids Research* 40(15):e115.
294. Ruano G, Kidd KK. Coupled amplification and sequencing of genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2815-19.
295. Crow JF. Hardy, Weinberg and Language Impediments. *Genetics*, 1999; 152: 821-825.
296. Erichsen MM, Løvås K, Skinningsrud B, et al. Clinical, immunological, and genetic features of autoimmune primary adrenal insufficiency: observations from a Norwegian registry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4882-902009.
297. Dalin F, Nordling Eriksson G, et al. Clinical and Immunological Characteristics of Autoimmune Addison Disease: A Nationwide Swedish Multicenter Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Feb 1;102(2):379-389.
298. Leelarathna L, Breen L, Powrie JK, et al. Co-morbidities, management and clinical outcome of auto-immune Addison's disease. *Endocrine*. 2010 Aug;38(1):113-7.

299. Zelissen PMJ, Bast EJEG, Croughs RJM Associated Autoimmunity in Addison's Disease *Journal of Autoimmunity* 1995; 8, 121–130.
300. Ferreira L, Silva J, Garrido S, et al. Primary adrenal insufficiency in adult population: a Portuguese Multicentre Study by the Adrenal Tumours Study Group *Endocrine Connections* 2017; 6: 935–942.
301. Kasperlik-Załuska AA, Midalska B, Czarnocka B, et al. Association of Addison's disease with autoimmune disorders--a long-term observation of 180 patients. *Postgrad Med. J* 1991; 67(793): 984-987.
302. Skov J, Höijer J, Magnusson PKE, et al. Heritability of Addison's disease and prevalence of associated autoimmunity in a cohort of 112,100 Swedish twins *Endocrine* 2017; 58:521–527.
303. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* 2014; 35(3): 347-69.
304. Myhre AG, Undlien DE, Løvås K, et al. Autoimmune Adrenocortical Failure in Norway Autoantibodies and Human Leukocyte Antigen Class II Associations Related to Clinical Features *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 618–623, 2002.
305. Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Gender-specific incidence of autoimmune diseases from national registers. *J Autoimmun* 2016; 69: 102-106.
306. Addison T. On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsule. In: *A Collection of the Published Writings of the late Thomas Addison MD*. London: New Sydenham Society, 1868.
307. Gill L, Zarbo A, Isedeh P, Jacobsen G, Lim HW, Hamzavi I. Comorbid autoimmune diseases in patients with vitiligo: A cross-sectional study. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74(2): 295-302.
308. Schmidt MB. Einebiglandulare Erkrankung (Nebennieren und Schilddrüse) bei Morbus Addisonii. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1926; 21: 212-21.
309. Rowntree LG, Snell AM. *Mayo Clinic Monographs*. Philadelphia: WB Saunders; 1931. A clinical study of Addison's disease.

310. Meyer G, Neumann K, Badenhop K, et al. Increasing prevalence of Addison's disease in German females: health insurance data 2008–2012. *European Journal of Endocrinology* 2014; 170: 367–373.
311. Hoshiro M, Ohno Y, Masaki H, et al. Comprehensive study of urinary cortisol metabolites in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64(1): 37-45.
312. Lewandowski KC, Marcinkowska M, Skowrońska-Józwiak E, et al. New onset Graves' disease as a cause of an adrenal crisis in an individual with panhypopituitarism: brief report. *Thyroid Res* 2008; 1(1): 7.
313. Thomas JB, Petrovsky N, Ambler GR. Addison's disease presenting in four adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2004; 5(4): 207-11.
314. Passanisi S, Timpanoro T, Lo Presti D, et al. Recurrent hypoglycaemia in type-1 diabetes mellitus may unravel the association with Addison's disease: a case report. *BMC Res Notes* 2014; 7: 634.
315. Chantzichristos D, Persson A, Eliasson B, et al. Mortality in patients with diabetes mellitus and Addison's disease: a nationwide, matched, observational cohort study. *Eur J Endocrinol* 2017; 176(1): 31-39.
316. Rusak E, Chobot A, Krzywicka A, Wnezlau J. Anti-parietal cell antibodies - diagnostic significance. *Adv Med Sci* 2016; 61(2): 175-179.
317. El Ali Z, Fichna M, Piniewska J, Kosowicz J, et al. Chromogranin A as a useful neuroendocrine marker in patients with autoimmune Addison's disease. *J Endocrinol Invest* 2010; 33(3): 186-91.
318. Rodrigues M, Ezzedine K, Hamzavi I, Pandya AG, Harris JE; Vitiligo Working Group. New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2017; 77(1): 1-13.
319. Collins SM, Dominguez M, Ilmarinen T, et al. AD. Dermatological manifestations of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome. *Br J Dermatol* 2006; 154(6): 1088-93.
320. Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol Biol* 2011; 677:459-70.

321. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 1997; 18(1): 107-34.
322. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002; 47(4): 434-44.
323. Zhang ZL, Wang Y, Zhou W, et al. Addison's disease secondary to connective tissue diseases: a report of six cases. *Rheumatol Int* 2009; 29(6): 647-50
324. Satta MA, Corsello SM, Della Casa S, et al. A. Adrenal insufficiency as the first clinical manifestation of the primary antiphospholipid antibody syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 52(1): 123-6.
325. Cooper GS, Bynum ML, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun* 2009; 33(3-4): 197-207.
326. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, et al. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84(3): 223-43.
327. Vanderpump MPJ, Michael W, Tunbridge G. The Epidemiology of Autoimmune Thyroid Disease. In: *Autoimmune Endocrinopathies*, 1999; p. 141-162. Ed. Volpé R. Humana Press Inc. Totowa NJ.
328. McLeod DS., Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine* 2012; 42(2): 252-65.
329. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001; 2(9): 777-80.
330. Alhonen S, Korhonen S, Tapanainen P, et al. Extended family history of diabetes and autoimmune diseases in children with and without type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(1):115-7.
331. Anaya JM, Castiblanco J, Tobón GJ, et al. Familial clustering of autoimmune diseases in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Autoimmun*. 2006;26(3):208-1.

332. Barcellos LF, Kamdar BB, Ramsay PP, et al. Clustering of autoimmune diseases in families with a high-risk for multiple sclerosis: a descriptive study. *Lancet Neurol*. 2006;5(11):924-31.
333. Pytel V, Matías-Guiu JA, Torre-Fuentes L, et al. Familial multiple sclerosis and association with other autoimmune diseases. *Brain Behav*. 2017 Dec 19;8(1):e00899.
334. Walters HM, Pan N, Moorthy LN, et al. Patterns and influence of familial autoimmunity in pediatric systemic lupus erythematosus. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2012;10(1):22.
335. Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME, Cardiel MH, et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1138-47.
336. Cooper GS, Wither J, McKenzie T, et al. The prevalence and accuracy of self-reported history of 11 autoimmune diseases. *J Rheumatol*. 2008 Oct;35(10):2001-4.
337. Narita T, Oiso N, Fukai K, et al. Generalized vitiligo and associated autoimmune diseases in Japanese patients and their families. *Allergol Int*. 2011 Dec;60(4):505-8.
338. Krawczuk-Rybak M, Grygorczuk S, Urban M. Występowanie chorób o podłożu autoimmunoagresji w rodzinach dzieci chorych na cukrzycę typu I. *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism* 1999; 5(1): 21-7.
339. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Familial association between type 1 diabetes and other autoimmune and related diseases. *Diabetologia*. 2009;52(9):1820-8.
340. White K, Wass J, Elliott A. Inheritance in autoimmune Addison's: the extended family profile. *Endocrine Abstracts* 2007; 13: P114.
341. Ludvigsson JF, Ludvigsson J, Ekbom A, et al. Celiac disease and risk of subsequent type 1 diabetes: a general population cohort study of children and adolescents. *Diabetes Care* 2006; 29:2483–2488.
342. Askling J, Fored CM, Geborek P, et al. Swedish registers to examine drug safety and clinical issues in RA. 2006 *Ann Rheum Dis* 65:707–712.
343. Ramagopalan SV, Dymant DA, Valdar W, et al. Autoimmune disease in families with multiple sclerosis: a population-based study. *Lancet Neurol*. 2007 Jul;6(7):604-10.

344. Marson A, Housley WJ, Hafler DA. Genetic basis of autoimmunity. *J Clin Invest* 2015; 125(6): 2234-41.
345. Marquez A, Kerick M, Zhernakova A, et al. Meta-analysis of Immunochip data of four autoimmune diseases reveals novel single-disease and cross-phenotype associations. *Genome Med.* 2018; 10(1): 97.
346. Eaton WW, Rose NR, Kalaydjian A, et al. Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *J Autoimmun* 2007; 29(1): 1-9.
347. Dittmar M, Libich C, Brenzel T, et al. Increased familial clustering of autoimmune thyroid diseases. *Horm Metab Res* 2011; 43(3): 200-4.
348. Diaz-Valencia PA, Bougneres P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health* 2015; 15: 255. doi: 10.1186/s12889-015-1591-y.
349. Walicka M, Chlebus M, Brzozowska M, et al. Prevalence of diabetes in Poland in the years 2010–2014. *Clinical Diabetology* 2015;4(6):232-237.
350. Silverberg NB. The epidemiology of vitiligo. *Current Dermatology Reports* 2015; 4(1): 36-43.
351. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. Autoimmune gastritis in type 1 diabetes: a clinically oriented review. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(2): 363-71.
352. Batko B, Stajszyk M, Swierkot J, et al. Prevalence and clinical characteristics of rheumatoid arthritis in Poland: a nationwide study. *Arch Med. Sci* 2019; 15(1): 134-140.
353. Kimpimaki T, Kulmala P, Savola K, et al. Disease-associated autoantibodies as surrogate markers of type 1 diabetes in young children at increased genetic risk. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(3): 1126-32.
354. De Grijse J, Asanghanwa M, Nouthe B, et al. Predictive power of screening for antibodies against insulinoma-associated protein 2 beta (IA-2beta) and zinc transporter-8 to select first-degree relatives of type 1 diabetic patients with risk of rapid progression to clinical onset of the disease: implications for prevention trials. *Diabetologia* 2010; 53(3): 517-24.

355. Siriwardhane T, Krishna K, Ranganathan V, et al. Significance of Anti-TPO as an Early Predictive Marker in Thyroid Disease. *Autoimmune Dis* 2019; 28;2019:1684074.
356. Jonsdottir B, Larsson C, Carlsson A, et al. Thyroid and Islet Autoantibodies Predict Autoimmune Thyroid Disease at Type 1 Diabetes Diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102(4): 1277-1285.
357. Coco G, Dal pra C, Presotto F, et al. Estimated risk for developing autoimmune Addison's disease in patients with adrenal cortex autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(5): 1637-45.
358. Kozhakhmetova A, Wyatt RC, Caygill C, et al. A quarter of patients with type 1 diabetes have co-existing non-islet autoimmunity: the findings of a UK population-based family study. *Clin Exp Immunol* 2018; 192(3): 251-58.
359. Tromer Y, Dolan LM, Kahaly G, et al. Genome wide identification of new genes and pathways in patients with both autoimmune thyroiditis and type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2015; 60: 32-9.
360. Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, et al. IA-2 antibodies – a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 1998; 41: 424-9.
361. Niechciał E, Rogowicz-Frontczak A, Piłaciński S, et al. Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age and metabolic state in patients with newly diagnosed autoimmune diabetes. *Acta Diabetol* 2018; 55(3): 287-94.
362. Siljander HT, Veijola R, Reunanen A, Virtanen SM, et al. . Prediction of type 1 diabetes among siblings of affected children and in general population. *Diabetologia* 2007; 50: 2272-5.
363. Dal Pilar Larosa M, Chen S, Steinmaus N, et al. A new ELISA for autoantibodies to steroid 21-hydroxylase. *Clin Chem Lb Med.* 2018; 56(6): 933-938.
364. Colls J, Betterle C, Volpato M, et al. Furmaniak J. Immunoprecipitation assay for autoantibodies to steroid 21-hydroxylase in autoimmune adrenal diseases. *Clin Chem* 1995; 41(3): 375-80.

365. Betterle C, Coco G, Zanchetta R. Adrenal cortex autoantibodies in subjects with normal adrenal function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19(1): 85-99.
366. Falorni A, Laureti S, Nikoshokov A, et al. 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with endocrine autoimmune diseases are highly specific for Addison's disease. *Belgian Diabetes Registry. Clin Exp Immunol* 1997; 107(2): 341-6.
367. Silva RC, Sallorenzo C, Kater CE, et al. Autoantibodies against glutamic acid decarboxylase and 21-hydroxylase in Brazilian patients with type 1 diabetes or autoimmune thyroid diseases. *Diabetes Nutr Metab* 2003; 16(3): 160-8.
368. Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimotos' thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2019; 26: 101367.
369. Lazurova I, Benhatchi K. Autoimmune thyroid diseases and nonorgan specific autoimmunity. *Pol Arch Med Wewn* 2012; 122 Suppl 1: 55-9.
370. Winkler C, Jolink M, Knopff A, et al. HLA, and Sex Define a Marked Risk of Organ-Specific Autoimmunity in First-Degree Relatives of Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2019; 42(9): 1684-1691.
371. Betterle C, Lazzarotto F, Fusari A, et al. Pancreatic autoantibodies in Italian patients with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus over the age of 20 years. *Acta Diabetol* 2006; 43(3): 79-83.
372. Rogowicz-Frontczak A, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Litwinowicz M, et al. Are zinc transporter type 8 antibodies a marker of autoimmune thyroiditis in non-obese adults with new-onset diabetes? *Eur J Endocrinol* 2014; 170(4): 651-8.
373. Rydzewska M, Michalak J, Bossowska A, et al. Analysis of diabetes-associated autoantibodies in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2019; 32(4): 355-61.
374. Karagzuel G, Simsek S, Deger O, et al. Screening of diabetes, thyroid, and celiac diseases-related autoantibodies in a sample of Turkish children with type 1 diabetes and their siblings. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 80(2): 238-243.

375. Bingley PJ, Boulware DC, Kirscher JP, et al. The implications of autoantibodies to a single islet antigen in relatives with normal glucose tolerance: development of other autoantibodies and progression to type 1 diabetes. *Diabetologia* 2016; 59(3): 542-9.
376. Sallorenzo C, Silva R, Kasamatsu T, et al.. Prevalence of pancreatic autoantibodies in non-diabetic patients with autoimmune thyroid disease and its relation to insulin secretion and glucose tolerance. *Arch Endocrinol Metab* 2017; 61(4): 361-66.
377. Jonsdottir B, Jonsson I, Lantz M. Prevalence of diabetes and presence of autoantibodies against zinc transporter 8 and glutamic decarboxylase at diagnosis and at follow up of Graves' disease. *Endocrine* 2019; 64(1): 48-54.
378. Fichna M, Rogowicz-Frontczak A, Zurawek M, et al. Positive autoantibodies to ZnT8 indicate elevated risk for additional autoimmune conditions in patients with Addison's disease. *Endocrine* 2016; 53(1): 249-57.
379. Incani M, Serafini C, Satta C, et al, High prevalence of diabetes-specific autoimmunity in first-degree relatives of Sardinian patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2017; 33(3): doi: 10.1002/dmrr.2864. Epub 2016 Nov 30.
380. Irvine WJ, Stewart AG, Scarth L. A clinical and immunological study of adrenocortical insufficiency (Addison's disease). *Clin Exp Immunol* 1967; 2(1): 31-70.
381. Mitchell AL, Pearce SH. Autoimmune Addison's disease: pathophysiology and genetic complexity. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8(5): 306-16.
382. Harjutsalo V, Reunanen A, Tuomilehto J. Differential transmission of type 1 diabetes from diabetic fathers and mothers to their offspring. *Diabetes* 2006; 55(5): 1517-24.
383. Heggarty H. Addison's disease in identical twins. *Br Med. J* 1968; 1(5591): 559. oraz Slimmonds JP. Lister J. Auto-immune Addison's disease in identical twins. *Postgrad Med J* 1978; 54(634): 552-4.
384. Park YS, Sanjeevi CB, Robles D, et al. Additional association of intra-MHC genes, MICA and D6S273, with Addison's disease. *Tissue Antigens* 2002; 60: 155-63.
385. Wray, N. & Visscher, P. Estimating trait heritability. *Nature Education* 2008; 1(1):29.

386. Hansen PS, Brix TH, Iachine I, et al. 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(1): 29-38.
387. Kyvik KO, Green A, Beck-Nielsen H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ* 1995; 311: 913–7.
388. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, et al. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes* 2003; 52(4): 1052–1055.
389. Weinstock C, Matheis N, Barkia S, et al. Autoimmune polyglandular syndrome type 2 shows the same HLA class II pattern as type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2011; 77(4): 317-24.
390. Flesch BK, Matheis N, Alt T, et al. HLA class II haplotypes differentiate between the adult autoimmune polyglandular syndrome types II and III. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(1): E177-82.
391. Sharma A, Liu X, Hadley D, Hagopian W, et al. Identification of non-HLA genes associated with development of islet autoimmunity and type 1 diabetes in the prospective TEDDY cohort. *J Autoimmun* 2018; 89: 90-100.
392. Chelala C, Duchatelet S, Joffret ML, et al. PTPN22 R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. *Diabetes* 2007; 56(2): 522-6.
393. Brorsson CA, Pociot F; Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Shared Genetic Basis for Type 1 Diabetes, Islet Autoantibodies, and Autoantibodies Associated With Other Immune-Mediated Diseases in Families With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2015; 38 Suppl 2: S8-13.
394. Maziarz M, Janer M, Roach JC, et al. A; Swedisch Childhood Diabetes Register; Diabetes Incidence in Sweden Study Group. The association between the PTPN22 1858C>T variant and type 1 diabetes depends on HLA risk and GAD65 autoantibodies. *Genes Immun* 2010; 11(5): 406-15.
395. Petrone A, Suraci C, Capizzi M, et al. The protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 (PTPN22) is associated with high GAD antibody titer in latent autoimmune diabetes in adults: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study 3. *Diabetes Care* 2008; 31(3): 534-8.

396. Kordonouri O, Hartmann R, Charpentier N, et al. Genetic risk markers related to diabetes-associated autoantibodies in young patients with type 1 diabetes in Berlin, Germany. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 118(4): 245-9.
397. Plagnol V, Howskon JM, Smyth DJ, et al. Type 1 Diabetes Genetics Consortium, Bingley PJ, Gough S.C., Todd JA. Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. *PLoS Genet* 2011; 7(8):e1002216.
398. Andersen MK, Lundgren V, Isomaa B, et al. Association of variants in HLA-DQA1-DQB1, PTPN22, INS, and CTLA4 with GAD autoantibodies and insulin secretion in nondiabetic adults of the Botnia Prospective Study. *Eur J Endocrinol* 2012; 167(1): 27-33.
399. Mainardi-Novo DT, Santos AS, Fukui RT, et al. The PTPN22 1858T allele but not variants in the proximal promoter region of IL-21 gene is associated with the susceptibility to type 1 diabetes and the presence of autoantibodies in a Brazilian cohort. *Clin Exp Immunol* 2013; 172(1): 16-22.
400. Araujo DB, Skarstrand H, Barone B, et al. Zinc transporter 8 autoantibodies in patients with type 1 diabetes from a multiethnic population and their first degree relatives. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014; 58(7): 737-43.
401. Mochizuki M, Amemiya S, Kobayashi K, et al. Association of the CTLA-4 gene 49 A/G polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children. *Diabetes Care* 2003; 26(3): 843-7.
402. Van der Auvera BJ, Vandewalle CL, Schuit FC, et al. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) independently from age and from other genetic or immune disease markers. The Belgian Diabetes Registry. *Clin Exp Immunol* 1997; 110(1): 98-103.
403. Vaidya B, Oakes EJ, Imrie H, et al. CTLA4 gene and Graves' disease: association of Graves' disease with the CTLA4 exon 1 and intron 1 polymorphisms, but not with the promoter polymorphism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58(6): 732-5.
404. Tomer Y, Greenberg DA, Barbesino G, et al. CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 86(4): 1687-93.

405. Ban Y, Davies TF, Greenberg DA, et al. Analysis of the CTLA-4, CD28, and inducible costimulator (ICOS) genes in autoimmune thyroid disease. *Genes Immun* 2003; 4(8): 586-93.
406. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 299-309.

10. ZAŁĄCZNIK NR 1 – ANKIETA BADAWCZA

Ocena ryzyka rozwoju narządowo swoistych schorzeń układu dokrewnego u krewnych pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą Addisona

Proszę uważnie przeczytać listę 23 chorób autoimmunologicznych i zaznaczyć, które z nich występują w Państwa rodzinie – kim jest dla Pani/Pana osoba chora (np. kuzynka), w którym roku urodziła się ta osoba i w jakim wieku zachorowała na daną chorobę.

UWAGA! Prosimy zaznaczać jedynie choroby zdiagnozowane wcześniej przez lekarza, natomiast nie schorzenia których istnienie podejrzewacie Państwo na podstawie opisu.

	Choroba autoimmunizacyjna	Krótki opis choroby	Kto choruje – proszę zaznaczyć kółkiem (ew. dopisać jeśli nie ma na liście)	Rok urodzenia tej osoby, np. 1967	Wiek rozpoznania choroby u krewnego, np. 36 lat
1	Choroba Addisona = niedoczynność nadnerczy	niewydolność nadnerczy wymagająca stałego pobierania Hydrocortisonu i często Cortineffu, objawy które Państwo znacie: ciemnienie skóry, słabnięcie, niskie ciśnienie, nudności/wymioty, zmęczenie, itd. (uwaga, pytanie NIE dotyczy	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od		

		niewydolności nadnerczy po ich usunięciu z różnych przyczyn)	strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
2	Niedoczynność tarczycy = choroba Hashimoto, inaczej przewlekłe lub autoimmunologiczne zapalenie tarczycy	niewydolność tarczycy, wymagająca stałego pobierania hormonów tarczycy w tabletkach (leki: Euthyrox, Letrox, Eltroxin)	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
3	Nadczynność tarczycy lub inaczej choroba Graves-Basedowa	nadmierna aktywność tarczycy, wymagająca leczenia Thyrozolem lub Metizolem, albo podania jodu radioaktywnego lub operacji; bywa że	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki,		

		towarzyszy jej wytrzeszcz oczu (orbitopatia)	ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
4	Cukrzyca typu 1	cukrzyca na zastrzykach insuliny od początku leczenia (bez okresu na tabletkach, jak w cukrzycy typu 2), zazwyczaj rozpoznana w młodszym wieku, ale czasem też u starszych osób. Zwykle nie są to osoby z otyłością w momencie rozpoznania, raczej występuje utrata masy ciała, oddawanie dużych ilości moczu i osłabienie	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		

5	Przedwczesna menopauza = przedwczesne wygasanie czynności jajników	koniec miesiączek u kobiety przed 40 rokiem życia (NIE spowodowany operacją, chemioterapią, ani radioterapią, tylko o niejasnej przyczynie, bez konkretnej innej choroby)	matka, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, siostra, kuzynka, córka, wnuczka		
6	Niedoczynność przytarczyc	stan chorobowy przytarczyc, powodujący niskie stężenia wapnia we krwi, skurcze i drętwienia mięśni oraz konieczność stałego pobierania dużych dawek wapnia i witaminy D (uwaga, pytanie NIE dotyczy osób z uszkodzeniem przytarczyc po usunięciu tarczycy lub radioterapii szyi)	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
7	Autoimmunologiczne zapalenie przysadki =	choroba przysadki powodująca niedostateczną produkcję jej hormonów, które sterują wzrostem, czynnością	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca,		

	limfocytarne zapalenie przysadki	tarczycy, nadnerczy, jąder i jajników; wymaga stałego pobierania hormonów z zewnątrz	dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
8	Bielactwo (<i>vitiligo</i>)	obszary odbarwień na skórze w postaci stopniowo powiększających się białych plam, które stają się szczególnie wyraźne po opaleniu się reszty skóry; plamy mogą występować w różnej liczbie i w różnych okolicach ciała	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		

9	Łysienie plackowate	place łysienia lub całkowite łysienie na głowie, które szybko postępuje, nie poddaje się leczeniu kremami i maściami, czasami ulega samoistnej poprawie i znów nawraca	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
10	Łuszczyca	łuszczące się rumieniowe zmiany na skórze, okresowo ulegające pogorszeniu, mogą być swędzące, pękać i pokrwawiać, np. w sytuacji stresu, zimą albo pod wpływem niektórych leków	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat,		

			kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
11	Niedobór witaminy B12 = niedokrwistość złośliwa = choroba Addisona- Biermera	zaburzenie wchłaniania witaminy B12, które powoduje konieczność podawania tej witaminy w formie zastrzyków domięśniowych, zwykle 1x w miesiącu	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
12	Przewlekłe zanikowe zapalenie żołądka (potwierdzone w badaniu wycinków uzyskanych podczas gastroskopii!!!)	stan zapalny błony śluzowej żołądka, który nie daje tak ciężkich objawów jak wrzody, ale jest przewlekły i może prowadzić do zaburzeń wchłaniania, m.in. witaminy B12 powodując rozwój niedokrwistości złośliwej; bez udziału bakterii <i>H.pylori</i>	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od		

			strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
13	Celiakia = choroba trzewna (potwierdzona w gastrokopii i oznaczeniach przeciwciał)	choroba polegająca na nietolerancji pokarmowej glutenu i wymagająca diety bezglutenowej	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
14	Choroba Leśniowskiego-Crohna lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego (colitis ulcerosa)	przewlekłe i nawracające stany zapalne jelit, charakteryzujące się bólami brzucha i biegunkami, wymagające leczenia immunosupresyjnego, pobierania	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki,		

		sterydów, a często nawet operacji z usuwaniem odcinka jelit	ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
15	Autoimmunologiczne zapalenie wątroby lub Pierwotna marskość żółciowa	ciężkie choroby wątroby o postępującym przebiegu i nieznanym przyczynie (bez zakażeń wirusowych, udziału toksyn ani alkoholu), prowadzące do niewydolności tego organu, często z towarzyszącą żółtaczką	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
16	Reumatoidalne zapalenie stawów	NIE zmiany zwyrodnieniowe stawów spowodowane wiekiem i przeciążeniami,	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony		

		tylko ciężka choroba zapalna z poranną sztywnością obrzękniętych stawów, deformacjami palców lub większych stawów; często leczona za pomocą długotrwanie stosowanych sterydów	matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
17	Zespół Sjogrena = zespół suchości	choroba tkanki łącznej objawiająca się suchością: niedostatecznym wydzielaniem łez i śliny (zespół suchego oka, suchość w ustach)	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		

18	Toczeń układowy	choroba tkanki łącznej charakteryzująca się zmianami skórnymi (np. rumień na twarzy w kształcie motyla), stawowymi, a często też uszkodzeniem nerek, które może prowadzić do niewydolności nerek	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
19	Skleroderma = twardzina układowa	choroba tkanki łącznej cechująca się stwardnieniem skóry oraz przewlekłym i postępującym włóknieniem narządów wewnętrznych, np. płuc, przełyku, nerek, prowadzącym do zaburzeń ich czynności	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat,		

			kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
20	Zespół antyfosfolipidowy	choroba z tendencją do zakrzepów, udarów i nawracających poronień; we krwi często stwierdza się obecność przeciwciał antykaroliolipinowych	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
21	Stwardnienie rozsiane	choroba ośrodkowego układu nerwowego, charakteryzująca się postępującym zmęceniem, zapaleniem nerwu wzrokowego z zaburzeniami widzenia barw lub jednostronną ślepotą, zaburzeniami czucia i sztywnością mięśni,	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od		

		niedowładami kończyn, zaburzeniem równowagi i koordynacji ruchowej	strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
22	Samoistna plamica małopłytkowa	choroba z niską liczbą płytek krwi bez znanej przyczyny; może charakteryzować się rumieniem skórnym oraz skłonnością do krwawień	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca, dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk		
23	Miastenia = choroba Erba-Goldflama	przewlekła choroba charakteryzująca się osłabieniem mięśni, ich zwiększoną męczliwością, powodująca trudność w	matka, ojciec, babcia od strony ojca, babcia od strony matki, dziadek od strony ojca,		

		<p>wykonywaniu powtarzalnych ruchów; może objawiać się m.in. opadaniem powiek, podwójnym widzeniem, obejmować mięśnie twarzy oraz zaburzać połykanie i chodzenie.</p>	<p>dziadek od strony matki, ciotka od strony mamy/ciotka od strony taty, wujek – od strony mamy, stryj – od strony taty, siostra, brat, kuzyn, kuzynka, córka, syn, wnuczka, wnuk</p>		
--	--	---	---	--	--

11. OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W POZNANIU



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 1051/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 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 (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 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. 1014 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); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. I w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, 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); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobiotycznych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrych Praktyk Klinicznych (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia 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 wiszczania 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 11 października 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu i główny badacz: dr hab. med. Marta Fichna

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób
Wewnętrznych oraz Klinika Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

*Członkowie zespołu
badawczego:*

**dr med. Monika Litwinowicz
prof. dr hab. Piotr Fichna
lek. Piotr Mafecki**

Temat badań:

**„Ocena ryzyka rozwoju narządowo swoistych schorzeń układu
dokrewnego u krewnych pacjentów z autoimmunologiczną chorobą
Addisona”.**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu poprawek wprowadzonych
do protokołu powyższego badania, polegających na rozszerzeniu składu zespołu
badawczego (jak wyżej), zgodnie z Aneks nr 2 z dnia 11.10.2018r. do Uchwały
Komisji Bioetycznej nr 539/17 z dnia 11.05.2017r. (Aneks nr 1 z dnia 04.01.2018r.)
Metodyka pozostaje bez zmian.**

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński