

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Katarzyna Lizis- Kolus

Ocena wpływu niedoboru witaminy D na przebieg choroby
Hashimoto u chorych w województwie świętokrzyskim

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Alicja Hubalewska-Dydejczyk

Pracę wykonano w Klinice Endokrynologii
Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach
Kierownik: dr n. med. Aldona Kowalska
we współpracy z
Pracownią Genetyki Kliniki i Katedry Endokrynologii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik: Prof. dr hab. Alicja Hubalewska-Dydejczyk

Kraków, rok 2015

*Pragnę wyrazić podziękowania
Mojemu Promotorowi,*

*Szanownej Pani Profesor dr hab. Alicji Hubalewskiej-Dydejczyk za wielką życzliwość , motywację,
poświęcony czas i nieocenioną pomoc merytoryczną w realizacji przewodu i dysertacji doktorskiej.*

*Szczególne podziękowania składam również Pani magister Annie Skalniak oraz Panu magistrowi
Jakubowi Piątkowskiemu za merytoryczną pomoc w realizacji badań genetycznych niezbędnych w
mojej pracy.*

*Dziękuję Pani dr n. med. Aldonie Kowalskiej oraz Dyrekcji Świętokrzyskiego Centrum Onkologii za
wyrażenie zgody na przeprowadzenie badań koniecznych w realizacji pracy*

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
2. WSTĘP	12
2.1. WITAMINA D.....	12
2.1.1. Historia odkrycia witaminy D.....	12
2.1.2. Synteza i metabolizm witaminy D.....	13
2.1.3. Mechanizm działania witaminy D... ..	15
2.1.3.1. <i>Mechanizm genomowy i receptor VDR</i>	15
2.1.3.2. <i>Mechanizm pozagenomowy</i>	17
2.1.3.3. <i>Efekty klasyczne działania witaminy D na homeostazę</i> <i>wapniowo-fosforanową</i>	19
2.1.3.4. <i>Efekty nieklasyczne – plejotropowe działania witaminy D</i>	20
2.1.4. Wpływ witaminy D na układ immunologiczny.....	22
2.1.5. Definicja niedoboru witaminy D.....	25
2.1.6. Epidemiologia niedoboru witaminy D.....	26
2.1.6.1. <i>Przyczyny niedoboru witaminy D</i>	28
2.1.6.2. <i>Ocena stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D</i>	29
2.2. CHOROBA HASHIMOTO.....	30
2.2.1. Definicja choroby Hashimoto.....	30
2.2.2. Epidemiologia choroby Hashimoto.....	30
2.2.3. Patogeneza choroby Hashimoto.....	32
2.2.3.1. <i>Czynniki genetyczne</i>	32
2.2.3.2. <i>Czynniki środowiskowe</i>	38
2.2.4. Mechanizmy rozwoju autoimmunologicznego zapalenia tarczycy.....	39
2.2.5. Historia naturalna choroby Hashimoto.....	42
2.2.6. Witamina D jako czynnik modulujący proces autoimmunizacyjny w przebiegu choroby Hashimoto.....	42
3. CELE PRACY	44
4. MATERIAŁ I METODY	45
4.1. BADANA GRUPA.....	45
4.2. PROTOKÓŁ BADANIA.....	46
4.3. PROCEDURY OZNACZEŃ BIOCHEMICZNYCH I HORMONALNYCH.....	47
4.3.1. Oznaczenie stężenia TSH.....	47
4.3.2. Oznaczenie stężenia a/TPO i a/Tg.....	48

4.3.3. Oznaczenie stężenia PTH.....	49
4.3.4. Oznaczenie stężenia 25OHD3.....	50
4.3.5. Oznaczenie stężenia Ca.....	51
4.3.6. Oznaczenie stężenia P.....	52
4.4. PROCEDURY GENETYCZNE – ANALIZA GENU <i>HLA-DRB1</i>	53
4.5. BADANIE ULTRASONOGRAFICZNE.....	54
4.6. ANALIZA STATYSTYCZNA.....	55
5. WYNIKI.....	56
5.1. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP.....	56
5.1.1. Grupa badana vs. grupa kontrolna	56
5.1.2. Porównanie wyników badań w obydwu grupach	58
5.2. Analiza zależności wieku ze stężeniami PTH, Ca i P w grupie z chorobą Hashimoto oraz w grupie kontrolnej.....	64
5.3. Porównanie wyników badań pomiędzy podgrupą E a grupą kontrolną.....	65
5.4. Analiza zależności wieku ze stężeniami PTH, Ca i P w podgrupie E oraz w grupie kontrolnej.....	67
5.5 Wpływ wybranych czynników na stężenie 25OHD3 w grupie badanej z chorobą Hashimoto.....	68
5.5.1. Ocena wpływu wieku na stężenie 25OHD3 w grupie z chorobą Hashimoto.....	68
5.5.2. Ocena wpływu czasu trwania choroby na stężenia 25OHD3 w grupie z chorobą Hashimoto.....	69
5.5.3. Ocena zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 w obrębie grupy badanej z chorobą Hashimoto a stanem czynnościowym gruczołu tarczowego.....	70
5.6. Ocena zależności pomiędzy wiekiem pacjentów i czasem trwania procesu autoimmunizacyjnego a stężeniem 25OHD3 w podgrupie E.....	71
5.7. Ocena związku stężenia 25OHD3 z aktywnością choroby Hashimoto na podstawie stężeń przeciwciał przeciwtarczycowych: a/TPO i a/Tg w całej grupie badanej.....	72
5.7.1. Ocena związku stężenia 25OHD3 z aktywnością choroby Hashimoto na podstawie stężenia a/TPO w całej badanej grupie.....	72

5.7.2. Ocena związku stężenia 25OHD3 z aktywnością choroby Hashimoto w całej grupie badanej na podstawie stężenia a/Tg.....	73
5.7.3. Ocena zależności stężenia 25OHD3 od bezwzględnych wartości stężeń a/TPO i a/Tg w grupie z chorobą Hashimoto.....	75
5.8. Ocena stężenia 25OHD3 w zależności od aktywności choroby Hashimoto ocenionej na podstawie dodatnich przeciwciał a/TPO i/lub a/Tg w podgrupie E....	76
5.9. Ocena związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a PTH, Ca i P w grupie chorych z chorobą Hashimoto.	77
5.9.1. Ocena związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH w grupie badanej chorobą Hashimoto.....	77
5.9.2. Ocena zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem Ca oraz P w grupie z chorobą Hashimoto.....	77
5.10. Analiza związku pomiędzy długością czasu trwania choroby a stężeniem PTH, Ca i P w grupie osób z chorobą Hashimoto.....	78
5.11. Analiza pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH, Ca i P w podgrupie pacjentów w podgrupie E.....	78
5.12. Analiza związku pomiędzy długością czasu trwania choroby a stężeniem PTH, Ca i P w podgrupie E.....	79
5.13. Analiza stężenia 25OHD3 w zależności od objętości gruczołu tarczycowego w badaniu ultrasonograficznym w grupie badanej z chorobą Hashimoto.....	80
5.14. Analiza stężenia 25OHD3 w zależności od objętości gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym w podgrupie E.....	81
5.15. Analiza genu <i>HLA-DRB1</i> u części osób w obrębie grupy badanej pacjentów z chorobą Hashimoto	82
5.15.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów z chorobą Hashimoto, u których dokonano analizy genu <i>HLA-DRB1</i>	82
5.15.2. Częstość występowania alleli genu <i>HLA-DRB1</i> w przeanalizowanej części osób z chorobą Hashimoto.....	82
5.15.3. Ocena porównawcza częstości występowania poszczególnych alleli genu <i>HLA-DRB1</i> pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną	84
5.15.4. Zależność pomiędzy średnimi stężeniami 25OHD3 a analizowanymi allelami genu <i>HLA-DRB1</i>	84

5.15.5. Analiza związku pomiędzy przedziałami stężeń 25OHD3 i wystąpieniem poszczególnych alleli genu <i>HLA-DRB1</i>	86
5.16. PODSUMOWANIE UZYSKANYCH WYNIKÓW	88
5.17. UWAGI KRYTYCZNE DOTYCZĄCE WYKONANYCH BADAŃ.....	94
6. DYSKUSJA I OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	96
7. WNIOSKI KOŃCOWE.....	119
8. STRESZCZENIE.....	121
9. SUMMARY.....	126
10. SPIS RYCIN I TABEL.....	132
11. PIŚMIENNICTWO.....	137

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AIDS – *acquired immune deficiency syndrome*, zespół nabytego niedoboru odporności

AITD – *autoimmunology thyroid disease*, autoimmunizacyjna choroba tarczycy

APAF-1 – *apoptotic protease activating factor-1*, proapoptyczny czynnik aktywujący proteazę 1

APC – *antigen presenting cell*, komórki prezentujące antygen

Apo-1 – *apoptosis antigen- 1*, antygen apoptozy-1

Apo2 ligand = tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL), ligand indukujący apoptozę, związany z czynnikiem martwicy nowotworów

Arg – arginina

a/Tg – *anti-thyroglobulin antibodies* przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie

a/TPO – *anti-thyroid peroxidase antibodies*, przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej

a/TSH-R – *thyrotropin receptor antibodies*, przeciwciała przeciwko receptorowi dla TSH

B cell – komórki B, limfocyty B

Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*, heterogenna grupa białek działających anty- apoptotycznie

BCR – *B Cell Receptor*, receptor komórek B

BGLAP – *bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein*, osteokalcyna

Bid - *BH3 – interacting domain death agonist*, gen proapoptyczny

BMI – *body mass index*, wskaźnik masy ciała

Ca – wapń

Ca⁺⁺ – wapń zjonizowany

CD4⁺, 1a, 40, 83, 86 – *cluster of differentiation, glikoproteiny* występująca na powierzchni komórek układu odpornościowego

CDK – *cyclin dependent kinase*, kinaza cyklino-zależna

CDKN1A – *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* zależny od cykliny inhibitor kinazy 1A

CMIA – *Chemiluminescent Microparticle Immunassay*, test immunologiczny, w którym antygen lub przeciwciało jest znakowane cząsteczką zdolną do emitowania światła podczas reakcji chemicznej

Csk – *C-terminal Src kinase*, C-końcowa kinaza Scr

CTLA4 – *ang. cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*, cytotoksyczne limfocyty T związane z białkiem 4

Cx 26, 32, 43 – *connexin* 26, 32, 43 – koneksyna 26, 32, 43
CYP – *cytochrome protein* , białko cytochromu
CYP27A1, CYP3A4, CYP2R1, CYP24A1– białka enzymatyczne należące do grupy
cytochromu P450
CYP24 – 24-hydroksylaza witaminy D
CYP27B1 – 1 α -hydroksylaza, enzym odpowiadający za hydroksylację 25OHD3 w pozycji 1
DBP – *vitamin D binding protein*, α -globulina wiążąca witaminę D
E2 – estradiol
EGF – *epidermal growth factor*, naskórkowy czynnik wzrostu
ERK – *extracellular-signal-regulated kinase*, kinaza regulująca pozakomórkowy mym
sygnałem, regulująca proces transkrypcji
FAP-1 – *Fas-associated phosphatase-1*, związana z Fas fosfataza 1
Fas – receptory śmierci
Fc γ R – receptory obecne na komórkach układu immunologicznego
Fok1, Bsm1, Taq1, Apa1, Poly (A) – polimorfizmy VDR
FoxP3 – *forhead box P3*, czynnik transkrypcyjny
FT3 – free triiodothyronine, wolna trójjodotytonina
FT4 – *free thyroxine*, wolna tyroksyna
G0,G1, S – fazy cyklu komórkowego
GD – Grave's disease, choroba Graves-Basedowa
Gln – glicyna
GM-CSF – *granulocyte-macrophages colony stimulating factor*, czynnik stymulujący
tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
His – histydyna
HELENA – Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence, projekt badawczy,
w którym dokonano oceny niedoboru witaminy D w populacji osób w wieku
dojrzwania
HLA-DR – *human leukocyte antigen*, system antygenów ludzkich leukocytów DR
HT – *Hashimoto thyroiditis*, zapalenie tarczycy Hashimoto, choroba Hashimoto
IAP – *inhibitor of apoptosis*, białko będące inhibitorem apoptozy
ICAM-1 – *intracellulare adhessive molekule*, wewnątrzkomórkowe molekuly adhezyjnych-1
IGF – *insulin-like growth factor* , insulino-podobny czynnik wzrostu
IL-2, 5, 6, 10, 12, 17, 21 – *interleukin*, interleukiny
INF- γ – *interferon γ* , interferon gamma

Lck, Fyn i Zap-70 – rodzaje kinaz tyrozynowych

Leu – leucyna

LPS – *liposacharid*, liposacharyd

Lys – lizyna

Lyp – *lymphoid proteintyrosine phosphatase*, limfocytarna fosfataza tyrozynowa

Me – mediana

MEK – *mitogen-activated protein kinase*, kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny

MEKK-1 – *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*, kinaza białkowa kinazy kinazy aktywowanej miogieniem

MHC – *major histocompatibility complex*, główny układ zgodności tkankowej

mRNA – *messenger RNA*, przekaźnikowy, informacyjny kwas rybonukleinowy

NHANES III – *The National Health and Nutrition Examination Survey III*, nazwa międzynarodowego badania dot. zdrowia i odżywiania

OPTIFORD – *Towards a Strategy for Optimal Vitamin D Fortification*, projekt badawczy dotyczący oceny niedoboru witaminy D

P – fosfor

p27, p21, p38 – *protein 27, protein 21*, białka należące do rodziny inhibitorów kinaz cyklino-zależnych

PAMPs – *patogen associated molecular patterns*, molekuły związane z patogenami

PDS – *Pendred syndrome*, zespół Pendreda

PGE2 – *prostaglandin E2*, prostaglandyna E2

PI3K – *ang. phosphatidyloinozitol 3-kinase*, 3-kinaza fosfatydyloinozytolu

PKC – *protein kinase C*, kinaza białkowa C

PLC – *phospholipase C*, fosfolipaza C

PPHPT – *Primary Hyperparathyroidism*, pierwotna nadczynność przytarczyc

PTH – parathormonu PTH

PTHrP – *PTH-related peptide*, peptyd PTH - podobny

PTPN22 – *protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22*, białko fosfatazy tyrozynowej, receptora typu non-22

Q₁ – kwartyl dolny

Q₃ – kwartyl dolny

RAF/MAPK – *rapidly accelerated fibrosarcoma/mitogen activated protein kinase*, kinaza białkowa aktywująca miogen

RANK – *receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$* , aktywator receptora czynnika jądrowego κ

dla ligandu B

RANKL – *receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*, ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B)

Rb – *retinoblastoma protein*, białko retinoblastoma

RLU – *relative luminescence units*, relatywne jednostki świecenia

ROS – *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu

RXR – *retinoid X receptor*, receptor dla retinoidu X

Scr – niereceptorowe kinazy tyrozynowe TCR - *T-cell receptor*, receptor komórek T

SD – odchylenie standardowe

SLC26A4 – *ang. solute carrier family 26, member 4*, gen kodujący pendrynę

SNP – *single nucleotide polymorphism*, polimorfizm pojedynczego nukleotydu

T cell – komórki T, limfocyty T

Tg.2098-2112 – białko będące pochodną tyreoglobuliny, biorące udział w autonomizacji tarczycowej

TGF- β – *transforming growth factor β* , transformujący czynnik wzrostu beta

Th – *T helper*, limfocyty T- pomocnicze

Th 1, 2, 17 – *T helper 1, 2, 17* limfocyty T pomocnicze 1, 2, 17

TIMP-1 – *tissue inhibitor metalloproteinases 1*, tkankowy inhibitor metaloproteinazy 1

TLR – *Toll-like receptor*, receptory Toll-podobne

TNF- α – *tumor necrosis factor α* , czynnik martwicy guza alfa

TRAIL – *Tumor Necrosis Factor - Related Apoptosis Ligand*, ligand indukujący apoptozę związany z czynnikiem martwicy nowotworów

Tregs – *regulatory T cells*, limfocyty T regulatorowe

TSH – *thyroid stimulating hormone (thyrotropin)*, hormon tyreotropowy, tyreotropina

Tyr – tyrozyna

UVB – *ultrafiolet B radiation*, promieniowanie ultrafioletowe B

Vc – objętość całkowita

V PP – objętość prawego płata gruczołu tarczowego

V LP – objętość lewego płata gruczołu tarczowego

VCAM-1 – *vascular cell adhesion molecule-1*, molekula adhezji komórkowej naczyń

VDR – *vitamin D receptor*, receptor dla witaminy D

VDRE – *ang. vitamin D response elements*, sekwencja wiążąca się z receptorem dla witaminy D

XCI – *X-chromosome inactivation*, inaktywacja chromosomu X

25OHD3 – 25-hydroksycholekalcyferol

1,25D3-MARRS – *membrane associated, rapid response steroid binding*, nieklasyczny
receptor błonowy dla 1,25OH2D3

1,25OH2D3 – 1,25-dihydrocholekalcyferol

24,25OH2D3 – 24,25-dihydrocholekalcyferol

95% PU – 95 procentowy przedział ufności

2. WSTĘP

2.1. WITAMINA D

Niedobór witaminy D jest problemem epidemiologicznym dotyczącym wiele populacji na świecie [1-7]. Wyniki przeprowadzonych badań dostarczają dowodów o jej korzystnym wpływie na wiele procesów zachodzących w organizmie człowieka. Niedobór witaminy D jest uważany za czynnik ryzyka m.in. chorób nowotworowych [5,6,7,8,9,10], sercowo-naczyniowych [11,12,13], metabolicznych [14], autoimmunizacyjnych [5,6,15,16,17,18,19], niektórych neurologicznych i psychiatrycznych [19, 20].

2.1.1. Historia odkrycia witaminy D

Witamina D została odkryta przez *Mellanbe'a* w 1919 roku podczas badań nad krzywicą. *Mellanbe* wysunął tezę, że przyczyną krzywicy może być niedobór w diecie substancji rozpuszczalnych w tłuszczach, przede wszystkim witaminy A [21].

Huldshinsky w Wiedniu i *Chick* w Anglii wykazali, że dzieci chorujące na krzywicę mogły być leczone ekspozycją na światło słoneczne lub sztucznie produkowanym światłem UV [21]. Podobne obserwacje odnotowali *Hess* i *Unger* [21]. Profesor *Steenbock* z Uniwersytetu w Wisconsin w 1916 roku przeprowadził własne doświadczenia w tej materii. Stwierdził, że kozy przebywające na otwartej przestrzeni w miesiącach letnich, wykazują dodatni bilans wapniowy, w porównaniu do grupy hodowanej w zamknięciu w miesiącach zimowych. Udowodnił on więc, że istnieje związek pomiędzy światłem słonecznym a retencją wapnia. Kontynuując swoje doświadczenia, *Steenbock* naświetlał szczury promieniowaniem UV, ich pożywienie i powietrze w klatkach, w których były przechowywane. Stwierdził, że nie tylko naświetlanie szczurów, ale także ich żywność stanowi prewencję w rozwoju krzywicy. Stwierdził, że ta aktywacja jest związana z nierozpuszczalną frakcją lipidów i wywnioskował, że nieaktywne tłuszcze zawarte w diecie i skórze pod wpływem promieniowania UV, ulegają przekształceniu do form aktywnych o działaniu przeciwkrzywicznym. Nieco później *Hess* i *Weistock*, niezależnie od *Steenbocka* odkryli, że naświetlanie światłem słonecznym stanowi prewencję dla rozwoju krzywicy. Pomimo jasno postawionej idei dotyczącej witaminy D, identyfikacja jej struktury została dokonana w 1932 roku przez *Askew'a*, który wyizolował witaminę D2 z naświetlonej frakcji ergosteroli. Ta postać witaminy D jest jej pierwszą wyizolowaną i zidentyfikowaną formą. Z kolei witamina D1 została wyodrębniona przez *Windausa* i *Linserta* jako artefakt związku addycyjnego pomiędzy witaminą D2 i lumisterolem. W 1935 roku *Windaus* wyizolował 7-dehydrocholesterol, a w 1937 roku wraz z *Bockiem* zidentyfikował witaminę D3.

Przypuszczenia dotyczące syntezy skórnej witaminy D₃ z 7-dehydrocholesterolu, zostały potwierdzone przez Holicka, a udowodnione dopiero w 1978 roku przez Esvelte'a, który metodą masowej spektrometrii wyizolował witaminę D₃ [22,23]. Obecnie uznany chemiczny proces naświetlania UV inicjujący syntezę witaminy D, został zdefiniowany na podstawie prac Velluza i niezależnie – Havingi [21].

2.1.2. Synteza i metabolizm witaminy D

System witaminy D obejmuje rozpuszczalne w tłuszczach prohormony, ich aktywne metabolity, enzymy uczestniczące w procesie aktywacji prohormonów i receptory modulujące wiele funkcji życiowych komórek. Określenie „witamina D” odnosi się do dwóch sekosteroidów: ergokalcyferolu, czyli witaminy D₂ oraz cholekalcyferolu, czyli witaminy D₃, które są efektem fotolizy z naturalnie występujących prekursorów steroli [24,25]. Witamina D₃ powstaje w organizmach zwierzęcych, natomiast D₂ – w roślinach i grzybach [26].

Witamina D powstaje w skórze pod wpływem promieniowania słonecznego o długości fal 280-315 nm z pochodnej cholesterolu – 7-dehydrocholekalcyferolu. Efektem tego procesu jest prewitamina D, która w wyniku termokonwersji, zostaje przekształcona w witaminę D oraz w związki nieaktywne biologicznie: lumisterol i tachysterol. W wyniku krótkotrwałej ekspozycji na promieniowanie UVB występuje przedłużone uwalnianie witaminy D ze skóry. Powodem tego jest powolne przekształcanie prowitaminy D w witaminę D i konwersja lumisterolu w prowitaminę D. Długotrwała ekspozycja na promieniowanie słoneczne nie prowadzi do powstawania toksycznych stężeń witaminy D ponieważ dochodzi do fotokonwersji prowitaminy D do lumisterolu i tachysterolu [24].

Pierwszym etapem metabolizmu witaminy do postaci aktywnych biologicznie, jest hydroksylacja w pozycji 25 w wątrobie. Katalizatorem tej reakcji jest najprawdopodobniej kompleks enzymatyczny – zespół 25-hydroksylaz witaminy D, który stanowią białka cytochromu CYP (*ang. cytochrome protein*), jak CYP27A1, CYP3A4, CYP2R1 [6,24,27].

Wynikiem tego procesu jest 25-hydroksycholekalcyferol (25OHD₃), będący głównym krążącym metabolitem w organizmie ludzkim. Jego stężenie jest biochemicznym miernikiem zaopatrzenia organizmu w witaminę D [5,6].

Następnym miejscem metabolizmu witamin D są nerki. W nich dochodzi do hydroksylacji w pozycji 1 i/lub 24. Katalizatorem hydroksylacji w pozycji 1 jest 1 α -hydroksylaza (CYP27B1) a produktem tej reakcji – 1,25-dihydrocholekalcyferol (1,25OH₂D₃), który jest aktywną biologicznie formą witaminy D. Wykazano, że głównym miejscem ekspresji 1 α -hydroksylazy jest kanalik proksymalny nerek, jednak jego obecność wykryto także

w makrofagach, tkance kostnej, płucach, łożysku, skórze, gruczołach piersiowych, prostaty, jelicie grubym, komórkach β wysp trzustkowych i w komórkach przytarczyc [6,26].

W wyniku hydroksylacji w pozycji 24 powstaje 24,25-dihydrocholekalcyferol (24,25OH₂D₃). Kluczowym enzymem tego procesu jest 24-hydroksylaza witaminy D (CYP24), obecna praktycznie we wszystkich komórkach, na które działa witamina D [6,24]. Funkcja 24,25OH₂D₃ nie została całkowicie wyjaśniona, ale podkreśla się jej udział w procesach regulacji wzrostu chrząstki i przebudowy kostnej [6]. Substratem dla CYP24 jest także 1,25OH₂D₃, której hydroksylacja w pozycji 24 jest pierwszym etapem degradacji pochodnych cholekalcyferolu. Z kolei 1,25OH₂D₃ reguluje aktywność hydroksylaz-aktywuje CYP24 i hamuje CYP27B1 [6].

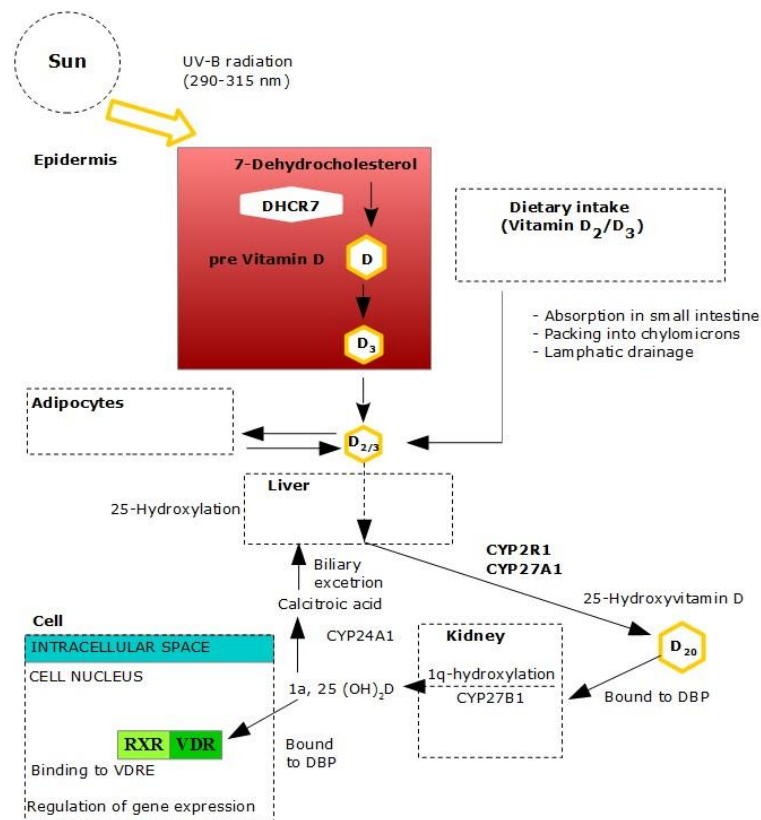
Aktywność 1 α -hydroksylazy i/lub 24-hydroksylazy zwiększa się pod wpływem parathormonu (PTH, ang. *parathyroid hormone, parathormone*), PTH – podobnego peptydu (PTHrP, ang. *PTH – related peptide*), prostaglandyn, hipokalcemii i hipofosfatemii [28]. Powstawanie aktywnych postaci witaminy D hamują: wzrost stężenia 1,25OH₂D₃ w wyniku niedoboru PTH i PTHrP, hiperkalcemia, hiperfosfatemia, kalcytonina oraz kwasica metaboliczna [28].

Eliminacja 25OHD₃ zachodzi w wyniku 24-hydroksylacji i wydalania do żółci. W warunkach fizjologicznych 3% krążących metabolitów witaminy D jest wydalanych z moczem i kałem [28]. Transport witaminy D ze skóry do krążenia nie został całkowicie wyjaśniony, natomiast w krążeniu jest ona w 85% transportowana w połączeniu z syntetyzowaną w wątrobie α -globuliną wiążącą witaminę D (DBP, ang. *vitamin D binding protein*), a w 15% niespecyficznie wiąże się z albuminami. W stanie wolnym w krążeniu występuje jedynie 0,04% 25OHD₃ i 0,4% 1,25OH₂D₃ [6,24,29]. Syntezę i metabolizm witaminy D przedstawia rycina 1.

Jak wspomiano, głównym krążącym metabolitem jest 25OHD₃, której stężenie odzwierciedla stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D. Jej okres półtrwania jest długi i wynosi około 3 tygodnie [26]. 1,25OH₂D₃ jest aktywną postacią witaminy D₃, ale jej oznaczanie w celu oceny stanu zaopatrzenia w tę witaminę nie jest rekomendowane. Jednym z ograniczeń jest krótki półokres rozpadu, który wynosi 6-8 godzin. Poza tym istnieją stany, w których pomimo niedoboru witaminy D, jej stężenie utrzymuje się w granicach norm referencyjnych lub nawet jest podwyższone, np.:

- ciąża,
- niewydolność nerek,
- sarkoidoza,

- gruźlica,
- reumatoidalne zapalenie stawów [2,26].



Rycina 1. Synteza i metabolizm witaminy D [na podstawie Kitson M.T, Roberts S.K. J. Hepatol. 2012 (30)]

2.1.3. Mechanizm działania witaminy D

2.1.3.1. Mechanizm genomowy i receptor VDR

Działanie witaminy D realizuje się na drodze dwóch mechanizmów: genomowego i pozagenomowego. Mechanizm genomowy jest związany z receptorem dla witaminy D-VDR (*ang. vitamin D receptor*), który jest receptorem wewnątrzkomórkowym obecnym w ponad 30 komórek ludzkiego organizmu [5] (Tabela 1). Gen dla VDR jest zlokalizowany na chromosomie 12q12-q14. Jego aktywacja dotyczy ponad 60 genów w różnych liniach komórkowych [5]. Genomowy mechanizm działania witaminy D jest przedmiotem intensywnych badań od lat 80-tych poprzedniego stulecia, kiedy to wykryto VDR [31].

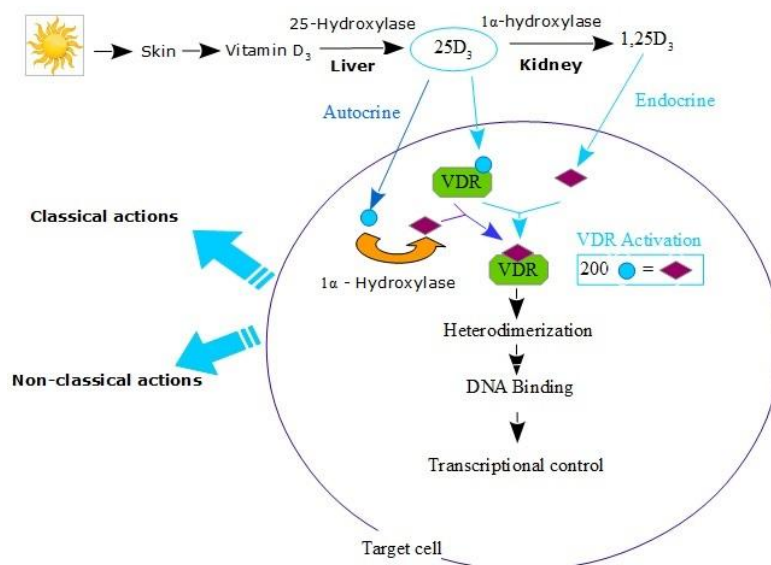
Tabela 1. Lokalizacja VDR w organizmie ludzkim [na podstawie (5)]

Narząd/ układ	Lokalizacja VDR
Układ sercowo-naczyniowy	kardiomyocyty, komórki mięśni gładkich naczyń
Układ endokryny	komórki C tarczycy, przytarczycy, komórki wyspowe Langerhansa
Skóra	mieszki włosowe, keratocyty
Układ pokarmowy	przełyk, żołądek, jelito, wątroba
Układ immunologiczny	grasica, limfocyty T i B, szpik kostny
Nerki	ramię wstępujące pętli Henlego, komórki kłębuszka nerkowego
Układ oddechowy	epitelium pęcherzyków płucnych
Układ kostno- mięśniowy	osteoblasty, chondrocyty, mięśnie prążkowane
Układ moczowo- płciowy	jajniki, jądra, moczowody

VDR należy do II klasy receptorów jądrowych i działa jak czynnik transkrypcyjny. W organizmie człowieka istnieje ponad 1900 klasycznych czynników transkrypcyjnych, jednym z nich jest VDR [31].

W wyniku przyłączenia się cholekalcyferolu i jego analogów do VDR, dochodzi do heterodimeryzacji z receptorem dla retinoidu X (RXR, *ang. retinoid X receptor*) i związania odpowiednich sekwencji VDRE (*ang. vitamin D response elements*). Po związaniu białek koaktywujących dochodzi do inicjacji transkrypcji [5,6]. Do licznej grupy genów, które są aktywowane na tej drodze należą geny dla: CYP24A1 (*ang. cytochrome P 450, family 24, subfamily polypeptide 1*), BGLAP, czyli osteokalcyny (*ang. bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein*), CDKN1A (*ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) oraz geny hamujące wzrost komórek i indukujące uszkodzenie DNA. Z kolei aktywność genu dla PTH jest hamowana przez kalcytriol [5,32].

Główne efekty działania 1,25OH₂D₃, zarówno klasyczne, wpływające na homeostazę wapniowo-fosforanową, jak i plejotropowe, realizowane są poprzez aktywację VDR (Rycina 2).



Rycina 2. Schemat aktywacji VDR [na podstawie Dusso A.S. *Kidney Int.* 2011 (33)]

2.1.3.2. Mechanizm pozagenomowy

Mechanizm pozagenomowy może współdziałać z genomowym mechanizmem działania witaminy D. Charakteryzuje się szybkim przekazywaniem sygnałów, nie zależy od transkrypcji, ale może bezpośrednio wpływać na procesy transkrypcyjne poprzez reakcje krzyżowe z udziałem innych dróg sygnałowych [5]. Mechanizm ten nie został dokładnie wyjaśniony. Sugeruje się, że może on rozpoczynać się w błonie komórkowej i aktywuje w niej nie-klasyczne receptory błonowe, w tym receptor dla 1,25OH₂D₃, czyli 1,25D₃-MARRS (*ang. membrane associated, rapid response steroid binding*) [5,34,35]. Aktywacja drogi pozagenomowej przez 1,25OH₂D₃ wywołuje szybkie przemieszczenie wapnia przez błonę śluzową jelita [5]. Przyłączenie kalcytriolu do błony plazmatycznej wywołuje aktywację wtórnych przekaźników, jak fosfolipaza C (PLC, *ang. phospholipase C*), kinaza białkowa C (PKC, *ang. protein kinase C*), 3-kinaza fosfatidyloinozytolu (PI3K, *ang. phosphatidyloinozitol 3-kinase*), białko kinazy C. Niektóre z nich, szczególnie RAF/MAPK (*ang. rapidly accelerated fibrosarcoma/mitogen activated protein kinase*), mogą wpływać poprzez reakcje krzyżowe z mechanizmami jądrowymi na regulację ekspresji genów, np. ERK (*ang. extracellular-signal-regulated kinase*) zmniejsza aktywność transkrypcyjną. Z kolei pozagenomowa aktywacja PKC może stabilizować VDR na drodze fosforylacji [5,36,37].

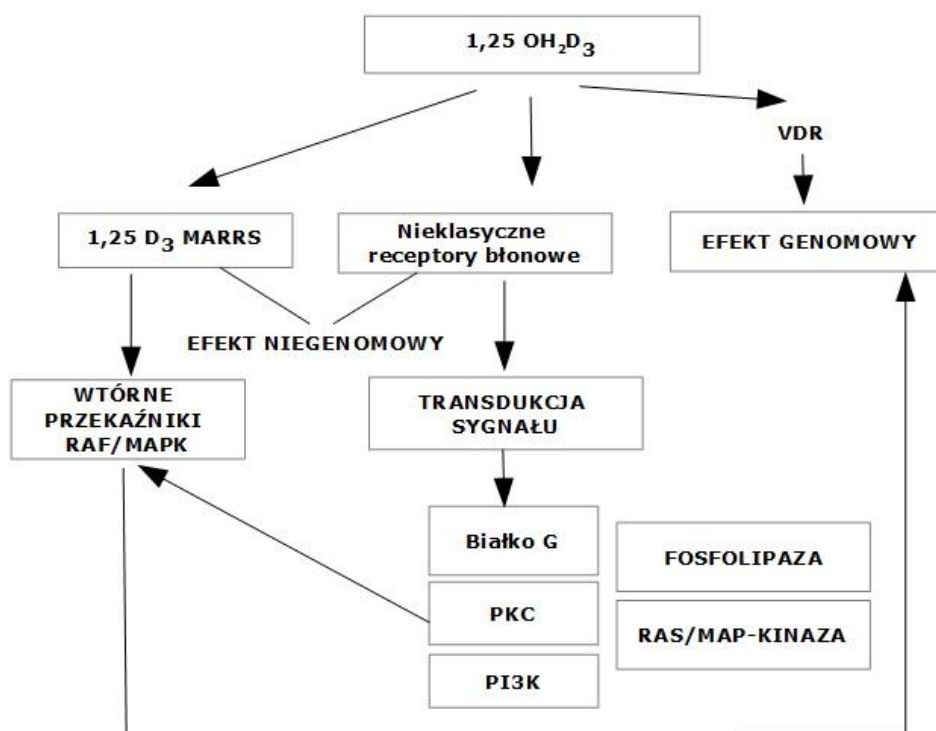
Mechanizmom pozagenomowym przypisuje się rolę w regulacji wzrostu komórek, ich różnicowania i apoptozy. Kalcytriol i jego analogi indukują zatrzymanie fazy G₀/G₁ cyklu

komórkowego, hamują także przejście z fazy G1 do S przez zwiększenie aktywności białek p27 i p21, a także wywołują zatrzymanie fazy G1 – poprzez zależne od cyklin inhibitory kinaz [5,6]. W warunkach prawidłowych w proces przechodzenia z fazy G1 do S jest zaangażowana fosforylacja białka retinoblastoma (Rb, *ang. retinoblastoma protein*). Następnie dochodzi do uwolnienia czynników transkrypcyjnych i aktywacji genów związanych z cyklem komórkowym, jak cykliny A i E. Proces fosforylacji Rb jest kontrolowany przez cykliny G1 oraz zależne od nich kinazy CDK (*ang. cyklin dependent kinase*) – aktywność tych ostatnich jest aktywowana przez białko p21 [6]. W warunkach doświadczalnych, stwierdzono że 1,25OH₂D₃ przyłączony do VDR zwiększa ekspresję białek p21, co wywołuje hamowanie kinaz CDK, w następstwie – brak fosforylacji Rb i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [6].

Innym mechanizmem działania kalcytriolu jest promowanie rozszczepienia kaspazy 3 i w mechanizmie zależnym od kaspazy wspomaganie procesów wzrostowych komórek przy udziale kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny – MEK (*ang. mitogen-activated protein kinase*) [5]. Poza tym 1,25OH₂D₃ zwiększa proapoptotyczną aktywność molekuly MEKK-1 (*ang. mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*) oraz hamuje fosforylację i ekspresję kinazy Akt, która reguluje drogę przeżycia komórki [5,38,39].

Pośrednimi drogami indukowania apoptozy przez kalcytriol są: zwiększenie TGF- β (*ang. transforming growth factor β*) i redukcja receptora dla EGF (*ang. epidermal growth factor*) oraz oddziaływanie na receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF, *ang. insulin-like growth factor*) i TNF- α (*ang. tumor necrosis factor α*) [5]. Bardziej bezpośrednio na indukowanie apoptozy działa on poprzez system Bcl-2 (*ang. B-cell lymphoma 2*), ceramidy i receptory śmierci, np. Fas oraz aktywowane stresem kinazy białkowe, np.: Jun-N-końcowe kinazy i białko p38 [5]. Poprzez hamowanie proteinaz serynowych, metaloproteinaz i procesu angiogenezy, kalcytriol zmniejsza inwazyjność guzów i procesy metastatyczne [40].

Witamina D współdziałając z wapniem we krwi wywiera efekt antyproliferacyjny poprzez hamowanie WNT/B-kateniny [5]. Na podstawie wyników z niektórych badań stwierdzono, że 25OHD₃, który także łączy się z VDR reguluje procesy różnicowania komórek oraz mitozy (działanie pozagenomowe), podczas gdy kalcytriol jest odpowiedzialny za homeostazę wapniowo- fosforanową [41]. Współdziałanie mechanizmu genomowego i pozagenomowego przedstawia rycina 3.



Rycina 3. Schemat współdziałania mechanizmów genomowego i pozagenomowego
 [na podstawie Lizis-Kolus K. i wsp., Przegląd Lek. 2013(42)]

2.1.3.3. Efekty klasyczne działania witaminy D na homeostazę wapniowo-fosforanową

Aktywne metabolity witaminy D mają wpływ na gospodarkę wapniowo-fosforanową w kościach, nerkach i przewodzie pokarmowym. Powodują wzrost stężenie wapnia i fosforanów w surowicy poprzez zwiększone wchłanianie jelitowe oraz zwiększają ich resorpcję z cewek proksymalnych nerek [24,43].

Na poziomie tkanki kostnej mają wpływ na układ RANK/RANKL (*ang. receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$*). Poprzez zwiększenie w osteoblastach RANKL dochodzi do aktywacji RANK w prekursorach osteoklastów, to z kolei przyspiesza ich dojrzewanie i resorpcję kostną [89]. Działają także na osteoblasty pobudzając je do wytwarzania fosfatazy zasadowej i osteokalcyny [43].

Poza tym witamina D i jej analogi biorą udział w utrzymaniu prawidłowego iloczynu wapniowo-fosforanowego, co jest ważne dla prawidłowej mineralizacji tkanki kostnej [89]. Istotny jest także ich udział w procesie przebudowy kostnej poprzez stymulację różnicowania monocytów do makrofagów, które łączą się osteoklastami i powodują wzrost resorpcji wapnia z tkanki kostnej [24,43].

W procesie przemiany witaminy D, sama witamina reguluje powstawanie własnych aktywnych metabolitów poprzez hamowanie aktywności 1α -hydroksylazy [43]. W prawidłowych stężeniach witamina D zmniejsza transkrypcję genu PTH, redukując syntezę PTH, co między innymi jest wykorzystywane w terapii pierwotnej nadczynności przytarczyc [43].

2.1.3.4. Efekty witaminy D nieklasyczne – plejotropowe

Nowotwory

Obecność VDR w tkankach nie związanych z gospodarką wapniowo-fosforanową stanowiło podstawy do prowadzenia badań w kierunku nieklasycznych, czyli plejotropowych działań witaminy D. Poza wymienionymi powyżej tkankami, obecność VDR wykryto także w komórkach licznych nowotworów, jak np.: raka piersi, prostaty, pęcherza moczowego, żołądka, jelita grubego, płuc, czerniaka, zróżnicowanego raka tarczycy i niektórych typów białaczek [5,6,44,45,46,47]. W procesie kancerogenezy wielu nowotworów istotną rolę odgrywa układ immunologiczny i komponenta zapalna [5]. Obecność VDR odkryto w układzie immunologicznym, co wskazuje na immunomodulującą aktywność witaminy D w chorobach nowotworowych [6,45,46].

Pozaszkieletowe działanie witaminy D może być także związane z wykryciem w 1979 roku pozanerkowej aktywności 1-alfa-hydroksylazy. Pierwszym miejscem wykazania jej obecności była tkanka łożyska, a następnymi makrofagi [44].

W badaniu dotyczącym raka brodawkowego tarczycy wykazano zwiększoną ekspresję VDR i 1α -hydroksylazy w komórkach nowotworu w porównaniu do zdrowych komórek pęcherzykowych tarczycy, z kolei ekspresja VDR w ogniskach metastatycznych w węzłach chłonnych była znacząco niższa niż w guzie pierwotnym [47].

Do najważniejszych mechanizmów przeciwnowotworowego działania witaminy D należą:

- hamowanie proliferacji,
- indukowanie apoptozy,
- hamowanie aktywności metaloproteinaz oraz proteinaz serynowych,
- wzrost ekspresji katedryny,
- spadek ekspresji integryn $\alpha 6$ i $\beta 4$,
- hamowanie angiogenezy [5,6].

Wykazano także, że polimorfizmy VDR są związane z występowaniem pewnych nowotworów [5,48,49,50] (Tabela 2).

Tabela 2. Związek polimorfizmów VDR z nowotworami

Rak lokalizacja	Rodzaj polimorfizmu VDR				
	Fok1	Bsm1	Taq1	Apa1	Poly(A)
prostata	+	+	+	+	+
piers	+	+	+	+	+
j. grube	+	+			
czerniak	+	+			
tarczyca	+		+	+	
jajnik	+			+	
nerka			+	+	
pęcherz moczowy	+				

W oparciu o wyniki badań, wykazano związek pomiędzy witamina D a występowaniem nowotworów [5]. Stwierdzono, że niedobór witaminy D jest związany ze zwiększonym ryzykiem ich rozwoju, a wysokie jej spożycie skutkuje zmniejszeniem tego ryzyka. Zaobserwowano także zmniejszoną agresywność przebiegu wielu chorób nowotworowych w miesiącach letnich [5,51]. Obserwacje zostały potwierdzone licznymi badaniami epidemiologicznymi, wykazującymi pozytywny wpływ światła słonecznego na przebieg i zapadalność na choroby nowotworowe [51,52,53,54].

Choroby układu sercowo-naczyniowego

Wyniki badań oceniających wpływ niedoboru witaminy D na organizm człowieka, pozwoliły nie tylko na wykazanie odwrotnej korelacji pomiędzy jej stężeniem a chorobami układu sercowo-naczyniowego [55,56,57]. Wyniki badania NHANES III (*ang. The National Health and Nutrition Examination Survey III*) w populacji amerykańskiej wykazały zwiększenie śmiertelności w przebiegu wielu chorób, ale przede wszystkim w chorobach sercowo-naczyniowych, jeżeli stężenie 25OHD3 było niższe niż 30 ng/ml, szczególnie w populacji kobiet oraz wykazano protekcyjne działanie witaminy D jeżeli jej stężenie osiąga 35-40 ng/ml [57]. Zaobserwowano znaczący wzrost występowania choroby niedokrwiennej serca, zawału serca i miażdżycy obwodowych naczyń wieńcowych w warunkach niedoboru witaminy D [56,57,58].

Choroby metaboliczne

Dzięki postępowi badań nad niedoborem witaminy D, wykazano także odwrotną korelację jej stężenia z występowaniem praktycznie wszystkich składowych zespołu metabolicznego [55]. Jej niedobór w sposób istotny negatywnie wpływa na przebieg nadciśnienia tętniczego, otyłość i insulinooporność [58,59]. Zgodnie z wynikami badania NHANES redukcja stężenia 25OHD3 sprzyja wzrostowi wagi ciała oraz BMI [58]. Podobne wyniki uzyskano także w innych badaniach populacyjnych [58,60].

Niedobór witaminy D w otyłości może wynikać z faktu, że jest ona rozpuszczalna w tłuszczach, więc istnieje zwiększona jej redystrybucja do tkanki tłuszczowej [58]. Na podstawie przeprowadzonych badań próbuje się wyjaśnić związek pomiędzy otyłością, niedoborem witaminy D oraz homeostazą kostną. Niedobór 25OHD3 prowadzi do wtórnej nadczynności przytarczyc i w konsekwencji do stymulacji aktywności nerkowej CYP27-hydroksylazy. W związku z tym stężenie 1,25OH₂D₃ w krążeniu jest prawidłowe, ale 25OHD₃ ulega dalszemu zmniejszeniu. Działając poprzez VDR, prowadzi to na drodze niewyjaśnionego do końca mechanizmu, do wzrostu masy ciała, który wpływa na późniejszą zwiększoną redystrybucję witaminy D w tkance tłuszczowej, pogłębiającą niedobór witaminy D. Sugeruje się także rolę leptyny, która negatywnie wpływa na ten proces, poprzez hamowanie CYP27B1 oraz 1 α -hydroksylazy zarówno w nerkach, jak i w tkance tłuszczowej [58,61].

2.1.4. Wpływ na układ immunologiczny

Obecność VDR oraz enzymów aktywujących witaminę D w układzie immunologicznym sugeruje jej immunomodulującą aktywność [5,6,62,63,64,65]. Udowodniono wpływ 1,25OH₂D₃ na limfocyty T i B, makrofagi oraz na komórki prezentujące antygen, w tym na komórki dendrytyczne [5,6,63,64,65,66,67]. Z kolei komórki dendrytyczne oraz aktywowane limfocyty T biorą udział w syntezie 1,25OH₂D₃ z prekursorów aktywowanych światłem słonecznym, co sugeruje aktywność auto/parakrynną układu immunologicznego [67]. Mechanizmy te są wielokierunkowe i nie zostały jeszcze w pełni poznane.

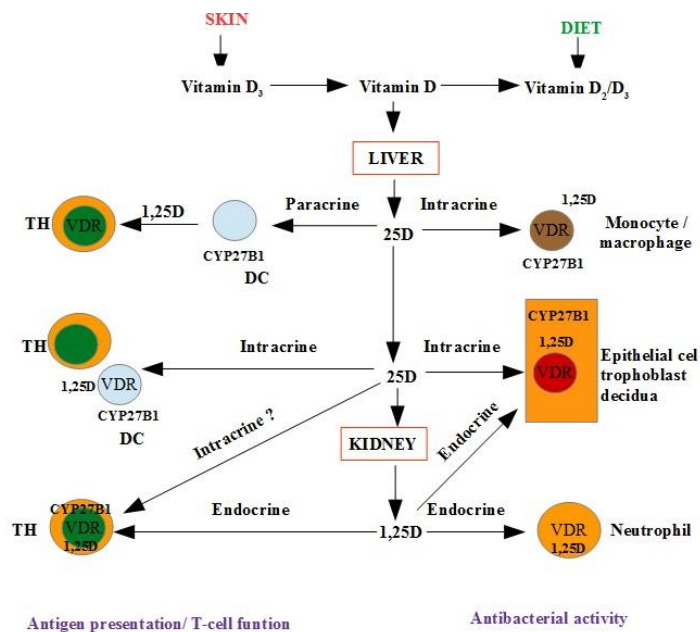
W oparciu o wyniki analiz przeprowadzonych w ostatnich latach bierze się pod uwagę cztery podstawowe mechanizmy działania witaminy D na limfocyty T:

1. Bezpośredni endokrynną wpływ kalcytriolu na komórki T.
2. Bezpośredni – autokrynną konwersja 25OHD₃ do 1,25OH₂D₃ przez aktywację CYP25B1 w monocytach, makrofagach i komórkach dendrytycznych, następnie VDR lokalnie autokrynnie wykorzystuje 1,25OH₂D₃. Na tej drodze w monocytach i makrofagach

promowana jest antybakteryjna odpowiedź na infekcję, z kolei w komórkach dendrytycznych wytworzona 1,25OH₂D₃ hamuje dojrzewanie, modulując funkcję Th (*ang. T helper*).

3. Bezpośrednie – parakryne efekty kalcytriolu na komórki T, wynikające z wytwarzania 1,25OH₂D₃ w komórkach dendrytycznych.

4. Pośrednie efekty na komórki prezentujące antygen przez lokalne wpływy kalcytriolu [63,68] (Rycina 4).



Rycina 4. Działanie witaminy D w układzie immunologicznym [na podstawie Prietl B., Treiber G., Thomas R. et al. *Nutrients*. 2013(63)]

Witamina D hamuje proliferację limfocytów T i powoduje przesunięcie fenotypu Th1 w kierunku Th2 [5,63,64,66]. Poprzez hamowanie limfocytów CD4⁺ (*ang. cluster of differentiation*) blokuje proliferację Th1 i produkcję przez nie cytokin [6,63,64]. Powoduje redukcję sekrecji interleukiny 2 (IL-2) i INF- γ (*ang. interferon γ*) przez komórki CD4⁺ i promuje produkcję IL-5 i IL-10, czego wynikiem jest przesunięcie w kierunku fenotypu Th2 [64].

Wykazano hamujący wpływ 1 α ,25OH₂D₃ na ekspresję IL-6. Jest ona ważnym czynnikiem stymulującym komórki Th17, które odgrywają kluczową rolę w reakcjach autoimmunizacyjnych [64,67]. Poza tym witamina D redukuje produkcję cytokin prozapalnych – IL-17, IL-21 i zwiększa produkcję cytokin przeciwzapalnych m.in. IL-10 [66].

Wpływ na limfocyty B realizuje się w hamowaniu sekrecji przeciwciał i produkcji autoprzeciwciał [63,64,66]. Wyniki ostatnich badań wskazują na dodatkowe efekty działania

kalcytriolu na homeostazę limfocytów B w postaci hamowania generacji komórek pamięci i komórek plazmatycznych, jak również promowania apoptozy komórek produkujących te limfocyty [65]. Powyższe mechanizmy wpływu kalcytriolu na limfocyty B mają szczególne znaczenie w patofizjologii chorób autoimmunizacyjnych. Działanie na komórki prezentujące antygen dotyczy komórek dendrytycznych oraz makrofagów [5,6,63,64,66]. Komórki dendrytyczne odgrywają kluczową rolę w regulacji aktywacji procesów immunologicznych i odpowiedzi na nie [6,63].

Dojrzewaniu komórek dendrytycznych towarzyszy zmniejszenie ekspresji molekuly kostymulującej 1a (CD1a) i wzrost ekspresji kostymulatorów, m.in. CD40, CD83, CD86 [6]. W jednym z badań w hodowli niedojrzałych komórek dendrytycznych z liposacharydem (LPS, *ang. liposacharid*), po dodaniu 1,25OH₂D₃ stwierdzono około 50% zmniejszenie ekspresji molekuł CD40, CD83, CD86, co dowodzi zahamowania ich dojrzewania [6]. Zaobserwowano także redukcję stężenia IL-12, która stymuluje powstawanie limfocytów Th1 oraz 7-krotny wzrost produkcji IL-10, biorącej udział w hamowaniu wytwarzania cytokin prozapalnych, w tym IFN- γ i IL-2 [6].

Witamina D promuje różnicowanie monocytów do makrofagów i zmniejsza uwalnianie przez nie cytokin prozapalnych oraz chemokin [6,63,64]. Do innych mechanizmów działania witaminy D na układ immunologiczny należy stymulacja prostaglandyny E₂ (PGE₂, *ang. prostaglandin E2*), podczas gdy GM-CSF (*ang. granulocyte-macrophages colony stimulating factor*) podlega supresji [64]. Niektóre komórki układu immunologicznego, w tym aktywowane makrofagi i komórki dendrytyczne, zawierają enzym 1 α -hydroksylazę, która jest niezbędna w procesie konwersji witaminy D do aktywnych metabolitów. Jest ona identyczna jak 1 α -hydroksylaza nerkowa, ale podlega innym mechanizmom regulacji ekspresji, jest regulowana przez układ immunologiczny – INF- γ [64].

Wykazano także wpływ witaminy D na zmianę fenotypu indukowania tolerancji immunologicznej, poprzez zwiększenie ekspresji genów typowych dla limfocytów T regulatorowych (Tregs, *ang. regulatory T cells*), w wyniku dodania kalcytriolu i IL-2 do kultury pierwotnych komórek T [63,69]. Tregs działają supresyjnie na reakcję prozapalną przez inne komórki układu immunologicznego, ich celem jest także ochrona przed odpowiedzią autoimmunizacyjną i zmniejszenie jej nasilenia [63,70]. Uważa się, że potencjalnie są one indukowane przez różne formy witaminy D na drodze pośredniej przez APC (*ang. antigen presenting cell*) i grupy komórek dendrytycznych oraz bezpośrednio przez działanie systemowego kalcytriolu i autokrynną konwersję 25OHD₃ do 1,25OH₂D₃ przez same Tregs [63,71].

Niektóre z przedstawionych mechanizmów działania witaminy D na układ immunologiczny stanowiły podstawę do prowadzenia badań oceniających jej stężenie i wpływ niedoboru w populacji chorych z chorobami autoimmunizacyjnymi, w tym autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy (AITD, *ang. autoimmunology thyroid disease*).

Witamina D a wrodzony układ odpornościowy

Wiele badań podkreśla potencjalny udział systemu monokin witaminy D jako niezbędnego w wytwarzaniu antymikrobiologicznych peptydów przez układ monocytów-makrofagów [58,72]. Wykazano, że aktywacja układu monocytu-makrofagi przez TLR (*ang. Toll-like receptor*) w obecności patogenu oraz PAMPs (*ang. pathogen associated molecular patterns*) wydzielanego przez *Mycobacterium tuberculosis* wywołuje ekspresję CYP27B1-hydroksylazy i genu VDR w tych komórkach. Niedobór 25OHD3 jako substratu dla CYP27B1-hydroksylazy makrofagów, skutkuje lokalnym deficytem 1,25OH2D3. W następstwie dochodzi do zmniejszenia wiązania 1,25OH2D3 z VDR w makrofagach, które ogranicza aktywację przeciwmikrobiologicznych genów, np. dla katelicydyny i w efekcie zmniejsza zwalczanie atakującego mikroorganizmu [72]. Wyniki tych obserwacji znajdują potwierdzenie w obserwacjach epidemiologicznych, dotyczących sezonowej zapadalności na choroby infekcyjne. *Ginde i wsp.* analizując występowanie infekcji górnych dróg oddechowych wykazali zwiększoną zapadalność w zależności od pory roku, wraz z redukcją stężenia 25OHD3, zwłaszcza w miesiącach zimowych, kiedy jest ono najmniejsze [73]. O ile stymulacja odpowiedzi antybakteryjnej przez witaminę D jest dowiedziona, to antywirusowe działanie witaminy D jest niejasne. Najpewniej także i w tym przypadku indukowana jest odpowiedź poprzez aktywację TLR [58].

2.1.5. Definicja niedoboru witaminy D

Na przestrzeni lat kryteria diagnostyczne dotyczące oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D ulegały zmianom. W 2013 roku Zespół Ekspertów opracował wytyczne suplementacji, jak również określił nowe kryteria diagnostyczne charakteryzujące stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D dla populacji zdrowej i grup ryzyka deficytu witaminy D w Europie Środkowej [1,2]. Deficytem określono stężenia 25OHD3 < 20 ng/ml (< 50 nmol/l), suboptymalne zaopatrzenie – jako stężenie wynoszące 20-30 ng/ml (50-75 nmol/l), natomiast stężenia pomiędzy 30-50 ng/ml (75-125 nmol/l) oceniono jako właściwe dla zapewnienia oczekiwanych plejotropowych efektorów działania witaminy D. Stężenia 25OHD3 w zakresie > 50-100 ng/ml (> 125-250 nmol/l) określa się jako wysokie i zaleca się utrzymanie lub obniżenie stosowanych dawek witaminy D. Za stężenia potencjalnie

toksyczne uznano stężenia 25OHD3 > 100 ng/ml (> 250 nmol/l), z kolei za toksyczne przyjęto stężenia > 200 ng/ml (> 500 nmol) [1,2].

2.1.6. Epidemiologia niedoboru witaminy D

Wyniki badań epidemiologicznych przeprowadzanych na świecie dowodzą powszechności niedoboru witaminy D dotyczącego każdej grupy wiekowej. Szacuje się, że ponad 1 bilion populacji światowej wykazuje niedobór witaminy D (< 30 ng/ml; 75 nmol/l) [7]. Mając na uwadze korzystny wpływ prawidłowych stężeń witaminy D, od kilkunastu lat wiele uwagi poświęca się w piśmiennictwie problemowi jej niedoboru i konieczności wyrównania nie tylko w aspekcie zdrowotnym, ale także ekonomicznym. W jednym z badań oceniono, że zwiększenie stężenia 25OHD3 do 40 ng/ml (100 nmol/l) każdego roku znacząco redukuje wskaźniki i ekonomiczne ograniczenia związane z różnego typu chorobami, z redukcją wydatków w zakresie ochrony zdrowia wynosząca ok. 187 000 milionów Euro rocznie [74]. Dotyczy to związanego z niedoborem witaminy D, zwiększonego ryzyka zachorowań na choroby narządu ruchu, w tym osteoporozę, choroby nowotworowe, układu sercowo-naczyniowego, autoimmunizacyjne, metaboliczne, infekcje i choroby stomatologiczne [6,74]. Wyniki jednego z badań epidemiologicznych przeprowadzonego w populacji pacjentów w Stanach Zjednoczonych wykazały, że stężenie 25OHD3 < 20 ng/ml dotyczy 36% zdrowych osobników pomiędzy 18-29 roku życia, 42% czarnoskórych kobiet w wieku 15-49 lat, 41% pacjentów ambulatoryjnych w wieku 49-83 lat oraz ok. 57% wszystkich pacjentów hospitalizowanych [28,75]. Badania epidemiologiczne przeprowadzone w krajach europejskich, wskazują na jeszcze większą skalę problemu związanego z niedoborem witaminy D [28,75-91]. Potwierdzają to wyniki projektu badawczego obejmującego grupę 8 532 pomenopauzalnych kobiet powyżej 65 roku życia (średnia wieku 74,2 lat) z osteoporozą lub osteopenią, przeprowadzonego we Francji, Belgii, Włoszech, Polsce, Węgrzech, Hiszpanii, Niemczech i Wielkiej Brytanii. W badanej populacji niedobór witaminy D dotyczył 79,6% oraz 32,1% kobiet dla stężeń odpowiednio 32 ng/ml (80 nmol/l) i 20 ng/ml (50 nmol/l). W grupie wiekowej poniżej 65 roku życia odpowiednio 86% i 45%. Najniższe stężenia występowały we Francji, a najwyższe w Hiszpanii [76].

W metaanalizie przeprowadzonej na podstawie publikacji z lat 1994-2004 a dotyczących niedoboru witaminy D w grupie pomenopauzalnych kobiet stwierdzono, że stężenie witaminy D < 20 ng/ml dotyczyło 1,6-86% ogólnej populacji badanych kobiet, w grupie z osteoporozą z jej stężeniem < 12 ng/ml – 12,5-76%, z wywiadem złamań kostnych przy stężeniu 15 ng/ml – 50-70% kobiet [77]. Z kolei w badaniu przeprowadzonym w Niemczech na populacji 776 pacjentów w miesiącu wrześniu, deficyt witaminy D < 20 ng/ml (50 nmol/l) dotyczył 45,1%,

ciężki niedobór < 10 ng/ml (30 nmol/l) – 9,8% a stężenie poniżej rekomendacji < 30 ng/ml (75 nmol/l) – u 88,9% badanych [78].

Problem niedoboru witaminy D dotyczy praktycznie wszystkich grup wiekowych. Wyniki innego badania przeprowadzonego również na niemieckiej populacji, obejmującego 98 000 mieszkańców północnych Niemiec w latach 2008-2011, wykazało u ponad 30% ogólnej populacji badanych oraz u 25% dorastających i młodych dorosłych, ciężki niedobór witaminy D, definiowany jako stężenie poniżej 10 ng/ml (25 nmol/l) [79]. Wyniki projektu HELENA przeprowadzonego w populacji dorastającej młodzieży z 10 europejskich krajów, wykazało niedobór witaminy D < 30 ng/ml (75 nmol/l) u blisko 80% badanych [80]. Z kolei w badaniu przeprowadzonym w Austrii, wśród dobrze wyedukowanych w zakresie opieki zdrowotnej studentek, ciężki niedobór witaminy D < 10 ng/ml (30 nmol/l) dotyczył 6,9%, a niedobór < 30 ng/ml (75 nmol) – 89,4% badanych [81].

Szereg badań sugeruje, że niskie stężenie witaminy D podczas ciąży ma negatywny wpływ na zdrowie matki, płodu i ma znaczenie w rozwoju dziecka po urodzeniu [82,83,84]. Wyniki badania przeprowadzonego w populacji 1311 ciężarnych kobiet w Belgii wykazały stężenie witaminy D < 30 ng/ml u 74,1%, < 20 ng/ml u 44,6%, a < 10 ng/ml – u 12,1% badanych [82]. Analiza przeprowadzona w populacji kobiet ciężarnych zamieszkujących Warszawę potwierdza skalę problemu. Optymalne stężenie witaminy D pomiędzy 30-80 ng/ml stwierdzono u 30%, stężenia suboptymalne pomiędzy 20-30 ng/ml u 38,7%, 10-20 ng/ml u 24%, a ciężki niedobór < 10 ng/ml u 7,4% badanych kobiet [83].

Mało jest danych populacyjnych dotyczących niedoboru witaminy D w Polsce. Na podstawie projektu OPTIFORD przeprowadzonego w 5 krajach europejskich, w tym w Polsce, niskie stężenie witaminy D w okresie zimowym stwierdzono u 9 z 10 badanych kobiet [84]. W badaniu przeprowadzonym w grupie starszych kobiet w wieku $69,1 \pm 5,7$ lat, średnie stężenie witaminy D wynosiło 13,6 ng/ml, stężenia > 30ng/ml wykazano u 4%, stężenia 20-30 ng/ml definiowane przez autorów jako hipowitaminoza u 12,8%, a niedobór oznaczający stężenia < 20 ng/ml u 83,2% badanych kobiet [85].

Pomimo wprowadzenia w 2009 roku rekomendacji dla populacji polskiej dotyczących konieczności oznaczania witaminy D oraz jej suplementacji, problem jej niedoboru jest nadal aktualny i dotyczy praktycznie wszystkich grup wiekowych [2,3]. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazują, że średnio 80% polskiej populacji wykazuje deficyt witaminy D < 20 ng/ml (50 nmol/l), niezależnie od wieku i jest on większy np. w porównaniu do populacji Stanów Zjednoczonych [7,87-91].

2.1.6.1. Przyczyny niedoboru witaminy D

Najczęstszą przyczyną niedoboru witaminy D jest zmniejszona jej synteza skórna, która w warunkach prawidłowych dostarcza ok. 80% dziennego zapotrzebowania. Jedynie 20% zapotrzebowania uzyskuje się w pożywieniu. Wydajność syntezy skórnej zmniejsza się wraz z wiekiem. Wykazano, że przy takiej samej ekspozycji na światło słoneczne, u osób powyżej 70 roku życia, wynosi ona jedynie ¼ możliwości produkcyjnych u osób młodych. Dodatkowo aplikacja kremów zawierających filtru UVB zmniejsza jej syntezę w skórze [3,92] (Tabela 3). Do głównych czynników dietetycznych warunkujący właściwy dowóz witaminy D należą produkty zawierające oleje rybne.

Tabela 3. Przyczyny niedoboru witaminy D

Zmniejszona synteza skórna	<ul style="list-style-type: none">- starszy wiek- stosowanie kremów z filtrem UVB- obniżona ekspozycja na światło słoneczne<ul style="list-style-type: none">* lęk przed nowotworami skóry* szerokość geograficzna
Dieta	niedostateczna podaż w pożywieniu
Otyłość	
Zmniejszenie syntezy witaminy D	<ul style="list-style-type: none">- niewydolność wątroby - ↓ 25OHD- niewydolność nerek - ↓ 1,25OH2D3
Laktacja	
Leki	<ul style="list-style-type: none">- glikokortykosteroidy- leki przeciwdrgawkowe- terapia przeciwwirusowa – AIDS
Choroby o podłożu genetycznym	Krzywica typu 1 zależna od witaminy D (mutacja genu kodującego 1 α -hydroksylazę) Krzywica hipofosfatemiczna *Krzywica typu 2 zależna od witaminy D (genetycznie uwarunkowana oporność na VDR; stężenia 25OHD3 jest prawidłowe lub nieznacznie podwyższone, wysokie stężenia 1,25OH2D3)

2.1.6.2. Ocena stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D na podstawie stężenia 25OHD w surowicy dla wszystkich grup wiekowych

Stan zapotrzebowania organizmu w witaminę D, został oceniony we wspomnianych rekomendacjach, wydanych w 2013 roku. Zalecenia ekspertów obrazuje tabela 4.

Tabela 4. Ocena stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D na podstawie stężenia 25OHD w surowicy dla wszystkich grup wiekowych] [2]

Stężenie 25OHD w surowicy		Działanie do rozważenia
nmol/l	ng/ml	
50	< 20	dawki lecznicze witaminy D
50-75	20-30	zwiększenie dotychczasowej dawki
75-125	30-50	utrzymanie dotychczasowej dawki
125-250	50-100	utrzymanie/obniżenie dawki
> 250	> 100	zaniechanie suplementacji do czasu uzyskania zalecanego zakresu stężeń
> 500	> 200	zaniechanie suplementacji/leczenie ewentualnych efektów toksycznych

W rekomendacjach wyodrębniono także grupy chorych i stany kliniczne, u których ocena stężenia witaminy D i leczenie jej niedoboru ma szczególne znaczenie na przebieg chorób i ich terapię. Wśród wymienionych grup chorych uwzględniono pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi, jak stwardnienie rozsiane, łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie skórno-mięśniowe, toczeń trzewny, choroba trzewna, choroba Crohna i nieswoiste zapalenia jelit [1,2].

2.2. CHOROBA HASHIMOTO

2.2.1. Definicja choroby Hashimoto

Przewlekłe autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy, inaczej nazywane przewlekłym limfocytarnym zapaleniem tarczycy lub chorobą Hashimoto (HT), stanowi najczęstszą postać zapalenia tarczycy i niedoczynności tarczycy, jak również jedną z najczęstszych endokrynopatii o podłożu autoimmunizacyjnym [93,94,95]. Rozpoznanie choroby opiera się na stwierdzeniu niedoczynności tarczycy oraz obecności krążących we krwi przeciwciał przeciwko antygenowi tarczycowemu: przeciw peroksydazie tarczycowej (a/TPO, *ang. anti-thyroid peroxidase antibodies*) oraz przeciw tyreoglobulinie (a/Tg, *ang. anti-thyroglobulin antibodies*). W odpowiedzi na przeciwciała w gruczole tarczowym pojawiają się nacieki limfocytarne, stopniowy zanik komórek pęcherzykowych tarczycy i rozplem tkanki łącznej – w konsekwencji stopniowo rozwija się niedoczynność tarczycy [93,94,95].

Chorobę po raz pierwszy opisał w 1921 roku japoński lekarz Hakaru Hashimoto [24,92]. Przeciwciała przeciw tyreoglobulinie i ich związek z HT, opisał Rott i wsp. w 1956 roku natomiast przeciwciała przeciw peroksydazie tarczycowej zostały opisane w 1964 roku [92,93]. Z kolei dzięki pracom profesor Czarnockiej i wsp. w 1985 roku wykryto tyreoperoksydazę - białko, będące autoantygenem dla przeciwciał a/TPO [94,95,96]. U części chorych z HT stwierdza się w surowicy obecność blokujących lub stymulujących przeciwciał przeciw receptorowi dla TSH, a także przeciw tyroksynie (T₄), trójjodotyroninie (T₃), przeciw symporterowi sodowo-jodowemu, megalinie i pendrynie [93].

2.2.2. Epidemiologia choroby Hashimoto

Występowanie HT dotyczy wszystkich grup wiekowych, z przewagą płci żeńskiej [93,94]. W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zachorowań na HT, zwłaszcza w grupie kobiet w wieku reprodukcyjnym. Postać choroby z subkliniczną niedoczynnością tarczycy ocenia się na 4-10% populacji, natomiast częstość występowania jawnej klinicznie niedoczynności w przebiegu HT szacuje się na 1-3% [94]. Z kolei na podstawie danych z projektu NHANES III, stwierdzono że 18% populacji, bez wcześniej rozpoznanej choroby tarczycy, bez względu na płeć i wiek wykazuje obecność przeciwciał przeciw tarczycowym: a/TPO w 11,4% i a/Tg w 10,4% przypadków [97]. Zaobserwowano przewagę płci żeńskiej w występowaniu przeciwciał przeciw tarczycowym w stosunku do populacji mężczyzn, a także wzrost ich występowania wraz z wiekiem [97]. W jednym z badań stwierdzono, że ok. 20% kobiet powyżej 60 roku życia wykazuje obecność przeciwciał przeciw tarczycowym [97]. W innym dowodem na predyspozycję płci żeńskiej w HT było częstsze występowanie u

kobiet przeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej (a/TPO) – 13,9% w stosunku do mężczyzn – 2,8% [98]. Na podstawie danych z projektu NHANES przewaga kobiet w występowaniu choroby Hashimoto występowała w stosunku 2:1, a obecnie jest szacowana na 7:1, a według innych danych nawet 10:1 [93,94,97].

Oceniono także predyspozycję rasową – znacznie większa częstotliwość przeciwciał u rasy białej i Japończyków niż w przypadku rasy czarnej i meksykanów amerykańskiego pochodzenia [95,97,99]. Przewaga płci żeńskiej w występowaniu HT nie została do końca wyjaśniona. Bierze się pod uwagę dwa mechanizmy: mikrochimeryzm płodowy oraz inaktywacja chromosomu X [95,100].

Płodowy mikrochimeryzm

Poza czynnikami genetycznymi i środowiskowymi w patogenezie HT, bierze się pod uwagę zjawisko mikrochimeryzmu płodowego. Jest ono definiowane jako obecność komórek płodowych w tkankach matki przenoszonych drogą krążenia macicznego podczas ciąży [95]. Dowiedziono, że wiele lat po porodzie chimeryczne męskie komórki były wykrywane w układzie krążenia matki, jak również w jej tkankach, takich jak tarczyca, płuca, skóra i węzły chłonne [101]. W HT płodowy mikrochimeryzm został wykryty w tarczycy na podstawie różnych badań u 28-83% badanych kobiet [95]. Zaobserwowano, że kobiety będące w eutyreozie z wywiadem ciążowym, mają częściej podwyższone stężenie przeciwciała a/TPO w porównaniu do grupy nie będących nigdy w ciąży [95]. Zjawisko mikrochimeryzmu w patogenezie HT nie jest do końca jasne i wymaga potwierdzenia badaniami prowadzonymi w przyszłości.

Inaktywacja chromosomu X

Innym zjawiskiem o podłożu epigenetycznym, którym próbuje się wytłumaczyć przewagę płci żeńskiej w występowaniu chorób autoimmunizacyjnych, w tym AITD, jest inaktywacja chromosomu X (XCI, *ang. X-chromosome inactivation*) [100]. W komórkach ssaków płci żeńskiej, jeden z dwóch chromosomów X jest inaktywowany we wczesnym życiu płodowym. Tkanki żeńskie stanowią więc mozaikę dwóch linii komórkowych, jedną pochodzenia ojcowskiego i drugą z jednym macicznym aktywnym chromosomem X. Arbitralnie przyjęto, że XCI jest definiowany jako inaktywacja tego samego chromosomu X w $\geq 80\%$ komórek. W konsekwencji zaburza to tolerancję immunologiczną wobec własnych antygenów pochodzących z linii pojedynczego chromosomu X i może indukować proces autoimmunologiczny. Wyniki kilku badań wykazały, że wypaczony XCI jest związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju AITD [100].

2.2.3. Patogeneza choroby Hashimoto

Pomimo postępu wiedzy na temat etiopatogenezy choroby Hashimoto, dokładny mechanizm odpowiedzialny za jej powstanie i rozwój nie został do końca wyjaśniony. Udowodniono, że HT jest konsekwencją współdziałania dwóch czynników: genetycznego i środowiskowego.

2.2.3.1. Czynniki genetyczne

Wyniki epidemiologicznych badań wśród rodzin i bliźniaków dotkniętych chorobami autoimmunizacyjnymi, dostarczyły wielu dowodów na obecność czynnika genetycznego w patogenezie HT. W obserwacjach prowadzonych wiele lat temu, jak również w ostatnich latach w rodzinach z autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy, dowiedziono obecności przeciwciał przeciw tarczycowym u ponad 60% krewnych pierwszego stopnia [95,102, 103].

W przypadku choroby u jednego z rodziców występowanie przeciwciał dotyczyło 28,9% dzieci płci żeńskiej i 16,7% – płci męskiej, natomiast choroba u obydwójga rodziców skutkowała ich występowaniem u dziewczynek w 42%, u chłopców – w 33% przypadków [103]. Wyniki tych obserwacji zostały potwierdzone wynikami z projektu NHANES III, gdzie wskaźnik ryzyka wystąpienia HT u rodzeństwa wynosił 28, jak również w analizach przeprowadzonych w Niemczech, w których wykazano 32 razy większe ryzyko rozwoju HT u dzieci i 21 razy większe – u rodzeństwa w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym HT [95,105,106].

Genetyczna predyspozycja do zachorowania na HT została udowodniona również w badaniach nad bliźniętami. U zdrowych bliźniąt monozygotycznych urodzonych z rodziców ze zdiagnozowaną HT, obecność przeciwciał a/TPO i a/Tg wynosiła odpowiednio – 53% i 47%, u heterozygotycznych – 22% i 13%, w porównaniu do zdrowej populacji – 9% i 7% [107].

Od wielu lat prowadzone są badania nad identyfikacją genów, biorących udział w rozwoju AITD – choroby Hashimoto i choroby Graves-Basedowa (GD). Najpewniej predyspozycje genetyczne w obydwu chorobach są różne i odpowiadają za różnice etniczne w ich występowaniu, jak również odmienne postacie kliniczne, obecność zmian ogniskowych w gruczole tarczowym, w tym raka [108].

W etiopatogenezie HT potencjalny udział mają:

1. Geny kodujące białka biorące udział w odpowiedzi immunologicznej:
 - *HLA-DR* (ang. *major histocompatibility complex, class II I III*),
 - *CTLA4* (ang. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*),
 - *PTPN22* (ang. *protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22*).

2. Gen specyficzny dla tkanki tarczycowej kodujący tyreoglobulinę (Tg) [108].

Bierze się także pod uwagę wpływ mutacji w genie *SLC26A4* (*ang. solute carrier family 26, member 4*), który koduje pendrynę, ale jego rola nie została jeszcze całkowicie wyjaśniona [108]. Ostatnio podkreśla się także możliwe wpływy polimorfizmów genów kodujących cytokiny w etiopatogenezie HT [95].

Gen HLA

Region MHC (*ang. major histocompatibility complex*) znajduje się na chromosomie 6p21 i obejmuje grupę genów kodujących białka związane z odpowiedzią immunologiczną. Został on zidentyfikowany jako pierwszy w związku z autoimmunizacyjnymi chorobami, w tym AITD. Wynika to z faktu, że geny wchodzące w jego skład charakteryzują się dużym polimorfizmem [95,100,108]. Podzielono je na trzy klasy: I klasa zawiera geny *HLA* typu A, B, C (*ang. human leukocyte antigen*), do II klasy należą geny *HLA-DP*, *-DQ*, *-DR*, natomiast w skład III klasy wchodzi między innymi geny białka szoku termicznego (HSP 70, *ang. heat shock protein*), gen *TNF- α* (*ang. tumor necrosis factor α*), geny kodujące składniki komplementu [93] (Rycina 5).



Rycina 5. Częściowa mapa krótkiego ramienia chromosomu 6 obrazująca molekularną organizację obszaru zawierającego loci *HLA* klas I, II, III [na podstawie Xie M., Li J., Jiag T. *BMC Bioinformatics*.2010;11 Suppl 11:S10. (109)]

W odróżnieniu od klarownego związku pomiędzy GD a *HLA*, dane dotyczące alleli *HLA* w HT nie są do końca zgodne [108]. W rasie kaukaskiej stwierdzono zwiększone ryzyko wystąpienia HT wobec obecności *HLA-DR3*, *-DR4*, *-DR5*, *-DQw7*, natomiast obecność *HLA DR1*, *-DR7*, *-DR8* i *-DR13* wykazuje rolę protekcyjną [93,108]. W innych populacjach zidentyfikowano inne allele *HLA* w związku z HT: w populacji japońskiej *-DRB4*, *-A2* i *-DRw53*, natomiast w chińskiej *-DRw9* [95].

HLA klasy I i II odrywają znaczącą rolę w prezentacji antygeny. *HLA* klasy II ulegają ekspresji na powierzchni komórek APC, wiążąc egzogenne antygeny. Komórki T rozpoznają antygen, ulegają aktywacji i odpowiadają na antygen poprzez interakcje z kompleksem zawierającym antygenowe białko i cząstkę *HLA*, co stanowi mechanizm ochronny wobec gospodarza. Region *HLA* jest wysoce polimorficzny i wykazuje związek z predyspozycją lub protekcją do różnych chorób autoimmunizacyjnych [93,108].

Niezbędnym warunkiem do pobudzenia limfocytów T jest prezentacja antygeny przez komórki APC. Według niektórych hipotez rolę tych komórek mogą pełnić tyreocyty pod wpływem stymulacji przez cytokiny [93].

Jak wspomniano powyżej, pomiędzy regionami kodującymi klasę I i II MCH jest usytuowany region III klasy. Ten ostatni wraz z regionem II klasy, koduje białka o charakterze immunoregulującym, które są związane z predyspozycją do AITD. Do genów regionu III klasy należy gen dla cytokiny TNF α . Będący jego produktem TNF α indukuje produkcję IFN γ oraz Il-6 i ma także swój udział w rozwoju HT. Nie udowodniono jego związku z przebiegiem i agresywnością choroby [93]. W etiopatogenezie HT bierze się także pod uwagę udział innych genów regionu *HLA* klasy III, należą do nich limfotoksyny α i β , białka szoku termicznego (HSP), jak również geny nie-*HLA*, leżące w obrębie HLA-TAP, DMA, DMB, LMP [93].

Gen CTLA4

Gen *CTLA4* jest usytuowany na chromosomie 2q33 i jest jednym z genów silnie wpływających na podatność w kierunku AITD [108]. Polimorfizmy genu *CTLA4*-antygeny 4, który jest związany z cytotoksycznymi limfocytami T są ściśle związane z występowaniem HT [93,95,108]. *CTLA4* jest supresorem odpowiedzi komórek T. Jego produkcja jest najpewniej stymulowana przez związanie receptora komórek T (TCR, ang. *T-cell receptor*) [93]. Dowiedziono, że myszy pozbawione tego genu (ang. *ctla4 knockout*) rozwijają limfoproliferacyjne choroby skutkujące śmiercią z autoimmunizacji w ciągu 3-4 tygodni po porodzie [108].

CTLA4 bierze udział w hamowaniu aktywności limfocytów T na drodze dwóch mechanizmów. Jeden z nich polega na rywalizacji z molekułą kostymulującą CD 28 o wspólny ligand, którym są cząstki CD80 i CD86, obecne na powierzchni komórek APC. Natomiast drugi – opiera się na bezpośrednim hamowaniu komórek T w wyniku negatywnej sygnalizacji podczas stymulacji TCR [90]. Zmniejszona aktywacja *CTLA4* i/lub upośledzenie jego funkcji w wyniku mutacji, będzie więc skutkowało wzrostem aktywacji limfocytów T [93].

Stwierdzono, że polimorfizmy w genie *CTLA4* wpływają na zwiększoną produkcję przeciwciał przeciwko specyficznym dla gruczołu tarczowego antygenom – TPO i Tg u pacjentów z HT [108]. Dokładna analiza genetyczna *CTLA4*, zawierająca 108 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, *ang. single nucleotide polymorphism*) wykazała dwa typy polimorfizmów związanych z HT: jeden oznaczony jako CT60, zlokalizowany w dół od regionu 4'UTR (c.6230A>G) i typowy dla rasy kaukaskiej i azjatyckiej, drugi – c.49A>G w eksonie 1, powodujący zmianę aminokwasów w pozycji 17 [93,108].

Gen PTPN22

Białko *Lyp* (*ang. lymphoid proteintyrosine phosphatase*) jest kodowane przez gen *PTPN22* zlokalizowany na chromosomie 1p13.3-p13.1, działa jako inhibitor komórek T poprzez wpływ na TCR, synergistycznie z białkiem Csk [108]. *Lyp* hamuje transdukcję sygnału TCR, co koreluje z jego aktywnością defosforylującą i inaktywuje autofosforylację miejsc na Src kinaz tyrozynowych Lck, Fyn i Zap-70 [108].

Wykazano, że u ludzi SNP w genie *PTPN22* – mutacja c.1858C > T w eksonie 14, wywołująca zamianę argininy na tryptofan w aminokwasie 620 białka *Lyp*, zwiększa podatność na cukrzycę typu 1, reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń trzewny, HT, GD, chorobę Addisona i inne choroby autoimmunizacyjne [108]. Z kolei polimorfizm c.1858C/T jest związany ze współwystępowaniem AITD, głównie z HT i cukrzycą typu 1 oraz AITD i toczeniem trzewnym [108]. Wpływ polimorfizmów tego genu na choroby autoimmunizacyjne jest niejednoznaczny. Wykazano, że allele 620W mają działać ochronnie przeciwko wystąpieniu choroby Crohn'a [110].

Efekt dawki genu, był obserwowany u osobników homozygotycznych dla alleli C1858T genu *PTPN22*, co może silniej redukować wiązanie *Lyp* z *Csk* (*ang. C-terminal Src kinase*) niż u heterozygot i w konsekwencji zwiększać ryzyko występowania chorób autoimmunizacyjnych [108]. Istnieją doniesienia o korelacji pomiędzy dawką genu a wiekiem pojawienia się chorób autoimmunizacyjnych [108].

U nosicieli polimorfizmu c.185T wykazano także zmienione zachowanie komórek B, które wykazują zmniejszoną zdolność do odpowiedzi na stymulację drogą BCR (*ang. B-cell receptor*). Można więc wnioskować, że osobnicy z takimi allelami mogą być skłonni do autoimmunizacji. Poprzez stymulację TCR dochodzi także do redukcji stężenia cytokiny przeciwzapalnej IL-10, co dodatkowo sprzyja procesom autoimmunologicznym [108].

Ostatnio publikowane metaanalizy dotyczące polimorfizmu C1858T genu *PTPN22*, dowodzą związku z AITD szczególnie w rasie kaukaskiej, ale wyższy stopień polimorfizmu był stwierdzony w GD, natomiast nie znaleziono związku z HT [111].

Gen dla tyreoglobuliny

Tyreoglobulina pełni ważną rolę jako substrat do syntezy hormonów tarczycy, a także autoantygen wobec którego kierowane są przeciwciała a/Tg, będące markerem HT. Przeciwciała a/Tg są obecne u ok. 80% chorych z HT [93]. Locus 8q24 zawierający gen *Tg* został powiązany z predyspozycją do AITD lub samym HT [93,95,108,112]. Następnie wykryto allele różnych mikrosatelitarnych markerów i różne polimorfizmy (SNPs) genu *Tg*, które mogłyby wpływać na rozwój HT [93,95,108]. Zwiększoną częstość występowania mikrosatelitarnego allelu *Tgms2* w genie *Tg* stwierdzono u 2,2% badanych osób rasy kaukaskiej zamieszkujących Wielką Brytanię oraz u Japończyków [113,114]. Sekwencjonowanie ludzkiego genu *Tg* pozwoliło na znalezienie 14 SNPs, spośród których cztery – grupa eksonów 10-12 SNP oraz ekson 33 SNP, były związane z HT [93,108]. Jednakże przeprowadzone w późniejszym czasie badania nie wykazały korelacji pomiędzy mikrosatelitami oraz polimorfizmami SNP a HT [93,108]. Rozbieżności w wynikach badań mogą być tłumaczone zbyt małymi liczebnościowo grupami badanych osobników ich różnym pochodzeniem rasowym, a także niejednoznacznością w kryteriach diagnostycznych HT i często – wspólną analizą GD i HT [108].

Pomimo powyższych niejasności, rolę jaką pełni Tg w fizjologii gruczołu tarczowego i obecność a/Tg u chorych z HT oraz dowody wynikające z części przeprowadzonych badań, wskazują na konieczność dalszych analiz genu *Tg* oraz jego mutacji/polimorfizmów, jako istotnych w etiopatogenezie HT.

Gen SLC26A4

SLC26A4/PDS (ang. *solute carrier family 26 member 4, Pendred syndrome*) jest poza genem *Tg*, jednym z genów specyficznych dla gruczołu tarczowego, który w ostatnim czasie jego mutacje są pod uwagę z związku z etiopatogenezą HT [108]. Gen ten jest zlokalizowany na chromosomie 7q31 i jest odpowiedzialny za zespół Pendreda, który charakteryzuje się między innymi zmianami ogniskowymi w tarczycy, obecnymi także u części chorych z HT oraz obustronnym ubytkiem słuchu typu zmysłowo-nerwowego. Ekspresja genu zachodzi w gruczole tarczowym, nerkach i uchu wewnętrznym [108].

Produktem genu jest glikoproteina – pendryna, zlokalizowana w błonie szczytowej komórek pęcherzykowych tarczycy, gdzie kontroluje transport jodu z tyreocytów do światła koloidu. Z kolei wychwyt jodu jest uważany za jeden z czynników środowiskowych w

etiopatogenezie HT [108]. Pendryna ulega ekspresji w komórkach tarczycy ze szczególnie obniżonym poziomem mRNA w tarczycy u chorych z HT i wzmożoną ekspresją w szczytowej błonie tyreocytów u chorych z GD [108,115]. Ekspresja pendryny jest regulowana poprzez synergistyczne pomiędzy TSH i Tg, które również są istotne dla HT [115].

Obecność przeciwciał przeciw pendrynie została wykazana u 98% chorych z HT [116]. Przeciwciała te korelują z przeciwciałami przeciw tyreoglobulinie, tyreoperoksydazie i symporterowi sodowo-jodkowemu, ale nie z przeciwciałami przeciwko receptorowi dla TSH (a/TSH-R, *ang. thyrotropin receptor antibodies*) [108]. Badania przeprowadzone nad sekwencjonowaniem genu pendryny pozwoliły na wykrycie mutacji, które są obecne zarówno u chorych z GD, jak i HT [108].

Geny cytokin i inne geny regulujące odpowiedź immunologiczną

Udowodniono, że pewne geny kodujące różne cytokiny pozapalne mają wpływ na przebieg HT [93,95]. $INF-\gamma$ jest produkowany przez komórki Th1, promuje pośredniczoną przez komórki cytotoksyczność, która powoduje zmiany destrukcyjne w HT. Jego wysokie stężenia występują u chorych z HT [93,95].

Wykazano związek pomiędzy polimorfizmem w genie *INF γ* w pozycji +874, powodującym jego zwiększoną produkcję, a nasileniem niedoczynności tarczycy w przebiegu HT [117]. Agresywny przebieg choroby był związany z allelem T, natomiast bardziej umiarkowany z allelem A [118]. Polimorfizmy genu *TGF- β* , który jest inhibitorem produkcji cytokin również mają związek z HT [95]. Allel T polimorfizmu +869T/C wiąże się ze zmniejszoną sekrecją *TGF- β* i cięższą postacią niedoczynności tarczycy, z kolei wariant C – ze zwiększoną ekspresją cytokiny [118].

Cięższy przebieg HT może być także związany z polimorfizmem – 2383C/T genu *FoxP3* (*ang. forhead box P3*), który jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za powstawanie limfocytów T regulatorowych (Tregs) [95]. Wykazano także związek rozwoju HT z allelem C polimorfizmu – 1031T/C genu *TNF α* [95].

Gen receptora witaminy D (gen VDR)

Jak poprzednio wspomiano, witamina D działając poprzez VDR wykazuje immunomodulujące właściwości i jej niedobór może mieć związek z chorobami autoimmunizacyjnymi. Wykazano związek polimorfizmu genu *VDR* z występowaniem cukrzycy typu 1 i choroby Addisona [95]. W przypadku HT wykryto związek polimorfizmu FokI w eksonie 2 [95,119,120]. W innym badaniu dotyczącym populacji chorwackiej polimorfizm regionu 3 genu *VDR* również był związany z HT i dotyczył ekspresji mRNA *VDR*. Istotną statystycznie częstość występowania w stosunku do grupy kontrolnej uzyskano

jedynie dla polimorfizmu VDR-Bsml [121]. Poza związkiem z genem *VDR*, istnieją doniesienia o wpływie polimorfizmu genu *CYP27B1*-hydroksylazy na etiopatogenezę HT [95].

2.2.3.2. Czynniki środowiskowe

Nadmierne spożycie jodu

Nadmierne spożycie jodu jest dobrze udokumentowanym czynnikiem środowiskowym wpływającym na immunogenność gruczołu tarczowego. Wykazano ponad czterokrotnie zwiększone stężenie przeciwciał przeciw-tarczycowych w wyniku zwiększonego dowozu jodu wynikającego z poprawy profilaktyki jodowej [93,95]. W jednym z badań interwencyjnych udowodniono, że umyślne narażenie na spożycie 500 µg jodu wywołało autoimmunizację tarczycy u 20% uprzednio zdrowych osobników [95].

Opisano kilka potencjalnych mechanizmów wpływu nadmiaru jodu na immunogenność tarczycy. Nadmierna ekspozycja na jod prowadzi do zwiększonej jodynacji Tg i zwiększa immunogenność przez tworzenie nowych zawierających jod epitopów. W konsekwencji dochodzi do zwiększonej immunogenności Tg, która jest prezentowana komórkom APC jako autoantygen [93,95].

Drugi proponowany mechanizm ma związek z ekspozycją na jod, która powoduje zwiększenie ilości reaktywnych form tlenowych (ROS, ang. reactive oxygen species) w tyreocytach w wyniku oksydacji tyreoperoksydazy tarczycowej. Konsekwencją tego jest zwiększenie ekspresji wewnątrzkomórkowych molekuł adhezyjnych-1 (ICAM-1, ang. *intracellulare adhesive molekule-1*) w komórkach pęcherzykowych tarczycy, które przyciągają komórki immunokompetentne [95].

Trzeci mechanizm jest związany z toksycznością jodu i dotyczy uszkodzenia tyreocytów przez ROS, co prowadzi do ich uszkodzeń i uwalniania autoantygenów [95]. Nadmiar jodu może także promować proces apoptozy w tyreocytach, poprzez zwiększenie ekspresji molekuly TRAIL (ang. *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Ligand*), czyli liganda czynnika martwicy nowotworów indukującego apoptozę [95].

Ostatni z mechanizmów dotyczy wpływu nadmiaru jodu na układ odpornościowy poprzez zwiększenie dojrzewania komórek dendrytycznych, wzrost liczby limfocytów T i stymulację limfocytów B do produkcji immunoglobulin [95].

Leki

Wpływ leków na immunogenność tarczycy i w konsekwencji rozwój HT jest odmienny i uzależniony od ich rodzajów [93,95].

Amiodaron i jodowe środki cieniujące używane w radiologii działają bezpośrednio toksycznie na gruczoł tarczowy [93]. Wywołana przez nie długotrwała ekspozycja na jod powoduje zmiany strukturalne w tyreocytach tj. obrzęk mitochondriów, wzrost ilości peroksysomów i wtórnych lizosomów, w konsekwencji apoptozę i martwicę tych komórek. Wynikiem tego jest uwolnienie autoantygeny tarczycowego [93].

Używany między innymi w terapii wirusowego zapalenia wątroby INF- γ wywołuje efekty toksyczne, wynikiem czego jest prezentacja autoantygeny tarczycowego, wyzwolenie odpowiedzi immunologicznej przez limfocyty Th1, supresja funkcji Treg, stymulacja cytokin i ekspresja MHC klasy I na tyreocytach [93,95]. Podczas terapii INF γ obserwuje się u ponad 40% leczonych przeciwciała przeciw tarczycowe i klinicznie jawna niedoczynność tarczycy – u 5-10% [95,122].

Podobnie działa używana w leczeniu czerniaka i raka nerki interleukina-2 (IL-2) i w konsekwencji mechanizmów toksycznych i immunogenicznych, dochodzi do hipotyreozy i obecności przeciwciał przeciw tarczycowych [95,123].

Sole litu używane w terapii także mogą zwiększać immunogenność tarczycy i prowadzić do niedoczynności, ale doniesienia te wymagają potwierdzenia [95,123].

Czynniki infekcyjne

Do czynników środowiskowych mających wpływ na rozwój HT należą zakażenia zarówno bakteryjne jak i wirusowe. Patogeny bakteryjne mające potencjalny związek z HT to: *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdoferi* [93,95,100,108].

Wśród zakażeń wirusowych uwzględnia się: wirus zapalenia wątroby typu C, wirus *Coxsackie B*, reowirusy. Związek pomiędzy zakażeniem a występowaniem HT tłumaczy się dwoma mechanizmami [93,95,100,108]. Pierwszy opiera się na teorii mimikry uznającej, że podobieństwo sekwencji pomiędzy białkami mikroorganizmu a cząstkami organizmu zakażonego, prowadzi do reakcji krzyżowej [93]. Drugi – to teoria „biernego obserwatora” (*ang. bystander theory*), która opiera się na zasadzie, że miejscowy stan zapalny w wyniku infekcji pobudza autoreaktywne limfocyty [93].

2.2.4. Mechanizmy rozwoju autoimmunologicznego zapalenia tarczycy

W warunkach obecności czynników genetycznych i środowiskowych u osób predysponowanych, w gruczole tarczowym dochodzi do aktywacji limfocytów CD4+ pod wpływem APCs, które stanowią głównie komórki dendrytyczne oraz makrofagi. Warunkiem do rozwoju kolejnych etapów choroby jest przełamanie tolerancji wobec własnych autoantygenów [93,95]. Przyczyną tego może być brak supresji autoreaktywnych limfocytów T przy udziale limfocytów regulatorowych CD25+ CD4+ oraz CD 8+ CD122+ [93]. Według

innej teorii autoreaktywne limfocyty T powstają w wyniku zaburzonej ekspresji kompleksów MHC klasy II na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy, wynikiem czego jest aktywacja limfocytów T [93].

Mechanizm ten został zaproponowany przez *Botazzo* w 1983r i zakłada, że pod wpływem zakażenia wirusowego, INF- γ lub zaburzeń w genomie, tyreocyty nabywają zdolności prezentowania antygenów zgodności tkankowej klasy II [93]. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują, że w etiopatogenezie HT istotną rolę odgrywają jednak klasyczne APC, a "zmienione" tyreocyty mogą wpływać na jej przebieg [93]. W HT odpowiedź autoimmunologiczna jest modulowana głównie przez cytokiny związane z limfocytami Th1 takimi jak TNF- α , INF- γ , IL-2 [98]. Wykazano, że w wyniku ekspozycji komórek pęcherzykowych tarczycy na autoantymen jakim jest tyreoglobulina, dochodzi do wzmożonej produkcji TNF- α , IL-2, IL-10, INF- γ , i IL-5 w stosunku do grupy kontrolnej [95].

Badając profile mRNA cytokin stwierdzono, że w patogenezę HT są włączone zarówno odpowiedzi immunologiczne związane z Th1, jak i Th2, ale z przewagą Th1 [95]. Autorzy jednego z badań, uważają że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy stosunkiem Th1/Th2 a stopniem ciężkości niedoczynności tarczycy w przebiegu HT [124].

W ostatnich latach zwrócono uwagę na podtyp limfocytów Th oznaczonych jako Th17. Uważa się, że ekspresja tych komórek jest dominująca w przebiegu HT, bardziej niż Th1 [95]. Po przełamaniu tolerancji immunologicznej, dochodzi do aktywacji limfocytów CD8+ i limfocytów B. Te ostatnie zaczynają produkować przeciwciała przeciwtarczycowe: przeciw peroksydazie tarczycowej (a/TPO) i przeciw tyreoglobulinie (a/Tg) [93]. Przeciwciała a/TPO są uważane za najlepszy wskaźnik procesu autoimmunologicznego w gruczole tarczowym. Wykazano, że stanowią heterogenną grupę i wyróżniono około 180 typów tych przeciwciał. Ich obecność stwierdza się u blisko 80% chorych z HT [92].

Przeciwciała a/TPO mają zdolność do wiązania się z typem pierwszym receptora Fc γ R na monocytach i neutrofilach [93]. Wykazano korelację pomiędzy stężeniem a/TPO a produkcją TNF- α i INF- γ i ustalono, że przeciwciała te mogą indukować wytwarzanie tych cytokin oraz IL-6 [95]. Stwierdzono także związek pomiędzy podklasą przeciwciał a/TPO i nasileniem hipotyreozy w przebiegu HT. Obecność podklasy IgG2 skutkuje większym ryzykiem powstania jawnej niedoczynności tarczycy [93].

Drugim rodzajem przeciwciał charakterystycznych dla HT są przeciwciała a/Tg. Ich rola w etiopatogenezie HT nie jest tak oczywista, jak w przypadku a/TPO, ponieważ Tg nie jest białkiem błonowym [93].

Innymi rodzajami przeciwciał mogącymi występować w AITD, są patognomiczne dla GD przeciwciała przeciw receptorom dla TSH oraz przeciwciała przeciw pendrynie, które w przyszłości mogą być wykorzystane w diagnostyce HT [93].

Ostatnim etapem rozwoju HT jest destrukcja gruczołu tarczowego będąca wynikiem nacieku z cytotoksycznych limfocytów T, produkujących przeciwciała limfocytów B oraz makrofagów [93,125]. Destrukcja jest konsekwencją procesu apoptozy zachodzącym w tarczycy [95]. Cały proces jest najpewniej wyzwalany zależna od limfocytów Th1 produkcją cytokin – TNF- α , INF- γ i IL-12. Komórki pęcherzykowe tarczycy pod wpływem układu dopełniacza zaczynają uwalniać prostaglandynę E2, IL-1, IL-6. To powoduje napływ cytotoksycznych limfocytów, które po przyłączeniu do receptorów na tyreocytów, uwalniają wewnątrzkomórkowe ziarnistości i powodują aktywację proteolitycznych enzymów kaspaz, co prowadzi do apoptozy [93,95]. Do aktywacji układu kaspaz może dochodzić w dwóch mechanizmach. Pierwszy z nich poprzez Fas receptor (Apo-1 lub CD 95), który jest typem I przezbłonowego białka i członkiem nadrodziny receptora TNF i Fas liganda – II typu przezbłonowego białka, który po przyłączeniu do receptora Fas indukuje apoptozę [95]. Druga droga indukcji apoptozy realizuje się poprzez TRAIL (Apo2L) (*ang. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), po przyłączeniu do jego receptorów TRAIL – R1(DR4) i TRAIL-R2(DR5). Obydwie drogi są indukowane poprzez cytokiny pozapalne, a układ Fas przede wszystkim przez TNF- α i INF- γ , IL-1 β [95].

W HT głównym apoptotycznym mechanizmem jest ten związany z receptorem Fas oraz zmniejszeniem Bcl-2, który jest głównym inhibitorem apoptozy, charakteryzującym się wysoką aktywnością w zdrowych tyreocytach [95]. Aktywacja apoptozy może odbywać się także w mechanizmie wewnątrzpochodnym (mitochondrialnym). Inicjować ją mogą czynniki uszkodzające komórkę, w tym zaburzenia metaboliczne, ale także składniki apoptozy zewnątrzpochodnej. Kaspaza 8 może aktywować molekułę Bid (*ang. BH3-interacting domain death agonist*) o działaniu apoptotycznym, należąca do rodziny Bcl-2. Uwolniony z mitochondriów cytochrom c w połączeniu z prokaspazą 9 i cząstką APAF-1 (*ang. apoptotic protease activating factor-1*) tworzy tzw. apoptozom, który pobudza kaspazy wykonawcze. W efekcie dochodzi do rozpadu jądra komórkowego i innych organelli i śmierci komórki [93]. Wyselekcjonowano czynniki, które działają protekcyjnie przeciwdziałając samobójczej śmierci komórki. Należą do nich: białko FAP-1 (*ang. Fas – associated phosphatase-1*), wspomniane cząsteczki z rodziny Bcl-2, białka IAP (*ang. inhibitor of apoptosis*) [93,95]. Oprócz apoptozy komórki CD8⁺ wywołują cytotoksyczność wpływającą na destrukcję gruczołu tarczowego poprzez aktywację cząstek ICAM-1 (*ang. intracellular adhesion*

molekule-1). Wykazano, że poziom ICAM-1, VCAM-1 (*ang. vascular cell adhesion molekule-1*) i TIMP-1 (*ang. tissue inhibitor metalloproteinases 1*) był znacząco wyższy w grupie chorych z HT w porównaniu do grupy kontrolnej [95]. Wysznięto więc hipotezę, że proces autoimmunizacyjny może mieć wpływ na zapalenie naczyń, dysfunkcję śródbłónka i remodeling tkankowy naczyń [95].

Udział w destrukcji tarczycy mają także występujące w końcowej fazie uszkodzenia połączeń międzykomórkowych. W HT wykazano zmniejszony poziom koneksyny 43 (Cx43, *ang. connexin 43*) w porównaniu do zdrowych tanek tarczycowych. Cx43 jest częścią koneksonów, które stanowią kanały połączeń między komórkami. Na modelach zwierzęcych w przebiegu AITD, stwierdzono redukcję białek Cx43, Cx32 i Cx26 [95]. Uszkodzenie integralności między komórkami gruczołu tarczowego, może ułatwiać przyłączenie przeciwciał a/TPO do peroksydazy tarczycowej i aktywować komplement [95].

2.2.5. Historia naturalna choroby Hashimoto

W przebiegu AITD, w tym HT obserwuje się kolejno po sobie występujące IV stadia choroby [100] (Tabela 5).

Tabela 5. Historia naturalna HT– stadia choroby [na podstawie 100]

Stadium choroby	Cechy charakterystyczne
I stadium	Prawidłowe stężenia TSH, FT4, FT3 Brak przeciwciał przeciw tarczycowych Obecność czynników ryzyka rozwoju HT (np. wywiad rodzinny, cechy nadreaktywności układu immunologicznego)
II stadium	Prawidłowe stężenie TSH, FT4, FT3 Obecność przeciwciał przeciw tarczycowych
III stadium	Subkliniczne zaburzenia czynności tarczycy
IV stadium	Klinicznie i laboratoryjnie jawne zaburzenia czynności tarczycy

2.2.6. Witamina D jako czynnik modulujący proces autoimmunizacyjny w przebiegu choroby Hashimoto

Warunkiem rozwoju choroby Hashimoto jest wyzwolenie procesu autoimmunizacyjnego u osób predysponowanych genetycznie pod wpływem czynników środowiskowych. Poznane

mechanizmy działania witaminy D w układzie immunologicznym sugerują, że jej niedobór poprzez zaburzenie równowagi immunologicznej może stanowić czynnik środowiskowy odgrywający istotną rolę w rozwoju HT. Istnieją także doniesienia o roli polimorfizmów VDR w etiopatogenezie HT, co z kolei może mieć wpływ na czynnik genetyczny w etiopatogenezie HT [95,119,120,121].

Poznanie mechanizmów działania witaminy D w układzie immunologicznym, dało podstawy do prowadzenia badań oceniających następstwa niedoboru witaminy D w aspekcie rozwoju i przebiegu chorób autoimmunizacyjnych. Wyniki badań epidemiologicznych sugerują związek pomiędzy niedoborem witaminy D i zwiększoną obecnością zachorowań na cukrzycę typu 1, stwardnienie rozsiane, toczeń trzewny, reumatoidalne zapalenie stawów i nieswoiste choroby zapalne jelit, autoimmunologiczne zapalenie mózgu, łuszczycę [6,15-19,63,64,66,126-129]. Korelacja pomiędzy niedoborem witaminy D a AITD nie jest wyjaśniona.

Innym zagadnieniem jest odpowiedź na pytanie, czy uzupełnienie jej niedoborów wywierałoby korzystny wpływ na przebieg chorób autoimmunizacyjnych. Próby odpowiedzi na zadane powyżej pytanie miała dostarczyć praca, będąca przeglądem zagadnień dotyczących tego problemu opublikowanych od stycznia 1973 do października 2011 roku [130]. W konkluzji stwierdzono, że podstawy badań genetycznych i epidemiologicznych wskazują na potencjalną prewencyjną rolę witaminy D w aspekcie chorób autoimmunizacyjnych, ale konieczne jest przeprowadzenie w przyszłości randomizowanych, kontrolowanych badań, aby umocnić korzystną rolę jej suplementacji w przebiegu tych chorób [130].

W ostatnim czasie ukazało się wiele doniesień na temat roli witaminy D w przebiegu AITD, w tym HT. Wyniki większości z nich wskazują na obniżone stężenie 25OHD w grupie chorych z HT, natomiast różnice dotyczą korelacji stężenia witaminy D w stosunku do czynności hormonalnej tarczycy i aktywności procesu autoimmunologicznego w ocenie przeciwciał przeciwtarczycowych [16,17,131-141].

3. CELE PRACY

Głównym celem pracy jest ocena wpływu niedoboru witaminy D na przebieg choroby Hashimoto u chorych w województwie świętokrzyskim.

Weryfikacji zostaną poddane następujące hipotezy badawcze:

Dokonano oceny związku obniżonego stężenia 25OHD3 z aktywnością HT na podstawie obecności przeciwciał przeciwarczycowych: przeciw peroksydazie tarczycowej (a/TPO) i przeciw tyreoglobulinie (a/Tg). Przeprowadzono analizę stężenia 25OHD3 w badanej grupie biorąc pod uwagę wpływ wieku pacjentów, czas trwania choroby HT oraz stan czynnościowy gruczołu tarczowego. Ze względu na rolę, jaką odgrywa witamina D w homeostazie wapniowo-fosforanowej dokonano także analizy jej wpływu na stężenia PTH, Ca i P w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej.

Podjęto próbę oceny związku obniżonego stężenia 25OHD3 z objętością gruczołu tarczowego w ocenie ultrasonograficznej. Z badanej grupy pacjentów z chorobą Hashimoto wyodrębniono podgrupę osób z dodatnimi przeciwciałami przeciwarczycowymi a/TPO i/lub a/Tg, będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną. Powyższe analizy przeprowadzono również w tej podgrupie. U części badanych przeprowadzono analizę mutacji w genie *HLA-DRB1*, biorącym udział w procesie regulacji odpowiedzi immunologicznej.

Wykazanie niedoboru witaminy D, a zwłaszcza jej wpływu na przebieg procesu autoimmunizacji tarczycowej może mieć znaczenie praktyczne. Może w przyszłości skutkować wprowadzeniem do rutynowych oznaczeń pomiar stężenia 25OHD3 u pacjentów z HT i w konsekwencji stosowania suplementacji lub terapii natywną witaminą D.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. BADANA GRUPA

Projekt otrzymał zgodę Komisji Bioetycznej Świętokrzyskiej Izby Lekarskiej w Kielcach (Opinia nr 17/2013). Po otrzymaniu szczegółowych informacji dotyczących projektu badawczego, wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniu. Część dotycząca badań genetycznych była realizowana w Pracowni Badań Genetycznych Katedry i Kliniki Endokrynologii UJ Collegium Medicum w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Współdziałanie mutacji w genach regulujących układ immunologiczny oraz w genach specyficznych dla gruczołu tarczowego w rozwoju choroby Hashimoto - badanie kohortowe rodzin oraz osób niespokrewnionych” (nr UMO-2011/01/B/N25/0037). Na udział w tym projekcie chorzy wyrazili osobną pisemną zgodę.

Wszyscy pacjenci byli leczeni w Poradni i Klinice Endokrynologii Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach. W badaniu wzięło udział 310 dorosłych osób w wieku powyżej 18 roku życia w tym 155 pacjentów z chorobą Hashimoto i 155 osób w grupie kontrolnej. Kryterium włączenia do badania stanowiło rozpoznanie choroby Hashimoto, czyli przewlekłego autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy, charakteryzującego się podwyższonymi wartościami przeciwciał przeciw tarczycowym a/TPO i/lub a/Tg, w konsekwencji wywołującego niedoczynność tarczycy, z koniecznością substytucyjnego leczenia l-tyroksyną.

Do grupy badanej zakwalifikowano także osoby z niedoczynnością tarczycy w trakcie leczenia l-tyroksyną i mieszczącymi się w granicach norm referencyjnych wartościami przeciwciał przeciw tarczycowym a/TPO i a/Tg. Byli to pacjenci z wieloletnią chorobą Hashimoto i obecnością udokumentowanych podwyższonych stężeń przeciwciał przeciw tarczycowym w przeszłości, u których wykluczono inne przyczyny hipotyreozy. W grupie badanej podwyższone wartości przeciwciał a/TPO stwierdzono u 141 (90,97%) osób, natomiast zawierające się w granicach norm referencyjnych u 14 (9,03%). Podwyższone stężenia przeciwciał a/Tg występowały u 82 (52,9%) pacjentów, natomiast u 73 (47,1%) osób zawierały się w granicach wartości referencyjnych. Podwyższone wartości przeciwciał zarówno a/TPO, jak i a/Tg stwierdzono u 78 osób z grupy badanej. Stężenia przeciwciał zawierające się w granicach norm referencyjnych wystąpiły u 17 osób (10,97%) w grupie badanej. Do grupy badanej zakwalifikowano także pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy, będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną, u których

stwierdzono podwyższone stężenia wyżej wymienionych przeciwciał. Grupę badaną stanowiło 155 osób, w tym większość kobiet – 144 oraz 11 mężczyzn.

W podgrupie badanej pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy w stadium eutyreozy z podwyższonymi wartościami przeciwciał przeciwtarczycowych znalazło się 45 osób, w tym 42 kobiety oraz 3 mężczyzn.

Grupę kontrolną stanowiło 155 osób, u których wykluczono autoimmunizacyjną chorobę tarczycy na podstawie braku obecności podwyższonych stężeń przeciwciał przeciwtarczycowych, z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku AITD, bez operacji gruczołu tarczowego. Podobnie jak w grupie badanej, kobiety stanowiły większość - 139 osób natomiast grupa mężczyzn zawierała 16 osób.

Zaplanowano przeprowadzenie analiz porównawczych uzyskanych wyników badań pomiędzy całą grupą badaną i grupą kontrolną. W podgrupie pacjentów, będących w eutyrozie, bez leczenia l-tyroksyną, z obecnością dodatnich przeciwciał przeciwtarczycowych również przeprowadzono analizy, których wyniki porównano z wynikami uzyskanymi dla całej grupy badanej, jak również dla grupy badanej.

Z udziału w badaniu zostali wykluczeni chorzy z:

- czynną chorobą nowotworową,
- niewydolnością wątroby,
- niewydolnością nerek,
- z innymi ciężkimi chorobami,
- leczeni z powodu osteoporozy,
- kobiety w ciąży i połogu,
- stosujący suplementację preparatami wapnia,
- stosujący suplementację preparatami witaminy D.

4.2. PROTOKÓŁ BADANIA

U każdego pacjenta z grupy badanej i kontrolnej zebrano wywiad lekarski oraz przeprowadzono podstawowe badanie przedmiotowe. Wszystkim osobom udzielono wyczerpujących informacji na temat udziału w przeprowadzonym badaniu. Każdy pacjent podpisał świadomą zgodę na udział w badaniu.

4.3. PROCEDURY OZNACZEŃ BIOCHEMICZNYCH I HORMONALNYCH

Badania hormonalne (25OHD3, PTH, TSH, a/TPO i a/Tg) przeprowadzono w Zakładzie Markerów Nowotworowych natomiast badania biochemiczne (Ca, P) w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach. Próbkę krwi pobierano na czczo w godzinach porannych, pomiędzy godziną 7.00 a 10.00.

4.3.1. Oznaczenie stężenia hormonu tyreotropowego (TSH)

TSH oznaczano w surowicy. Krew po wykrzepieniu (ok. 30 minut) wirowano od 10 do 15 minut, przy obrotach wirówki 3500 obrotów/minutę w temperaturze 20 do 22°C. Próbkę surowicy do oznaczenia stężenia TSH były przechowywane w temperaturze -20°C przez okres czasu nie dłuższy niż 1 miesiąc. Oznaczenia przeprowadzono przy użyciu testu firmy Abbott na analizatorze ARCHITECT i 2000 SR. Jest on oparty o dwustopniową metodę immunochemiczną z użyciem mikrocząsteczek i znacznika chemiluminescencyjnego (*ang. Chemiluminescent Microparticle Immunassay – CMIA*) służącą do wykrywania obecności TSH w ludzkiej surowicy lub osoczu oraz wykorzystującą elastyczne protokoły testowe Chemiflex TM. W pierwszym etapie reakcji mieszane są: badana próbka oraz paramagnetyczne mikrocząstki opłaszczone przeciwciałami anti-βTSH oraz rozpuszczalnik testu. TSH obecne w próbce wiąże się z przeciwciałami anti TSH opłaszczonymi na mikrocząstkach. W drugim etapie po przemyciu, dodawany jest konjugat zawierający przeciwciała anti-αTSH, znakowane akrydyną. Do mieszaniny reakcyjnej dodawany jest roztwór przygotowawczy oraz roztwór wyzwalający reakcję. Natężenie wywołanej reakcją chemiluminescencji mierzone jest w relatywnych jednostkach świecenia (RLU). Istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy ilością TSH w badanej próbce a natężeniem świecenia zmierzonym przez układ optyczny analizatora ARCHITECT i 2000SR. Czulość analityczna TSH wynosi $\leq 0,0025 \mu\text{IU/ml}$, a czulość funkcjonalna TSH $\leq 0,01 \mu\text{IU/ml}$. ARCHITECT TSH test jest tak skonstruowany, że swoistość analizatora stanowi $< 10\%$ reakcji krzyżowych z FSH, LH, hCG. Wartości referencyjne TSH w surowicy u ludzi zawierają się w granicach od 0,35 do 4,94 $\mu\text{IU/ml}$. Czynniki interferujące wpływającymi na przebieg oznaczenia *in vitro* mogą być heterofilne przeciwciała obecne w surowicy, które są zdolne do reakcji z immunoglobulinami będącymi reagentami testu.

Na wynik testu wpływają:

- stężenie bilirubiny $> 20 \text{ mg/dl}$,
- hemoglobina $> 500 \text{ mg/dl}$,

- stężenie trójglicerydów > 3000 mg/dl,
- stężenie białka całkowitego > 12 g/dl.

4.3.2. Oznaczenie stężenia przeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej (a/TPO) i przeciw tyreoglobulinie (a/Tg)

a/TPO i a/Tg oznaczano w surowicy. Krew po wykrzepieniu (ok. 30minut) wirowano w czasie od 10 do 15 minut, przy obrotach wirówki 3500 obrotów / minutę. Próbki surowicy do oznaczenia a/TPO i a/Tg były przechowywane w temperaturze -20 °C przez okres czasu nie dłuższy niż 1 miesiąc. Do oznaczenia użyto analizatora Immulite 2000 xpi Immunoassay System firmy Siemens.

Przeciwciała a/TPO i a/Tg oznaczono za pomocą testu immunoenzymatycznego, chemiluminescencyjnego (CMIA), kanapkowego, opartego na reakcji fazy stałej.

Reakcja chemiluminescencyjna obejmuje 4 etapy:

I etap

Podczas reakcji immunologicznej konjugat z fosfatazą alkaliczną (odczynnik) jest wiązany do kulki znajdującej się wewnątrz próbki testowej.

Ilość związanej fosfatazy alkalicznej jest proporcjonalna (dla testów kanapkowych) lub odwrotnie proporcjonalna (dla testów konkurencyjnych) do stężenia oznaczanego składnika w próbce pacjenta.

II etap

Płukanie próbki testowej.

III etap

Dodawanie substratu chemiluminescencyjnego do próbki testowej i przejście próbki do luminometru (inkubacja 10 minut).

IV etap

Próbka testowa przemieszczana jest przez komorę fotopowielacza, gdzie następuje pomiar światła wytworzonego w procesie reakcji luminescencyjnej.

Reakcje chemiluminescencyjne związane z estrami akrydynowymi (wytwarzającymi błyski świetlne) wzmacniają enzymatycznie reakcje w systemie IMMULITE dając przedłużone świecenie. W reakcji luminescencyjnej substrat (fosforan adamantyl-dioxetanu) jest bardzo szybko wiązany przez fosfatazę alkaliczną związaną z kulką do nietrwałego anionu. Nietrwały anion bezpośrednio po powstaniu emituje foton światła. Ilość emitowanego światła jest proporcjonalna do ilości związanej fosfatazy alkalicznej. W porównaniu do innych metod detekcji chemiluminescencja zapewnia większy stopień precyzji. W testach

kanapkowych natężenie świecenia mierzone przez lumenometr jest wprost proporcjonalne do stężenia oznaczanej substancji.

Parametry laboratoryjne dla testu a/TPO

Czułość analityczna użytego testu wynosi 5,0 IU/ml. Zakres pomiarowy obejmuje wartości do 1000 IU/ml (WHO 1st IRP 66/387). Wartości referencyjne u osób zdrowych dla a/TPO wynoszą poniżej 35 IU/ml.

Na wynik testu a/TPO nie wpływają:

- bilirubina w stężeniach < 200 mg/dl,
- hemoglobina w stężeniach < 381 mg/dl,
- trójglicerydy w stężeniach < 3000 mg/dl.

Parametry laboratoryjne dla testu a/Tg

Czułość analityczna testu wynosi 2,2 IU/ml. Zakres pomiarowy obejmuje wartości do 3000 IU/ml (WHO 1st IRP 65/93). Wartości referencyjne a/Tg w populacji osób zdrowych stanowią poniżej 40 IU/ml.

Na wynik testu a/Tg nie wpływają:

- bilirubina w stężeniach < 200 mg/dl,
- hemoglobina w stężeniach < 381 mg/dl,
- trójglicerydy w stężeniach < 4000 mg/dl.

Przeciwciała heterofilne obecne w surowicy ludzkiej mogą wchodzić w reakcje z immunoglobulinami będącymi reagentami testu immunologicznego, wpływając na przebieg oznaczenia *in vitro*. Wpływ przeciwciał heterofilnych może ujawnić się w oznaczeniach wykonywanych w surowicy osób mających ciągły kontakt ze zwierzętami lub zwierzęcymi produktami krwiopochodnymi, stanowiąc przyczynę błędnych wyników. W użytym teście ryzyko interferencji zostało zminimalizowane przez odpowiedni dobór proporcji odczynników, ale potencjalnie może wystąpić w rzadkich przypadkach.

4.3.3. Oznaczenie stężenia parathormonu (PTH)

PTH oznaczano w osoczu na czczo, pomiędzy godziną 7.00 a 10.00 w osoczu krwi żyłnej. Krew żylną pobierano do schłodzonej probówki z EDTA i wirowano w wirówce z chłodzeniem przez 10-15 minut, przy obrotach 3500/min, w temperaturze 4 °C. Następnie oddzielono osocze i oznaczono stężenie PTH. Oznaczenia wykonywano przy użyciu testu immunochemicznego z użyciem mikrocząsteczek i znacznika chemiluminescencyjnego (CMIA). Architect intact PTH jest dwustopniowym, przeprowadzonym techniką kanapkową testem immunochemicznym, służącym do ilościowego wykrywania całej cząsteczki PTH

w ludzkiej surowicy i osoczu przy użyciu metody CMIA z zastosowaniem elastycznych protokołów testowych Chemiflex, przy użyciu analizatora ARCHITECT i System 2000 SR firmy Abbott. W pierwszym etapie reakcji mieszane są: badana próbka, rozcieńczalnik testu oraz paramagnetyczne mikrocząstki opłaszczane przeciwciałami anty-PTH. Cała cząsteczka PTH obecna w badanej próbce wiąże się z przeciwciałami anty-PTH opłaszczonymi na mikrocząstkach. W drugim etapie, po przemyciu, do mieszaniny reakcyjnej dodawany jest konjugat zawierający przeciwciała anty- PTH znakowane akrydyną. Po kolejnym cyklu przemycia, do mieszaniny reakcyjnej dodawany jest roztwór przygotowawczy oraz roztwór wyzwalający reakcję, a powstałe w wyniku tej reakcji natężenie chemiluminescencji mierzone jest we względnych jednostkach świecenia (RLU, *ang. Relative Light Unit*). Istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy ilością całej cząsteczki PTH w badanej próbce a natężeniem świecenia zmierzonym przez układ optyczny analizatora ARCHITECT i System 2000 SR firmy Abbott. Czułość analityczna PTH wynosi ≤ 1 pg/ml. Zakres pomiarowy obejmuje wartości do 2500 pg/ml. Wartości referencyjne PTH na czczo u zdrowych osób wynoszą od 15,0 do 68,3 pg/ml. Test ARCHITECT intact PTH opracowano w taki sposób, aby reaktywność krzyżowa wynosiła $\leq 0,01\%$ przy oznaczaniu strukturalnie podobnych fragmentów PTH (1-34, 39-68, 53-84, 44-68, 39-84).

4.3.4. Oznaczenie hydroksychlekalcyferolu (25OHD₃)

25OHD₃ oznaczano w godzinach porannych na czczo pomiędzy godziną 7.00 a 10.00, w surowicy krwi żyłnej (krew żylna bez antykoagulantów). Pobrana krew była wirowana w wirówce z chłodzeniem o obrotach 3500 /min. Próbkę surowicy były przechowywane w temperaturze 2-8°C. Jeżeli oznaczenie nie było wykonane w ciągu 48 godzin, to próbki surowicy były przechowywane w temperaturze -20 °C przez okres czasu nie dłuższy niż 1 miesiąc. Oznaczenia wykonano metodą radioimmunoenzymatyczną (RIA, *ang. Radioimmunoassay*), przy użyciu gotowych zestawów firmy Diasource Immuno Assays S.A. Reaktywność próbek mierzono na liczniku promieniowania LKB Clini gamma 1272. Czułość metody była równa 1,2 ng/ml. Swoistość testu oceniana jako odsetek reakcji krzyżowej uzyskany przez porównanie stężenia uzyskującego 50% hamowania pokazano w tabeli 6.

Tabela 6. Swoistość testu oceniona jako odsetek reakcji krzyżowych dla poszczególnych form chemicznych witaminy D

Składnik	Reaktywność krzyżowa (%)
25OHD3	100
25OHD2	< 0,3
1,25OH2D3	89
1,25OH2D2	< 0,01
Witamina D3	< 0,03
Witamina D2	< 0,03
24,25OH2D3	< 0,8

W związku z tym, że stężenia 1,25OH2D3 są praktycznie 100 razy niższe do stężeń 25OHD3, ta reaktywność krzyżowa nie ma znaczenia klinicznego i nie interferuje w tym oznaczeniu. Powyższe wyniki wskazują na brak reakcji krzyżowych z innymi witaminami z grupy D. Współczynnik zmienności wewnątrzseryjnej oznaczenia 25OHD3 przy użyciu zestawu firmy wynosił firmy Diasource Immuno Assays S.A. wynosił 8,7% natomiast współczynnik zmienności międzysesyjnej – 7,3%. Wartości referencyjne 25OH3na czczo u osób zdrowych, w oparciu o powyższy zestaw zawierały się pomiędzy: 8,2-57,4 ng/ml, natomiast zakres pomiarowy stanowił stężenia do 145,2 ng/ml. Interpretacja wyników badań pacjentów biorących udział w badaniu zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej była dokonywana w oparciu o wytyczne dla populacji Europy Centralnej, opublikowane w 2013 roku [1].

4.3.5. Oznaczenie stężenia wapnia (Ca)

Pomiar stężenia Ca był wykonywany w surowicy ludzkiej pobranej na czczo w godzinach porannych pomiędzy godziną 7.00 a 10.00, metodą fotometryczną przy użyciu analizatora COBAS INTEGRA 800 za pomocą odczynnika Calcium Gen.2, firmy Roche. Zasada pomiaru polega na reakcji jonów Ca w środowisku zasadowym z 5-nitro-5'-metylo-BABTA (NM-BABTA), tworząc związek. Związek ten w drugim etapie reaguje z EDTA. Zmiana absorbancji jest wprost proporcjonalna do stężenia Ca i mierzona jest metoda fotometryczną. Absorbancja była odczytywana przy długości fali 340 nm.

Brak istotnej interferencji występuje warunkach:

- stężenia bilirubiny < 60 mg/dl,

- stężenie hemoglobiny < 1000 mg/dl,
- lipemii – jeżeli wartości znajdują się wskaźnika L, odnoszącego się do zmętnienia surowicy,
- stężenia magnezu < 15 mmol/l,
- stosowania leków i dożylnych środków kontrastowych używanych w rezonansie magnetycznym używanych w stężeniach terapeutycznych.

Zakres pomiarowy stężenia Ca w użytej metodzie wynosił od 0,20 do 5,0 mmol/l (0,8-10,1 mg/dl). Czulość metody, będąca granicą wykrywalności wynosiła 0,2 mmol/l (0,8 mg/dl). Powtarzalność wyrażona jako współczynnik zmienności (według ulotki producenta zestawu) wynosiła 1,8%. Precyzja pośrednia wyrażona jako współczynnik zmienności (według ulotki producenta zestawu) wynosiła 2,1%. Zakres norm referencyjnych obejmowała stężenia Ca: 2,1-2,6 mmol/l.

4.3.6. Oznaczenie stężenia fosforu (P)

Pomiar stężenia P był wykonywany w surowicy ludzkiej pobranej na czczo w godzinach porannych metodą fotometryczną, przy użyciu analizatora COBAS INTEGRA 800 za pomocą odczynnika Phosphate (Inorganic) ver.2, firmy Roche. Metoda oznaczenia polegała na reakcji fosforanu nieorganicznego z molibdenianem amonu z utworzeniem fosfomolibdenianu amonu, którego stężenie jest wprost proporcjonalne do stężenia fosforu nieorganicznego. Oznaczenie jest wykonywane poprzez pomiar wzrostu absorbancji przy długości fal 340 nm.

Czynniki interferujące, przy których brak jest istotnej interferencji obejmują:

- stężenie bilirubiny < 51 mg/dl,
- stężenie hemoglobiny < 420 mg/dl,
- lipemii – przy stężeniu intralipidu < 1000 mg/dl,
- stosowanie leków używanych w stężeniach terapeutycznych,
- w bardzo rzadkich przypadkach gammopatii, szczególnie typu IgM (makroglobulinemia Waldenströma), wyniki mogą być niemiarodajne.

Zakres pomiarowy stężenia P w zastosowanej metodzie wynosi 0,31-20 mg/dl (0,10-6,46 mmol/l). Czulość metody, będąca dolną granicą wykrywalności, oceniana jako najniższe mierzalne stężenie oznaczanej substancji, które można odróżnić od zera wynosi 0,31 mg/dl (0,1 mmol/l). Zakres normo referencyjnych stężenia P stanowi stężenia 2,7-4,5 mg/dl (0,87-1,45 mmol/l). Powtarzalność wyrażona jako współczynnik zmienności (według ulotki producenta zestawu) wynosi 1,4%. Precyzja pośrednia wyrażona jako współczynnik zmienności (według ulotki producenta zestawu) wynosi 2,5%.

4.4. PROCEDURY GENETYCZNE – ANALIZA GENU *HLA-DRB1*

Analizy genetyczne niezbędne do realizacji pracy doktorskiej, zostały przeprowadzone w Pracowni Badań Genetycznych Katedry i Kliniki UJ Collegium Medium w Krakowie. Rekrutowani pacjenci byli poddani badaniom genetycznym w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. "Współdział mutacji w genach regulujących układ immunologiczny oraz w genach specyficznych dla gruczołu tarczowego w rozwoju choroby Hashimoto - badanie kohortowe rodzin oraz osób niespokrewnionych" (nr UMO-2011/01/B/NZ5/00337). Przeprowadzono analizę genu *HLA-DRB1*. Oceniono polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), czyli mutacje zmiany sensu w obrębie eksonu 2 genu *HLA-DRB1*, powodujące zmiany w aminokwasach białka w pozycjach 26, 30, 70, 71, 74. Według ostatnich doniesień z dostępnej literatury uważa się, że nie określony typ *HLA-DR*, ale specyficzna sekwencja aminokwasowa kieszeni wiążącej peptyd obecna wśród różnych typów, warunkuje skłonność do wystąpienia choroby autoimmunologicznej. Do tych aminokwasów należą: Tyr-26, Tyr- 30, Gln-70, Lys-71, Arg-74. Ich kodony są zlokalizowane w obrębie eksonu 2 genu *HLA-DRB1*, którego sekwencjonowanie zostało przeprowadzone w projekcie.

Izolacja DNA

Do celu oceny genomowego DNA od każdego uczestnika badania pobierano 5ml krwi pełnej na EDTA w systemie zamkniętym. Do czasu izolacji materiał był przechowywany w temperaturze -20 °C. Przed samym procesem izolacji DNA krew była rozmrażana w temperaturze pokojowej i dokładnie mieszana. Do izolacji DNA używano zestawów High Pure PCR Template Preparation Kit firmy Roche. Następnie jakość uzyskanego DNA podlegała weryfikacji przy użyciu pomiaru spektrofotometrycznego UV/VIS na urządzeniu firmy Eppendorf-BioPhotometer. Ustawienia: DNA dwuniciowy ($A_{260} = 1$ dla 50 ng/μl), korekcja tła względem absorbancji przy 340 nm. Stężenie DNA jest bezpośrednio odczytywane z urządzenia i obliczone na podstawie wartości absorbancji przy długości fali 260 nm.

Genotypowanie polimorfizmów SNP

Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów były genotypowane na macierzach przy zastosowaniu sond TaqMan w aparacie HiScan, przy użyciu zestawu GoldenGate w wersji Custom, firmy Illumina.

Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie dotyczyło eksonu 2 genu *HLA-DRB1*. Analiza sekwencji była przeprowadzona w oparciu o reakcję Sangera oraz elektroforetyczny rozdział otrzymanych produktów w aparacie do elektroforezy kapilarnej ABI 3500 na kapilarach 50 cm.

Etapy pre-sekwencyjne:

- PCR – mieszanina reakcyjna zawiera polimerazę HotStartTaq Plus DNA Polymerase i bufor dostarczone przez firmę Qiagen oraz dNTP Mix w stężeniu końcowym 0,2 mM,
- i odpowiednio zaprojektowane startery sensowne i antysensowne w ostatecznym stężeniu,
- po 0,2mM oraz 200ng DNA,

- elektroforeza w 2% żelu agarozowym firmy Serva w buforze TEA (10x stężony) firmy TransFarm, uwidoczniony za pomocą bromku etydyny (10 mg/ml) firmy Sigma, przy użyciu studni firmy Whatman, zasilacza firmy Consort, kamery: UVP transilluminator),
- oczyszczanie produktu PCR poprzez użycie zestawu High Pure PCR Purification Kit firmy Roche
- PCR sekwencyjny przy użyciu BigDye Terminator v3.1 Cyclesequencing Kit,
- oczyszczanie produktu przez zastosowanie zestawów BigDye XTerminator™ Purification Kit lub DyeExSpi Kit (Qiagen).

Uzyskane sekwencje zostaną zebrane przy użyciu oprogramowania dostarczonego przez producenta do sekwenatora-3500 Series Collection Software, przy dostępnych ustawieniach Rapid, następnie były uliniowane z sekwencjami referencyjnymi bazy ncbi – Gen Bank w programie SeqScape (applied Biosystems), wersja 4.1. Wszystkie urządzenia konieczne do przeprowadzenia analiz są dostępne w Pracowni Badań Genetycznych przy Katedrze i Klinice Endokrynologii UJ Collegium Medicum.

4.5. BADANIE ULTRASONOGRAFICZNE

Badanie ultrasonograficzne gruczołu tarczowego wykonano na aparacie Hitachi EUB-6500, głowicą liniową 7,5 MHz. Objętość każdego z płatów tarczycy obliczono korzystając z wzoru: $V [ml] = 0,5 \times \text{głębokość} \times \text{szerokość} \times \text{długość badanego płata [cm]}$. Objętość całkowitą uzyskano poprzez sumę objętości płata prawego i lewego tarczycy.

4.6. OPIS ZASTOSOWANYCH ANALIZ STATYSTYCZNYCH

Charakterystyki cech ilościowych dokonano poprzez podanie wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym, zakresu 95% przedziału ufności dla średniej, wartości mediany wraz z kwartylem dolnym (Q_1) i górnym (Q_3), wartości minimalnej i maksymalnej. Cechy jakościowe scharakteryzowano za pomocą rozkładu liczbowego i procentowego. Porównania przeciętnych wartości cechy ilościowej w dwóch różnych populacjach (tj. grupie pacjentów i grupie kontrolnej) dokonano za pomocą testu t-Studenta dla zmiennych niezależnych, jeżeli wszystkie założenia testu (tj. normalność i jednorodność) były spełnione. W przypadku braku normalności rozkładu cechy chociaż w jednej z populacji stosowano test nieparametryczny Manna-Whitney'a. Natomiast w przypadku braku jednorodności wariancji badanej cechy w populacjach wykorzystywano test Welcha. Zgodność empirycznego rozkładu cechy ilościowej z teoretycznym rozkładem normalnym sprawdzano testem Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji cechy ilościowej w kilku populacjach sprawdzano testem Levene'a. Związek dwóch cech ilościowych oceniano za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona lub w przypadku braku zgodności rozkładu chociaż jednej z badanych cech z rozkładem normalnym za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana. Wyniki uznawano za statystycznie istotne, jeżeli obliczony poziom prawdopodobieństwa p nie przekraczał poziomu istotności $\alpha = 0,05$. Obliczenia wykonano przy użyciu programu R. Do analiz genetycznych w ocenie porównawczej grupy badanej z grupą kontrolną użyto testu chi-kwadrat. W ocenie zależności stężeń 25OHD3 od alleli genu *HLA-DRB1* wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), zaś analizę post-hoc przeprowadzono za pomocą testu Fishera. Obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistica 10.

5. WYNIKI

5.1. CHARAKTERYSTYKA GRUP BADANYCH

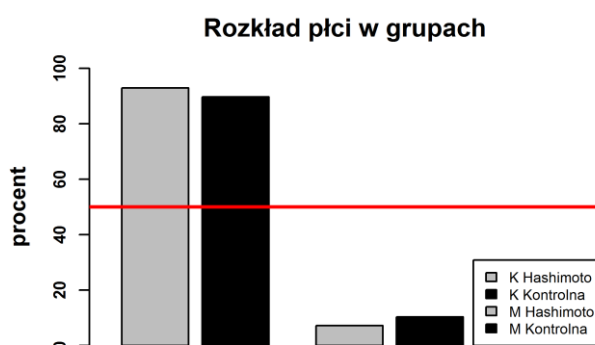
5.1.1. Grupa badana vs. grupa kontrolna

W badaniu wzięło udział łącznie 310 osób, 155 osób z chorobą Hashimoto, w tym 144 kobiety (92,90%) w średnim wieku $49,43 \pm 18,16$ lat (najmłodsza w wieku 18 lat, najstarsza – 81 lat) i 11 mężczyzn (7,10%) w średnim wieku $58,28 \pm 16,98$ lat (najmłodszy w wieku 47 lat, a najstarszy – 77 lat) oraz 155 osób bez AITD, w tym 139 (89,70%) kobiet w średnim wieku $48,76 \pm 16,76$ lat (najmłodsza w wieku 17 lat, najstarsza – 82 lata) i 16 mężczyzn (10,30%) – średni wiek $55,8 \pm 16,11$ lat (najmłodszy w wieku 20 lat, a najstarszy – 84 lat). Odsetek kobiet i mężczyzn nie różnił się istotnie w badanych grupach ($p = 0,314$; test chi-kwadrat) (Tabela 7, Rycina 6).

Średni wiek chorych wynosił $49,80 \pm 16,10$ lat. Najmłodszy pacjent, biorący udział w badaniu miał 18 lat, a najstarszy 81 lat. Wiek dla połowy chorych osób nie przekroczył 53 lat. W grupie osób zdrowych średni wiek wynosił $48,40 \pm 18,30$ lat. Najmłodsza osoba w tej grupie była w wieku 17 lat a najstarsza 84. Wiek połowy osób z grupy kontrolnej nie przekroczył 48,50 lat. Mediana wieku w grupie kontrolnej nie różniła się istotnie od mediany w wieku w grupie badanej ($p = 0,584$; test Manna-Whitneya) (Tabela 8, Rycina 7).

Tabela 7. Rozkład płci w grupie badanej z chorobą Hashimoto i kontrolnej

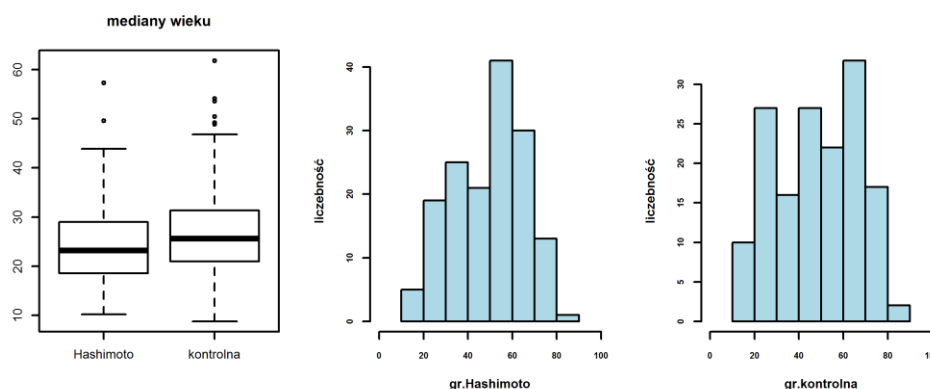
Grupa	Ch. Hashimoto	Kontrolna	p
kobieta	144 [92,90%]	139 [89,70%]	< 0,001
mężczyzna	11 [7,10%]	16 [10,30%]	



Rycina 6. Rozkład płci w grupie z chorobą Hashimoto oraz w grupie kontrolnej

Tabela 8. Charakterystyki opisowe wieku w grupie z chorobą Hashimoto i grupie kontrolnej

Grupa	średnia ± SD	95%PU	min-max	Me (Q ₁ - Q ₃)	p
Choroba Hashimoto	49,80 ± 16,10	47,30-52,40	18-81	53,00 (37,50-61,00)	0,584
Kontrolna	48,40 ± 18,30	45,50-51,30	17-84	48,50 (31,25-65,00)	



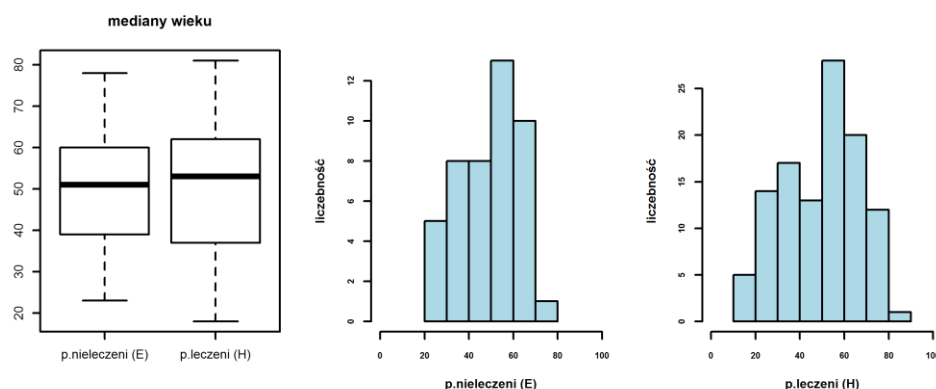
Rycina 7. Rozkład wieku w grupie z chorobą Hashimoto oraz w grupie kontrolnej

Grupę badaną, którą stanowili pacjenci z podwyższonymi stężeniami przeciwciał przeciwtarczycowych (a/TPO i/lub a/Tg) podzielono na dwie podgrupy w zależności od czynności hormonalnej gruczołu tarczowego: chorzy z chorobą Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy, w trakcie leczenia substytucyjnego preparatami l-tyroksyny (H) oraz chorzy z podwyższonymi przeciwciałami przeciwtarczycowymi w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną (E). Podgrupę H stanowiło 110 chorych w średnim wieku $49,85 \pm 16,99$ lat, gdzie najmłodszy pacjent miał 18 lat, a najstarszy 81 lat. Wiek połowy chorych leczonych nie przekroczył 53 lat. W podgrupie E średni wiek chorych wynosił $49,78 \pm 13,89$ lat, wiek najmłodszej osoby – 23 lat, a najstarszej 78 lat. Wiek połowy chorych leczonych nie przekroczył 51 lat. Mediana wieku pacjentów leczonych i nieleczonych nie różniła się istotnie ($p = 0,937$; test Manna-Whitneya) (Tabela 9, Rycina 8).

W podgrupie H byli to pacjenci z wyrównaną niedoczynnością tarczycy w trakcie terapii l-tyroksyną – 107 osób, tylko u trzech 3 osób stwierdzono w niewielkim stopniu podwyższone stężenia TSH: 11,24 μ IU/ml, 7,89 μ IU/ml, 5,92 μ IU/ml.

Tabela 9. Charakterystyki opisowe wieku w grupie badanej dla podgrupy osób z chorobą Hashimoto, leczonych z powodu niedoczynności tarczycy l-tyroksyną (H) i podgrupy pacjentów, będących w stadium eutyreozy z obecnością podwyższonych wartości przeciwciał przeciwtarczycowych (E)

Grupa	N	średnia ± SD	95%PU	min-max	Me (Q ₁ -Q ₃)	p
Podgrupa E	45	49,78±13,89	45,60-53,95	23,00-78,00	51 (39,00-60,00)	0,937
Podgrupa H	110	49,85±16,99	46,64-53,07	18,00-81,00	53 (37,25-61,75)	



Rycina 8. Rozkład wieku w obrębie grupy badanej w podgrupie chorych z podwyższonymi stężeniami przeciwciał przeciwtarczycowych będących w eutyreozie, nieleczonych l-tyroksyną (E) oraz w grupie chorych z chorobą Hashimoto leczonych preparatem l-tyroksyny z powodu niedoczynności tarczycy (H)

5.1.2. Porównanie przeciętnych wartości wybranych oznaczeń hormonalnych, biochemicznych i ultrasonograficznych pomiędzy grupą badaną z chorobą Hashimoto oraz grupą kontrolną

Podstawowe wyniki badań w grupie badanej i kontrolną zestawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Charakterystyki opisowe badanych cech w grupach: grupa badana z chorobą Hashimoto (n = 155 osób) oraz grupy kontrolnej (n = 155 osób). Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe (SD), zakres 95 przedziału ufności dla średniej (95%PU), wartości mediany (Me) wraz z kwartylem dolnym (Q₁) i górnym (Q₃). Statystycznie istotne różnice: grupa badana vs. grupa kontrolna – wartość p.

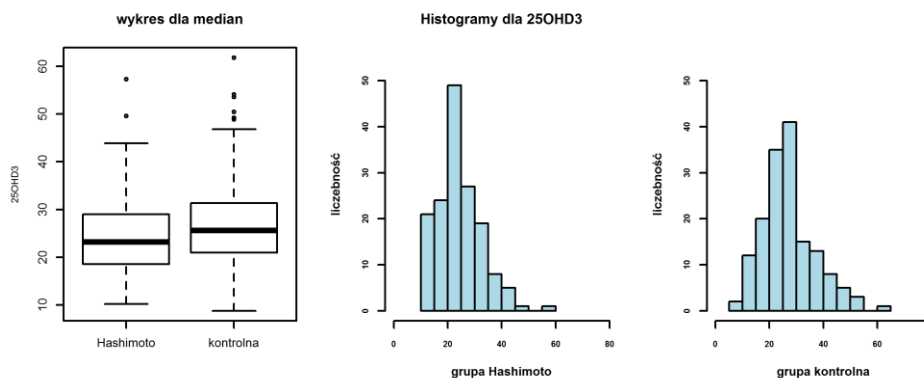
Cecha	Grupa	średnia ± SD	95%PU	min-max	Me (Q ₁ -Q ₃)	p
Wyniki badań hormonalnych						
25OHD3	Choroba Hashimoto	24,18 ± 8,45	22,85-25,53	10,20-57,3	23,20 (18,60-29,00)	0,006
	Kontrolna	27,19 ± 9,61	25,67-28,72	8,80-61,80	25,60 (21,01-31,35)	
TSH	Choroba Hashimoto	2,12 ± 1,51	1,88-2,36	0,02-11,24	1,87 (1,10-2,70)	< 0,001
	Kontrolna	1,54 ± 0,88	1,40-1,68	0,35-4,87	1,37 (0,91-1,92)	
PTH	Choroba Hashimoto	62,26 ± 21,52	60,84-67,67	20,60-136,50	62,30 (51,05-76,35)	< 0,001
	Kontrolna	53,61 ± 19,32	50,54-56,67	20,50-110,50	54,90 (37,10-65,30)	
Wyniki badań biochemicznych						
Ca	Choroba Hashimoto	2,44 ± 0,13	2,42-2,46	1,39-2,72	2,44 (2,40-2,51)	0,484
	Kontrolna	2,45 ± 0,09	2,43-2,46	2,22-2,66	2,45 (2,38-2,51)	
P	Choroba Hashimoto	3,59 ± 0,50	3,51-3,67	2,25-4,81	3,56 (3,23-3,90)	0,138
	Kontrolna	3,66 ± 0,35	3,61-3,72	2,91-4,99	3,67 (3,40-3,88)	
Wyniki ultrasonograficzne						
V c	Choroba Hashimoto	11,64 ± 6,86	10,55-12,72	1,65-43,83	9,71 (7,39-14,75)	< 0,001
	Kontrolna	20,45 ± 10,02	18,86-22,04	4,24-65,40	18,54 (12,86-24,18)	
V PP	Choroba Hashimoto	6,25 ± 3,78	5,65-6,85	0,67-22,80	5,11 (3,91-7,73)	< 0,001
	Kontrolna	10,92 ± 6,20	9,94-11,91	2,08-52,90	10,07 (7,02-12,75)	
V LP	Choroba Hashimoto	5,38 ± 3,40	4,84-5,92	0,98-23,47	4,50 (3,19-6,68)	< 0,001
	Kontrolna	9,53 ± 4,71	8,78-10,28	2,11-26,52	8,97 (5,78-11,72)	

Wykazano występowanie statystycznie istotnej różnicy pomiędzy medianą 25OHD3 w badanych grupach, chociaż same ich wartości różniły się w niewielkim stopniu (p = 0,006; test Manna-Whitney'a). Mediana stężenia 25OHD3 w grupie Hashimoto wynosiła 23,20

ng/ml przy zakresie kwartylowym od 18,60 do 29,00 podczas gdy w grupie kontrolnej wynosiła 25,60 ng/ml, wobec zakresu kwartylowego od 21,01 do 31,35 (Rycina 9).

W grupie badanej u żadnego z pacjentów z chorobą Hashimoto nie stwierdzono stężenia $25\text{OHD}_3 \leq 10$ ng/ml, stężenia pomiędzy > 10 do ≤ 20 ng/ml wystąpiły u 45 osób (29,03%), od > 20 do ≤ 30 ng/ml u 76 chorych (49,03%), natomiast u 34 (21,94%) osób stężenia 25OHD_3 stanowiły > 30 ng/ml, co spełniało kryteria prawidłowego zaopatrzenia w witaminę D3.

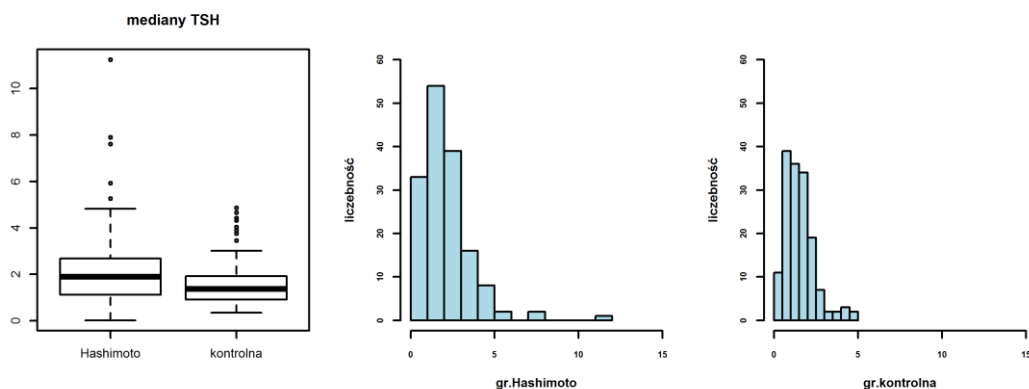
W grupie kontrolnej 2 osoby uzyskały stężenia $25\text{OHD}_3 \leq 10$ ng/ml (1,29%), definiowane jako deficyt witaminy D3, w 32 (20,65%) przypadkach stwierdzono stężenia 25OHD_3 pomiędzy >10 do ≤ 20 ng/ml, podobnie jak w grupie badanej u 76 osób (49,03%) wystąpiły stężenia 25OHD_3 w przedziale od > 20 do ≤ 30 ng/ml, natomiast u 45 (29,03%) – stężenia 25OHD_3 były prawidłowe, czyli > 30 ng/ml.



Rycina 9. Mediany 25OHD_3 (po stronie lewej) oraz histogramy 25OHD_3 (po stronie prawej) w grupie pacjentów w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

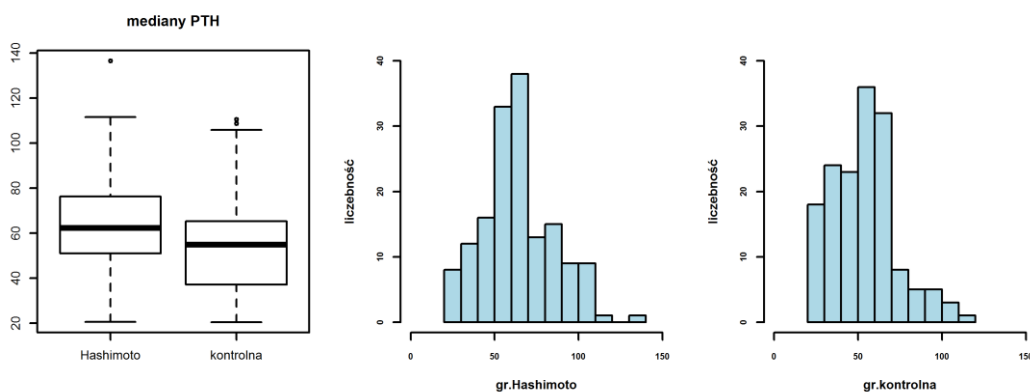
Wykazano występowanie statystycznie istotnej różnicy pomiędzy medianą stężenia TSH w grupie z chorobą a medianą stężenia TSH mierzoną w grupie osób zdrowych ($p < 0,001$; test Manna-Whitney'a) (Rycina 10). Mediana stężenia TSH w grupie badanej była wyższa i wynosiła $1,87 \mu\text{IU/ml}$, przy zakresie kwartylowym od $1,10$ do $2,70$, natomiast mediana stężenia w grupie kontrolnej wynosiła $1,37 \mu\text{IU/ml}$ przy zakresie kwartylowym od $0,91$ do $1,92$. Świadczy to o dobrym doborze pacjentów. Grupa kontrolna obejmowała osoby, u których wykluczono zaburzenia czynności hormonalnej tarczycy (stężenie TSH zawierające się w zakresie norm referencyjnych). Pacjenci z chorobą Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy, będący w trakcie terapii l-tyroksyną stanowili większość grupy

badanej 70,97% (podgrupa H), podczas gdy chorzy z podwyższonymi przeciwciałami przeciwtarczycowymi w stadium eutyreozy stanowili 29,03% (podgrupa E).



Rycina 10. Mediany stężeń oraz histogramy TSH w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

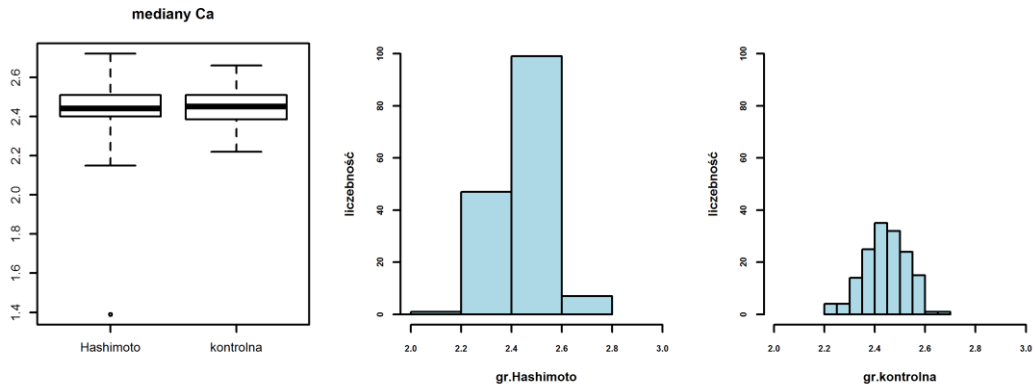
Mediana stężenia PTH w grupie z chorobą Hashimoto różniła się istotnie wyższa statystycznie od mediany stężenia PTH w grupie kontrolnej ($p < 0,001$; test Manna-Whitney'a) (Rycina 11). Mediana stężenia PTH w grupie z chorobą Hashimoto wynosiła 62,30 pg/ml wobec zakresu kwartylowego od 51,05 do 76,35, a w grupie kontrolnej – 54,90 pg/ml, przy zakresie kwartylowym od 37,10 do 65,30.



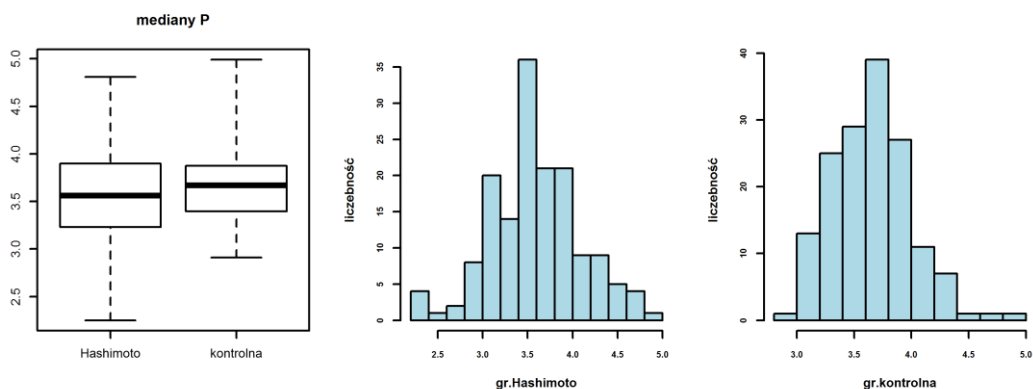
Rycina 11. Mediany stężeń oraz histogramy PTH w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

W analizach parametrów biochemicznych pomiędzy grupą badaną a kontrolną nie wykazano występowania statystycznie istotnej różnicy w zakresie median stężeń: wapnia (2,44 mmol/l, przy zakresie kwartylowym od 2,40 do 2,51 oraz 2,45 mmol/l, przy zakresie

kwartylowym od 2,38 do 2,51; $p = 0,484$; test Manna-Whitney'a), fosforu (3,56 mg/dl przy zakresie kwartylowym od 3,23 do 3,90 oraz 3,67 mg/dl, przy zakresie kwartylowym od 3,40 do 3,88; $p = 0,138$ test Manna-Whitney'a) (Rycina 12 i 13).

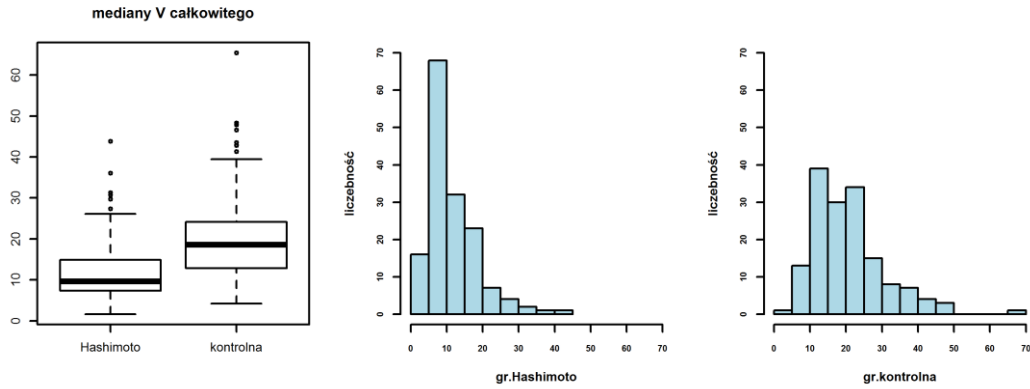


Rycina 12. Mediany stężeń Ca w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej



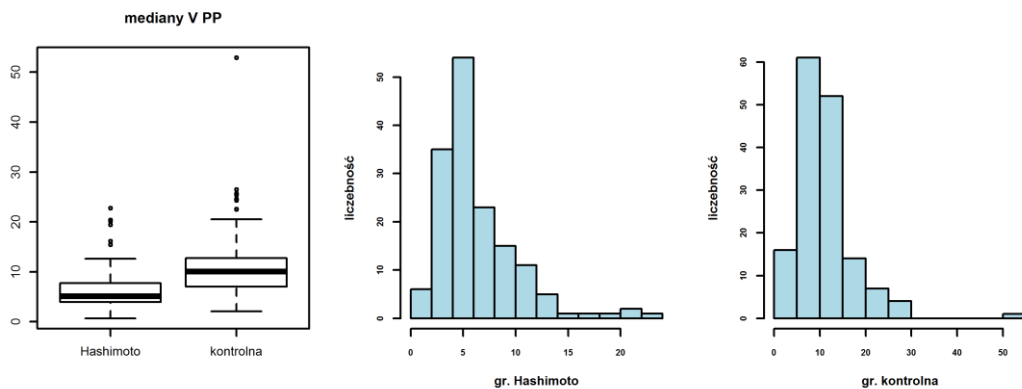
Rycina 13. Mediany stężeń P w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

Analiza objętości gruczołu tarczowego w ocenie ultrasonograficznej wykazała występowanie statystycznie istotnej różnicy mediany objętości całkowitej gruczołu tarczowego (V_c) w grupie badanej z chorobą Hashimoto i grupie badanej ($p < 0,001$; test Manna-Whitney'a) (Rycina 14). W grupie badanej wartość mediana wynosiła 9,71 ml, przy zakresie kwartylowym od 7,39 do 14,75. W grupie kontrolnej mediana stanowiła 18,54 ml, wobec zakresu kwartowego od 12,86 do 24,18.



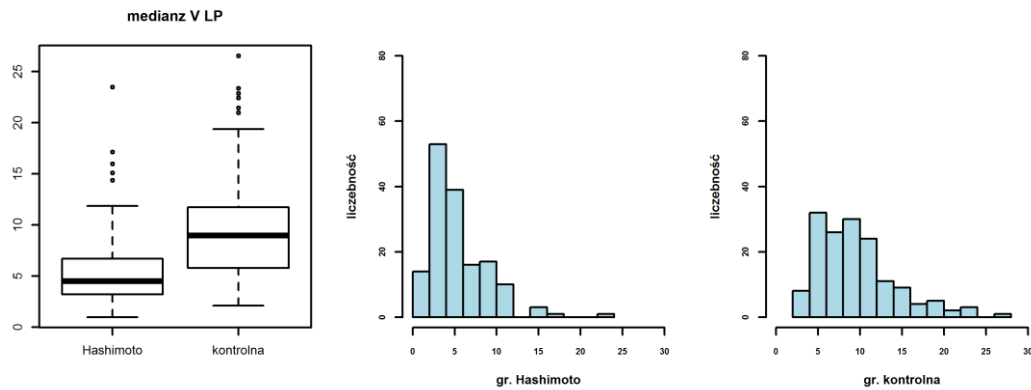
Rycina 14. Mediany V całkowitej (Vc) gruczołu tarczowego w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

Występowanie istotnej statystycznie różnicy median w stosunku do grupy kontrolnej, dotyczyło także obydwu płatów. Mediana V PP w grupie badanej z chorobą Hashimoto wynosiła 5,11 ml, przy zakresie kwartylowym od 3,91 do 7,73, a w grupie kontrolnej mediana była wyższa i wynosiła 10,07 ml wobec zakresu kwartylowego od 7,02 do 12,75 (Rycina 15).



Rycina 15. Mediany V PP w grupie pacjentów w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

Mediana V LP w grupie badanej stanowiła 4,50 ml, gdzie zakres kwartylowym zawierał się w przedziale od 3,19 do 6,68 i różniła się istotnie od mediany V LP w grupie kontrolnej, która wynosiła 8,97 ml przy zakresie kwartylowym od 5,78 do 11,72 (Rycina 16).

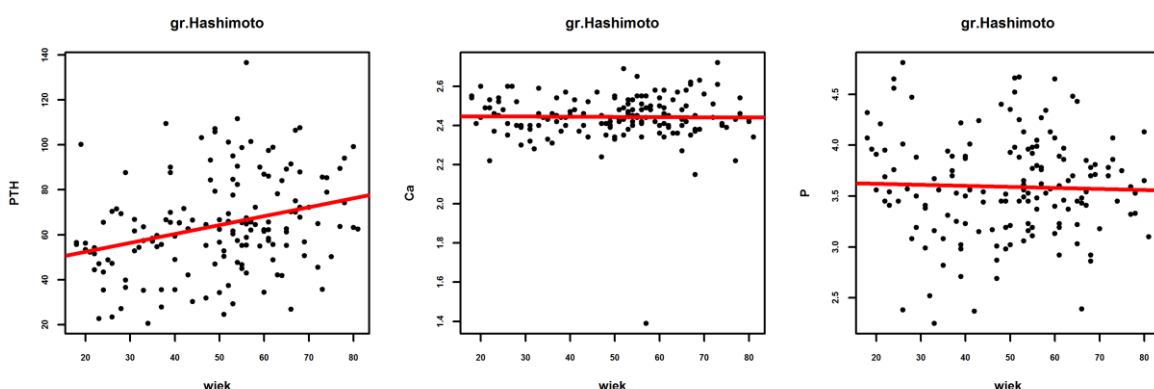


Rycina 16. Mediany V LP w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

5.2. ANALIZA ZALEŻNOŚCI WIEKU ZE STĘŻENIAMI PTH, Ca I P W GRUPIE Z CHOROBAŃ HASHIMOTO ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ

Wykazano, że wiek pacjentów w grupie z chorobą Hashimoto jest istotnie skorelowany z PTH ($R = 0,31$, $p < 0,001$; wsp. Spearmana). Współzależność tych cech jest dodatnia i średnio silna. Skorygowany współczynnik determinacji (R^2) dla modelu opisującego wpływ wieku na PTH w grupie pacjentów wynosi 8,3%, co wskazuje, że zmienność wieku w ok. 8,3% wpływa na przeciętny poziom PTH.

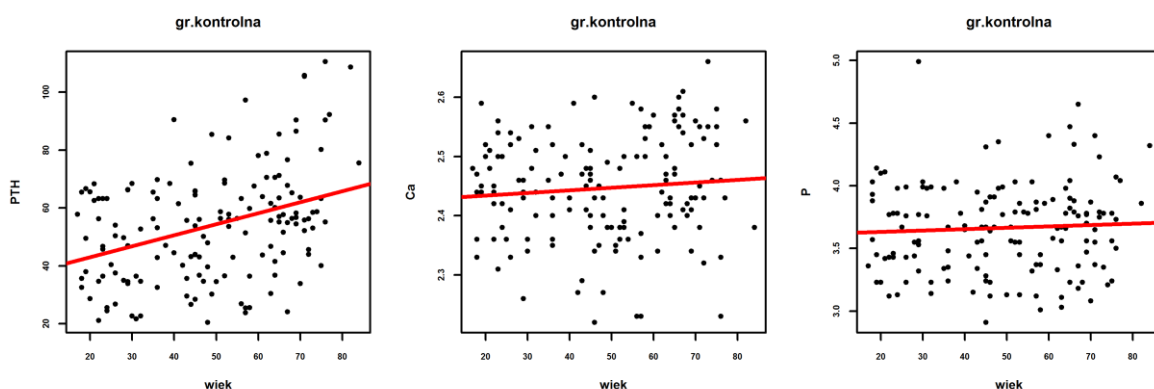
Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a stężeniem Ca ($R = 0,01$, $p = 0,886$, wsp. Spearmana) oraz P ($R = -0,02$, $p = 0,788$, wsp. Spearmana). Wpływ wieku na stężenie PTH oraz Ca i P w grupie z chorobą Hashimoto przedstawia rycina 17.



Rycina 17. Wpływ wieku w grupie z chorobą Hashimoto na stężenie PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej)

Wykazano, że wiek pacjentów w grupie kontrolnej jest istotnie skorelowany z PTH ($R = 0,31$, $p < 0,001$, wsp. Spearmana). Współzależność tych cech jest dodatnia i średnio silna. Skorygowany współczynnik determinacji (R^2) dla modelu opisującego wpływ wieku na PTH w grupie kontrolnej wynosi 10,4%, co oznacza że zmienność wieku w ok. 10,4% wpływa na przeciętny poziom PTH (Rycina 18, wykres po stronie lewej).

Nie występowała natomiast statystycznie istotna korelacja pomiędzy wiekiem pacjentów a stężeniem Ca ($R = 0,09$, $p = 0,273$, wsp. Spearmana) oraz P ($R = 0,05$, $p = 0,500$, wsp. Spearmana). Wpływ wieku na stężenie PTH oraz Ca i P przedstawia rycina 18 (wykres środkowy i po stronie prawej).



Rycina 18. Wpływ wieku w grupie kontrolnej na stężenie PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej)

5.3. PORÓWNANIE PRZECIĘTNYCH WARTOŚCI OZNACZEŃ HORMONALNYCH, BIOCHEMICZNYCH I ULTRASONOGRAFICZNYCH POMIĘDZY GRUPĄ PACJENTÓW Z PODWYŻSZONYMI WARTOŚCIAMI PRZECIWCIAŁ PRZECIWTARCZYCOWYCH, BĘDĄCYCH W STADIUM EUTYREOZY BEZ LECZENIA L-TYROKSYNĄ (PODGRUPA E) A GRUPĄ KONTROLNĄ

Podstawowe wyniki badanych wartości oznaczeń charakteryzujących badaną podgrupę chorych w stadium eutyreozы z dodatnimi przeciwciałami a/TPO i/lub a/Tg (podgrupa E) oraz grupę kontrolną zestawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Charakterystyki opisowe analizowanych cech w podgrupie badanej E, pacjentów w stadium eutyreozy z podwyższonymi stężeniami przeciwciał przeciwarczycowych a/TPO i/lub a/Tg (n = 45 osób) oraz grupy kontrolnej (n = 155 osób). Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe (SD), zakres 95 przedziału ufności dla średniej (95%PU), wartości mediany (Me) wraz z kwartylem dolnym (Q₁) i górnym (Q₃). Statystycznie istotne różnice: podgrupa badana vs. grupa kontrolna – wartość p

Cecha	Podgrupa/grupa	średnia ± SD	95%PU	min-max	Me (Q ₁ -Q ₃)	p
Wyniki badań hormonalnych						
25OHD3	Podgrupa E	27,97 ± 9,46	25,12-30,81	10,50 -57,30	28,70(21,40-33,20)	0,403
	Kontrolna	27,19 ± 9,61	25,67-28,72	8,80-61,80	25,60 (21,01-31,35)	
TSH	Podgrupa E	1,74 ± 0,92	1,46-2,02	0,09-4,24	1,83 (0,96-2,16)	0,118
	Kontrolna	1,42 ± 0,93	1,28-1,57	0,35-6,50	1,24 (0,85-1,81)	
PTH	Podgrupa E	58,99 ± 21,87	52,42 - 65,56	23,4-111,60	57,10 (43,40-70,00)	0,175
	Kontrolna	53,61 ± 19,32	50,54 - 56,67	20,5-110,50	54,90 (37,10-65,30)	
Wyniki badań biochemicznych						
Ca	Podgrupa E	2,42 ± 0,18	2,37-2,47	1,39-2,65	2,42 (2,38-2,48)	0,335
	Kontrolna	2,45 ± 0,09	2,43-2,46	2,22-2,66	2,45 (2,38-2,51)	
P	Podgrupa E	3,60 ± 0,53	3,44-3,76	2,25-4,66	3,54 (3,33-3,97)	0,455
	Kontrolna	3,66 ± 0,35	3,61-3,72	2,91-4,99	3,67 (3,40-3,88)	
Wyniki ultrasonograficzne						
V c	Podgrupa E	15,40 ± 8,34	12,90-17,91	4,89-43,83	13,84 (9,36-19,24)	<0,001
	Kontrolna	20,45 ± 10,02	18,86-22,04	4,24-65,40	18,54 (12,86-24,18)	
V PP	Podgrupa E	8,11 ± 4,37	6,80-9,42	2,40-20,36	7,11 (5,02-10,11)	<0,001
	Kontrolna	10,92 ± 6,20	9,94-11,91	2,08-52,90	10,07 (7,02-12,75)	
V LP	Podgrupa E	7,29 ± 4,31	5,99 - 8,58	2,06 - 23,47	6,11 (4,13-9,79)	<0,001
	Kontrolna	9,53 ± 4,71	8,78 - 10,28	2,11 - 26,52	8,97 (5,78-11,72)	

Nie wykazano występowania statystycznie istotnej różnicy median stężeń 25ODH3 pomiędzy podgrupą badaną E a grupą kontrolną (p = 0,403; test Manna-Whitney'a). Mediana

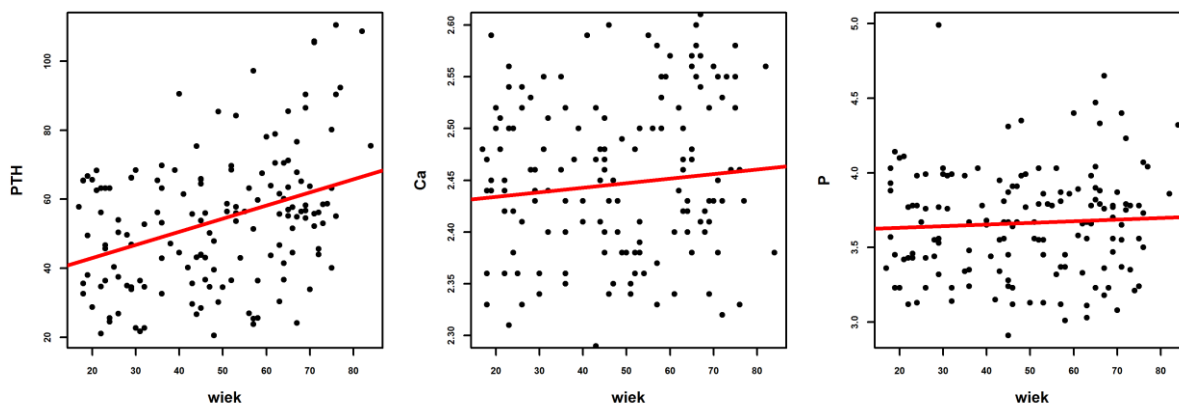
stężen 25OHD3 w podgrupie badanej wynosiła 28,7 ng/ml, przy zakresie kwartylowym od 21,40 do 33,20. W podgrupie E u nikogo nie stwierdzono stężenia 25OHD3 \leq 10 ng/ml. U 7 osób (15,56 %) uzyskano stężenia pomiędzy > 10 do ≤ 20 ng/ml, u 20 osób (44,44%) wyniki 25OHD3 zawierały się w przedziale od > 20 do ≤ 30 ng/ml, kryteria prawidłowego zaopatrzenia w witaminę D, czyli stężenia 25OHD3 > 30 ng/ml, stwierdzono u 18 osób (40%). Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy median stężeń TSH w podgrupie E i grupie kontrolnej ($p = 0,118$; test Manna-Whitney'a). Mediana stężenia TSH w podgrupie badanej wynosiła 1,83 μ IU/ml, wobec zakresu kwartowego od 0,96 do 2,16. Nie wykazano również istotnej statystycznie różnicy median stężeń PTH, Ca, P w podgrupie E oraz grupie kontrolnej (odpowiednio: $p = 0,175$; $p = 0,335$; $p = 0,455$; test Manna-Whitney'a). Mediana stężeń PTH w badanej podgrupie wynosiła 57,10 pg/ml, przy zakresie kwartylowym od 43,40 do 70,0. Natomiast mediana stężeń Ca wynosiła 2,42 mmol/l, przy zakresie kwartylowym od 2,38 do 2,48 a mediana stężeń P wynosiła 3,54 mg/dl, wobec zakresu kwartylowego od 3,33 do 3,97.

Analiza objętości gruczołu tarczowego w ocenie ultrasonograficznej wykazała występowanie statystycznie istotnej różnicy median objętości całkowitej (V_c) oraz objętości płata prawego (V_{PP}) i lewego (V_{LP}) tarczycy w podgrupie pacjentów w stadium eutyreozy bez leczenia l-tyroksyną z dodatnimi przeciwciałami przeciw-tarczycowymi (podgrupa E) i grupie kontrolnej (odpowiednio: $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; test Manna-Whitney'a). W podgrupie E mediany objętości V_c , V_{PP} i V_{LP} były istotnie mniejsze w porównaniu do grupy kontrolnej. W badanej podgrupie mediana V_c wynosiła 13,84 ml, przy zakresie kwartylowym od 9,36 do 19,24. Mediana V_{PP} stanowiła 7,11 ml, wobec zakresu kwartylowego od 5,02 do 10,11, a mediana V_{LP} wynosiła 6,11 ml, przy zakresie kwartylowym od 4,13 do 9,79.

5.4. ANALIZA ZALEŻNOŚCI WIEKU ZE STĘŻENIAMI PTH, CA I P W PODGRUPIE E PACJENTÓW, BĘDĄCYCH W EUTYREOZIE Z OBECNOŚCIĄ DODATNICH PRZECIWCIAŁ PRZECIWTARCZYCOWYCH

W podgrupie E wykazano występowanie statystycznie istotnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a stężeniem PTH ($R = 0,47$; $p = 0,001$; wsp. Pearsona). Korelacja jest dość silna i dodatnia. Z roku na rok przeciętne stężenie PTH wzrasta o ok. 0,74 pg/ml. Zmienność wieku w 20,17% wpływa na zmienność stężenia PTH (skorygowany wsp. determinacji R^2). Wiek w badanej podgrupie nie koreluje natomiast istotnie ze stężeniem Ca

($R = -0,14$; $p = 0,369$, wsp. Spearmana) oraz P ($R = 0,05$; $p = 0,764$, wsp. Pearsona). Powyższe analizy obrazuje rycina 19.



Rycina 19. Wpływ wieku w podgrupie E na stężenie PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa) i P (po stronie prawej)

5.5. WPŁYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW NA STĘŻENIE 25OHD3 W GRUPIE BADANEJ Z CHOROBA HASHIMOTO

W grupie z choroba Hashimoto wyszczególnione zostały trzy czynniki zakłócające, które mogłyby wpływać na efekty kolejnych badań:

- wiek,
- czas choroby,
- stan czynnościowy gruczołu tarczowego: niedoczynność tarczycy w trakcie terapii l-tyroksyną.

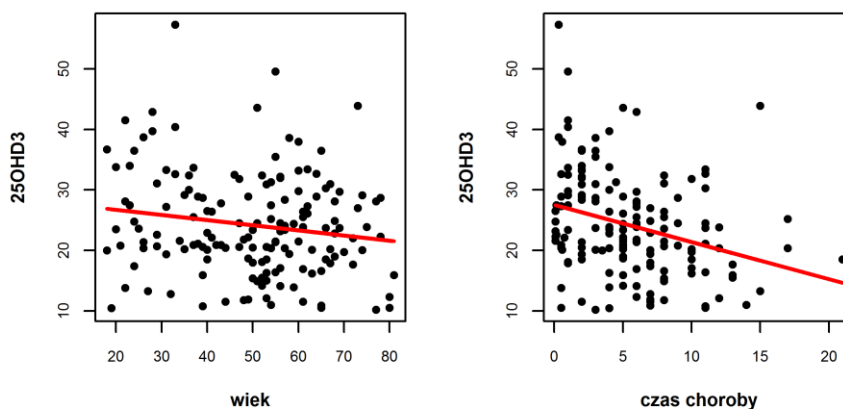
W związku z tym w pierwszej kolejności przeprowadzona została analiza wpływu tych czynników na przeciętne stężenia 25OHD3.

5.5.1. Ocena wpływu wieku na stężenie 25OHD3 w grupie z chorobą Hashimoto

Korelacja pomiędzy wiekiem a stężeniem 25OHD3 w grupie z chorobą Hashimoto była statystycznie nieistotna ($R = -0,12$; $p = 0,143$; wsp. Spearmana), co oznacza, że w grupie badanych pacjentów wiek nie był istotnym czynnikiem modulującym stężenie 25OHD3 (Rycina 20, wykres po stronie lewej).

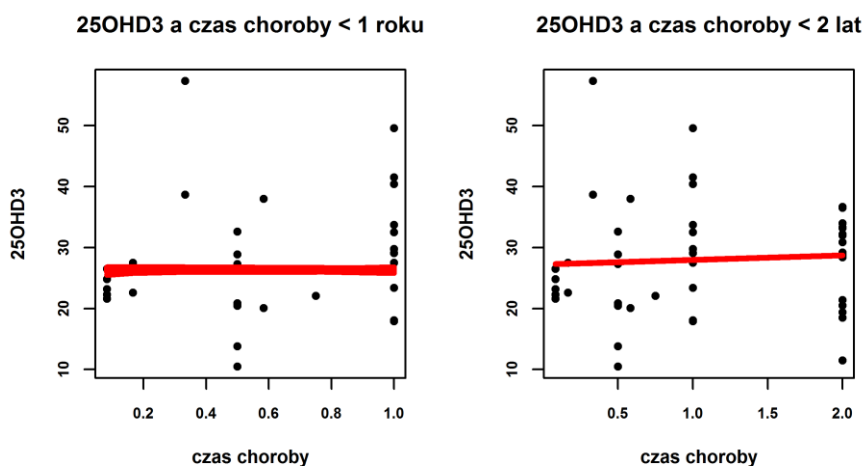
5.5.2. Ocena wpływu czasu trwania choroby Hashimoto na stężenia 25OHD3 w grupie z chorobą Hashimoto

Istotną współzależność wykazano pomiędzy czasem trwania choroby Hashimoto a przeciętnymi wynikami stężeń 25OHD3 w badanej grupie pacjentów ($R = -0,32$; $p < 0,001$; wsp. Spearmana). Korelacja ta jest średnio silna i ujemna, co oznacza, że wraz ze wzrostem jednej z badanych cech, przeciętne wartości drugiej cechy będą malały. Współczynnik kierunkowy prostej regresji, opisującej wpływ czasu trwania choroby na przeciętne wyniki 25OHD3 w grupie pacjentów wynosi $-0,615$, co oznacza, że z roku na rok przeciętny poziom 25OHD3 maleje o ok. $0,615$ ng/ml. Skorygowany współczynnik determinacji wyniósł $8,4\%$. Zatem zmienność przeciętnych wyników 25OHD3 można wyjaśnić w ok. $8,4\%$ za pomocą zmienności czasu trwania choroby. Analizę obrazuje rycina 20, po stronie prawej.



Rycina 20. Zależność pomiędzy wiekiem pacjentów (wykres po stronie lewej) oraz czasem trwania choroby (wykres po stronie prawej) a stężeniem 25OHD3 w grupie pacjentów z chorobą Hashimoto

Podobną analizę przeprowadzono w grupie osób z czasem trwania choroby nieprzekraczającym jednego roku, jak również w grupie osób z czasem trwania choroby nieprzekraczającym dwóch lat. W obu przypadkach nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a stężeniami 25OHD3. Wynik dla czasu trwania choroby < 1 roku ($N = 30$) wyniósł $R = 0,23$; $p = 0,223$; wsp. Spearmana, natomiast dla czasu trwania choroby < 2 lata ($N = 46$) $R = 0,16$; $p = 0,295$; wsp. Spearmana (Rycina 21).



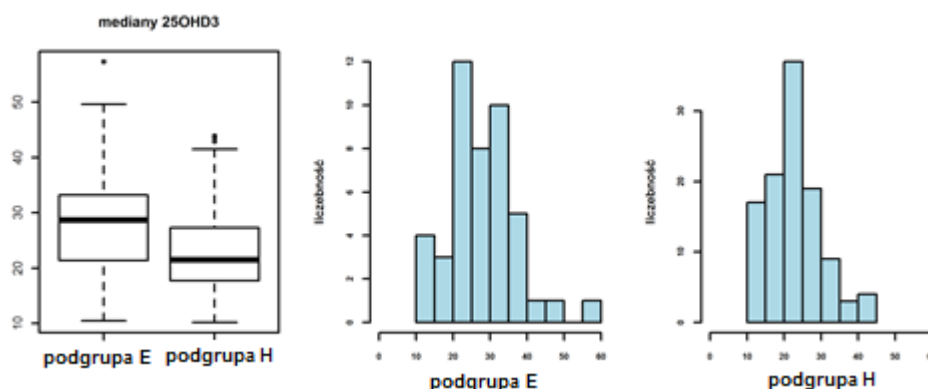
Rycina 21. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a czasem trwania choroby Hashimoto < 1 rok (wykres po stronie lewej) oraz < 2 lata (wykres po stronie prawej) w grupie badanej

5.5.3. Ocena zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 w obrębie grupy badanej z chorobą Hashimoto a stanem czynnościowym gruczołu tarczowego: chorzy w stadium hipotyreozy w trakcie leczenia substytucyjnego preparatem l-tyroksyny (podgrupa H) oraz chorzy w stadium eutyreozy, bez leczenia (podgrupa E).

Pacjenci będący w stadium niedoczynności tarczycy, wymagający leczenia preparatem l-tyroksyny (podgrupa H) charakteryzowali się przeciętnie niższymi stężeniami 25OHD3 niż osoby w stadium eutyreozy bez leczenia l-tyroksyną (podgrupa E). Mediana stężenia 25OHD3 w podgrupie H wynosiła 21,50 ng/ml, przy zakresie kwartylowym od 17,80 do 27,30, natomiast w podgrupie E mediana stężenia 25OHD3 stanowiła 28,70 ng/ml, wobec zakresu kwartylowego od 21,40 do 33,20. Zatem w podgrupie H wykazano zależność między stanem czynnościowym tarczycy a przeciętnym stężeniem 25OHD3 ($p < 0,001$; test Manna-Whitney'a (Tabela 12, Rycina 22)).

Tabela 12. Charakterystyki opisowe stężeń 25OHD3 w obrębie grupy badanej chorych z dodatnimi przeciwciałami a/TPO i/lub a/Tg w zróżnicowaniu na: podgrupę H – pacjentów z niedoczynnością tarczycy, wymagających terapii l-tyroksyną oraz podgrupę E – osób z HT, będących w eutyreozie, bez leczenia l-tyroksyną

Grupa	N	średnia ± SD	95%PU	min-max	Me (Q ₁ - Q ₃)	p
Podgrupa H	110	22,64 ± 7,50	21,22-24,06	10,20-43,90	21,50 (17,80- 27,30)	< 0,001
Podgrupa E	45	27,97 ± 9,46	25,12-30,81	10,50-57,30	28,70 (21,40-33,20)	

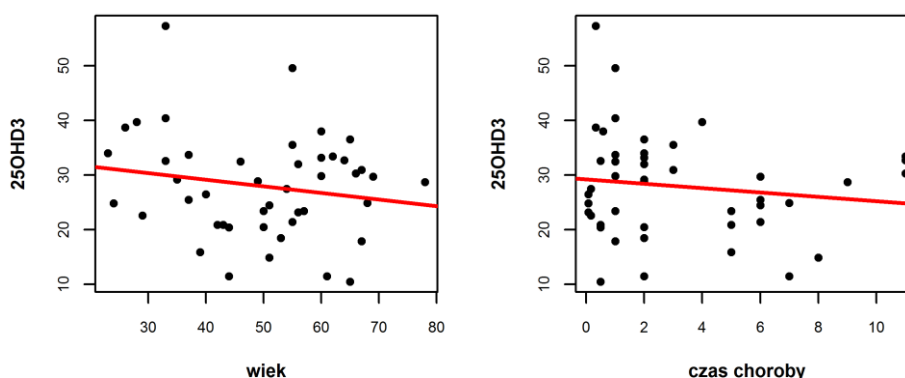


Rycina 22. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stanem czynnościowym gruczołu tarczowego w podgrupie pacjentów w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną (podgrupa E) a podgrupą chorych z chorobą Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy, w trakcie leczenia preparatem l-tyroksyny (podgrupa H)

5.6. OCENA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY WIEKIEM PACJENTÓW I CZASEM TRWANIA PROCESU AUTOIMMUNIZACYJNEGO A STĘŻENIEM 25OHD3 W PODGRUPIE CHORYCH W STADIUM EUTYREOZY, BEZ LECZENIA L-TYROKSYNĄ Z DODATNIMI PRZECIWCIAŁAMI PRZECIWTARCZYCOWYMI (PODGRUPA E)

W związku z tym, że wyniki powyższych analiz sugerują ewentualnie możliwy wpływ terapii l-tyroksyną na stężenie 25OHD3, dokonano oceny wpływu pozostałych parametrów, mogących mieć wpływ na jej stężenie, czyli wieku pacjentów i czasu trwania choroby w podgrupie E.

Korelacja pomiędzy wiekiem pacjentów w podgrupie E a stężeniem 25OHD3 była statystycznie nieistotna ($R = -0,18$; $p = 0,245$; wsp. Pearsona). Podobnie więc jak w całej grupie badanej wiek nie był czynnikiem wpływającym na stężenie 25OHD3. Zależność pomiędzy wiekiem pacjentów w podgrupie E a stężeniem 25OHD3 przedstawia rycina 23, po stronie lewej. Podobnie jak powyżej, nie wykazano występowania statystycznie istotnej korelacji pomiędzy czasem trwania choroby autoimmunizacyjnej a przeciętnymi stężeniami 25OHD3 w badanej podgrupie ($R = -0,07$; $p = 0,630$; wsp. Spearmana) (Rycina 23, po stronie prawej). W analizie dla całej badanej grupy czynnik ten był istotnie modyfikującym stężenie 25OHD3, ale w późniejszych latach choroby, bez wpływu w ciągu jej pierwszych 2 lat.



Rycina 23. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a wiekiem pacjentów w podgrupie E (wykres po stronie lewej) oraz czasem trwania choroby (wykres po stronie prawej)

5.7. OCENA ZWIĄZKU STĘŻENIA 25OHD3 Z AKTYWNOŚCIĄ CHOROBY

HASHIMOTO NA PODSTAWIE STĘŻEŃ PRZECIWCIAŁ

PRZECIWTARCZYCOWYCH: PRZECIW PEROKSYDAZIE TARCZYCOWEJ

(A/TPO) I PRZECIW TYREOGLOBULINIE (A/TG) W CAŁEJ BADANEJ GRUPIE

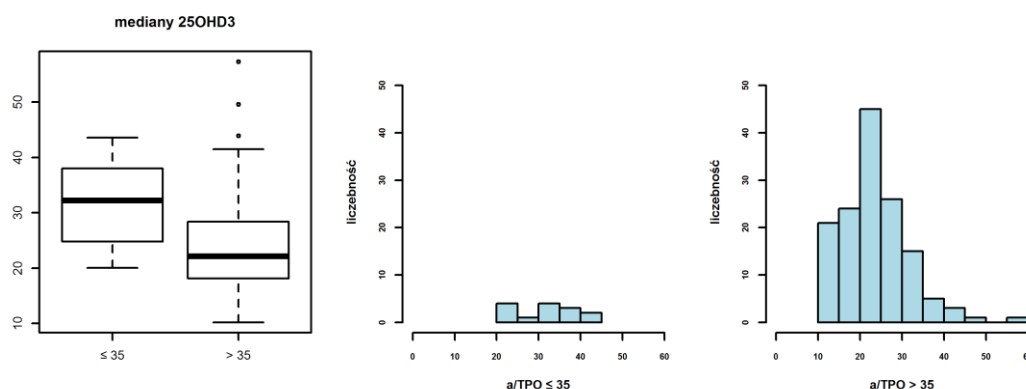
5.7.1. Ocena związku stężenia 25OHD3 z aktywnością choroby Hashimoto na podstawie stężenia przeciwciał a/TPO w całej badanej grupie

W grupie z chorobą Hashimoto podwyższone stężenie przeciwciał a/TPO powyżej 35 IU/ml stwierdzono u 141 (90,97%) osób, natomiast zawierające się w granicach norm referencyjnych u 14 (9,03%) badanych. Pacjenci, u których w czasie przeprowadzania analiz stężenia przeciwciał a/TPO zawierały się w granicach norm referencyjnych w przeszłości, w chwili rozpoznania choroby, mieli nieprawidłowe, wysokie ich wartości. Wykazano występowanie statystycznie istotnych różnic median 25OHD3 w grupie pacjentów z a/TPO poniżej i równe 35 IU/ml (stężenie przeciwciał w zakresie norm referencyjnych) i w grupie z a/TPO wynoszącą powyżej 35 IU/ml (stężenie przeciwciał powyżej górnego zakresu norm referencyjnych) ($p = 0,001$; test Manna-Whitney'a) (Tabela 13, Rycina 24). W podgrupie chorych z a/TPO poniżej i równe 35 IU/ml zaobserwowano wyższe stężenia 25OHD3 niż w podgrupie pacjentów, u których a/TPO stanowiło stężenia powyżej 35 IU/ml. Mediana stężeń 25OHD3 w podgrupie chorych z a/TPO ≤ 35 IU/ml wynosiła 32,00 ng/ml, przy zakresie kwartylowym od 25,63 do 37,68. Z kolei mediana stężeń w podgrupie chorych z

a/TPO > 35 IU/ml stanowiła 22,10 ng/ml, wobec zakresu kwartylowego od 18,10 do 28,40. Przeprowadzona analiza wskazuje na związek pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby w aspekcie wartości stężenia przeciwciał a/TPO. Podwyższonemu stężeniu przeciwciał, a zatem aktywnemu procesowi autoimmunizacyjnemu odpowiadają niższe stężenia 25OHD3 i odwrotnie przy prawidłowych stężeniach a/TPO (nieaktywnej chorobie) obserwuje się wyższe stężenia 25OHD3.

Tabela 13. Charakterystyki opisowe stężenia 25OHD3 w grupie badanej w zależności aktywności choroby na podstawie stężeń przeciwciał przeciwtarczycowych a/TPO: podgrupa z a/TPO ≤ 35 IU/ml vs. podgrupa z a/TPO > 35 IU/ml

a/TPO [IU/ml]	N	25OHD3				p
		średnia± SD	95%PU	min-max	Me (Q ₁ -Q ₃)	
≤ 35	14	31,81 ± 7,58	27,44-36,19	20,05-43,60	32,00 (25,63-37,68)	< 0,001
> 35	141	23,43 ± 8,17	22,07-24,79	10,20-57,30	22,10 (18,10-28,40)	



Rycina 24. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby Hashimoto na podstawie przeciwciał przeciwtarczycowych a/TPO w podgrupie ze stężeniem a/TPO ≤ 35 IU/ml oraz a/TPO > 35 IU/ml

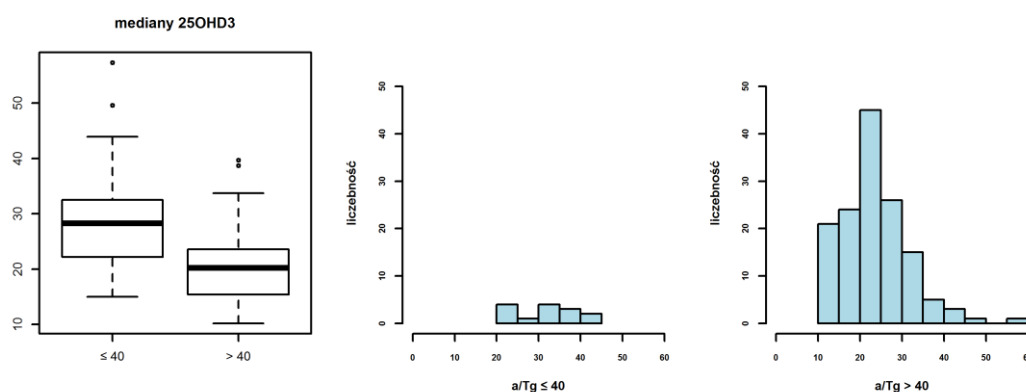
5.7.2. Ocena związku stężenia 25OHD3 z aktywnością choroby Hashimoto w całej grupie badanej na podstawie stężenia a/Tg

W obrębie grupy badanej z chorobą Hashimoto podwyższone miano przeciwciał a/Tg, wynoszące powyżej 40 IU/ml występowało u 82 (52,9%) pacjentów, natomiast u 73 (47,1%) osób mieściło się w granicach wartości referencyjnych. Podobnie jak w przypadku a/TPO,

pacjenci z wartościami przeciwciał a/Tg obecnie zawierającymi w granicach norm referencyjnych, w przeszłości, przy rozpoznaniu choroby, posiadali ich podwyższone stężenia. Wykazano występowanie statystycznie istotnych różnic median 25OHD3 w podgrupie pacjentów ze stężeniem a/Tg poniżej i równe 40 IU/ml oraz powyżej 40 IU/ml ($p < 0,001$; test Manna-Whitney'a) (Tabela 14, Rycina 25). W podgrupie pacjentów z a/Tg poniżej i równe 40 IU/ml zaobserwowano wyższe stężenia 25OHD3 niż w podgrupie chorych, u których a/Tg wynosiło powyżej 40 IU/ml. Mediana stężeń 25OHD3 w podgrupie chorych z a/Tg ≤ 40 IU/ml wynosiła 28,70 ng/ml, przy zakresie kwartylowym od 23,20 do 32,70. Z kolei mediana stężeń w podgrupie chorych z a/Tg powyżej 40 IU/ml stanowiła 20,20 ng/ml, wobec zakresu kwartylowego od 15,40 do 23,60.

Tabela 14. Charakterystyki opisowe stężeń 25OHD3 w grupie badanej z chorobą Hashimoto w zależności aktywności choroby na podstawie stężeń przeciwciał przeciw tarczycowych a/Tg: podgrupa z a/Tg ≤ 40 IU/ml vs. podgrupa z a/Tg > 40 IU/ml

a/Tg [IU/ml]	N	25OHD3				p
		średnia \pm SD	95%PU	min-max	Me (Q ₁ -Q ₃)	
≤ 40	73	28,94 \pm 7,95	27,09-30,80	15,00-57,30	28,70 (23,20-32,70)	< 0,001
> 40	82	19,95 \pm 6,40	18,54-21,35	10,20-39,70	20,20 (15,40-23,60)	



Rycina 25. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby Hashimoto na podstawie przeciwciał przeciwtarczycowych a/Tg w podgrupie ze stężeniem a/Tg ≤ 40 IU/ml oraz a/Tg > 40 IU/ml

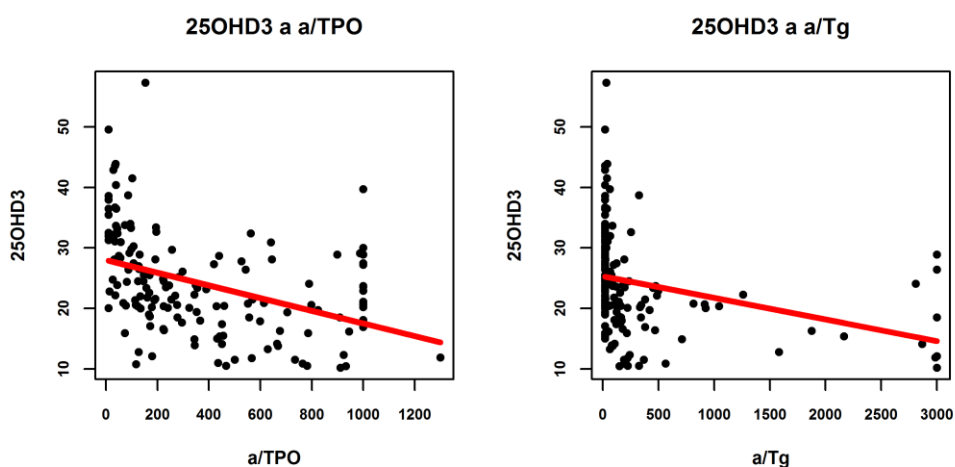
Przeprowadzona analiza jest spójna z powyższą, dotyczącą przeciwciał a/TPO i wskazuje na związek pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby Hashimoto ocenioną

obecnością przeciwciał a/Tg. Zatem wyniki obydwu analiz wskazują na obecność istotnie niższych stężeń 25OHD3 wobec aktywnego procesu autoimmunizacyjnego w chorobie Hashimoto (podwyższone stężenia a/TPO i a/Tg).

5.7.3. Ocena zależności stężenia 25OHD3 od bezwzględnych wartości stężeń przeciwciał przeciwtarczycowych a/TPO i a/Tg w grupie badanej z chorobą Hashimoto

W całej badanej występuje statystycznie istotna korelacja pomiędzy 25OHD3 a a/TPO ($R = -0,52$; $p < 0,001$; współczynnik korelacji rang Spearmana). Korelacja jest ujemna, co oznacza, że wzrost jednej z badanych cech spowoduje spadek przeciętnych wartości drugiej zmiennej. Korelacja ta jest jednak średnio silna. Przeprowadzona analiza regresji, oceniająca wpływ przeciwciał a/TPO na stężenie 25OHD3 wykazała, że a/TPO wyjaśnia 16,5% zmienności 25OHD3 (skorygowany współczynnik determinacji R^2) (Rycina 26, wykres po stronie lewej).

Bardzo podobną korelację wykazano dla 25OHD3 i a/Tg ($R = -0,53$; $p < 0,001$; współczynnik korelacji rang Spearmana). Przeprowadzona analiza regresji, oceniająca wpływ przeciwciał a/Tg na stężenie 25OHD3 wykazała, że a/Tg wyjaśnia 8,03% zmienności 25OHD3 (skorygowany współczynnik determinacji R^2) (Rycina 26, po stronie prawej).

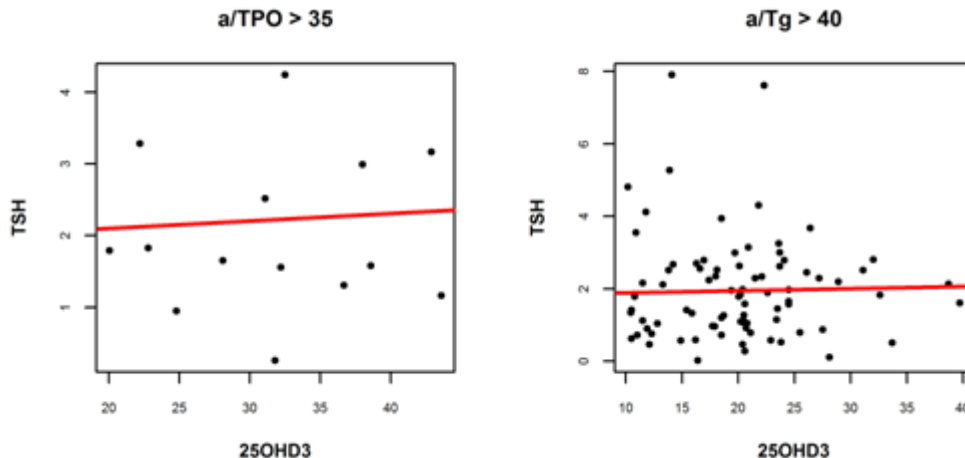


Rycina 26. Ocena zależności stężenia 25OHD3 w zależności od bezwzględnych wartości stężeń przeciwciał a/TPO (po stronie lewej) i a/Tg (po stronie prawej) w grupie z chorobą Hashimoto

5.8. OCENA STĘŻENIA 25OHD3 W ZALEŻNOŚCI OD AKTYWNOŚCI CHOROBY HASHIMOTO OCENIONEJ NA PODSTAWIE DODATNICH PRZECIWCIAŁ PRZECIWTARCZYCOWYCH A/TPO I/LUB A/Tg W PODGRUPIE E

Z uwagi na wykazanie korelacji pomiędzy aktywnością choroby Hashimoto ocenionej na podstawie obecności podwyższonych przeciwciał a/TPO i a/Tg w całej badanej grupie, przeprowadzono również analizę w celu oceny tej zależności w podgrupie pacjentów z dodatnimi przeciwciałami przeciwtarczycowymi, ale będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną (podgrupa E).

W badanej podgrupie chorych nie wykazano występowania statystycznie istotnej korelacji pomiędzy stężeniem 25OHD3 przeciwciałami a/TPO ($R = 0,11$, $p = 0,198$, wsp. Spearmana) (Rycina 29, wykres po stronie lewej). Podobne wyniki uzyskano w badanej podgrupie w ocenie przeciwciał a/Tg. Nie wykazano występowania statystycznie istotnej korelacji pomiędzy stężeniem 25OHD3 i a/Tg ($R = 0,02$, $p = 0,879$; wsp. Spearmana) (Rycina 27, wykres po stronie prawej). Wyniki tej analizy są rozbieżne z wynikami uzyskanymi dla całej grupy badanej, gdzie wykazano odwrotną korelację pomiędzy stężeniem 25OHD3 a obecnością podwyższonych przeciwciał a/TPO i/lub a/Tg.



Rycina 27. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby w podgrupie E na podstawie podwyższonych wartości przeciwciał przeciwtarczycowych: a/TPO > 35 IU/ml (wykres po stronie lewej) oraz a/Tg > 40 IU/ml (wykres po stronie prawej)

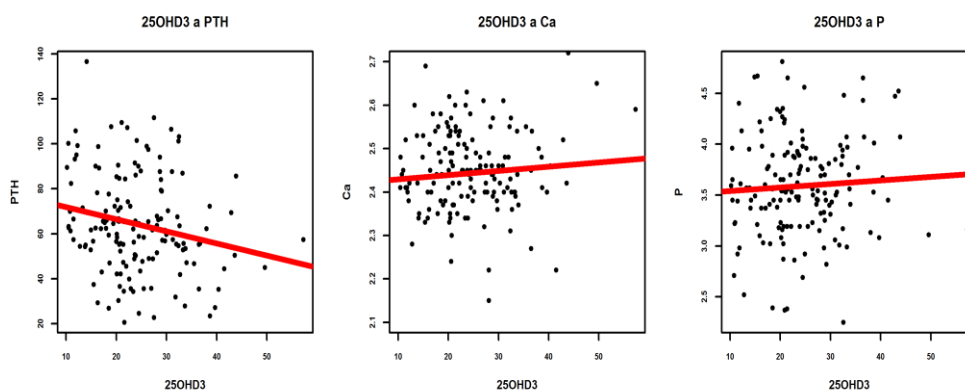
5.9. OCENA ZWIĄZKU POMIĘDZY STĘŻENIEM 25OHD3 A PTH, CA I P W GRUPIE CHORYCH Z CHOROBA HASHIMOTO

5.9.1. Ocena związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH w grupie badanej chorobą Hashimoto

Wykazano występowanie statystycznie istotnej korelacji między stężeniami 25OHD3 a PTH. Obserwacja ta jest zgodna z mechanizmami homeostazy hormonalnej i mineralnej w przypadku zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej i homeostazy kostnej, gdzie niższym stężeniom 25OHD3 odpowiadają wyższe stężenia PTH. Korelacja jest ujemna i niezbyt silna ($R = -0,21$, $p = 0,009$; wsp. Spearmana). Wyniki analizy regresji liniowej, badające wpływ cechy 25OHD3 na PTH wykazały, że zmienność PTH jedynie w 3,8 % była wyjaśniana zmiennością 25OHD3 (skorygowany współczynnik determinacji R^2). Zależność tę przedstawiono na rycinie 30, wykres po stronie lewej.

5.9.2. Ocena zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem Ca oraz P w grupie z chorobą Hashimoto

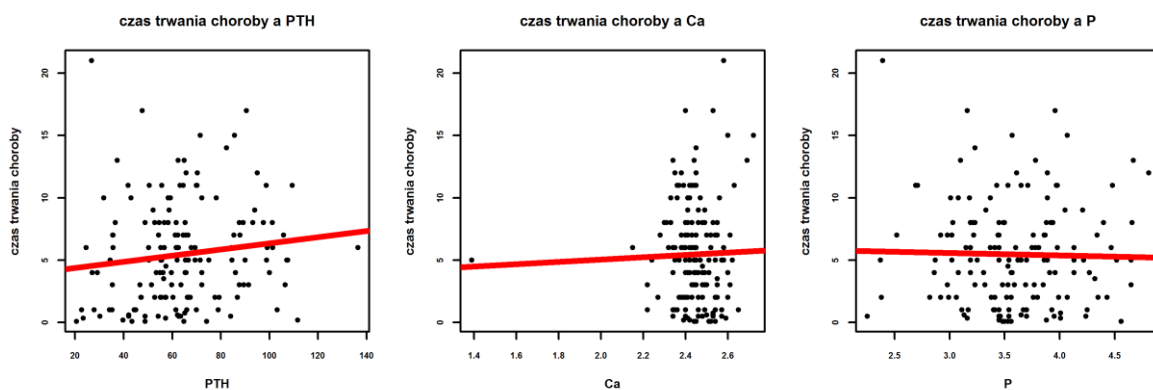
W przeprowadzonym badaniu nie wykazano występowania statystycznie istotnej zależności pomiędzy stężeniem Ca a 25OHD3 ($R = 0,04$, $p = 0,643$, wsp. Spearmana), jak również między P a 25OHD3 ($R = 0,05$, $p = 0,536$; wsp. Spearmana). Analizy obrazuje rycina 28 (wykres środkowy i po stronie prawej).



Rycina 28. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej)

5.10. ANALIZA ZWIĄZKU POMIĘDZY DŁUGOŚCIĄ CZASU TRWANIA CHOROBY A STĘŻENIEM PTH, Ca I P W GRUPIE OSÓB Z CHOROBA Hashimoto

W związku z tym, że wykazano wpływ czasu trwania choroby na stężenie 25OHD3 przeprowadzono analizę wpływu tego parametru na stężenie PTH oraz Ca i P u chorych z chorobą Hashimoto. Wykazano występowanie statystycznie istotnej zależności pomiędzy PTH a czasem trwania choroby ($R = 0,18$; $p = 0,023$; wsp. Spearmana). Zależność między zmiennymi jest dodatnia, co oznacza że wzrost jednej cechy spowoduje wzrost średnich wartości drugiej cechy. Jednak jest to zależność dość słaba. Czas trwania choroby Hashimoto nie był czynnikiem modulującym stężenie Ca i P. W przypadku stężenia Ca współczynnik korelacji wynosił zaledwie $R = -0,08$ ($p = 0,315$, wsp. Spearmana), a w przypadku stężenia P $R = -0,01$, $p = 0,888$, wsp. Spearmana). Zależność wpływu czasu trwania choroby Hashimoto na stężenie PTH i gospodarkę Ca-P przedstawia rycina 29.

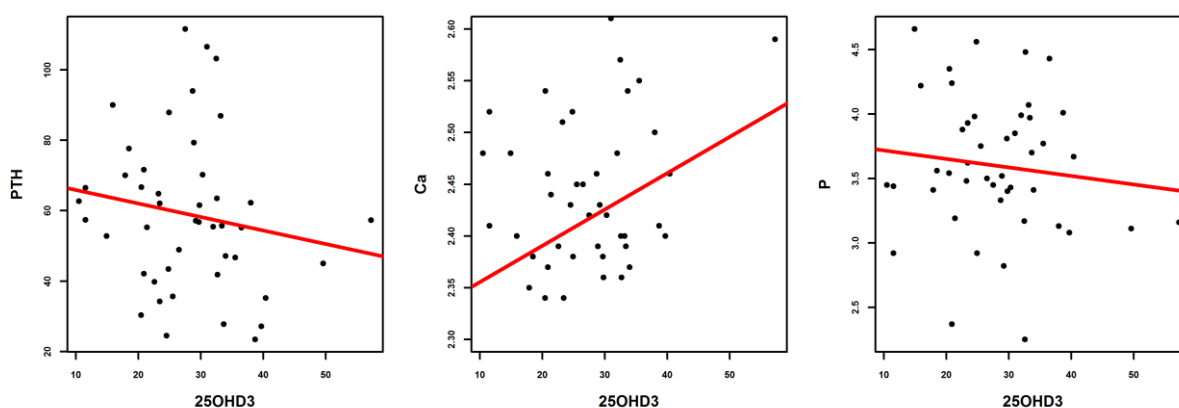


Rycina 29. Wpływ czasu trwania choroby Hashimoto na stężenie PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej)

5.11. ANALIZA POMIĘDZY STĘŻENIEM 25OHD3 A STĘŻENIEM PTH, Ca I P

W PODGRUPIE PACJENTÓW W STADIUM EUTYREOZY I DODATNIMI PRZECIWCIAŁAMI PRZECIWTARCZYCOWYMI (PODGRUPA E)

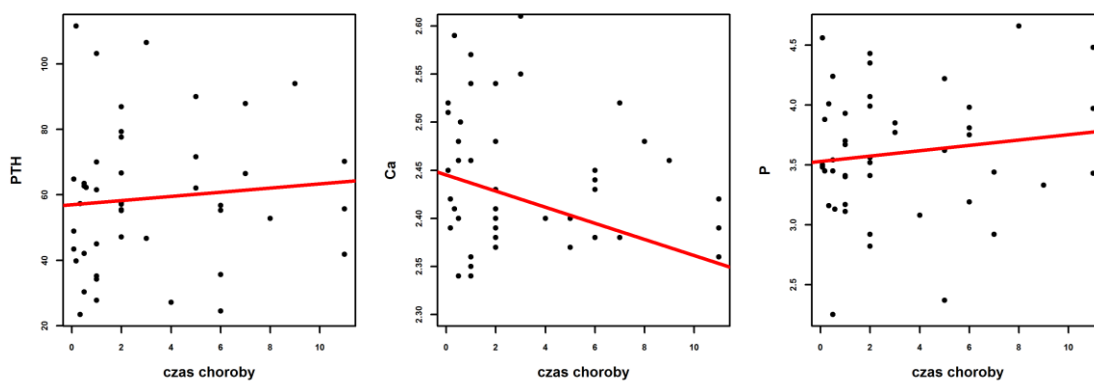
Na podstawie przeprowadzonej analizy w podgrupie E nie wykazano występowania statystycznie istotnej korelacji między stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH ($R = -0,17$, $p = 0,277$; wsp. Pearsona) (Rycina 25, wykres po stronie lewej). Nie wykazano również występowania statystycznie istotnej zależności między stężeniami Ca a 25OHD3 ($R = -0,16$, $p = 0,304$, wsp. Spearmana), jak również między stężeniami P a 25OHD3 ($R = -0,09$, $p = 0,574$, wsp. Pearsona) (Rycina 30, wykres środkowy i po stronie prawej).



Rycina 30. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej) w podgrupie E

5.12 . ANALIZA ZWIĄZKU POMIĘDZY DŁUGOŚCIĄ CZASU TRWANIA CHOROBY A STĘŻENIEM PTH, Ca I P W PODGRUPIE E, CZYLI OSÓB Z DODATNIMI PRZECIWCIAŁAMI PRZECIWTARCZYCOWYMI, BĘDĄCYMI W STADIUM EUTYREOZY, BEZ LECZENIA L-TYROKSYNĄ

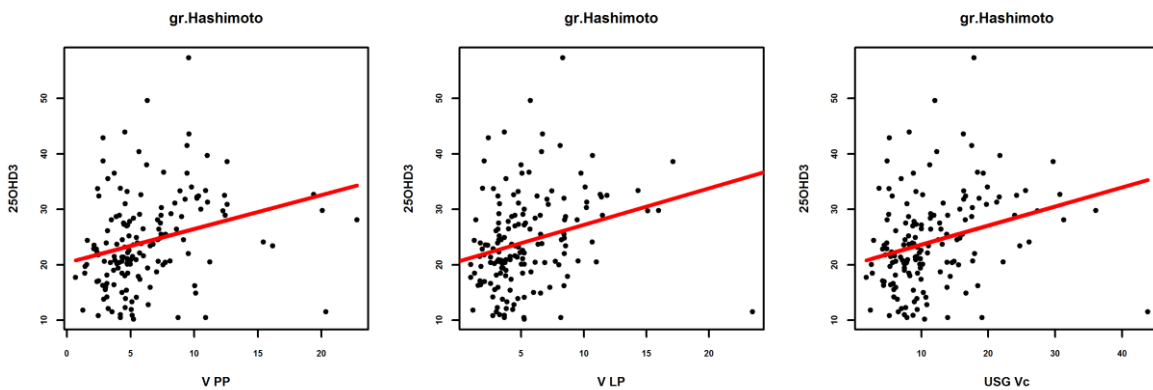
W związku z tym, że w grupie z chorobą Hashimoto wykazano zależność pomiędzy czasem trwania choroby a stężeniem PTH, dokonano oceny tych parametrów w podgrupie E. Nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy długością czasu trwania choroby a stężeniami: PTH ($R = 0,15$; $p = 0,323$; wsp. Spaermana), Ca ($R = 0,18$; $p = 0,233$; wsp. Spaermana) oraz P ($R = 0,06$; $p = 0,674$; wsp. Spaermana). Powyższe analizy przedstawia rycina 31.



Rycina 31. Wpływ długości czasu trwania choroby na stężenie PTH (wykres po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (wykres po stronie prawej) w podgrupie E

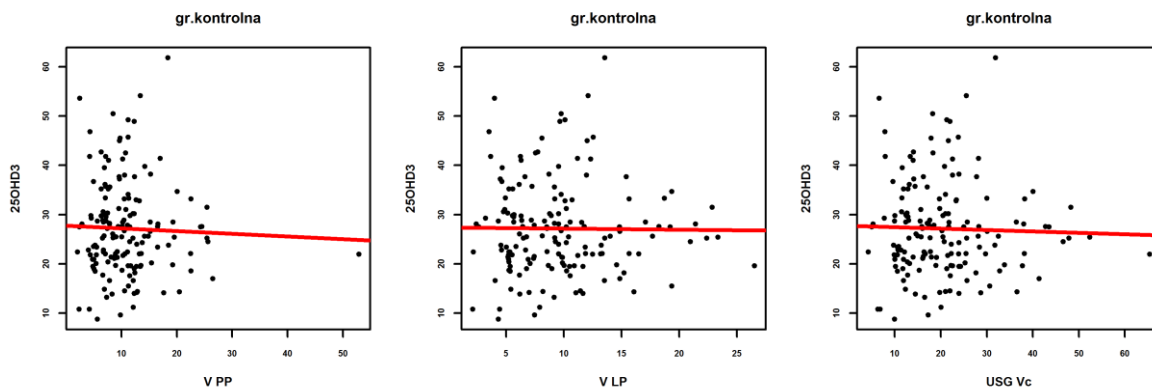
5.13. ANALIZA STĘŻENIA 25OHD3 W ZALEŻNOŚCI OD OBJĘTOŚCI GRUCZOŁU TARCZOWEGO W BADANIU ULTRASONOGRAFICZNYM W GRUPIE BADANEJ Z CHOROBAŁ HASHIMOTO

W grupie pacjentów z chorobą Hashimoto przeprowadzono analizę stężenia 25OHD3 w zależności od objętości gruczołu tarczowego w ocenie ultrasonograficznej. Wykazano występowanie statystycznie istotnej zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 a całkowitą objętością gruczołu tarczowego (Vc) ($R = 0,33$, $p < 0,001$; wsp. Spearmana). Zależność ta dotyczyła także objętości prawego płata (V PP) ($R = 0,35$, $p < 0,001$; wsp. Spearmana) oraz płata lewego (V LP) ($R = 0,32$, $p < 0,001$; wsp. Spearmana) gruczołu tarczowego (Rycina 32).



Rycina 32. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością prawego płata tarczycy (V PP) (po stronie lewej), objętością lewego płata tarczycy (V LP) (wykres środkowy) i całkowitą objętością gruczołu tarczowego (Vc) (po stronie prawej) w grupie chorych z chorobą Hashimoto

W grupie kontrolnej również przeprowadzono również analizę stężenia 25OHD3 w zależności od objętości gruczołu tarczowego w ocenie ultrasonograficznej. Nie wykazano występowania statystycznie istotnej współzależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 a całkowitą objętością gruczołu tarczowego (Vc) ($R = -0,03$, $p = 0,698$; wsp. Spearmana), jak również dla objętości prawego płata (V PP) ($R = -0,03$, $p = 0,733$; wsp. Spearmana) oraz płata lewego (V LP) ($R = -0,01$, $p = 0,786$; wsp. Spearmana) gruczołu tarczowego (Rycina 33).

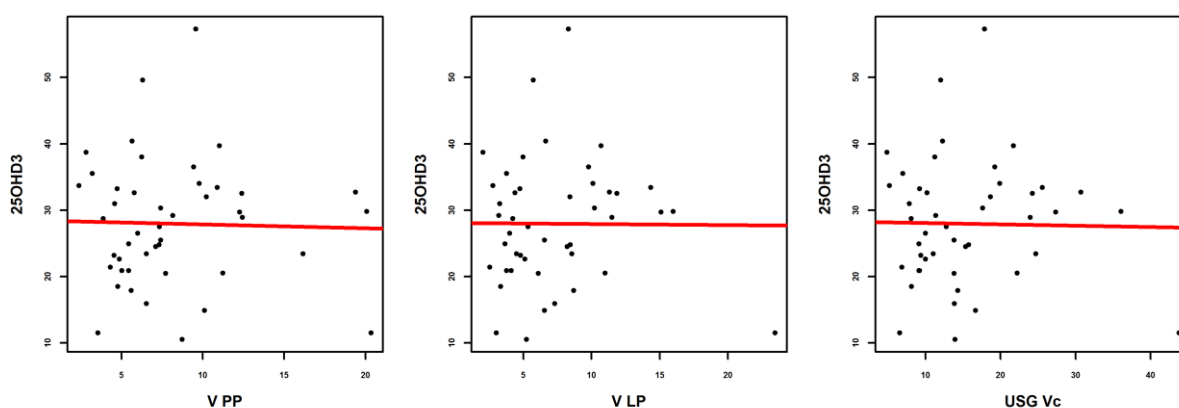


Rycina 33. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością prawego płata tarczycy (V PP) (po stronie lewej), objętością lewego płata tarczycy (V LP) (wykres środkowy) i całkowitą objętością gruczołu tarczowego (Vc) (wykres po stronie prawej) w grupie kontrolnej

5.14. ANALIZA STĘŻENIA 25OHD3 W ZALEŻNOŚCI OD OBJĘTOŚCI GRUCZOŁU TARCZOWEGO W BADANIU ULTRASONOGRAFICZNYM W PODGRUPIE PACJENTÓW W STADIUM EUTYREOZY, BEZ LECZENIA L-TYROKSYNĄ, Z OBECNOŚCIĄ DODATNICH PRZECIWCIAŁ PRZECIWTARCZYCOWYCH (PODGRUPA E)

Podobnie jak powyżej, również w podgrupie chorych dodatnimi przeciwciałami przeciwtarczycowymi, ale będącymi w stadium eutyreozy (podgrupa E), przeprowadzono analizę zależności stężenia 25OHD3 od objętości całkowitej (Vc) oraz płata prawego (V PP) i lewego (V LP) gruczołu tarczowego w ocenie ultrasonograficznej. Nie wykazano występowania statystycznie istotnej współzależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 a Vc ($R = 0,06$, $p = 0,685$; wsp. Spearmana), V PP ($R = 0,03$, $p = 0,843$; wsp. Spearmana) oraz V LP ($R = 0,10$, $p = 0,151$; wsp. Spearmana). Uzyskane wyniki obrazuje Rycina 34 (dla Vc – wykres po stronie prawej, dla V PP – część środkowa, dla V LP – wykres po stronie lewej).

Wyniki analiz są rozbieżne z wynikami przeprowadzonymi powyżej dotyczącymi całej badanej grupy z chorobą Hashimoto, w której wykazano dodatnią zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością całkowitą oraz prawego i lewego płata gruczołu tarczowego.



Rycina 34. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a V PP (wykres po stronie lewej), V LP (wykres środkowy) i Vc (wykres po stronie prawej) w podgrupie E

5.15. ANALIZA GENU *HLA-DRB1* U CZĘŚCI (N = 71) OSÓB W OBRĘBIE GRUPY BADANEJ PACJENTÓW Z CHOROBAŁ HASHIMOTO

5.15.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów z chorobą Hashimoto, u których dokonano analizy genu *HLA-DRB1*

W obrębie grupy badanej z chorobą Hashimoto u 71 (45,80%) osób dokonano oceny genu *HLA-DRB1*. Wszyscy pacjenci byli w stadium niedoczynności tarczycy wyrównanej terapią l-tyroksyną. Analizowaną grupę stanowiły kobiety w średnim wieku $46,32 \pm 19,13$ lat, gdzie najmłodsza osoba miała 18 lat, a najstarsza 78 lat. Grupę kontrolną stanowiło 20653 osób z bazy danych dla polskiej populacji (www.allelefreqencies.net; test chi-kwadrat).

Stężenie 25OHD3 odpowiadające kryterium prawidłowego wyrównania, czyli > 30 ng/ml spełniło 12 osób (16,90%). Stężenia suboptymalne w przedziale $> 20 \leq 30$ ng/ml stwierdzono u 29 badanych (40,85%), natomiast stężenia deficytowe w przedziale $> 10 \leq 20$ ng/ml dotyczyły 30 osób (42,25%). U żadnego pacjenta nie wystąpiły stężenia 25OHD3 < 10 ng/ml.

5.15.2. Częstość występowania alleli genu *HLA-DRB1* w przeanalizowanej części osób z chorobą Hashimoto

Zestawienie badanych alleli genu *HLA-DRB1* w badanej grupie przedstawia Tabela 15. W badanej grupie wykazano, że najczęściej występującym allelem był DRB1*07:01 (21,8%). Następnymi w kolejności najczęściej stwierdzanymi allelami były DRB1*01:01 (14,8%) oraz DRB1*11:01 (14,1%). Pozostałe allele badanego genu wystąpiły z częstością poniżej 10%. Do grupy najrzadziej występujących alleli należały: DRB1*04:07, DRB1*08:04, DRB1*11:03, DRB1*15:02, DRB1*16:01 (każdy z nich wystąpił tylko jeden raz, co

stanowiło 0,7%). W badanej grupie analizowanego genu *HLA-DRB1*, osoby będące homozygotami i heterozygotami wystąpiły z częstością odpowiednio 54,9% (N = 39) i 45,1% (N = 32). Wśród homozygot najczęściej występującym był allel DRB1*07:01 – posiadało go 33% homozygot (oraz 16% heterozygot). Wśród heterozygot najczęściej pojawiał się allel DRB1*03:01 – posiadało go 31% heterozygot (oraz 5% homozygot).

Tabela 15. Analiza częstości występowania alleli genu *HLA-DRB1* w badanej grupie 71 pacjentów z chorobą Hashimoto

<i>HLA- allele</i>	Ilość alleli <i>HLA-DRB1</i>	% alleli <i>HLA-DRB1</i>
DRB1*01:01	21	14,79
DRB1*01:02	2	1,41
DRB1*03:01	14	9,86
DRB1*04:01	3	2,11
DRB1*04:04	4	2,82
DRB1*04:07	1	0,70
DRB1*07:01	31	21,83
DRB1*08:01	5	3,52
DRB1*08:04	1	0,70
DRB1*11:01	20	14,08
DRB1*11:03	1	0,70
DRB1*11:04	9	6,34
DRB1*12:01	2	1,41
DRB1*13:01	12	8,45
DRB1*13:02	2	1,41
DRB1*13:03	2	1,41
DRB1*14:01	4	2,82
DRB1*15:01	6	4,23
DRB1*15:02	1	0,70
DRB1*16:01	1	0,70
OGÓLEM	142	100,00

5.15.3. Ocena porównawcza częstości występowania poszczególnych alleli genu *HLA-DRB1* pomiędzy badaną grupą osób z chorobą Hashimoto a grupą kontrolną

W dalszej kolejności dokonano oceny porównawczej pomiędzy częstością występowania każdego z podtypów *HLA-DRB1* z grupą kontrolną, którą stanowiła grupa z bazy danych dla polskiej populacji wynosząca 20653 osób (www.allelefreqencies.net; test χ^2). Pojawienie się allela DRB1*11:04 było istotnie wyższe w badanej grupie niż w grupie kontrolnej ($p = 0,002$). Średnie stężenie 25OHD3 w grupie pacjentów z HT i obecnością tego allela wynosiło 22,97 ng/ml. W przypadku obecności wystąpienia allela DRB1*11:04, iloraz szans (OR = 2,15) wskazuje na ponad dwukrotnie wyższe ryzyko wystąpienia choroby Hashimoto niż w grupie osób zdrowych.

Z kolei wystąpienie allela DR-B1*15:01 wskazuje na sytuację odwrotną. Jego obecność była istotnie niższa w grupie badanej niż w grupie kontrolnej ($p = 0,009$). Średnie stężenie 25OHD3 u osób z HT i obecnością tego allela wynosiło 23,87 ng/ml. Iloraz szans (OR = 0,47) wskazuje na to, że ryzyko znalezienia się w grupie chorych zmniejsza się ponad dwukrotnie w przypadku obecności tego allela w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnie stężenia 25OHD3 w obecności alleli DRB1*11:04 i DRB1*15:01 różniły się nieznacznie. Na podstawie przeprowadzonej analizy przy małej liczebnościowo grupie badanej nie można więc wykazać, że obecność tych alleli genu *HLA-DRB1* w badanej grupie może mieć związek niskimi lub prawidłowymi stężeniami witaminy D.

5.15.4. Zależność pomiędzy średnimi stężeniami 25OHD3 a analizowanymi allelami genu *HLA-DRB1*

Do oceny różnic stężenia 25OHD3 pomiędzy poszczególnymi allelami genu *HLA-DRB1* zastosowano analizę wariancji ANOVA i stwierdzono w tym zakresie istotne różnice, o czym świadczy test post hoc Fishera.

Średnie stężenie 25OHD3 dla osobników z allelem DRB1* 15:02 wynosiło 32,1 ng/ml i było istotnie wyższe od średnich stężeń 25OHD3 dla alleli DRB1*04:04 i DRB1*13:02 ($p = 0,041$ i $p = 0,043$). Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach 25OHD3 pomiędzy DRB1*15:02 a pozostałymi allelami. Dla osób z allelem DRB1*01:01 średnie stężenie 25OHD3 23,90 ng/ml i było istotnie wyższe w porównaniu do pacjentów z allelem DRB1*11:01 i istotnie niższe w stosunku do osób z allelem DRB1*13:03 ($p = 0,042$ i $p = 0,007$).

Średnie stężenie 25OHD3 w niższej grupie pacjentów z allelem DRB1*03:01 wynosiło 20,98 ng/ml. Wykazano, że było istotnie niższe w porównaniu do osób z allelami DRB1*13:01 i DRB1*13:03 ($p = 0,025$ i $p = 0,001$).

W przeprowadzonej analizie pacjenci z allelem DRB1*15:01 posiadali średnie stężenie 25OHD3 wynoszące 23,87 ng/ml. Wykazano istotnie niższe stężenie 25OHD3 w tej grupie w stosunku do osób z allelem DRB1*13:03 ($p = 0,015$).

Średnie stężenie 25OHD3 w grupie osób z allelem DRB1*04:01 wynosiło 18,433 ng/ml i było znamienne niższe w porównaniu z pacjentami z allelami DRB1*13:01 i DRB1*13:03 ($p = 0,046$ i $p = 0,002$). Osoby z allelem DRB1*07:01 charakteryzowały się średnim stężeniem 25OHD3 wynoszącym 24,04 ng/ml. Stężenie to było istotnie niższe w porównaniu do pacjentów z allelem DRB1*13:03 ($p = 0,007$) i istotnie wyższe w stosunku do osób z allelem DRB1*11:01 ($p = 0,022$).

Z kolei w grupie chorych z allelem DRB1* 11:01 średnie stężenie 25OHD3 wynosiło 19,91 ng/ml i było istotnie niższe w porównaniu do osób z allelami DRB1*01:01, DRB1*07:01, DRB1*13:01, DRB1*13:03 ($p = 0,042$, $p = 0,022$, $p = 0,004$ i $p = 0,005$).

Średnie stężenie 25OHD3 w grupie osób z allelem DRB1*11:04 wynosiło 22,97 ng/ml i było istotnie niższe w porównaniu do osób z allelem DRB1*13:03 ($p = 0,007$). Natomiast dla osób z allelami DRB1*04:07 (średnie stężenie 25OHD3 – 21,3 ng/ml), DRB1*11:03 (średnie stężenie 25OHD3 - 30,40 ng/ml), DRB1* 12:01 (średnie stężenie 25OHD3 – 28,45 ng/ml) oraz DRB1*16:01 (średnie stężenie 25OHD3 – 24,50 ng/ml) nie wykazano istotności statystycznej w porównaniu ze średnimi stężeniami 25OHD3 w grupie z pozostałymi allelami analizowanego genu.

U osób z allelem DRB1*13:01 średnie stężenie 25OD3 wynosiło 26,54 ng/ml i było istotnie wyższe niż w grupie osób z allelami DRB1*03:01, DRB1*04:01, DRB1*11:01, DRB1*04:04 i DRB1*13:02 (odpowiednio: $p = 0,025$, $p = 0,046$, $p = 0,004$, $p = 0,015$, $p = 0,040$, $p = 0,038$) oraz istotnie niższe w stosunku do DR*13:03 ($p = 0,040$).

Analiza grupy osób z allelem DRB1*01:02 wykazała, że w grupie tej średnie stężenie 25OHD3 wynosiło 18,05 ng/ml i było istotnie niższe w porównaniu z osobami z allelami DRB1*13:01 oraz DRB1 13:03 ($p = 0,076$ i $p = 0,004$).

Średnie stężenie 25OHD3 u pacjentów z allelem DRB1*04:04 wynosiło 17,77 ng/ml i było istotnie niższe w porównaniu z grupami osób z allelami DR*15:05, DR*13:01 i DR*13:03 (odpowiednio: $p = 0,042$, $p = 0,017$, $p = 0,0007$).

U osób z allelem DRB1*13:03, dla których stężenie 25OHD3 wynosiło 36,4 ng/ml wykazano istotnie wyższe stężenia 25OHD3 w stosunku do większości innych alleli: DRB1*01:01, DRB1*03:01, DRB1*15:01, DRB1*04:01, DRB1*04:01, DRB1*07:01, DRB1*11:01, DRB1*11:04, DRB1*13:01, DRB1*01:02, DRB1*04:04, DRB1*14:01, DRB1*08:01, DRB1*08:04, DRB1*13:02 (odpowiednio: $p = 0,007$, $p = 0,001$, $p = 0,015$,

$p = 0,001$, $p = 0,007$, $p = 0,0005$, $p = 0,007$, $p = 0,04$, $p = 0,003$, $p = 0,0008$, $p = 0,003$, $p = 0,003$, $p = 0,031$, $p = 0,002$).

U pacjentów z allelem DRB1*14:01 wynosiło 19,91 ng/ml, DRB1* 08:01, ze średnim stężeniem 25OHD3 wynoszącym 20,86 ng/ml oraz DRB1*08:04, gdzie średnie stężenie 25OHD3 wynosiło 19,80 ng/ml, stwierdzono istotnie niższe stężenia 25OHD3 w stosunku do osób z allelem DRB1*13:03 (odpowiednio: $p = 0,003$, $p = 0,003$ i $p = 0,031$).

Średnie stężenie 25OHD3 w grupie osób z allelem DRB1*13:02 wynosiło 16,60 ng/ml i było istotnie niższe w porównaniu do osób z allelami: DRB1*15:02, DRB1*13:01 oraz DRB1* 13:03 (odpowiednio: $p = 0,044$, $p = 0,040$, $p = 0,002$).

Na podstawie powyższych analiz wykazano, że stężenia 25OHD3 odpowiadające jej prawidłowemu wyrównaniu były istotnie wyższe w obecności allela DRB1*13:03.

W zakresie stężeń 25OHD3 odpowiadających deficytowi lub stężeniom suboptymalnym w analizowanych allelach wykazano istotne różnice pomiędzy poszczególnymi analizowanymi allelami, ale uzyskane wyniki nie pozwalają na wskazanie, które z nich mogłyby predysponować do obniżonych stężeń 25OHD3.

5.15.5. Analiza związku pomiędzy przedziałami stężeń 25OHD3 i wystąpieniem poszczególnych alleli genu *HLA-DRB1*

Dla celów analizy związku między stężeniem 25OHD3 i wystąpieniem danego allela genu *HLA-DRB1*, przyjęto podział na stężenia deficytowe, suboptymalne oraz optymalne. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w rozkładach stężeń 25OHD3 w zależności od wystąpienia lub braku u chorego danego allela (Tabela 16).

Tabela 16. Stężenie 25OHD3 w zależności od występowania danego allela genu

HLA-DRB1

Allel genu <i>HLA</i>	Występowanie	Stężenie 25OHD3 [ng/ml]			p-value*
		deficytowe [> 10 ≤ 20]	suboptymalne [> 20 ≥ 30]	prawidłowe [> 30 < 50]	
<i>DRB1*01:01</i>	nie (n=58)	23 (40%)	25 (43%)	10 (17%)	1
	tak (n=13)	5 (38%)	6 (46%)	2 (15%)	
<i>DRB1*01:02</i>	nie (n=69)	27 (39%)	30 (43%)	12 (17%)	1
	tak (n=2)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	
<i>DRB1*03:01</i>	nie (n=59)	20 (34%)	28 (47%)	11 (19%)	0,129
	tak (n=12)	8 (67%)	3 (25%)	1 (8%)	
<i>DRB1*04:01</i>	nie (n=69)	27 (39%)	30 (43%)	12 (17%)	1
	tak (n=2)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	
<i>DRB1*04:04</i>	nie (n=67)	25 (37%)	30 (45%)	12 (18%)	0,384
	tak (n=4)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	
<i>DRB1*04:07</i>	nie (n=70)	28 (40%)	30 (43%)	12 (17%)	1
	tak (n=1)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
<i>DRB1*07:01</i>	nie (n=53)	22 (42%)	22 (42%)	9 (17%)	0,876
	tak (n=18)	6 (33%)	9 (50%)	3 (17%)	
<i>DRB1*08:01</i>	nie (n=66)	26 (39%)	28 (42%)	12 (18%)	0,838
	tak (n=5)	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	
<i>DRB1*08:04</i>	nie (n=70)	27 (39%)	31 (44%)	12 (17%)	0,563
	tak (n=1)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
<i>DRB1*11:01</i>	nie (n=57)	21 (37%)	26 (46%)	10 (18%)	0,728
	tak (n=14)	7 (50%)	5 (36%)	2 (14%)	
<i>DRB1*11:03</i>	nie (n=70)	28 (40%)	31 (44%)	11 (16%)	0,169
	tak (n=1)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
<i>DRB1*11:04</i>	nie (n=65)	26 (40%)	28 (43%)	11 (17%)	1
	tak (n=6)	2 (33%)	3 (50%)	1 (17%)	
<i>DRB1*12:01</i>	nie (n=69)	28 (41%)	30 (43%)	11 (16%)	0,311
	tak (n=2)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	
<i>DRB1*13:01</i>	nie (n=62)	27 (44%)	25 (40%)	10 (16%)	0,142
	tak (n=9)	1 (11%)	6 (67%)	2 (22%)	
<i>DRB1*13:02</i>	nie (n=69)	26 (38%)	31 (45%)	12 (17%)	0,464
	tak (n=2)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
<i>DRB1*13:03</i>	nie (n=70)	28 (40%)	31 (44%)	11 (16%)	0,169
	tak (n=1)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
<i>DRB1*14:01</i>	nie (n=68)	26 (38%)	30 (44%)	12 (18%)	0,772
	tak (n=3)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	
<i>DRB1*15:01</i>	nie (n=66)	26 (39%)	30 (45%)	10 (15%)	0,247
	tak (n=5)	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	
<i>DRB1*15:02</i>	nie (n=70)	28 (40%)	31 (44%)	11 (16%)	0,169
	tak (n=1)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
<i>DRB1*16:01</i>	nie (n=70)	28 (40%)	30 (43%)	12 (17%)	1
	tak (n=1)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	

*) dokładny test Fisher'a

5.16. PODSUMOWANIE UZYSKANYCH WYNIKÓW BADAŃ

1. Porównanie przeciętnych wartości wybranych parametrów hormonalnych, biochemicznych i ultrasonograficznych pomiędzy grupą badaną z chorobą Hashimoto oraz grupą kontrolną

- a/ Mediana stężeń 25OHD3 w grupie badanej pacjentów z HT była istotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej.
- b/ Z kolei mediana stężeń TSH w grupie badanej była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej
- c/ Grupa badana pacjentów HT charakteryzowała się istotnie wyższą medianą stężeń PTH w stosunku do grupy kontrolnej.
- d/ W ocenie parametrów biochemicznych nie wykazano istotnych różnic zarówno w medianach stężeń wapnia, jak i fosforu pomiędzy analizowanymi grupami.
- e/ Pomiedzy grupą badaną i kontrolną wykazano występowanie statystycznie znamienych różnic median objętości całkowitej gruczołu tarczowego, jak również płata prawego i lewego w ocenie ultrasonograficznej. Mediany objętości całkowitej tarczycy oraz każdego z płatów osobno, były istotnie mniejsze niż w grupie kontrolnej.

2. Analiza zależności wieku ze stężeniami PTH, Ca i P w grupie z chorobą Hashimoto oraz w grupie kontrolnej

- a/ W przeprowadzonych analizach stwierdzono istotną korelację pomiędzy wiekiem pacjentów z HT a PTH. Zmienność wieku wpływa na przeciętne stężenie PTH w około 8,3%.
- b/ Z kolei nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów z HT a stężeniem wapnia i fosforu.

3. Porównanie przeciętnych wartości parametrów hormonalnych, biochemicznych i ultrasonograficznych pomiędzy grupą pacjentów z podwyższonymi stężeniami przeciwciał przeciw tarczycy, będących w stadium eutyreozы bez leczenia l-tyroksyną (podgrupa E) a grupą kontrolną

- a/ Analiza median stężeń 25OHD3 pomiędzy podgrupą E a grupą badaną nie wykazała istotnej różnicy median 25ODH3. Wynik ten jest zatem odmienny od uzyskanego w ocenie całej grupy badanej pacjentów z HT w porównaniu do grupy kontrolnej.

- b/ Mediana stężenia TSH w grupie nie różniła się istotnie od mediany TSH w grupie kontrolnej.
- c/ Podobnie nie stwierdzono również istotnej statystycznie różnicy median stężeń PTH, Ca, P w podgrupie E oraz grupie kontrolnej.
- d/ W ocenie ultrasonograficznej objętość całkowita, jak również płuca prawego i lewego gruczołu tarczycowego były istotnie mniejsze niż w grupie badanej.

4. Analiza zależności wieku ze stężeniami PTH, Ca i P w podgrupie E pacjentów, będących w eutyreozy z obecnością dodatnich przeciwciał przeciw tarczycowym.

W podgrupie E stwierdzono obecność statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a stężeniem PTH. Korelacja ta jest dość silna i dodatnia, a zmienność wieku w 20,17% wpływa na zmienność stężenia PTH.

5. Wpływ wybranych czynników na stężenie 25OHD3 w grupie badanej z chorobą Hashimoto

- a/ Nie wykazano związku pomiędzy wiekiem a stężeniem 25OHD3 w grupie z chorobą Hashimoto, zatem w grupie badanych pacjentów wiek nie był istotnym czynnikiem modulującym stężenie 25OHD3.
- b/ W przeprowadzonej analizie wykazano istotną współzależność pomiędzy czasem trwania choroby a przeciętnymi wynikami stężeń 25OHD3 w grupie pacjentów z chorobą Hashimoto. Korelacja ta jest średnio silna i ujemna.
- c/ Natomiast nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a stężeniami 25OHD3 w grupie osób z czasem trwania choroby nieprzekraczającym jednego roku, jak również w grupie osób z czasem trwania choroby nieprzekraczającym dwóch lat.

6. Ocena zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 w obrębie grupy badanej z chorobą Hashimoto a stanem czynnościowym gruczołu tarczowego: chorzy w stadium hipotyreozy w trakcie leczenia substytucyjnego preparatem l-tyroksyny (H) oraz chorzy w stadium eutyreozy, bez leczenia (E)

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano zależność między stanem czynnościowym tarczycy a przeciętnymi stężeniami 25OHD3; pacjenci z niedoczynnością tarczycy w trakcie terapii preparatem l-tyroksyny charakteryzowali się przeciętnie niższymi stężeniami 25OHD3 niż osoby nieleczone, będące w stadium eutyreozy. Trudno jest jednak jednoznacznie powiedzieć niedobór witaminy D związany

jest z rozwojem niedoczynności tarczycy czy też niedoczynność tarczycy (aczkolwiek wyrównana terapią) istotnie wpływa na przeciętne stężenia 25OHD3.

7. Ocena zależności pomiędzy wiekiem pacjentów i czasem trwania procesu autoimmunizacyjnego a stężeniem 25OHD3 w podgrupie chorych w stadium eutyrezy, bez leczenia l-tyroksyną z dodatnimi przeciwciałami przeciw-tarczycowymi (podgrupa E)

- a/ Korelacja pomiędzy wiekiem pacjentów w podgrupie E a stężeniem 25OHD3 była nieistotna statystycznie, zatem podobnie jak w całej grupie badanej wiek nie był czynnikiem wpływającym na stężenie 25OHD3.
- b/ Nie wykazano także występowania istotnej korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a przeciętnymi stężeniami 25OHD3 w podgrupie E. Czynnikiem ten wpływał istotnie na stężenie 25OHD3 w całej grupie badanej, ale obserwacja ta nie dotyczyła pierwszych dwóch lat trwania choroby.

8. Ocena związku stężenia 25OHD3 z aktywnością choroby Hashimoto na podstawie stężeń przeciwciał przeciw-tarczycowych: przeciw peroksydazie tarczycowej (a/TPO) i przeciw tyreoglobulinie (a/Tg)

- a/ W podgrupie chorych z a/TPO poniżej i równe 35 IU/ml stwierdzono istotnie wyższe stężenia median 25OHD3 niż w podgrupie pacjentów, u których a/TPO stanowiło stężenia powyżej 35 IU/ml. Obserwacja wskazuje na możliwy związek pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby w ocenie wartości stężenia przeciwciał a/TPO. Podwyższonemu stężeniu przeciwciał, a zatem aktywnemu procesowi autoimmunizacyjnemu odpowiadają niższe stężenia 25OHD3 i odwrotnie przy prawidłowych stężeniach a/TPO (nieaktywnej chorobie) obserwuje się wyższe stężenia 25OHD3.
- b/ Podobnie jak powyżej, wykazano występowanie istotnych różnic median stężeń 25OHD3 w podgrupie pacjentów ze stężeniem a/Tg poniżej i równe 40 IU/ml oraz powyżej 40 IU/ml. Pacjenci z a/Tg poniżej i równe 40 IU/ml charakteryzowali się wyższymi stężeniami 25OHD3 niż chorzy z a/Tg powyżej 40 IU/ml.

9. Ocena zależności stężenia 25OHD3 od bezwzględnych wartości stężeń przeciwciał przeciw-tarczycowych a/TPO i a/Tg w grupie badanej z chorobą Hashimoto

- a/ W całej badanej wykazano istotną korelację pomiędzy stężeniem 25OHD3 a a/TPO. Korelacja jest ujemna i średnio silna. Analiza regresji, oceniająca wpływ przeciwciał a/TPO na stężenie 25OHD3 wykazała, że a/TPO wyjaśnia 16,5% zmienności 25OHD3.
- b/ Podobną zależność wykazano dla stężenia 25OHD3 i a/Tg. Analiza regresji oceniająca wpływ przeciwciał a/Tg na stężenie 25OHD3 wykazała, że a/Tg wyjaśnia 8,03% zmienności 25OHD3.

10. Ocena stężenia 25OHD3 w zależności od aktywności choroby Hashimoto ocenionej na podstawie dodatnich przeciwciał przeciwtarczycowych a/TPO i/lub a/Tg w podgrupie E

- a/ W podgrupie E nie wykazano występowania istotnej korelacji pomiędzy stężeniem 25OHD3 a przeciwciałami a/TPO.
- b/ Podobne wyniki uzyskano w analizie dotyczącej przeciwciał a/Tg, gdzie również nie wykazano występowania statystycznie istotnej korelacji pomiędzy stężeniem 25OHD3 i a/Tg.

Powyższe wyniki są zatem rozbieżne z uzyskanymi dla całej grupy badanej, gdzie wykazano odwrotną korelację pomiędzy stężeniem 25OHD3 a obecnością podwyższonych przeciwciał a/TPO i/lub a/Tg.

11. Ocena związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a PTH, Ca i P w grupie chorych z chorobą Hashimoto

- a/ W przeprowadzonych analizach wykazano istotną korelację pomiędzy stężeniami 25OHD3 a PTH. Korelacja jest ujemna i niezbyt silna. Analizy regresji liniowej wykazała, że zmienność PTH jedynie w 3,8% była wyjaśniana zmiennością.
- b/ Nie wykazano istotnej zależności między stężeniami Ca oraz P a 25OHD3.

12. Analiza związku pomiędzy długością czasu trwania choroby a stężeniem PTH, Ca i P w grupie osób z chorobą Hashimoto

- a/ W przeprowadzonej analizie pomiędzy długością czasu trwania choroby a stężeniem PTH, wykazano statystycznie istotną zależność. Zależność ta jest dodatnia, ale dość słaba.
- b/ Natomiast czas trwania choroby Hashimoto nie był czynnikiem modulującym stężenie Ca i P.

13. Analiza pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH, Ca i P w podgrupie pacjentów w stadium eutyreozy i dodatnimi przeciwciałami przeciwarczycowymi (podgrupa E)

W analizowanej w podgrupie E nie wykazano występowania istotnej korelacji pomiędzy stężeniami 25OHD3 a PTH. Podobnie nie wykazano istotnej zależności między stężeniami Ca i P a 25OHD3.

14. Analiza związku pomiędzy długością czasu trwania choroby a stężeniem PTH, Ca i P w podgrupie E, czyli osób z dodatnimi przeciwciałami przeciwarczycowymi, będącymi w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną (podgrupa E)

Analiza przeprowadzona w podgrupie nie wykazała istotnej korelacji pomiędzy długością czasu trwania choroby a stężeniami PTH, Ca, P. Wyniki te są rozbieżne z uzyskanymi dla całej grupy badanej, gdzie wykazano zależność pomiędzy badanymi zmiennymi.

15. Analiza stężenia 25OHD3 w zależności od objętości gruczołu tarczycowego w badaniu ultrasonograficznym w grupie badanej z chorobą Hashimoto

W całej grupie badanej wykazano występowanie istotnej zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 a całkowitą objętością, jak również objętością prawego i lewego płata gruczołu tarczycowego. W grupie kontrolnej natomiast nie wykazano istotnej współzależności pomiędzy tymi zmiennymi.

16. Analiza stężenia 25OHD3 w zależności od objętości gruczołu tarczycowego w badaniu ultrasonograficznym w podgrupie grupie pacjentów w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną, z obecnością dodatnich przeciwciał przeciwarczycowych (podgrupa E)

W przeprowadzonej analizie zależności stężenia 25OHD3 od objętości całkowitej oraz płata prawego i lewego gruczołu tarczycowego w ocenie ultrasonograficznej nie wykazano istotnej współzależności pomiędzy tymi zmiennymi.

Obserwacja ta jest rozbieżna z przeprowadzoną dla całej badanej grupy z chorobą Hashimoto, gdzie wykazano dodatnią zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością całkowitą oraz prawego i lewego płata gruczołu tarczycowego.

17. Analiza genu *HLA-DRB1* u części (n = 71) osób w obrębie grupy badanej pacjentów z chorobą Hashimoto

- a/ W badanej grupie najczęściej występującym allelem był DRB1*07:01. Następnymi w kolejności najczęściej stwierdzanymi allelami były DRB1*01:01 oraz DRB1*11:01. Do grupy najrzadziej występujących alleli należały: DRB1*04:07, DRB1*08:04, DRB1*11:03, DRB1*15:02, DRB1*16:01 (każdy z nich wystąpił tylko jeden raz).
- b/ W badanej grupie analizowanego genu *HLA-DRB1*, osoby będące homozygotami i heterozygotami wystąpiły z częstością odpowiednio 54,9% (n=39) i 45,1% (n=32). Wśród homozygot najczęściej występującym był allel DRB1*07:01 i posiadało go 33% homozygot (oraz 16% heterozygot). Wśród heterozygot najczęściej pojawiał się allel DRB1*03:01 – posiadało go 31% heterozygot (oraz 5% homozygot).
- c/ W przeprowadzonej analizie wykazano, że pojawienie się allela DRB1*11:04, dla którego średnie stężenie 25OHD3 wynosiło 22,97 ng/ml było istotnie wyższe w badanej grupie niż w grupie kontrolnej. Iloraz szans wskazuje, że obecność allela DRB1*11:04 wskazuje na ponad dwukrotnie wyższe ryzyko wystąpienia choroby Hashimoto niż w grupie osób zdrowych.
- d/ Natomiast obecność allela DRB1*15:01 wskazuje na odwrotną sytuację. Jego wystąpienie było istotnie niższe w grupie badanej niż w grupie kontrolnej. Średnie stężenie 25OHD3 u osób z HT i obecnością tego allela wynosiło 23,87 ng/ml. Iloraz szans wskazuje, że w przypadku obecności tego allela w stosunku do grupy kontrolnej, ryzyko znalezienia się w grupie chorych zmniejsza się ponad dwukrotnie.
- e/ Ze względu na to, że średnie stężenia 25OHD3 w obecności alleli DRB1*11:04 i DRB1*15:01 różniły się nieznacznie nie można wykazać, że związku tych alleli ze stężeniami 25OHD3.
- f/ Na podstawie powyższych analiz wykazano, że stężenia 25OHD3 odpowiadające jej prawidłowemu wyrównaniu były istotnie wyższe w obecności allela DRB1*13:03. W zakresie stężeń 25OHD3 odpowiadających deficytowi lub stężeniom suboptymalnym w analizowanych allelach wykazano istotne różnice pomiędzy poszczególnymi analizowanymi allelami, ale uzyskane wyniki nie pozwalają na wskazanie, które z nich mogłyby predysponować do obniżonych stężeń 25OHD3.
- g/ Przyjmując podział stężeń 25OHD3 na deficytowe, suboptymalne oraz optymalne, przeprowadzono analizę związku pomiędzy tymi przedziałami i wystąpieniem danego allela genu *HLA-DRB1*.
- h/ Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w rozkładach stężeń 25OHD3 w zależności od wystąpienia lub braku u chorego danego allela.

5.17. UWAGI KRYTYCZNE DOTCZĄCE WYKONANYCH BADAŃ

1. Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej występowała liczebnościowa przewaga kobiet w stosunku do mężczyzn. Taka dysproporcja płci jest zgodna z danymi epidemiologicznymi dotyczącymi przewagi płci żeńskiej w występowaniu choroby Hashimoto. Znaczna przewaga kobiet biorących udział w badaniu i mała grupa mężczyzn uniemożliwiły jednak przeprowadzenie analiz porównawczych pomiędzy płciami.
2. Podgrupa E dotycząca pacjentów w eutyreozy bez leczenia l-tyroksyną z obecnością podwyższonych wartości przeciwciał a/TPO i/lub a/Tg jest trudna do sprecyzowania. Może ona zawierać osoby z AITD w okresie przebytej serokonwersji, bez rozwinięcia jeszcze hipotyreozy lub też osoby bez AITD z obecnością dodatknych przeciwciał przeciwtarczycowych. Analizy przeprowadzone w tej grupie mogą być zatem nie końca precyzyjne.
3. Oznaczenia 25OHD3 były przeprowadzone bez zróżnicowania na porę roku, której wpływ na stężenie witaminy D jest istotny. Badanie przeprowadzane było w sposób ciągły przez blisko trzy lata, zatem obejmowało oznaczenia 25OHD3 zarówno w okresie jesienno-wiosennym, kiedy stężenia witaminy D są najniższe oraz w okresie wiosenno-letnim, czyli w okresie lepszego nasłonecznienia i zwiększonej jej syntezy skórnej. Wyniki stanowią zatem średnią oznaczeń całorocznych, ale wobec znacznych liczebnościowo grup badanej i kontrolnej, pozwalają na wyciągnięcie płynących z nich wniosków.
4. W przeprowadzonych analizach dotyczących 25OHD3 nie uwzględniono BMI, której wpływ na analizy może być zasadny, ponieważ zawartość tkanki tłuszczowej ma wpływ na stężenie witaminy D.
5. W podgrupie H dotyczącej pacjentów z chorobą Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy leczonej l-tyroksyną, jedynie trzy osoby charakteryzowały się niewyrównaną niedoczynnością tarczycy z maksymalnym stężeniem TSH- 11,94 μ IU/ml, podczas gdy pozostałe 107 osób posiadało stężenie TSH zawierające się w granicach norm referencyjnych podczas terapii. Nie było więc możliwe przeprowadzenie analizy dotyczącej niewyrównanej niedoczynności tarczycy w tej grupie chorych.

- 6.** W analizie ultrasonograficznej gruczołu tarczowego wykazano istotną różnicę mediany objętości całkowitej tarczycy i każdego jej płata osobno w porównaniu do grupy kontrolnej. Postęp wiedzy dotyczący choroby Hashimoto i obserwowana tendencja do jej występowania u coraz młodszych kobiet, pozwalają na wczesne wykrycie choroby i wdrożenie leczenia. Ogranicza to troficzny wpływ TSH na gruczoł tarczowy i może mieć wpływ na występowanie mniejszych wymiarów gruczołu tarczowego.
- 7.** W ultrasonograficznej ocenie gruczołu tarczowego uwzględniono cechy morfologiczne typowe dla choroby Hashimoto w grupie badanej i ich brak w grupie kontrolnej. Nie uwzględniono obecności zmian ogniskowych pojedynczych i mnogich w budowie tarczycy. Badanie miało na celu ocenę wpływu stężenia 25OHD3 na tarczycę u osób z typowymi jej cechami w badaniu ultrasonograficznym, a uwzględnienie współistnienia przebudowy guzowatej może w przyszłości wnieść dodatkowe informacje do tego zagadnienia.
- 8.** Analiza dotycząca związku alleli genu *HLA-DRB1* ze stężeniem 25OHD3 ma znaczenie czysto teoretyczne. Oceniono stężenie 25OHD3 w poszczególnych pojedynczych allelach, a każdy osobnik posiada parę alleli i może być zarówno homozygotą, jak i heterozygotą.

6. DYSKUSJA I OMÓWIENIE WYNIKÓW

Głównym celem pracy była ocena wpływu niedoboru witaminy D na przebieg HT u pacjentów w województwie świętokrzyskim. W ostatnich latach obserwuje się znaczący postęp w wyjaśnieniu i zrozumieniu wielokierunkowego działania witaminy D w układzie immunologicznym. Obecność w tym układzie VDR, jak również enzymów biorących udział w metabolizmie witaminy D dowodzi jej aktywności modulującej procesy immunologiczne [5,6 62-66]. Wykazanie działania witaminy D w układzie immunologicznym daje podstawy do prowadzenia badań nad jej związkiem z chorobami autoimmunizacyjnymi, w tym nad autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy, czyli chorobą Hashimoto.

1. Dobór analizowanych grup pacjentów i ocena porównawcza podstawowych wartości oznaczeń hormonalnych, biochemicznych i ultrasonograficznych pomiędzy grupami *a/ Ocena stężenia 25OHD3 w grupie badanej pacjentów z chorobą Hashimoto i w grupie kontrolnej*

W przeprowadzonym badaniu wykazano występowanie statystycznie istotnej różnicy pomiędzy medianą stężenia 25OHD3 w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. Obserwacja ta jest spójna z większością wyników badań zawartych w dostępnej literaturze, niemniej jednak w części opublikowanych danych literaturowych takiej obserwacji nie potwierdzono [16,17,131-137]. W badaniu przeprowadzonym przez *Kivity i wsp.* wykazano znamienne większy deficyt 25OHD3, definiowany jako stężenia < 10 ng/ml w grupie 50 pacjentów z AITD w stosunku do grupy 42 osób bez AITD (72% vs. 30,6%; $p < 0,001$). Badanie było przeprowadzone w Debreczynie (Węgry) w ciągu dwóch pierwszych tygodni marca 2006 roku, czyli w czasie przewidywanych minimalnych stężeń 25OHD3 w Europie Centralnej [16]. *Bozkurt i wsp.* w analizie przeprowadzonej w miesiącach letnich (czerwiec - sierpień) w Turcji, również wykazali istotnie statystycznie niższe stężenia 25OHD3 w grupie chorych z HT w stosunku do grupy kontrolnej [17]. Porównano grupę 180 chorych z HT, będących w stadium niedoczynności tarczycy wyrównanej terapią l-tyroksyną (stabilne stężenie TSH przez ostatnie dwa miesiące przed badaniem), do grupy 180 pacjentów z HT w stadium eutyreozy, bez leczenia oraz do grupy kontrolnej 180 zdrowych ochotników. Niedobór 25OHD3 dla miesięcy letnich zdefiniowano jako ciężki < 10 ng/ml, średni 11-20 ng/ml, łagodny 21-30 ng/ml. Ciężki niedobór 25OHD3 dotyczył głównie pacjentów z HT, leczonych l-tyroksyną (48,3% badanych), mniejszy odsetek stanowili chorzy z HT w stadium eutyreozy (35% chorych); w grupie kontrolnej ciężki niedobór 25OHD3 dotyczył 20,5%

pacjentów ($p < 0,001$). Powyższą obserwację potwierdza inne badanie, przeprowadzone również w populacji tureckiej przez *Tamera i wsp.* w miesiącach od października 2008 roku do lutego 2009 roku, w którym podobnie jak w poprzednich analizach, wykazano znamienne niższe stężenie 25OHD3 w populacji 161 chorych z HT w stosunku do 162 chorych z grupy kontrolnej [131]. Kolejnym badaniem, w którym jednoznacznie wykazano niedobór 25OHD3 w grupie chorych z AITD (65z HT, 46 z GD) była analiza przeprowadzona w Korei przez *Shin i wsp.* [132]. Wykazano statystycznie istotną różnicę w stężeniach 25OHD3 pomiędzy grupą z AITD w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,001$). Pacjenci byli objęci obserwacją od marca 2010 roku do czerwca 2011 roku jest fakt, że badanie nie wykazało sezonowych różnic w stężeniach 25OHD3. Jak oczekiwano, stężenia 25OHD3 były najniższe w miesiącach zimowych, ale różnice w stosunku do pozostałych pór roku nie były istotne statystycznie. Autorzy tłumaczą tę obserwację faktem, że większość pacjentów charakteryzowała się przewlekłym stanem znacznego niedoboru 25OHD3 [132]. Wpływ niedoboru witaminy D na przebieg HT, został wykazany także w badaniu przeprowadzonym przez *Mansournia i wsp.* [133]. Autorzy badali pacjentów z HT w stadium subklinicznej i klinicznie jawnej niedoczynności tarczycy. Wyniki sugerują, że wyższe stężenia 25OHD3 były związane z mniejszym ryzykiem HT. Każdy wzrost stężenia 25OHD3 o 5 ng/ml, skutkowało zmniejszeniem ryzyka wystąpienia HT o 19% [133]. W dostępnej literaturze przewaga niedoboru 25OHD3 dotyczy praktycznie wszystkich grup wiekowych. W kolejnym badaniu przeprowadzonym również w Turcji, *Camurdan i wsp.* dokonali oceny stężenia 25OHD3 w grupie 78 dzieci z HT. Podobnie jak w poprzednich badaniach, autorzy wykazali istotny niedobór 25OHD3 w grupie dzieci z HT w stosunku do grupy kontrolnej (31,2 ng/ml vs. 57,9 ng/ml; $p < 0,001$) [134]. Chociaż wyniki prezentowanego w pracy doktorskiej badania, jak również powyższych analiz wskazują na związek niedoboru 25OHD3 u chorych z HT, niejasnym pozostaje fakt, czy niskie jej stężenie jest przyczyną, czy skutkiem autoimmunizacji gruczołu tarczowego.

W analizowanej podgrupie pacjentów będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną, z obecnością dodatnich przeciwciał przeciwarczycowych nie wykazano istotnie niższych stężeń 25OHD3 w porównaniu do grupy kontrolnej. Ta rozbieżność w stosunku do całej badanej grupy chorych, może wynikać z charakteru badanej podgrupy. Może ona bowiem rekrutować się z osób z HT we wczesnych fazach jej rozwoju, w których doszło do serokonwersji, bez wywołania hipotyreozy. Z drugiej strony wiadomo na podstawie danych literaturowych, że w populacji 2-20% osób bez AITD możliwe jest występowanie dodatnich przeciwciał przeciwarczycowych [97,142,143].

Wadą przeprowadzonego badania jest z pewnością brak określenia konkretnej pory roku przy ocenie stężenia 25OHD3. Było ono przeprowadzone w okresie czasu od marca 2010 do marca 2013 roku, bez względu na porę roku. Innym czynnikiem, który mógł mieć wpływ na wyniki przeprowadzonych analiz jest wiek badanych pacjentów oraz wskaźnik masy ciała – BMI (*ang. body mass index*); wiadomo bowiem, że u osób starszych obserwuje się tendencję do niższego stężenia witaminy D w stosunku do grupy osób młodszych, chociaż nie potwierdza tego analiza przeprowadzona przez *Choi i wsp.* [135]. W pracy tej wykazano, że obniżone stężenia witaminy D dotyczą kobiet w wieku przedmenopauzalnym. W dyskusji autorzy próbują tłumaczyć tę obserwację rolą estrogenów i witaminy D w rozwoju AITD [135].

W badaniu będącym tematem rozprawy doktorskiej, średni wiek pacjentów w HT wynosił $49,8 \pm 16$ lat, z czego połowa nie przekroczyła 53 roku życia, a większość stanowiły kobiety (92,9%) w stosunku do mężczyzn (7,1%). Biorąc pod uwagę czynnik wieku, badane kobiety były w większości w okresie około- i wczesnomenopauzalnym. Analiza ta zatem wydaje się być spójna z obserwacją autorstwa *Choi i wsp.*

Zgodnie z danymi zawartymi w dostępnej literaturze wartość BMI ma również istotny wpływ na stężenie witaminy D. U osób otyłych obserwuje się tendencję do niższych jej stężeń. Skorygowanie przeprowadzonych analiz z uwzględnieniem BMI pacjentów mogłoby mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Jak wspomniano powyżej, wyniki badań oceniających związek niedoboru witaminy D z HT są niejednoznaczne. Słaby związek pomiędzy niskim stężeniem 25OHD3 a autoimmunizacją tarczycową, wykazano w badaniu *Goswami i wsp.* [136]. Sprzeczne z powyższymi są analizy przeprowadzone w Holandii. W badaniu autorstwa *Effraimidis i wsp.* porównano stężenia witaminy D w grupie pacjentów predysponowanych genetycznie do AITD, bez dodatnich przeciwciał a/TPO i a/Tg oraz w grupie chorych ze świeżo rozwiniętą AITD w stadium eutyreozy bez leczenia, ale z dodatnimi przeciwciałami. Wykazano, że niedobór witaminy D nie jest związany z wczesnymi stadiami autoimmunizacji tarczycy [137]. Kontynuując tezę o braku inicjującego wpływu witaminy D na rozwój HT, nasuwa się pytanie, czy jej niedobór będzie odgrywał rolę w dalszych etapach procesu autoimmunizacyjnego w AITD.

b/ Stężenie TSH w analizowanych grupach

Analiza porównawcza stężeń TSH wykazała statystycznie istotną różnicę pomiędzy stężeniem TSH w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. U większości osób z HT obserwuje się tendencję do stopniowego wzrostu stężenia TSH w miarę postępu czasu trwania

choroby. Dynamika tego wzrostu jest różna. U osób zdrowych, u których wykluczono HT na podstawie braku obecności przeciwciał przeciwarczycowych oraz obrazu ultrasonograficznego gruczołu tarczowego nie obserwuje się takiej tendencji. Poza tym u osób z niedoczynnością tarczycy nawet w trakcie leczenia l-tyroksyną występują wahania stężenia TSH, wynikające m.in. z nieprzestrzegania reżimu terapeutycznego, postępu procesu autoimmunizacyjnego, stosowanej okresowo innej farmakoterapii i wpływu diety. Natomiast stwierdzono brak statystycznie istotnej różnicy median TSH w podgrupie pacjentów będących w eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną, z dodatnimi przeciwciałami przeciwarczycowymi.

c/ Analiza oceny porównawczej stężeń PTH, Ca, P pomiędzy badanymi grupami

W przypadku niedoboru witaminy D obserwuje się wzrost stężenia PTH w granicach norm referencyjnych lub rozwoju wtórnej nadczynności przytarczyc, który jest wynikiem mechanizmu adaptacyjnego w celu utrzymania homeostazy wapniowo-fosforanowej [144,145,146,147].

W grupie badanej z chorobą Hashimoto wykazano znamienne wyższe stężenie PTH przy obserwowanych niższych stężeniach 25OHD3 w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast nie stwierdzono różnicy median PTH w podgrupie pacjentów w eutyreozy z dodatnimi przeciwciałami przeciwarczycowymi, bez leczenia l-tyroksyną w porównaniu do grupy kontrolnej. Na podwyższone stężenie PTH mogłaby mieć wpływ hipokalcemia, ale nie stwierdzono jej u żadnego z badanych pacjentów. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy stężeniami wapnia w analizowanych grupach. Warto podkreślić, że wyższe wartości stężeń PTH stwierdza się w populacji osób starszych; obserwuje się tendencję do niewielkiego obniżania się stężenia wapnia, najczęściej w granicach wartości referencyjnych, czemu sprzyja nieznaczny wzrost stężenia PTH. W przeprowadzonym badaniu analizowana grupa była wiekowo podobna do grupy kontrolnej, więc czynnik ten nie tłumaczy istotnych statystycznie różnic w stężeniu PTH pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Zatem za jedyny czynnik powodujący wzrost stężeń PTH w badanej grupie chorych należy uznać niedobór 25OHD3.

W badaniu przeprowadzonym przez *Kawaharę i wsp.* wykazano dominujący wpływ 25OHD3 (a nie 1,25OH2D3) na negatywną regulację transkrypcji genu PTH, na drodze wewnątrzkomórkowej aktywacji 1-alfa-hydroksylazy w komórkach przytarczyc [144]. Z kolei *Ignjatovic i wsp.* dokonali próby oceny związku HT z pierwotną nadczynnością przytarczyc (PHPT, *ang. Primary Hyperparathyroidism*). Wykazali obecność PHPT u 0,3% ogólnej populacji oraz 1,89 % chorych z HT w Serbii. Wyszunęli przypuszczenie, że proces autoimmunizacyjny w HT może mieć wpływ na HT lub odwrotnie. W przeprowadzonej

analizie autorzy nie wzięli jednak pod uwagę potencjalnego niedoboru 25OHD3 biorącego udział w etiopatogenezie nadczynności przytarczyc [145].

d/ Analiza oceny porównawczej wielkości gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym pomiędzy badanymi grupami

Na podstawie danych z dostępnej literatury szacuje się, że przeciwciała przeciwtarczycowe mogą być nieobecne u około 13 % lub występują w niskich stężeniach u około 17 % u pacjentów z HT, z drugiej strony stwierdza się ich obecność u 2 - 20% zdrowej populacji [97,142,143]. Stąd obrazowanie ultrasonograficzne, wzbogacone techniką dopplerowską może być dodatkowym narzędziem w diagnostyce HT [143]. Obrazy ultrasonograficzne mogą przybierać różne postacie w przebiegu HT i zależą od fazy choroby. Objętość gruczołu tarczowego w HT jest uzależniona od fazy choroby [148]. Początkowo obserwuje się jego prawidłową wielkość lub nawet powiększenie [148]. Rzadko przybiera sferyczny kształt, najczęściej powiększeniu ulega wymiar poprzeczny tarczycy [148]. W późniejszych fazach choroby ulega ona najczęściej zmniejszeniu, w skrajnych przypadkach choroby występuje atrofia gruczołu [148].

We wczesnej fazie choroby w obrazie ultrasonograficznym obserwuje się nieregularne, policykliczne, często słabo zaznaczone obrysy gruczołu tarczowego oraz obniżoną echogeniczność mięszu i /lub niejednorodną strukturę oraz hipoechogeniczne obszary zwłaszcza w okolicach podtorebkowych, a w centralnych częściach narządu tzw. pseudoguzki [149]. Echogeniczność mięszu tarczycy jest często zbliżona do echogeniczności otaczających mięśni, stąd trudna bywa jednoznaczna ocena granic gruczołu [148]. Późniejszym fazom HT towarzyszy stopniowe włóknienie mięszu tarczycy i tkanka łączna zastępuje prawidłową i zdolną do produkcji hormonów tkankę tarczycową [143,148].

Poza obecnością pseudoguzków w mięszu gruczołu tarczowego, w przebiegu HT mogą występować typowe zmiany ogniskowe, zarówno łagodne, jak i złośliwe, w tym raki oraz chłoniaki tarczycy [150]. W dostępnym piśmiennictwie częstość współwystępowania raka brodawkowatego tarczycy z HT szacuje się na 9-16% przypadków raka w populacji pacjentów ze zmianami ogniskowymi tarczycy weryfikowanymi biopsją aspiracyjną cienkoigłową [151]. Większość chłoniaków tarczycy rozwija się na podłożu HT. Szacuje się, że ryzyko wystąpienia chłoniaka w tej grupie chorych jest 60 - 80 razy większe niż w pozostałej populacji [151].

W badaniu dopplerowskim gruczołu tarczowego, zwłaszcza w początkowych stadiach HT obserwuje się wzmożony przepływ naczyniowy, co tłumaczy się rozwojem niedoczynności tarczycy i troficzną stymulacją TSH [142,143]. W późniejszych fazach choroby wraz ze

zmniejszeniem objętości gruczołu i włóknieniem stwierdza się zmniejszenie lub brak unaczynienia tarczycy [143,148].

Nieprawidłowy ultrasonograficznie obraz tarczycy w HT nigdy nie ulega poprawie, a opisane powyżej zmiany występują do końca życia pacjenta [148]. Opisane cechy obrazu ultrasonograficznego tarczycy nie charakteryzują się jednak 100% czułością i szacuje się, że około 10% pacjentów z HT wykazuje prawidłowy obraz usg gruczołu [148]. Analiza objętości gruczołu tarczowego wykazała występowanie istotnej różnicy mediany objętości gruczołu tarczowego pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

Rozwój wiedzy na temat powszechności występowania HT w ostatnich kilkudziesięciu latach niewątpliwie przyczynia się do jej wczesnego wykrywania. Troficzny wpływ podwyższonego stężenie TSH na powiększenie się gruczołu tarczowego i jego unaczynienie jest więc ograniczony przez włączenie terapii l-tyroksyną. Długość trwania procesu autoimmunizacyjnego, w związku z procesami destrukcyjnymi jest dodatkowym czynnikiem zmniejszającym objętości tarczycy u badanych pacjentów, zatem szybka diagnoza HT i obniżenie stężenia TSH w wyniku wczesnego zastosowania terapii l-tyroksyną mogą ograniczać występowanie powiększonych gruczołów tarczowych i obecności typowych zmian ogniskowych (nie pseudoguzków). W badanej grupie pacjentów z HT stwierdzono głównie niepowiększone gruczoły tarczowe.

Grupę kontrolną stanowiły osoby z prawidłowym obrazem ultrasonograficznym gruczołów tarczowych i w części z wolem guzowatym nietoksycznym co wpłynęło na istotne statystycznie różnice wielkości pomiędzy badanymi grupami.

e/ Porównanie przeciętnych wskaźników oznaczeń hormonalnych, biochemicznych i ultrasonograficznych pomiędzy podgrupą pacjentów będących w stadium eutyreozy, bez leczenia z obecnością podwyższonych przeciwciał przeciw-tarczycowych a grupą kontrolną

W przeprowadzonych analizach nie stwierdzono występowania statystycznie istotnej różnicy median 25OHD3, TSH, Ca, P oraz PTH w badanej podgrupie w stosunku do grupy kontrolnej. Wykazano natomiast istotną zależność w całkowitej objętości, płata prawego i lewego gruczołu tarczowego w ocenie ultrasonograficznej w stosunku do grupy kontrolnej. Wyniki dotyczące 25OHD3, TSH i PTH są zatem rozbieżne z uzyskanymi dla całej grupy badanej, w której dominują pacjenci z niedoczynnością tarczycy w trakcie terapii l-tyroksyną w przebiegu choroby Hashimoto.

W dostępnej literaturze brak jest badań porównawczych analizujących powyższe wskaźniki w tych dwóch podgrupach. Wiadomo, że możliwe jest wystąpienie podwyższonych wartości przeciwciał przeciwarczycowych w zdrowej populacji ma bez obecności AITD [142,143]. Z drugiej natomiast strony, we wczesnych fazach HT, stwierdza się podwyższone przeciwciała, przy stężeniu TSH w zakresie norm referencyjnych [100,137]. Rozbieżność zatem w uzyskanych wynikach być może mieć związek z faktem przynależności do analizowanej podgrupy osób tyreologicznie zdrowych lub będących we wczesnej fazie HT. Nie jest możliwa precyzyjna identyfikacja tych pacjentów. Jednym z kryteriów włączenia do badania był także charakterystyczny dla HT obraz ultrasonograficzny gruczołu tarczowego.

Brak statystycznie istotnej różnicy w zakresie median stężeń PTH jest najpewniej konsekwencją wyższych stężeń 25OHD3 w badanej podgrupie, niż w całej grupie badanej, dla której wykazano statystycznie znamiennej różnicę w stosunku do grupy kontrolnej. Analizy dotyczące stężeń Ca i P w badanej podgrupie w stosunku do grupy kontrolnej są zbieżne do wykazanych powyżej dla całej grupy badanej. Podobnie też jak dla całej grupy badanej, uzyskano statystycznie istotną różnicę w badanej podgrupie w zakresie oceny objętości tarczycy w stosunku do grupy kontrolnej. Wynik analizy może sugerować, że badaną podgrupę stanowią pacjenci z wczesną fazą HT (a nie osoby bez patologii tarczycy).

2. Omówienie wpływu wybranych czynników na stężenie 25OHD3 w grupie pacjentów z chorobą Hashimoto

a/ Analiza wpływu wieku na stężenie 25OHD3 w grupie pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy

Jednym z czynników mogących wpływać na obniżone stężenie 25OHD3 w analizowanej grupie mógłby być wiek pacjentów w badanej grupie. U osób starszych obserwuje się tendencję do niższych stężeń 25OHD3 niż u osób wiekowo młodszych [145]. Jest to związane z mniejszą ekspozycją na promieniowanie UV, jak również redukcją wydolności syntezy aktywnych metabolitów witaminy D w miarę starzenia się organizmu [3,90,92,145]. W przeprowadzonym badaniu nie wykazano związku pomiędzy wiekiem chorych w grupie badanej a stężeniem 25OHD3. Podobne wyniki uzyskano także w podgrupie chorych będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną z obecnością dodatnich przeciwciał przeciwarczycowych. Brak takiej zależności, najpewniej wynika z doboru wiekowego grupy badanej, której mediana wieku nie przekraczała 53 lat. Można zatem przypuszczać, że u osób wiekowo starszych wyniki analizy mogłyby być odmienne.

b/ Analiza wpływu czasu trwania autoimmunizacyjnej choroby tarczycy na stężenie 25OHD3 w grupie badanej z chorobą Hashimoto

W przeprowadzonym badaniu wykazano istotną współzależność pomiędzy czasem trwania HT a przeciętnymi wynikami stężeń 25OHD3 w całej badanej grupie. Natomiast w podgrupie pacjentów z dodatnimi przeciwciałami, będącymi w stadium eutyreozy, bez terapii l-tyroksyną, nie stwierdzono takiej zależności. Ze względu na wspomnianą powyżej możliwość obecności podwyższonych wartości przeciwciał przeciwtarczycowych w zdrowej populacji, w badanej grupie mogły się znaleźć osoby zdrowe z dodatnimi przeciwciałami oraz pacjenci z HT we wczesnym stadium choroby [97,142,143, 100, 137].

W dostępnej literaturze istnieje niewiele obserwacji na temat korelacji czasu trwania HT ze stężeniem 25OHD3. Podobnych obserwacji do powyższych, dokonał *Bozkurt i wsp.* wykazując, że stężenie 25OHD3 było znamienne niższe niż w grupie kontrolnej i ciężkość niedoboru korelowała z długością trwania HT. Autorzy odwołują się do patomechanizmu działania 25OHD3 w układzie immunologicznym [17]. Długotrwały niedobór witaminy D, jako czynnika stymulującego autoimmunizację tarczycy, może sprzyjać progresji jej destrukcji.

Wykazanie jedynie słabej korelacji pomiędzy czasem trwania HT oraz zbyt mało analiz w dostępnej literaturze na jej potwierdzenie, nie pozwalają na wysunięcie wniosku o jednoznacznym wpływie tego czynnika na stężenie 25OHD3. Interesujące są wyniki cytowanego już badania *Effraimidisa i wsp.* w populacji holenderskiej, w którym wykazano, że deficyt witaminy D nie jest związany z wczesnymi stadiami autoimmunizacji tarczycowej. Autorzy wysuwają wniosek, że deficyt 25OHD3 nie jest czynnikiem sprawczym w rozwoju AITD ani w grupie chorych predysponowanych genetycznie, ani w stadium wczesnej serokonwersji [137]. W prezentowanym badaniu przeprowadzono analizę w grupie chorych z HT i czasem trwania choroby nieprzekraczającym jednego roku, jak również dwóch lat. W obu przypadkach nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy tymi czasokresami a stężeniem 25OHD3. Obserwacja ta jest zatem zgodna z wynikami pracy *Effraimidisa i wsp.* Sugestia o braku zależności pomiędzy krótkim czasem trwania HT a stężeniem 25OHD3 i wykazanie takiej relacji przy dłuższym czasie jej trwania, może sugerować, że obniżone stężenie witaminy D nie jest czynnikiem inicjującym proces autoimmunizacyjny w tarczycy, ale może być jednym z czynników, które stymulują lub wzmacniają ten proces na wielu płaszczyznach. Ten negatywny wpływ niedoboru lub deficytu witaminy D na patomechanizm HT może zwiększać się wraz ze z długością trwania procesu chorobowego.

Skoro więc wynik badania będącego tematem rozprawy doktorskiej wskazuje na istnienie korelacji pomiędzy długością czasu trwania HT (ale nie w przypadku wczesnego jej stadium) i stężeniem 25OHD3, a czynnik wieku nie był istotny, obserwację tę, powołując się na rozważania *Bozkurta i wsp.*, można tłumaczyć patomechanizmem niedoboru lub deficytu witaminy D w układzie immunologicznym. Przewlekły niedobór witaminy D, nakładający się na długotrwały proces autoimmunizacyjny, wzmacnia nieprawidłowy tor odpowiedzi autoimmunologicznej w HT. Wpływu na wykazanie dodatniej korelacji pomiędzy niedoborem witaminy D a długością trwania HT, można też upatrywać w przewadze płci żeńskiej w badanej grupie. U kobiet występuje wielokrotnie większa predyspozycja do występowania HT. Zatem w grupie kobiet wpływ niedoboru witaminy D na przebieg HT, będzie szczególnie widoczny. Być może wyniki byłyby inne, gdyby grupę badaną stanowiła większa liczebnościowo grupa mężczyzn, jak również obserwacja dotyczyłaby dłuższego okresu czasu.

c/ Analiza stężenia 25OHD3 w zależności od stanu czynnościowego gruczołu tarczowego w całej grupie badanej pacjentów z chorobą Hashimoto będących w stadium niedoczynności tarczycy i wymagających leczenia l-tyroksyną oraz w podgrupie osób w stadium eutyreozy (E), bez leczenia l-tyroksyną z obecnością podwyższonych wartości przeciwciał przeciw tarczycowym

W pracy przeprowadzono porównanie stężeń 25OHD3 w dwóch podgrupach pacjentów: z obecnością dodatnich przeciwciał a/TPO/ lub a/Tg, ale pozostających w eutyreozy i nieleczonych l-tyroksyną oraz chorych z chorobą Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy wymagającą terapii l-tyroksyną. Pacjenci pozostający w trakcie terapii l-tyroksyną spełniali kryteria wyrównanej niedoczynności tarczycy (stężenia TSH zawierające się w granicach wartości referencyjnych), za wyjątkiem trzech osób, u których stężenie TSH było w niewielkim stopniu podwyższone. W związku z tym nie było możliwe przeprowadzenie analizy w grupie chorych z biochemicznie niewyrównaną niedoczynnością tarczycy. Wykazano, że w tej podgrupie występowały przeciętnie niższe stężenia 25OHD3 niż u osób nieleczonych, będących w stadium eutyreozy.

W dostępnej literaturze przeprowadzono badania, których wyniki wskazywały na związek pomiędzy niedoborem 25OHD3 a podwyższonym stężeniem TSH, bez względu na obecność AITD [16,17,131,132,138-141]. *Kivity i wsp.* wykazali korelację pomiędzy deficytem 25OHD3 a nieprawidłową czynnością hormonalną gruczołu tarczowego u chorych z AITD. W podgrupie pacjentów z HT stężenie TSH było wyższe przy stężeniu 25OHD3 < 10 ng/ml w stosunku do stężeń TSH wobec 25OHD3 > 10 ng/ml, chociaż nie było statystycznie

istotne. Obserwacja ta dotyczyła także chorych z chorobą Gravesa - Basedowa, ale nie występowała u osób bez AITD. Brak znamienności statystycznej tłumaczono relatywnie małą liczebnością grup badanych (50 osób z AITD) [16]. Związek terapii l-tyroksyną u chorych z HT a niedoborem 25OHD3 został wykazany w badaniu *Bozkurta i wsp.* Do badania włączono pacjentów z rozpoznaną wcześniej HT, którzy będąc w stadium niedoczynności tarczycy osiągnęli eutyreozę w trakcie terapii l-tyroksyną stosując stałą dawkę przez co najmniej 6 miesięcy (grupa 1) oraz osoby będące w eutyreozie ze świeżo rozpoznaną HT na podstawie podwyższonych wartości przeciwciał przeciw-tarczycowych i typowego obrazu ultrasonograficznego gruczołu tarczowego (grupa 2). Grupę kontrolną stanowiły osoby w eutyreozie, bez podwyższonych stężeń przeciwciał przeciw-tarczycowych, z prawidłowym obrazem ultrasonograficznym tarczycy (grupa 3). Autorzy chcieli uniknąć bezpośredniego działania hipo- i hipertyreozы na metabolizm witaminy D lub pośredniego przez metabolizm lipidów i funkcję nerek [17,152].

Większość badanych wykazywało średniego stopnia niedobór 25OHD3 ($10 \leq 25OHD3 < 20\text{ng/ml}$). Z kolei ciężki niedobór 25OHD3 $< 10\text{ng/ml}$ w przeważającej liczbie dotyczył pacjentów z HT leczonych l-tyroksyną (48,3%), w porównaniu do osób z HT będących w eutyreozie, bez leczenia l-tyroksyną (35%) i grupy kontrolnej (20,5%). Autorzy sugerują, że substytucyjna terapia l-tyroksyną może zwiększyć klirens metaboliczny witaminy D [17]. Należy więc wysunąć przypuszczenie, że skoro chorzy z HT charakteryzują się skłonnością do obniżonego stężenia witaminy D, to nałożenie się dodatkowego czynnika, jakim jest terapia l-tyroksyną, może pogłębiać ten niedobór. Być może miało to wpływ na wyniki uzyskane w pracy (istotne niższe stężenia 25OHD3 w grupie chorych z niedoczynnością tarczycy, leczonych l-tyroksyną w stosunku do grupy z HT, bez leczenia w stadium eutyreozy). Należy zaznaczyć, że u wszystkich pacjentów z grupy badanej i kontrolnej wykluczono niewydolność nerek.

Związek pomiędzy stanem czynnościowym gruczołu tarczowego a niedoborem witaminy D u chorych z HT został wykazany pracy *Tamera i wsp.* Wykazano, że niedobór 25OHD3 był większy w przypadku jawnej klinicznie i subklinicznej niedoczynności tarczycy w stosunku do grupy osób będących w eutyreozie, ale obserwacja ta nie była znamienna statystycznie [131]. Podobne wyniki uzyskał *Mackawy i wsp.* w grupie chorych z niedoczynnością tarczycy [141]. Do badania rekrutowano chorych z niedoczynnością tarczycy, bez ustalenia jej podłoża, u których stężenie TSH wynosiło $> 5 \mu\text{IU/ml}$, z towarzyszącymi obniżonymi stężeniami tyroksyny (T4) i trójdotyroniny (T3). Wykazano znamienne niższe stężenia 25OHD3 u chorych z niedoczynnością tarczycy względem grupy kontrolnej. Autorzy pracy

powołując się na inne doniesienia, tłumaczą wpływ hipotyreozy na niskie stężenie witaminy D poprzez upośledzone wchłanianie w przewodzie pokarmowym oraz nieprawidłową jej aktywację [141].

Chailurkit i wsp. z kolei wykazali zależność pomiędzy niższymi stężeniami 25OHD3 a wyższymi stężeniami TSH, u pacjentów z dodatnimi przeciwciałami a/Tg. Jednakże po uwzględnieniu wieku (podział na tercyle) i płci grupy badanej okazało się, że wyższe stężenia 25OHD3 są niezależnie związane z niższymi stężeniami TSH, ale tylko u chorych odpowiadającym najniższemu tercylowi wiekowemu [138].

Badania dotyczące stanu czynnościowego gruczołu tarczowego w aspekcie niedoboru witaminy D dotyczyły każdej grupy wiekowej, także dzieci. W jednym z analiz autorstwa *Zaidman i wsp.* również wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniem 25OHD3 a TSH, natomiast dodatnią w stosunku do wartości T4 i T3. W wytłumaczeniu tych zależności autorzy upatrują negatywnego wpływu niedoboru witaminy D na układ immunologiczny, wynikiem czego jest rozwój autoimmunizacji tarczycy i w konsekwencji zaburzenie jej czynności hormonalnej [140].

Doniesienia o związku niedoboru witaminy D i podwyższonego stężenia TSH były przyczyną do przeprowadzenia tego typu badań w populacji osób starszych. W jednym z nich *Zhang i wsp.* wykazali obecność wyższych stężeń 25OHD3 wobec niższych stężeń TSH, po korelacji z wiekiem, stężeniem wolnej tyroksyny (FT4) i wolnej trójjodotyroniny (FT3), objętością gruczołu tarczowego i obecnością w nim przebudowy guzkowej oraz paleniem tytoniu w grupie mężczyzn. Autorzy wykazali odwrotną zależność pomiędzy stężeniami 25OHD3 a TSH jedynie w grupie mężczyzn w średnim i starszym wieku [139].

Jednym z badań, którego wyniki są sprzeczne z istnieniem korelacji pomiędzy 25OHD3 a stanem czynnościowym gruczołu tarczowego, jest analiza przeprowadzona przez *Shin i wsp.* w populacji koreańskiej. W grupie 111 pacjentów z AITD (65 z HT i 46 z GD) w stosunku do grupy kontrolnej 193 osób bez AITD, nie wykazano związku pomiędzy obniżonym stężeniem 25OHD3 a stężeniem TSH ($p = 0,572$) i FT4 ($p = 0,052$). Znamienność statystyczną uzyskano jedynie w ocenie stężenia FT3 pomiędzy badanymi grupami ($p < 0,001$) [132].

Biorąc pod uwagę przytoczone analizy, obecność istotnych statystycznie niskich stężeń 25OHD3 w grupie chorych z niedoczynnością tarczycy, wyrównaną terapią l-tyroksyną w prezentowanym badaniu, wydaje się być uzasadniona. Wyniki tej analizy mogą sugerować, że niedoczynności tarczycy w przebiegu HT sprzyja stan obniżonego stężenia 25OHD3, ale

trudno jednoznacznie stwierdzić, czy hipotyreoza (w badaniu wyrównana terapią l-tyroksyną) ma istotny wpływ na przeciętne stężenia 25OHD3, czy może niedobór witaminy D wywiera wpływ na rozwój niedoczynności tarczycy.

Można przypuszczać, że wzięcie pod uwagę w przeprowadzonych analizach takich czynników jak: wiek badanych, BMI, czy palenie tytoniu, pozwoliłoby na skorygowanie i rozwinięcie wstępnie wysuniętych wniosków. Mała liczebnościowo grupa badanych mężczyzn (7,1%) względem kobiet (92,9%) nie pozwoliła na uwzględnienie czynnika płci jako istotnego w analizach.

3. Ocena związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością autoimmunizacyjnej choroby tarczycy ocenionej na podstawie obecności p/ciał a/TPO i a/Tg.

W przeprowadzonym badaniu wykazano istotne różnice median stężeń 25OHD3 w całej grupie badanej z dodatnimi przeciwciałami a/TPO i a/Tg. Zatem obserwacja ta wskazuje na związek pomiędzy aktywnością HT, ocenionej na podstawie stężeń a/TPO i/lub a/Tg. Podwyższonemu stężeniu a/TPO i a/Tg odpowiadają znamienne niższe stężenia 25OHD3. Oznacza to, że pacjenci z ujemnymi przeciwciałami mają przeciętnie wyższe stężenia 25OHD3, niż w przypadku dodatnich przeciwciał.

Ujemną stroną badania jest brak skorelowania uzyskanych zależności z takimi czynnikami jak BMI, palenie tytoniu. Korelacja z płcią nie była możliwa do przeprowadzenia ze względu na znaczną przewagę liczby kobiet w badanych grupach (92,9% vs. 7,1%). Innym aspektem mogącym mieć wpływ na uzyskane wyniki jest brak zróżnicowania uzyskanych stężeń 25OHD3 w zależności od pór roku. Wyniki wskazują więc jedynie na tendencję zależności niskich stężeń 25OHD3 z dodatnimi przeciwciałami przeciwtarczycowymi w grupie badanej, co daje pewne podstawy do sugestii o związku niedoboru witaminy D z występowaniem autoimmunizacji tarczycowej. W dostępnej literaturze doniesienia na temat związku pomiędzy dodatnimi przeciwciałami przeciwtarczycowymi a stanem 25OHD3 są niejednoznaczne. Część wyników badań potwierdza ten związek [16,17,132,134,135,136,140], część jednak nie wskazuje na jego występowanie [137,138,139].

Oceniając związek stężenia 25OHD3 z autoimmunizacją gruczołu tarczowego skupiano uwagę głównie na obecności podwyższonych przeciwciał przeciwtarczycowych. Jednej z pierwszych analiz dotyczących związku niedoboru 25OHD3 a autoimmunizacją gruczołu tarczowego przeprowadził *Goswami i wsp.* Badanie wykazało jedynie słabą odwrotną

korelację pomiędzy niedoborem 25OHD3 a dodatnimi przeciwciałami a/TPO. Współczynnik korelacji między a/TPO a 25OHD3 wynosił: $R = -0,044$ ($p = 0,268$), natomiast po skorygowaniu tej zależności z wiekiem pacjentów uzyskano znamienność statystyczną ($R = -0,08$; $p = 0,04$). Jako deficyt 25OHD3 przyjęto stężenie ≤ 10 ng/ml. Porównując obecność a/TPO w zakresach stężeń 25OHD3 ≤ 10 i > 10 ng/ml, nie stwierdzono istotnych różnic [136].

Kivity i wsp. badając pacjentów z HT, wykazali odwrotną korelację pomiędzy deficytem 25OHD3 < 10 ng/ml a obecnością dodatnich przeciwciał przeciwtarczycowych [16].

Badanie *Bozkurta i wsp.* również w grupie chorych z HT potwierdziło negatywną korelację pomiędzy stężeniem 25OHD3 a obecnością dodatnich przeciwciał przeciwtarczycowych a/TPO i a/Tg ($p < 0,001$) [17].

Ciekawych obserwacji dostarcza praca *Choi i wsp.*, w której wykazano statystycznie istotny związek niskiego stężenia 25OHD3 z obecnością dodatnich a/TPO jedynie w grupie przedmenopauzalnych kobiet [135]. Nie stwierdzono istnienia takiej korelacji u starszych kobiet po menopauzie.

Jako deficyt również przyjęto stężenia 25OHD3 ≤ 10 ng/ml, pomiędzy 10-30 ng/ml – jako niedobór, za prawidłowe uznano stężenia > 30 ng/ml. Autorzy dokonali oceny aktywności autoimmunizacyjnej choroby tarczycy nie tylko na podstawie obecnych a/TPO (podgrupa a/TPO+), ale także poprzez ocenę morfologicznych cech gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym, nie biorąc pod uwagę jego wielkości (podgrupa a/TPO+/US+). Do badania włączono osoby dotychczas nieleczone z powodów tyreologicznych, w analizach nie brano pod uwagę stężenia TSH (średnie stężenie w badanej grupie było prawidłowe). W obydwu podgrupach uzyskano statystycznie istotną i odwrotną korelację ze stężeniem 25OHD3 (odpowiednio: $p = 0,003$ i $p < 0,001$). Autorzy sugerują istnienie wzajemnie zakłócającego się związku pomiędzy witaminą D a estrogenami w rozwoju AITD, która znacznie częściej dotyczy kobiet. Kobiety charakteryzują się przewagą w występowaniu limfocytów CD4+ i znacznie większą produkcją Th1-zależnych cytokin niż mężczyźni. Mechanizm immunomodulującego działania witaminy D w obecności E2 jest niejasny. Estrogeny stymulują akumulację kalcytriolu u kobiet. W badaniach u osób ze stwardnieniem rozsianym i autoimmunologicznym zapaleniem mózgu stwierdzono, że witamina D działa silniej modulująco na układ immunologiczny u kobiet niż u mężczyzn, stąd wskazano na współdziałanie 17 β -estradiolu (E2) i kalcytriolu w patogenezie tych schorzeń. Być może podobny mechanizm pozwoliłby wytłumaczyć uzyskane wyniki w cytowanym badaniu. E2 hamuje transkrypcję CYP24A1, który koduje 24-hydroksylazę, będącą enzymem

inaktywującym kalcytriol oraz wspomaga biosyntezę VDR. Poza tym indukuje wiązanie i internalizację białka wiążącego witaminę D (DBP) do samoreaktywnych limfocytów T i makrofagów, co ułatwia akumulację kalcytriolu w komórkach układu immunologicznego [135].

Autorami jednej z ostatnich prac, w której wykazano odwrotną zależność pomiędzy 25OHD3 a obecnością a/TPO w AITD ($p < 0,001$) byli *Shin i wsp.* [132]. Jako deficyt 25OHD3 przyjęto jej stężenia poniżej 20 ng/ml, a niedobór stanowił przedział stężeń od 21 do 29 ng/ml. Do badania włączono 304 pacjentów, w tym 111 z AITD, z których 65 osób miało zdiagnozowaną HT i 46 - GD. Wyniki analizy są interesujące, ponieważ powyższa zależność dotyczyła jedynie przeciwciał a/TPO tylko w grupie z AITD, natomiast nie wykazano korelacji pomiędzy 25OHD3 a obecnością przeciwciał przeciw receptorom dla TSH (a/TSH-R; $p = 0,127$) w grupie z AITD i bez - AITD. Na podstawie wieloczynnikowej analizy regresji po skorygowaniu z wiekiem, płcią, BMI, obecnością zmian ogniskowych, wola i cech przewlekłego zapalenia gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym i czynności hormonalnej tarczycy wykazano, że 25OHD3 jest niezależnym czynnikiem wpływającym na obecność dodatnich a/TPO [132].

Poprzednie badania dotyczyły populacji dorosłych z HT. Niektóre z analiz przeprowadzone w grupie dzieci również wskazywały na istnienie wyżej przedstawionych korelacji. *Camurdan i wsp.* w grupie dzieci z HT, wykazali statystycznie istotną odwrotną zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a dodatnimi a/TPO ($R = - 0,3$; $p = 0,007$) [134].

Podobne wyniki uzyskano w pracy *Zaidman i wsp.*, gdzie obecność dodatnich przeciwciał a/TPO i a/Tg była statystycznie wyższa w grupie dzieci z deficytem 25OHD3, zdefiniowanym jako stężenia pomiędzy 10-20 ng/ml w porównaniu do grupy ze stężeniem > 30 ng/ml [140]. Jak wspomniano powyżej, w dostępnej literaturze wyniki analiz korelacji pomiędzy aktywnością procesu autoimmunizacyjnego a stężeniem 25OHD3 są sprzeczne, część z nich nie potwierdza istnienia takiego związku.

Chailurtit i wsp. wykazali, że u pacjentów z dodatnimi a/Tg stężenie TSH było wyższe, podczas gdy stężenie 25OHD3 było niższe. W dodatku przewaga niedoboru 25OHD3 w grupie z dodatnimi a/Tg była istotnie wyższa niż w grupie z dodatnimi a/TPO i ujemnymi a/Tg ($p < 0,05$). Jednakże po skorygowaniu z wiekiem i płcią status 25OHD3 nie korelował z dodatnimi a/Tg ani a/TPO [138].

Ciekawe wyniki przedstawiono w badaniu *Zhang i wsp.*, w którym nie wykazano związku pomiędzy stanem 25OHD3 i dodatnimi przeciwciałami przeciwtarczycowymi (a/TPO i/lub a/Tg) w analizie wieloczynnikowej logistycznej regresji po uwzględnieniu wieku, płci, BMI i

palenia tytoniu. Jednakże wysokie miana a/Tg, a/TPO oraz a/Tg i/lub a/TPO występowały znamienne częściej w grupie chorych z deficytem witaminy D (< 20 ng/ml) w porównaniu z grupą bez deficytu (odpowiednio: $p = 0,008$; $p = 0,005$; $p = 0,004$). Zatem stan deficytu witaminy D był niezależnie związany z wysokim mianem dodatnich przeciwciał przeciwtarczycowych, co zdaniem autorów wymaga uwagi i uwzględnienia w analizach prowadzonych w przyszłości [139].

Z kolei wyniki wspomnianego już badania przeprowadzonego w Holandii przez *Effraimidisa i wsp.* wykazały, że deficyt witaminy D nie jest związany z wczesnymi stadiami autoimmunizacji tarczycowej [137]. Stężenie 25OHD3 nie było istotnie niższe ani u osób genetyczną predyspozycją do AITD, ani w grupie chorych z serokonwersją w zakresie a/TPO *de novo*. Było to pierwsze badanie oceniające prospektywnie związek pomiędzy stężeniem 25OHD3 i autoimmunizacją tarczycową, co zdaniem autorów, stanowi jego przewagę w stosunku do poprzednich badań przekrojowych. Autorzy podejmują dyskusję z wynikami badania przeprowadzonego w Turcji przez *Tamera i wsp.*, sugerując że rozbieżności uzyskane w tych dwóch pracach, mogą wynikać z wpływu różnych czynników środowiskowych. Jednym z nich są infekcje, które mogą współdziałać z deficytem witaminy D we wzmacnianiu ryzyka wystąpienia autoimmunizacji tarczycowej. Udowodniony jest związek niskich stężeń witaminy D ze skłonnością do zakażeń wirusowych i retrowirusowych. W grupie kobiet predysponowanych genetycznie do AITD, bez obecności dodatnich przeciwciał przeciwtarczycowych w momencie rekrutacji do badania stwierdzono statystycznie wyższe stężenia 25OHD3 niż w grupie kontrolnej. Autorzy sugerują, że być może wysokie stężenia 25OHD3 miały działać protekcyjnie na układ immunologiczny, chroniąc przed wytwarzaniem przeciwciał, a więc przeciwdziałając autoimmunizacji [137].

a/ Ocena stężenia 25OHD3 w podgrupie pacjentów będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną a z obecnością podwyższonych przeciwciał przeciwtarczycowych

Przeprowadzono także analizę oceniającą stężenie 25OHD3 w podgrupie pacjentów z podwyższonymi przeciwciałami a/TPO i /lub a/Tg będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną. Wyniki badania są sprzeczne z powyższymi, dotyczącymi pacjentów z HT w całej grupie badanej i wskazują na brak zależności pomiędzy aktywnością autoimmunizacyjnej choroby tarczycy a stężeniem 25OHD3 w tej podgrupie.

Przeprowadzone zatem obserwacje mogą wskazywać, że niedobór witaminy D ma istotny wpływ na proces autoimmunizacyjny w grupie chorych z chorobą Hashimoto, ale już w fazie niedoczynności tarczycy. W konsekwencji najpewniej ta właśnie grupa chorych może odnieść najwięcej korzyści z leczenia lub suplementacji witaminą D.

W dostępnej literaturze brak jest badań mogących potwierdzić słuszność powyższej hipotezy. Jedynie badanie *Bozkurta i wsp.* zwraca na to uwagę, ale jednak nie przeprowadzono w nim analiz zależności stężeń przeciwciał przeciwtarczycowych z 25OHD3 w każdej podgrupie osobno, oceniając je u wszystkich pacjentów HT, bez względu na obecność leczenia l-tyroksyną [17].

W części badań analizowano związek pomiędzy dodatnimi przeciwciałami a autoimmunizacyjną chorobą tarczycy w ogólnym ujęciu, skupiając się głównie na badaniach przy obecności przeciwciał przeciwtarczycowych. W badaniu *Shin i wsp.* kryterium włączenia do badania spełniali pacjenci z chorobą Hashimoto, chorobą Graves-Basedowa i z AITD w stadium eutyreozy. Musieli jednak spełnić warunek braku leczenia l-tyroksyną i lekami przeciwtarczycowymi. Badana grupa była więc niejednolita pod względem oceny czynności hormonalnej tarczycy [132].

Uzyskane wyniki w badaniu będącym tematem pracy doktorskiej mogą wynikać charakteru badanej podgrupy. Jak wspomniano powyżej, na podstawie danych z literatury nawet do 20% populacji, bez autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, ma obecne podwyższone przeciwciała tarczycowe [142,143]. Z drugiej jednak strony nie można wykluczyć, że w tej grupie mogą być pacjenci z wczesnymi stadiami choroby Hashimoto, gdzie w miarę upływu czasu rozwinię się hipotyreoza. Na ten wczesny etap choroby, jak sugerują dane z literatury, witamina D nie ma kluczowego wpływu [137].

4. Ocena związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a PTH, Ca i P w grupie pacjentów z chorobą Hashimoto

a/ Związek pomiędzy stężeniem 25OHD3 a PTH w grupie badanej z chorobą Hashimoto

W przeprowadzonym badaniu wykazano statystycznie istotną korelację pomiędzy stężeniem 25OHD3 a PTH w całej badanej grupie. Obserwacja ta jest zgodna z mechanizmami regulacji hormonalnej i mineralnej w zakresie gospodarki wapniowo-fosforanowej i homeostazy kostnej, gdzie niższymi stężeniami 25OHD3 odpowiadają wyższe (w granicach norm referencyjnych lub powyżej) stężenia PTH. W prezentowanym badaniu korelacja ta jest ujemna i niezbyt silna. Nie wykazano natomiast istnienia statystycznie istotnej zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem Ca i P.

W przeprowadzonych analizach wykazano także dodatnią korelację pomiędzy stężeniem 25OHD3 a wiekiem pacjentów oraz czasem trwania HT. W dostępnej literaturze nieliczne analizy dotyczyły oceny stężenia PTH i zaburzeń gospodarki Ca-P w przebiegu HT w

związku z stężeniami 25OHD3 [132,136,141,145]. W badaniu *Goswami i wsp.* dokonano oceny stężenia PTH w grupie chorych z AITD w aspekcie występowania pierwotnej nadczynności przytarczyc (PHPT). Wykazano, że PHPT była znamienne częstsza w przypadku stężeń 25OHD3 \leq 10 ng/ml (25 nmol/l) w porównaniu z grupą chorych ze stężeniami 25OHD3 $>$ 10 ng/ml ($p < 0,001$). Było to spójne z wynikami innych badań w populacji hinduskiej, które jednoznacznie wskazywały na istnienie wpływu deficytu witaminy D na wzrost stężenia PTH, zmniejszoną absorpcję wapnia w przewodzie pokarmowym i upośledzenie gęstości mineralnej kości [136]. Ciekawych wyników dostarcza badanie przeprowadzone w populacji Serbii przez *Ignjatovic i wsp.*, w którym wykazano znamienne większą częstość występowania PHPT w grupie chorych z HT niż w pozostałej populacji ($p < 0,05$) [145]. W komentarzu autorzy przedstawiają możliwe patomechanizmy wpływu PTH i Ca na gruczoł tarczowy i odwrotnie. W badaniach na ludziach i zwierzętach wykazano, że zwiększone endogenne stężenie Ca w przebiegu PHPT działa jak czynniki wzrostowy na rozwój wola. Zatem, podwyższone stężenie PTH i Ca są głównymi czynnikami łączącymi PHPT i HT. Biorąc jednak pod uwagę statystycznie małą liczbą pacjentów z HT, u których obserwuje się podwyższone stężenie PTH i Ca, rozwój autoimmunizacji tarczycy u tych osób jest raczej wynikiem genetycznych i środowiskowych czynników. Dowodów na autoimmunologiczny związek pomiędzy HT a PHPT dostarcza, zdaniem autorów, fakt wykrycia u części chorych z PHPT obecności przeciwciał przeciw przytarczycowym. Uważają oni, że u części pacjentów z HT, podwyższone stężenie PTH jest związane z przewlekłym zapaleniem i z odpowiedzią ze strony układu immunologicznego w postaci zdolności do produkcji cytokin oraz reakcją na ich obecność. W HT wykryto min. obecność IL-1, IL-6 i IL-8, natomiast w przypadku PHPT- IL-6 oraz TNF- α . Z drugiej strony autorzy zwracają uwagę na fakt znacznie częściej występujących chorób gruczołu tarczowego u kobiet. Powołując się na dane z literatury u kobiet po 50 roku życia - 1/10, a po 60 roku życia - 1/6 kobiet rozwija niedoczynność tarczycy. W cytowanym badaniu autorzy wykazali równoległy wzrost stężenia a/TPO i PTH w grupie kobiet powyżej 60 \pm 12,6lat, jak również przewagę występowania PHPT w tej właśnie grupie wiekowej w porównaniu do ogólnej populacji. Czynnikiem wieku odgrywa rolę w tendencji do wzrostu PTH i zmniejszenia się stężenia 25OHD3, zwłaszcza u pomenopauzalnych kobiet. Zatem, idąc za autorami badania, należy zadać pytanie, czy autoimmunizacyjny proces w HT powoduje PTH i wzrost Ca, czy raczej nadprodukcja PTH lub Ca wpływa na HT, czy raczej predyspozycja genetyczna jest tu kluczowym czynnikiem wywołującym obydwie patologie [145]. Odnosząc się powyższych rozważań, w prezentowanym badaniu głównym czynnikiem odpowiedzialnym za istotnie

wyższe stężenia PTH w grupie badanej w stosunku do kontrolnej najpewniej jest statystycznie niższe stężenie 25OHD3 w grupie z HT. Z założenia wyłączono z analizy osoby, u których występowały zaburzenia gospodarki Ca-P oraz funkcji nerek, stąd ocena występowania PHPT nie była możliwa. Jedną z przyczyn wyłączenia z grupy badanej osób z PHPT, był fakt częstego występowania niedoboru witaminy D u osób z tą patologią, co mogłoby mieć wpływ na przeprowadzone w badaniu analizy. Statystycznie istotne podwyższone stężenie PTH w grupie badanej ma z pewnością związek ze znamioną liczebnościową przewagą kobiet (92,9%) w stosunku do mężczyzn (7,1%). Blisko połowa badanych kobiet była w wieku około- i wczesnomenopauzalnym. Jak wspomniano powyżej płeć żeńska, zwłaszcza w okresie pomenopauzalnym predysponuje do wyższych stężeń PTH i niższych 25OHD3.

W badanej podgrupie pacjentów nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem PTH a niskimi stężeniami 25OHD3. Podobnie czas trwania choroby nie wpływał na stężenie PTH. Brak korelacji można ponownie tłumaczyć doborem pacjentów do badanej podgrupy, czyli ich przynależnością do populacji z dodatnimi przeciwciałami przeciwarczycowymi bez AITD lub stanowiły ją osoby we wczesnych stadiach rozwoju HT, na których wpływ patogenetyczny 25OHD3 jest dyskusyjny [137,142, 143].

b/ Związek pomiędzy stężeniem 25OHD3 a Ca i P w grupie z chorobą Hashimoto

Jak wspomniano powyżej przeprowadzone analizy nie wykazały związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniami Ca i P w całej grupie badanej i podgrupach pacjentów z HT i pacjentami w eutyreozy z dodatnimi przeciwciałami przeciwarczycowymi.

W badaniu przeprowadzonym przez *Mackawy i wsp.* wykazano, że stężenie wapnia zjonizowanego (Ca^{++}) jest znamionnie niższe w grupie pacjentów z niedoczynnością tarczycy porównaniu do grupy kontrolnej ($p = 0,000$), zwłaszcza w grupie kobiet (ta sama obserwacja dotyczyła stężenia 25OHD3; $p = 0,000$). Zatem autorzy uważali, że niedoczynność tarczycy ma związek nie tylko z niższym stężeniem 25OHD3, ale i Ca^{++} . Zwrócili oni jednak uwagę, że istotność statystyczna w przypadku niższych stężeń Ca w badanej grupie wynika najpewniej z pomiaru Ca^{++} jako aktywnej jego formy, podczas gdy stężenie Ca całkowitego pozostaje niezmienione [141]. W badaniu tym nie odniesiono się do stężeń PTH i P. Z kolei w analizie wykonanej przez *Shin i wsp.*, która wykazała istotnie obniżone stężenie 25OHD3 będące w odwrotnej korelacji z podwyższonymi a/TPO u chorych z AITD, nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach Ca i P pomiędzy grupą z AITD a kontrolną - bez AITD (odpowiednio: $p = 0,095$; $p = 0,126$) [132]. Wyniki powyższych analiz są zbieżne z wynikami w prezentowanym badaniu. Jak wspomniano powyżej, z badania będące tematem pracy doktorskiej wyłączono osoby z zaburzeniami gospodarki Ca-P. W ocenie związku pomiędzy

badanymi wskaźnikami a stężeniem Ca, uwzględniono jedynie jego stężenie całkowite. Być może inne korelacje byłoby konsekwencją oznaczenia stężenia Ca⁺⁺.

5. Analiza zależności pomiędzy objętością gruczołu tarczowego ocenioną w badaniu ultrasonograficznym a stężeniem 25OHD3 w grupie pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy

W prezentowanym badaniu wykazano istnienie statystycznie istotnej różnicy objętości gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym w grupie chorych z HT a stężeniem 25OHD3 ($R = 0,33$; $p < 0,001$). W dostępnej literaturze niewiele jest obserwacji na ten temat i są one rozbieżne [17,153]. W części prac posługiwano się jedynie obrazem ultrasonograficznym tarczycy w ocenie obecności charakterystycznych cech morfologicznych dla HT, bez oceny jej objętości [1352,135]. Do prezentowanego badania zostali włączeni pacjenci z HT, u których obraz ultrasonograficzny był typowy dla przewlekłego autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy. Zakładając, że niedobór witaminy D jest istotnym czynnikiem w patomechanizmie autoimmunizacji tarczycowej, której następstwem jest destrukcja narządu, oceniono objętość tarczycy w grupie badanej i porównano z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na istotną rolę niedoboru witaminy D w destrukcji tarczycy. Należy jednak podkreślić, że z pewnością nie jest ona jedynym czynnikiem, ale jednym z wielu. *Bozkurt i wsp.* we wspomnianym wcześniej badaniu również wykazał pozytywną korelację pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością gruczołu tarczowego ($R = 0,145$; $p < 0,001$). Podobnie inni autorzy obserwowali, że im większy niedobór 25OHD3 tym mniejsza tarczyca w ocenie ultrasonograficznej [17]. Zależność ta dotyczyła pacjentów z HT w stadium niedoczynności tarczycy wyrównanej terapią substytucyjną l-tyroksyną oraz seropozytywnych pacjentów ze świeżo rozpoznaną chorobą, będących w stadium eutyreozy w stosunku do grupy kontrolnej. Autorzy ci podkreślają, że w ocenie różnic objętości tarczycy należałoby wziąć pod uwagę także zaopatrzenie w jod (ewentualny niedobór jodu) [17].

W jednej z ostatnich publikacji autorstwa *Bizzaro i wsp.* zwrócono uwagę, że obniżone stężenie 25OHD3 (< 20 ng/ml) było związane z zwiększoną objętością tarczycy w obrazie ultrasonograficznym [153].

a/ Analiza zależności pomiędzy objętością gruczołu tarczowego ocenioną w badaniu ultrasonograficznym a stężeniem 25OHD3 w podgrupie pacjentów będących w eutyreozie, bez leczenia l-tyroksyną, z obecnością dodatnich przeciwciał przeciw tarczycowym

Na podstawie przeprowadzonej analizy w badanej podgrupie pacjentów nie wykazano związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością gruczołu tarczowego w badanej podgrupie pacjentów.

Jak wspomniano powyżej, różnica w wynikach uzyskanych w całej grupie badanej może wynikać z przewagi chorych z chorobą Hashimoto, u których wykazano powyższą zależność. Należy także powołać się na cytowane już dane z literatury, sugerujące możliwą przynależność do tej podgrupy chorych z dodatnimi przeciwciałami reprezentującymi zdrowej tyreologicznie populacji [97,142,143]. To mogłoby tłumaczyć zbieżność analizy z wynikiem dla grupy kontrolnej. Jedynym zaprzeczeniem tego faktu jest obecność typowych dla choroby Hashimoto cech ultrasonograficznych w budowie gruczołu tarczowego w badanej podgrupie. Najpewniej pacjenci z badanej podgrupy stanowią populację we wczesnym stadium choroby Hashimoto, kiedy witamina D nie jest kluczowym czynnikiem w patofizjologii choroby, jak sugerowano powyżej [137].

6. Analiza genu *HLA-DRB1* u pacjentów z chorobą Hashimoto i związku jego alleli ze stężeniem 25OHD3

Geny kodujące glikoproteiny HLA znajdują się na chromosomie 6p21 [108]. Region ten zawiera wiele genów odpowiedzialnych za odpowiedź autoimmunologiczną [108]. HLA I i II odgrywają główną rolę w prezentacji antygenów [108]. Pomiędzy regionem kodującym I i II klasę MHC, jest usytuowany region klasy III. Wspólnie z regionem klasy II jest brany pod uwagę w predyspozycji do wystąpienia AITD [108]. Region HLA jest polimorficzny i wiąże się z predyspozycją do chorób autoimmunizacyjnych lub wykazuje działanie ochronne przed ich wystąpieniem [154,155].

Cząstki HLA II są uaktywniane na powierzchni komórek prezentujących antygen i wiążą np. egzogenne antygeny. Limfocyty T rozpoznają antygen, ulegają aktywacji. Poprzez interakcje z kompleksem zawierającym antygenowe białko i molekułę HLA odpowiadają na obecność antygenów [108]. Pierwsze badania dotyczące związku HT z układem HLA w rasie Kaukaskiej wykazały, że predyspozycja do HT jest związana z HLA-DR3, -DR4, -DR5, natomiast rolę ochronną przed wystąpieniem choroby wykazują HLADR1, -DR7, -DR8 i -DR13 [92,106]. W innych rasach odpowiedzialne za predyspozycję lub protekcję do wystąpienia HT odpowiedzialne są inne regiony HLA [95].

Menconi i wsp. wykazali jednak, że predyspozycja do wystąpienia HT jest związana nie tyle z konkretnymi regionami HLA, a raczej z pewnymi sekwencjami w obrębie różnych typów HLA, czyli z tzw. kieszeniami wiążącymi białko [156]. W badaniu przeprowadzonym w

grupie osób rasy Kaukaskiej z HT w porównaniu do grupy kontrolnej wykazano, że skłonność do HT jest związana z pewnym „kluczem” aminokwasowym, w którego skład wchodzi: Tyr-26, Tyr-30, Lys-71 i Arg-74. Natomiast działanie protekcyjne przed wystąpieniem HT wykazują: Leu-26, His-3, Arg-70, Arg-71 i Gln/Leu-74. Wszystkie allele genu *HLA-DRB1* związane z ryzykiem wystąpienia HT wpływają niezależnie na chorobę [156]. W HT podatność kieszeni wiążącej peptydy jest dużo silniejsza niż jej potencjał do ochrony przed chorobą. Wiąże ona autoantygeny pochodzące ze specyficznych dla tarczycy białek, jak np. tyreoglobulina, które są następnie rozpoznawane przez receptory pozbawionych tolerancji komórek T [156].

Jacobson i wsp. podjęli próbę wyjaśnienia, w jaki sposób molekuly HLA klasy II mogą nadawać podatność na wystąpienie chorób autoimmunizacyjnych. Każda molekula HLA klasy II ma zdolność do związania od 650 do 2000 różnych, w tym własnych, białek. Jeżeli zostaną one rozpoznane przez aktywowane limfocyty T, które utraciły tolerancję, może dojść do rozwoju autoimmunizacji, znacznie częściej niż do zjawiska ochrony gospodarza [157]. Podatność lub oporność w obrębie kieszeni wiążącej peptydy w *HLA-DR*, może wpływać na selekcję białek tyreoglobuliny, które zostają przedstawione limfocytom T w inicjacji AITD [157].

Jacobson i wsp. wysunęli hipotezę, że Arg-74, która jest powszechna zarówno w kieszeniach wiążących białka w GD i HT, stanowi kluczową pozycję do wiązania peptydów. Większość interakcji białek MCH klasy II jest związanych z podatnością aminokwasów w pozycji 71 i 74 łańcucha β . Autorzy podkreślają, że Arg-74 odgrywa główną rolę w stabilizacji tyreoglobuliny w obrębie kieszeni wiążącej *HLA-DR* [157]. W publikacji tej przedstawiono także cztery białka, będące pochodnymi tyreoglobuliny, które mają wpływ na rozwój autoimmunizacji tarczycowej, jednym z nich jest Tg.2098-2112 [157]. Jak wspomniano powyżej, dokonano prób oceny, czy obecność pewnych alleli *HLA-DRB1* predysponuje do rozwoju HT, a innych może działać protekcyjne. Wyniki analiz są niejednoznaczne [93,108,158,159]. Niektóre badania nie wykazały żadnej korelacji pomiędzy występowaniem HT a allelami *HLA-DRB1* [159].

Jednym z badań, w którym wykazano istotnie częstsze występowanie allela DRB1*04 (DRB1*04:05) u pacjentów z chorobą Hashimoto była analiza przeprowadzona w populacji greckiej. Z kolei występowanie allela DRB1*07 było znamienne niższe [158]. W badaniu przeprowadzonym w Tunezji w grupie chorych z AITD, znamienne częściej natomiast występowały allele -DR11 i -DR12 [160].

Próby wyjaśnienia związku pomiędzy autoimmunizacją a występowaniem alleli DRB1*04 podjął się *Schonland i wsp.* [161]. Wysłunięto tezę, że u osób z takimi allelami dochodzi do skrócenia telomerów w komórkach CD4+ i granulocytach w ciągu pierwszych dwóch dekad życia. Proces ten skutkuje przyspieszeniem starzenia się procesu replikacji tych komórek. Konsekwencją tego może być zmniejszeniu skuteczności układu immunologicznego w zakresie odpowiedzi na antygen i utrata jego funkcji ochronnej [161]. W badaniu będącym przedmiotem pracy doktorskiej obecność allela DRB1*15:01 była istotnie mniejsza, czyli ryzyko znalezienia się w grupie z HT była ponad dwukrotnie niższe niż w grupie kontrolnej. Natomiast znamienne ponad dwukrotnie wyższe ryzyko wystąpienia HT w stosunku do grupy kontrolnej powodowała obecność allela DRB1*11:04.

Wykazano także, że stężenia 25OHD3 odpowiadające jej prawidłowemu wyrównaniu były istotnie wyższe w obecności allela DRB1*13:03. Z kolei nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w rozkładach stężeń 25OHD3 (podział na stężenia deficytowe, suboptymalne i odpowiadające prawidłowemu wyrównaniu) w zależności od wystąpienia lub braku u chorego danego allela.

Jak wspomniano powyżej obecność *HLA-DR13* może działać protekcyjnie na wystąpienie HT [93,108]. Być może zatem jednym z kierunków tego protekcyjnego działania jest skłonność do wyższych stężeń 25OHD3 u pacjentów z HT. W dostępnej literaturze brak jest doniesień na temat związku 25OHD3 z allelem DRB1*13:03, jak również z obecnością innych alleli genu *HLA-DRB1*. Interpretacja uzyskanych wyników badań nie upoważnia do wysunięcia jednoznacznych wniosków ze względu na małą liczebnościowo grupę badaną. Powyższe obserwacje z pewnością wymagają przeprowadzenia dalszych badań i mają charakter doniesień wstępnych.

W ostatnich latach obserwuje się znaczący postęp w wyjaśnieniu i zrozumieniu wielokierunkowego działania witaminy D w układzie immunologicznym. Obecność w tym układzie VDR, jak również enzymów biorących udział w metabolizmie witaminy D dowodzi jej modulującej aktywności procesy immunologiczne [5,6 62-66]. Przedstawione działania witaminy D w układzie immunologicznym dają podstawy do prowadzenia badań nad jej związkiem z chorobami autoimmunizacyjnymi, w tym nad autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy, czyli chorobą Hashimoto. Konieczność skierowania uwagi na ten problem jest związana z obserwowanym zwiększeniem zachorowań na HT w ostatnich latach, zwłaszcza u kobiet w wieku reprodukcyjnym. Niedobór i deficyt witaminy D jest zjawiskiem o zasięgu globalnym. Przyniesione fakty uzasadniają poszukiwanie związku pomiędzy niskimi

stężeniami witaminy D a występowaniem HT. Jednoznaczne wykazanie korelacji, a w konsekwencji wprowadzenie zalecenia do leczenia/suplementacji witaminy D mogłoby przeciwdziałać nasilonemu procesowi autoimmunizacyjnemu, a może nawet ograniczyć zwiększoną zachorowalność na HT.

7. WNIOSKI KOŃCOWE

Przeprowadzone badanie wskazuje na częste występowanie niedoboru witaminy D u pacjentów z chorobą Hashimoto i należy sądzić, że może on mieć niekorzystny wpływ na przebieg choroby. Obserwacja dotyczy zwłaszcza pacjentów z niedoczynnością tarczycy, wymagających terapii l-tyroksyną w przebiegu aktywnej choroby Hashimoto. Uzasadnia to wskazania do monitorowania stężenia 25OHD3 u chorych z chorobą Hashimoto. Można zatem przypuszczać, że zastosowanie suplementacji/leczenia natywną witaminą D w tej grupie pacjentów mogłoby mieć korzystny wpływ na przebieg choroby oddziałując na ograniczenie nieprawidłowej odpowiedzi autoimmunologicznej.

Wnioski szczegółowe

1. W przeprowadzonym badaniu wykazano istotnie niższe stężenia 25OHD3 u pacjentów z chorobą Hashimoto w stosunku do grupy kontrolnej; nie wykazano takiej zależności w podgrupie pacjentów z podwyższonymi stężeniami przeciwciał przeciw-tarczycowych, będącymi w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną.
2. Większość pacjentów z HT charakteryzowało się obniżonym stężeniem 25OHD3 (78,06 %), głównie w zakresie stężeń suboptymalnych.
3. W podgrupie pacjentów z niedoczynnością tarczycy w przebiegu HT, wymagających leczenia l-tyroksyną wykazano istotnie niższe stężenia 25OHD3 niż w podgrupie osób z HT, będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną. Obserwacja ta może sugerować, że niedoczynności tarczycy w przebiegu HT sprzyja stan obniżonego stężenia 25OHD3.
4. W całej badanej grupie chorych z HT wykazano istotną zależność pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciw-tarczycowych a/TPO i a/Tg a obniżonym stężeniem 25OHD3. Podobnej korelacji nie wykazano dla podgrupy pacjentów z podwyższonymi przeciwciałami, będących w eutyreozie i nie wymagających leczenia l-tyroksyną. Można zatem wnioskować, że pacjenci z aktywną HT w stadium niedoczynności są szczególnie podatni na występowanie niedoboru witaminy D i ta właśnie grupa może odnieść szczególne korzyści z wyrównania tego niedoboru.
5. Wykazano, że stężenie 25OHD3 obniża się wraz z czasem trwania HT; nie wykazano takiej zależności w podgrupie pacjentów będących w eutyreozie, bez leczenia l-tyroksyną, z dodatnimi przeciwciałami przeciw-tarczycowymi. Obserwacja ta sugeruje to, że obniżone stężenie 25OHD3 mieć modulujący wpływ w późniejszym czasie trwania choroby,

pogłębiając nieprawidłową odpowiedź układu immunologicznego. Wymaga to jednak przeprowadzenia dalszych badań.

6. Nie wykazano znaczącego wpływu obniżonego stężenia 25OHD3 na zaburzenia gospodarki wapniowo- fosforanowej w badanej grupie pacjentów z HT. Grupa badana charakteryzowała się istotnie wyższą medianą stężeń PTH w stosunku do grupy kontrolnej, co może mieć związek z niższymi stężeniami 25OHD3 w grupie badanej, ale nie powodowała zaburzeń w zakresie stężeń Ca i P.
7. W przeprowadzonej analizie genu *HLA-DRB1* nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w rozkładach stężeń 25OHD3 w zależności od wystąpienia lub braku u chorego danego allela. Nie wykazano różnic w stężeniach 25OHD3 pomiędzy allelami zwiększającymi ryzyko wystąpienia HT (DRB1*11:04) oraz wystąpienie alleli, których obecność zmniejszałaby to ryzyko (DRB1*15:01). Jednakże analizy przeprowadzone w małej liczebnościowo grupie badanej nie pozwalają wysunąć jednoznacznych wniosków.

8. STRESZCZENIE

Wstęp: Niedobór witaminy D jest problemem o zasięgu epidemiologicznym na świecie. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na jej korzystny wpływ dotyczący wielu procesów zachodzących w organizmie człowieka. Niedobór witaminy D jest uważany za czynnik ryzyka m.in. chorób nowotworowych, sercowo-naczyniowych, metabolicznych, autoimmunizacyjnych, niektórych neurologicznych i psychiatrycznych.

Wykrycie obecności receptorów dla witaminy D (VDR) w większości komórek ludzkiego organizmu, w tym w układzie odpornościowym, spowodowało rozwój badań nad wpływem witaminy D na fizjologiczne i patologiczne procesy zachodzące w naszym organizmie. Poza udokumentowaną rolą witaminy D w gospodarce wapniowo-fosforanowej i wpływie na tkankę kostną, przedmiotem zainteresowań w ostatnich latach jest jej działanie plejotropowe, dotyczące m.in. chorób autoimmunizacyjnych. Przewlekłe autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy, inaczej nazywane chorobą Hashimoto, stanowi jedną z najczęstszych endokrynopatii o podłożu autoimmunizacyjnym jak również najczęstszą postać zapalenia tarczycy i jej niedoczynności. Rozpoznanie choroby opiera się na stwierdzeniu niedoczynności tarczycy oraz obecności krążących we krwi przeciwciał przeciwko antygenowi tarczycowemu: przeciw peroksydazie tarczycowej (a/TPO) oraz/lub przeciw tyreoglobulinie (a/Tg).

Obserwowany w ostatnich latach wzrost zachorowań na HT u coraz młodszych osób, wymaga poszukiwania czynników mogących mieć wpływ na jej rozwój. Jednym z nich może być niedobór witaminy D. Wskaźnikiem oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D jest stężeniem jej metabolitu – hydroksycholekalcyferolu, czyli 25OHD3.

W 2013 roku Zespół Ekspertów określił nowe kryteria diagnostyczne charakteryzujące stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D dla populacji Europy Środkowej. Za deficytowe uznano stężenia 25OHD3 < 20 ng/ml (< 50 nmol/l), suboptymalne zaopatrzenie stanowią 20-30 ng/ml (50-75 nmol/l), natomiast stężenia pomiędzy 30-50 ng/ml (75-125 nmol/l) określono jako prawidłowe dla zapewnienia oczekiwanych plejotropowych efektorów działania witaminy D.

Głównym celem pracy jest ocena wpływu niedoboru witaminy D na przebieg choroby Hashimoto u chorych w województwie świętokrzyskim. Poza tym dokonano oceny związku obniżonego stężenia 25OHD3 z aktywnością HT na podstawie obecności przeciwciał przeciwtarczycowych a/TPO i a/Tg. Przeprowadzono analizę stężenia 25OHD3 w badanej grupie biorąc pod uwagę wpływ wieku pacjentów, czas trwania choroby HT oraz stan

czynnościowy gruczołu tarczowego. Dokonano także oceny jej wpływu na stężenia PTH, Ca i P w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. Przeprowadzono próbę oceny związku obniżonego stężenia 25OHD3 z objętością gruczołu tarczowego w ocenie ultrasonograficznej. U części badanych przeprowadzono analizę mutacji w genie *HLA-DRB1*, biorącym udział w procesie regulacji odpowiedzi immunologicznej. Z badanej grupy pacjentów z chorobą Hashimoto wyodrębniono podgrupę osób z dodatnimi przeciwciałami przeciwarczycowymi a/TPO i/lub a/Tg, będących w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną. Powyższe analizy przeprowadzono również w tej podgrupie.

Materiał i metody: Wszyscy pacjenci byli leczeni w Poradni i Klinice Endokrynologii Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach, gdzie również przeprowadzono badania laboratoryjne i ultrasonograficzne. Część dotycząca badań genetycznych była realizowana w Pracowni Badań Genetycznych Katedry i Kliniki Endokrynologii UJ Collegium Medicum. Po otrzymaniu szczegółowych informacji dotyczących projektu badawczego i wyrażeniu pisemnej zgody na uczestnictwo w badaniu, pacjenci byli poddani wstępnej weryfikacji lekarskiej, a następnie zakwalifikowani do przeprowadzenia niezbędnych analiz biochemicznych i ultrasonograficznych. W surowicy krwi oznaczono stężenie 25OHD3, TSH, a/TPO, a/Tg, Ca i P, w osoczu krwi żyłnej – stężenie PTH. Próbkę krwi pobierano na czczo w godzinach porannych, pomiędzy godziną 7.00 a 10.00.

W badaniu wzięło udział łącznie 310 dorosłych osób powyżej 18 roku życia, 155 osób z chorobą Hashimoto, w tym 144 kobiety (śr. wiek $49,43 \pm 18,16$ lat) i 11 mężczyzn (śr. wiek $58,28 \pm 16,98$ lat) oraz 155 zdrowych osób, w tym 139 kobiet (śr. wiek $48,76 \pm 16,76$ lat) i 16 mężczyzn (śr. wiek $55,80 \pm 16,11$ lat).

Grupę badaną, którą stanowili pacjenci z podwyższonymi stężeniami przeciwciał przeciwarczycowych (a/TPO i/lub a/Tg) podzielono na dwie podgrupy w zależności od czynności hormonalnej gruczołu tarczowego: chorzy z chorobą Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy w trakcie leczenia substytucyjnego preparatami l-tyroksyny (H) oraz chorzy w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną (E). Podgrupę H stanowiło 110 chorych (śr. wieku $49,85 \pm 16,99$ lat), natomiast podgrupę E – 45 chorych (śr. wieku $49,78 \pm 13,89$ lat). W podgrupie H byli pacjenci z wyrównaną niedoczynnością tarczycy w trakcie terapii l-tyroksyną – 107 osób, jedynie u trzech 3 osób stwierdzono w niewielkim stopniu podwyższone stężenia TSH: 11,24 μ IU/ml, 7,89 μ IU/ml, 5,92 μ IU/ml.

Wyniki: Mediana stężeń 25OHD3 w grupie badanej pacjentów z HT była istotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej ($p = 0,006$). Mediana stężenia 25OHD3 w grupie Hashimoto wynosiła 23,20 ng/ml przy zakresie kwartylowym od 18,60 do 29,00, podczas gdy w grupie

kontrolnej wynosiła 25,60 ng/ml, wobec zakresu kwartylowego od 21,01 do 31,35. Natomiast w podgrupie E nie wykazano istotnej różnicy median 25ODH3 w stosunku do grupy kontrolnej ($p = 0,403$). Mediana stężenia 25OHD3 w podgrupie E wynosiła 28,7 ng/ml, przy zakresie kwartylowym 21,40 do 33,20.

Mediana stężeń TSH w grupie badanej była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej, a w podgrupie E nie różniła się istotnie od mediany TSH w grupie kontrolnej (odpowiednio: $p < 0,001$ i $p = 0,118$) Mediana stężenia TSH w grupie badanej wynosiła 1,87 $\mu\text{IU/ml}$, przy zakresie kwartylowym od 1,10 do 2,70, natomiast mediana stężenia w grupie kontrolnej wynosiła 1,37 $\mu\text{IU/ml}$, przy zakresie kwartylowym od 0,91 do 1,92.

Grupa badana pacjentów z HT charakteryzowała się istotnie wyższą medianą stężeń PTH w stosunku do grupy kontrolnej, czego nie stwierdzono w podgrupie E (odpowiednio: $p < 0,001$ i $p = 0,175$). Mediana stężenia PTH w grupie badanej z HT wynosiła 62,30 pg/ml wobec zakresu kwartylowego od 51,05 do 76,35, a w grupie kontrolnej – 54,90 pg/ml, przy zakresie kwartylowym od 37,10 do 65,30.

Mediany stężeń wapnia i fosforu pomiędzy analizowanymi grupami nie różniły się istotnie (dla grupy badanej: $p = 0,484$ i $p = 0,138$; dla podgrupy E: $p = 0,335$ i $p = 0,455$).

Pomiędzy całą grupą badaną i kontrolną wykazano występowanie statystycznie znamienych różnic median objętości całkowitej gruczołu tarczowego (V_c), jak również płata prawego (V_{PP}) i lewego (V_{LP}) w ocenie ultrasonograficznej ($p < 0,001$). Mediany objętości całkowitej tarczycy oraz każdego z płatów osobno, były istotnie mniejsze niż w grupie kontrolnej. W grupie badanej wartość mediany V_c wynosiła 9,71 ml, przy zakresie kwartylowym od 7,39 do 14,75. W grupie kontrolnej mediana V_c stanowiła 18,54 ml, wobec zakresu kwartowego od 12,86 do 24,18. Mediana V_{PP} w grupie badanej z HT wynosiła 5,11 ml, przy zakresie kwartylowym od 3,91 do 7,73, a w grupie kontrolnej była wyższa i wynosiła 10,07 ml wobec zakresu kwartylowego od 7,02 do 12,75. Mediana V_{LP} w grupie badanej stanowiła 4,50 ml, gdzie zakres kwartylowym zawierał się w przedziale od 3,19 do 6,68 i różniła się istotnie od mediany V_{LP} w grupie kontrolnej, która wynosiła 8,97 ml przy zakresie kwartylowym od 5,78 do 11,72.

Podobne wyniki uzyskano dla podgrupy E ($p < 0,001$). W badanej podgrupie mediana V_c wynosiła 13,84 ml, przy zakresie kwartylowym od 9,36 do 19,24 , mediana V_{PP} 7,11 ml, wobec zakresu kwartylowego od 5,02 do 10,11, natomiast mediana V_{LP} wynosiła 6,11 ml, przy zakresie kwartylowym od 4,13 do 9,79.

Nie wykazano związku pomiędzy wiekiem a stężeniem 25OHD3 w całej grupie badanej z HT, jak również w podgrupie E (odpowiednio: $p = 0,143$, $p = 0,245$).

W ocenie wpływu czasu trwania choroby na stężenie 25OHD3 wykazano istotną, średnio silną i ujemną korelację pomiędzy tymi danymi w grupie pacjentów z HT ($p < 0,001$). Natomiast nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a stężeniami 25OHD3 w grupie osób z czasem trwania choroby nieprzekraczającym jednego roku, jak również w grupie osób z czasem trwania choroby nieprzekraczającym dwóch lat ($p = 0,223$ i $p = 0,295$). Korelacja ta nie dotyczyła także pacjentów z podgrupą E ($p = 0,163$).

Analiza oceny zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 w obrębie grupy badanej z HT a stanem czynnościowym gruczołu tarczowego (podgrupa H vs. podgrupa E) wykazała występowanie istotnie niższych stężeń 25OHD3 w grupie pacjentów z niedoczynnością tarczycy w trakcie leczenia l-tyroksyną w stosunku do osób w stadium eutyreozy, bez takiej terapii ($p < 0,001$). Mediana stężeń 25OHD3 w podgrupie H wynosiła 21,50 ng/ml, przy zakresie kwartylowym od 17,80 do 27,30, natomiast w podgrupie E mediana stężeń 25OHD3 stanowiła 28,70 ng/ml, wobec zakresu kwartylowego od 21,40 do 33,02.

W ocenie związku stężenia 25OHD3 z aktywnością HT na podstawie stężeń przeciwciał przeciwtarczycowych a/TPO i a/Tg w podgrupie chorych z wartościami przeciwciał zawierającymi się w granicach norm referencyjnych (a/TPO poniżej i równe 35 IU/ml oraz a/Tg poniżej i równe 40 IU/ml) stwierdzono istotnie wyższe stężenia median 25OHD3 niż w podgrupie pacjentów, u których wartości a/TPO i a/Tg były podwyższone (odpowiednio: $p = 0,001$, $p < 0,001$). Wyniki dotyczą także analizy bezwzględnych wartości stężeń a/TPO i a/Tg. Mediana stężeń 25OHD3 w podgrupie chorych z a/TPO ≤ 35 IU/ml wynosiła 32,0 ng/ml, przy zakresie kwartylowym od 25,63 do 37,68. Z kolei mediana stężeń w podgrupie chorych z a/TPO > 35 IU/ml stanowiła 22,10 ng/ml, wobec zakresu kwartylowego od 18,10 do 28,40. Mediana stężeń 25OHD3 w podgrupie chorych z a/Tg ≤ 40 IU/ml wynosiła 28,70 ng/ml, przy zakresie kwartylowym od 23,20 do 32,70. Z kolei mediana stężeń w podgrupie chorych z a/Tg powyżej 40 IU/ml stanowiła 20,20 ng/ml, wobec zakresu kwartylowego od 15,40 do 23,60. Natomiast w podgrupie E nie wykazano występowania istotnej korelacji pomiędzy stężeniem 25OHD3 a przeciwciałami a/TPO i a/Tg (odpowiednio: $p = 0,198$ i $p = 0,879$).

W ocenie związku pomiędzy stężeniem 25OHD3 a PTH w grupie badanej z HT wykazano istotną, ujemną i niezbyt silną korelację pomiędzy tymi zmiennymi ($R = -0,21$; $p = 0,009$). Natomiast nie wykazano podobnej zależności dla podgrupy E ($p = 0,277$). W zakresie stężeń Ca i P nie wykazano istotnej zależności ze stężeniem 25OHD3 w całej grupie badanej, jak i podgrupie E (odpowiednio: $p = 0,643$ i $p = 0,536$; $p = 0,304$ i $p = 0,574$).

W całej grupie badanej wykazano występowanie istotnej zależności pomiędzy stężeniem 25OHD3 a Vc, jak również V PP i V LP w ocenie ultrasonograficznej ($p < 0,001$).

Natomiast zarówno w podgrupie E, jak i grupie kontrolnej natomiast nie wykazano istotnej współzależności pomiędzy tymi zmiennymi (podgrupa E: $p = 0,685$, $p = 0,843$, $p = 0,151$ oraz grupa kontrolna: $p = 0,698$, $p = 0,733$, $p = 0,786$).

Analizy genu *HLA-DRB1* dokonano u części ($N = 71$) osób w obrębie grupy badanej z HT. W badanej grupie najczęściej występującym allelem był DRB1*07:01. Następnymi w kolejności najczęściej stwierdzanymi allelami były DRB1*01:01 oraz DRB1*11:01. Do grupy najrzadziej występujących alleli należały: DRB1*04:07, DRB1*08:04, DRB1*11:03, DRB1*15:02, DRB1*16:01.

Stwierdzono, że pojawienie się allela DRB1*11:04, dla którego średnie stężenie 25OHD3 wynosiło 22,97 ng/ml było istotnie wyższe w badanej grupie niż w grupie kontrolnej ($p = 0,002$). Iloraz szans wskazuje, że obecność allela DRB1*11:04 wskazuje na ponad dwukrotnie wyższe ryzyko wystąpienia choroby Hashimoto niż w grupie osób zdrowych.

Natomiast obecność allela DRB1*15:01, dla którego średnie stężenie 25OHD3 wynosiło 23,87 ng/ml była istotnie niższa w grupie badanej niż w grupie kontrolnej ($p = 0,009$). Iloraz szans wskazuje, że w przypadku obecności tego allela ryzyko znalezienia się w grupie chorych zmniejsza się ponad dwukrotnie. Niewielki różnice w stężeniach 25OHD3 pomiędzy analizowanymi allelami nie pozwalają na wykazanie ich związku ze stężeniami 25OHD3.

Oceniając zależność pomiędzy średnimi stężeniami 25OHD3 a analizowanymi allelami genu *HLA-DRB1* wykazano, że stężenia 25OHD3 odpowiadające jej prawidłowemu wyrównaniu były istotnie wyższe w obecności allela DRB1*13:03. W zakresie stężeń 25OHD3 odpowiadających deficytowi lub stężeniom suboptymalnym w analizowanych allelach wykazano istotne różnice pomiędzy poszczególnymi analizowanymi allelami, ale uzyskane wyniki nie pozwalają na wskazanie, które z nich mogłyby predysponować do obniżonych stężeń 25OHD3.

Wnioski: Przeprowadzone badanie wskazuje na istotnie częste występowanie niedoboru witaminy D u pacjentów z chorobą Hashimoto i jego niekorzystny wpływ na przebieg choroby. Obserwacja dotyczy zwłaszcza pacjentów z niedoczynnością tarczycy, wymagających terapii l-tyroksyną w przebiegu aktywnej choroby Hashimoto. Może to stanowić uzasadnienie wskazań do oceny stężenia 25OHD3 u chorych z chorobą Hashimoto i daje nadzieję, że zastosowanie suplementacji/leczenia natywną witaminą D w tej grupie chorych mogłoby mieć korzystny wpływ na przebieg procesu autoimmunizacyjnego.

9. SUMMARY

Introduction: Vitamin D deficiency is a problem with an epidemiological range in the world. The results of this study indicate its beneficial effects for many processes in the human body. Vitamin D deficiency is considered a risk factor for such diseases such as cancer, cardiovascular, metabolic, autoimmune diseases, certain neurological and psychiatric disorders.

Detection of the presence of vitamin D receptor (VDR) in most cells in the human body, including the immune system led to the development of research on the effects of vitamin D in physiological and pathological processes in our body. In addition to the documented role of vitamin D in calcium-phosphate economy and the impact on bone tissue, the subject of interest in recent years is its pleiotropic effects, concerning, among others autoimmune diseases. Chronic autoimmune thyroiditis, also known as Hashimoto's thyroiditis, is one of the most common autoimmune endocrinopathy, as well as the most common form of thyroiditis and its hypothyroidism. The diagnosis is based on the finding of hypothyroidism and the presence of circulating antibodies against the thyroid antigen: anti-thyroid peroxidase (a/TPO) and/or anti-thyroglobulin (a/Tg).

The increasing rate of HT in younger and younger people that is observed in recent years, needs searching for factors that may affect its development. One of them may be vitamin D deficiency. The indicators for the evaluation of the body supply of vitamin D is the concentration of its metabolite – hydroxycholecalciferol, or 25OHD3. In 2013 the Panel of Experts described the new diagnostic criteria characterizing the state of the body's supply of vitamin D for the population of Central Europe. For the deficit concentration it was 25OHD3 concentration <20 ng/ml (<50 nmol/l), the suboptimal one is 20-30 ng/ml (50-75 nmol/l) while the concentration between 30-50 ng/ml (75-125 nmol/l) was determined as valid to ensure the expected pleiotropic effectors of vitamin D.

The main aim of the study is to assess the influence of vitamin D deficiency on the course of Hashimoto's disease in patients from the region of Kielce. Apart from this, I examined the relationship of decreased level of 25OHD3 with HT activity based on the presence of antibodies and a/TPO and a/Tg. The 25OHD3 concentration analysis was performed in the examined group taking into account the impact of patients' age, disease duration of HT and functional status of the thyroid gland. Its effects on PTH, Ca and P in the test group, relative to the control group, were also assessed. The trial of assessing the relationship between 25OHD3 decreased level and the thyroid gland volume in ultrasound examination was

conducted. In some patients the mutations analysis were carried out in the *HLA-DRB1* gene involved in the regulation of immune response. From the study group of patients with Hashimoto's thyroiditis, a subgroup of patients with positive thyroid antibodies a/TPO and/or a/Tg at the stage of euthyroid was chosen, without l-thyroxine treatment. The above analysis was also carried out in this subgroup.

Material and Methods: All patients were treated in the Holy Cross Cancer Center in Kielce at the Clinic of Endocrinology, where there were also conducted laboratory and ultrasound tests. The part relating to genetic testing was carried out in the Laboratory of Genetic Research at the Department of Endocrinology, Jagiellonian University Medical College. After receiving detailed information on the research project and receiving a written consent to participate in the study, the patients were given an initial medical verification, and then qualified to carry out the necessary biochemical and ultrasound analysis. In the blood serum concentration it was determined 25OHD3, TSH, a/TPO, a/Tg, Ca and P concentration in venous plasma – PTH. The blood samples were taken on an empty stomach in the morning, between 7.00 and 10.00 a.m. The study involved a total of 310 adults over 18 years of age, 155 people with Hashimoto's thyroiditis, including 144 women (age of $49,43 \pm 18,16$ years) and 11 men (age of $58,28 \pm 16,98$ years) and 155 healthy people, including 139 women (age $48,76 \pm 16,76$ years) and 16 men (age of $55,8 \pm 16,11$ years). The test group that consisted of patients with elevated levels of antibodies (a/TPO and/or a/Tg) was divided into two subgroups depending on the hormonal activity of the thyroid gland: patients with Hashimoto's hypothyroidism in stages during the substitution therapy with L-thyroxine (H) and euthyroid sick stage without treatment of l-thyroxine (E). The H subgroup consisted of 110 patients (age of $49,85 \pm 16,99$ years), while the E subgroup – 45 patients (age of $49,78 \pm 13,89$ years). In the H subgroup there were patients with compensated hypothyroidism during treatment with l-thyroxine – 107 people and only three 3 patients had slightly elevated levels of TSH: 11,24 microIU/mL, 7,89 microIU/mL, 5,92 microIU/ml.

Results: The median of 25OHD3 concentrations in the study group of patients with HT was significantly lower compared to the control group ($p = 0,006$). The median concentration of 25OHD3 in Hashimoto group was 23,20 ng/ml quartile range from 18,60 to 29,00, while in the control group it was 25,60 ng/ml, compared to quartile range of 21,01 to 31,35. However, the E subgroup showed no significant difference in the median of 25ODH3 related to the control group ($p = 0,403$). The median of 25OHD3 concentration in the E subgroup was 28,7 ng/ml at the quartile range of 21,40 - 33,20.

The median of TSH serum in the test group was significantly higher than in the control group and subgroup E did not differ significantly from the median of TSH in the control group ($p < 0,001$ and $p = 0,118$), the median of TSH levels in the study group was 1,87 microIU/ml and the quartile ranged from 1,10 to 2,70, and the median concentration in the control group was 1,37 microIU/ml at quartile range from 0.91 to 1.92.

The study group of patients with HT characterized by significantly higher median levels of PTH compared to the control group, which is not found in the E subgroup ($p < 0,001$ and $p = 0,175$). The median concentration of PTH in the test group with HT was 62,30 pg/ml to quartile range of 51,05 to 76,35, and the control group – 54,90 pg/ml and the quartile range from 37,10 to 65,30. The median of calcium and phosphorus concentrations between the analyzed groups did not differ significantly (for the study group: $p = 0,484$ and $p = 0,138$; for the E subgroup: $p = 0,335$ and $p = 0,455$). Between the test group and the control group it was demonstrated the existence of significant differences in median of the total volume of the thyroid gland (Vc) as well as right lobe (V PP) and left one (V LP) in the ultrasound examination ($p < 0,001$). The median of the total volume of each of the thyroid lobes apart, were significantly lower than in the control group. In the test group the median value of Vc was 9,71 ml and the quartile range from 7,39 to 14,75. In the control group, the median Vc constituted 18,54 ml, quartile range from 12,86 to 24,18. The median of V PP in the study group with HT was 5,11 ml, and quartile range of 3,91 to 7,73, and in the control group it was higher and amounted to 10,07 ml with quartile range from 7,02 to 12,75. The median of V LP in the study group was the 4,50 ml, where the range quartile ranged from 3,19 to 6,68, and differed significantly from the median of V LP in the control group, which was 8,97 ml at quartile range from 5 78 to 11.72.

Similar results were obtained in the E subgroup ($p < 0,001$). In the tested subgroup the median of Vc was 13,84 ml and the quartile range from 9,36 to 19,24, the median of V PP was 7,11 ml, compared with quartile range from 5,02 to 10,11, and the median of V LP was 6,11 ml and the quartile range from 4,13 to 9,79.

There was no correlation between age and 25OHD3 concentration in the whole group of HT as well as in the E subgroup ($p = 0,143$, $p = 0,245$).

In assessing of the impact of the duration of the disease on 25OHD3 concentration it was shown a significant, medium strong and negative correlation between these data in patients with HT ($p < 0,001$). In contrast, it was shown no significant correlation

between disease duration and 25OHD3 concentrations in patients with disease duration not exceeding one year, as well as in patients with disease duration of less than two years ($p = 0,223$ and $p = 0,295$). This correlation did not also apply the patients from the E subgroup ($p = 0,163$).

The analysis of the assess of the relationship between the 25OHD3 concentration within the study group with HT and functional status of the thyroid gland (the H subgroup vs. the E subgroup showed a significantly lower incidence of 25OHD3 concentrations in patients with hypothyroidism during treatment with l-thyroxine as compared to people in the euthyrosis stadium without such treatment ($p < 0,001$). The median of 25OHD3 concentrations in the H subgroup H was 21.50 ng/ml, with quartile range from 17,80 to 27,30, while the median of 25OHD3 concentrations in the E subgroup represented 28,70 ng/ml, with quartile range from 21,40 to 33,02.

Evaluating the correlation between the 25OHD3 concentration and the HT activity on the basis of serum antibodies a/TPO and a/Tg values in the subgroup of patients with the antibodies included within the limits of the reference standards (a/TPO below and equal to 35 IU/ml and a/Tg below and equal to 40 IU/ml) it was stated significantly higher median levels of 25OHD3 concentration than in the subgroup of patients whose values of a/TPO and a/Tg were increased ($p = 0,001$, $p < 0,001$). The results also concern the analysis of the absolute values of concentrations of a/TPO and a/Tg.

The median of 25OHD3 concentration in the subgroup of the patients with a/TPO \leq 35 IU/ml was 32,0 ng/ml, with quartile range from 25,63 to 37,68. On the other hand, the median of the concentrations in the subgroup of patients with a/TPO $>$ 35 IU/ml was 22,10 ng/ml, compared to quartile range from 18,10 to 28,40. The median of 25OHD3 concentration in the subgroup of the patients with a/Tg \leq 40 IU/ml, was 28,70 ng/ml, with quartile range from 23,20 to 32,70. On the other hand, the median of the concentrations in the subgroup of patients with a a/Tg higher than 40 IU ml was a 20,2 ng/ml, compared to quartile range from 15,40 to 23,60. However, in the E subgroup it was proved no significant correlation between 25OHD3 concentration and the antibodies a/TPO and a/Tg ($p = 0,198$ and $p = 0,879$).

In assessing the relationship between 25OHD3 concentration and PTH in the study group with HT it was shown a significant, negative and not very strong correlation between these variables ($R = -0,21$; $p = 0,009$). In contrast, in the E subgroup there were no similar dependencies ($p = 0,277$). In terms of Ca and P concentrations it was

shown no significant correlation with the concentration of 25OHD3 in the whole study group and the E subgroup ($p = 0,643$ and $p = 0,536$, $p = 0,304$ and $p = 0,574$).

In the whole study group it was demonstrated the existence of significant correlation between the concentration of 25OHD3 and Vc, as well as V PP and V LP in the ultrasound evaluation ($p < 0,001$).

In contrast, both the E subgroup and the control group had no significant correlation between these variables (subgroup E: $p = 0,685$, $p = 0,843$, $p = 0,151$ and control group: $p = 0,698$, $p = 0,733$, $p = 0,786$).

The analysis of the HLA-DRB1 gene was made in part (N = 71) patients within the study group with HT. In the study group the most common allele was DRB1*07:01. The next in order of the most frequent alleles were DRB1*01:01 and DRB1*11:01. The group of the rarest alleles included: DRB1*04:07, DRB1*08:04, DRB1*11:03, DRB1*15:02, DRB1*16:01.

It was found that the appearance of allele DRB1*11:04, for which the average concentration of 25OHD3 was 22,97 ng/ml was significantly higher in the study group than in the control group ($p = 0,002$). The odds ratio indicates that the presence of the allele DRB1*11:04 indicates more than twice risk of Hashimoto's disease than in healthy people.

The presence of allele DR-B1*15:01, for which the average concentration of 25OHD3 was 23,87 ng/ml was significantly lower in the study group than in the control group ($p = 0,009$). The odds ratio indicates that the presence of this allele reduces the risk of the disease more than doubled.

The small differences in the concentrations of 25OHD3 between the analyzed alleles do not show their relationship with the concentrations of 25OHD3.

Assessing the relationship between the average concentrations of 25OHD3 and analyzed alleles *HLA-DRB1* gene it was shown that the concentrations of 25OHD3 corresponding with its proper alignment were significantly higher in the presence of the allele DRB1*13:03. In the range of the concentrations of 25OHD3 corresponding with the deficit or suboptimal concentrations in the analyzed alleles it was demonstrated the significant differences between the analyzed alleles, but the results do not allow to identify which of them could predispose to reduced concentrations of 25OHD3.

Conclusions: This study indicates a significantly high prevalence of vitamin D deficiency in patients with Hashimoto's thyroiditis and its adverse impact on the

course of the disease. The observation applies especially patients with hypothyroidism, requiring l-thyroxine therapy in active Hashimoto disease. This may justify the indications for the evaluation of 25OHD3 concentrations in patients with Hashimoto's thyroiditis and it gives the hope that the use of supplementation treatment with native vitamin D in this group of patients would have a positive impact on the autoimmune process.

10. SPIS RYCIN I TABEL

- Rycina 1. Synteza i metabolizm witaminy D [na podstawie Matthew Y.Kitson, Stuart K. Roberts. J. Hepatol. 2012(29)]str.15*
- Rycina 2. Schemat aktywacji VDR [na podstawieDusso A.S. Kidney Intern. 2011 (32)].....str.17*
- Rycina 3. Schemat współdziałania mechanizmów genomowego i pozagenomowego [na podstawie Lizis-Kolus K.i wsp.,Przegląd Lek. 2013 (41)].....str.19*
- Rycina 4. Działanie witaminy D w układzie immunologicznym [na podstawie Prietl B., Treiber G., Thomas R. et al. Nutrients. 2013 (64)].....str.23*
- Rycina 5. Częściowa mapa krótkiego ramienia chromosomu 6 obrazująca molekularną organizację obszaru zawierającego loci HLA klas I, II, III [na podstawie Xie M., Li J., Jiag T.BMC Bioinformatics.2010;11Suppl 11:S10. (109)].....str.33*
- Rycina 6. Rozkład płci w grupie badanej z chorobą Hashimoto i grupie kontrolnej.....str.56*
- Rycina 7. Rozkład wieku w grupie z chorobą Hashimoto oraz w grupie kontrolnej...str.57*
- Rycina 8. Rozkład wieku w obrębie grupy badanej w podgrupie chorych z podwyższonymi stężeniami przeciwciał przeciwarczycowych będących w eutyreozie, nieleczonych l-tyroksyną (E) oraz w grupie chorych z chorobą Hashimoto leczonych preparatem l-tyroksyny z powodu niedoczynności tarczycy (H).....str.58*
- Rycina 9. Mediany 25OHD3 (po stronie lewej) oraz histogramy 25OHD3 (po stronie prawej) w grupie pacjentów w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.....str.60*
- Rycina 10. Mediany oraz histogramy TSH w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.....str.61*
- Rycina 11. Mediany oraz histogramy PTH w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.....str.61*
- Rycina 12. Mediany Ca w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.....str.62*

<i>Rycina 13. Mediany P w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.....</i>	<i>str.62</i>
<i>Rycina 14. Mediany V całkowitej (Vc) gruczołu tarczowego w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.....</i>	<i>str.63</i>
<i>Rycina 15. Mediany V PP w grupie pacjentów w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.....</i>	<i>str.63</i>
<i>Rycina 16. Mediany V LP w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.....</i>	<i>str.64</i>
<i>Rycina 17. Wpływ wieku w grupie z chorobą Hashimoto na stężenie PTH (po stronie lewej, Ca (część środkowa), P (po stronie prawej)).....</i>	<i>str.64</i>
<i>Rycina 18. Wpływ wieku w grupie kontrolnej na stężenie PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej)).....</i>	<i>str.65</i>
<i>Rycina 19. Wpływ wieku w podgrupie E na stężenie PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa) i P (po stronie prawej)).....</i>	<i>str.68</i>
<i>Rycina 20. Zależność pomiędzy wiekiem pacjentów (wykres po stronie lewej) oraz czasem trwania choroby (wykres po stronie prawej) a stężeniem 25OHD3 w grupie pacjentów z chorobą Hashimoto.....</i>	<i>str.69</i>
<i>Rycina 21. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a czasem trwania choroby Hashimoto < 1 rok (wykres po stronie lewej) oraz < 2 lata (wykres po stronie prawej) w grupie badanej.....</i>	<i>str.70</i>
<i>Rycina 22. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stanem czynnościowym gruczołu tarczowego w podgrupie pacjentów w stadium eutyreozy, bez leczenia l-tyroksyną (podgrupa E) a podgrupą chorych z chorobą Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy, w trakcie leczenia preparatem l-tyroksyny (podgrupa H).....</i>	<i>str.71</i>
<i>Rycina 23. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a wiekiem pacjentów w podgrupie E (wykres po stronie lewej) oraz czasem trwania choroby (wykres po stronie prawej).....</i>	<i>str.72</i>

- Rycina 24. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby Hashimoto na podstawie przeciwciał przeciwarczycowych a/TPO w podgrupie ze stężeniem a/TPO ≤ 35 IU/ml oraz a/TPO > 35 IU/ml.....str.73*
- Rycina 25. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby Hashimoto na podstawie przeciwciał przeciwarczycowych a/Tg w podgrupie ze stężeniem a/Tg ≤ 40 IU/ml oraz a/Tg > 40 IU/ml.....str.74*
- Rycina 26. Ocena zależności stężenia 25OHD3 w zależności od bezwzględnych wartości stężeń przeciwciał a/TPO (po stronie lewej) i a/Tg (po stronie prawej) w grupie z chorobą Hashimoto.....str.75*
- Rycina 27. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a aktywnością choroby w podgrupie E na podstawie podwyższonych wartości przeciwciał przeciwarczycowych: a/TPO > 35 IU/ml (wykres po stronie lewej) oraz a/Tg > 40 IU/ml (wykres po stronie prawej).....str.76*
- Rycina 28. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej).....str.77*
- Rycina 29. Wpływ czasu trwania choroby Hashimoto na stężenie PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej).....str.78*
- Rycina 30. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a stężeniem PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej) w podgrupie E.....str.79*
- Rycina 31. Wpływ długości czasu trwania choroby na stężenie PTH (po stronie lewej), Ca (część środkowa), P (po stronie prawej) w podgrupie E.....str.79*
- Rycina 32. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością prawego płata tarczycy (V PP) (po stronie lewej), objętością lewego płata tarczycy (V LP) (wykres środkowy) i całkowitą objętością gruczołu tarczowego (Vc) (po stronie prawej) w grupie chorych z chorobą Hashimoto.....str.80*

<i>Rycina 33. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością prawego płata tarczycy (V PP) (po stronie lewej), objętością lewego płata tarczycy (V LP) (wykres środkowy) i całkowitą objętością gruczołu tarczowego (Vc) (po stronie prawej) w grupie kontrolnej.....</i>	<i>str.81</i>
<i>Rycina 34. Zależność pomiędzy stężeniem 25OHD3 a objętością prawego płata tarczycy (V PP po stronie lewej), objętością lewego płata tarczycy (V LP wykres środkowy) i całkowitą objętością gruczołu tarczowego (Vc po stronie prawej) w podgrupie E.....</i>	<i>str.82</i>
<i>Tabela 1. Lokalizacja VDR w organizmie ludzkim.....</i>	<i>str.16</i>
<i>Tabela 2. Związek polimorfizmów VDR z nowotworami.....</i>	<i>str.21</i>
<i>Tabela 3. Przyczyny niedoboru witaminy D [na podstawie 1,2].....</i>	<i>str.28</i>
<i>Tabela 4. Ocena stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D na podstawie stężenia 25OHD w surowicy dla wszystkich grup wiekowych – Rekomendacje dawkowania w populacji osób zdrowych oraz w grupach ryzyka deficytów – wytyczne dla Europy Środkowej 2013 roku. Standardy Medyczne/Pediatrics, 2013; 10: 5730-5738 [2].....</i>	<i>str.29</i>
<i>Tabela 5. Historia naturalna HT – stadia choroby, wg Effraimidis G [100].....</i>	<i>str. 42</i>
<i>Tabela 6. Swoistość testu oceniona jako odsetek reakcji krzyżowych dla poszczególnych form chemicznych witaminy D.....</i>	<i>str.51</i>
<i>Tabela 7. Rozkład płci w grupie badanej z chorobą Hashimoto i kontrolnej.....</i>	<i>str.56</i>
<i>Tabela 8. Charakterystyki opisowe wieku w grupie z chorobą Hashimoto i grupie kontrolnej.....</i>	<i>str.57</i>
<i>Tabela 9. Charakterystyki opisowe wieku w grupie badanej dla podgrupy osób z chorobą Hashimoto, leczonych z powodu niedoczynności tarczycy l-tyroksyną (H) i podgrupy pacjentów, będących w stadium eutyreozy z obecnością podwyższonych wartości przeciwciał przeciwtarczycowych (E).....</i>	<i>str.58</i>
<i>Tabela 10. Charakterystyki opisowe badanych cech w grupach: grupa badana z chorobą Hashimoto (n = 155 osób) oraz grupy kontrolnej (n = 155 osób). Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± odchylenie</i>	

standardowe (SD), zakres 95 przedziału ufności dla średniej (95%PU), wartości mediany (Me) wraz z kwartylem dolnym (Q₁) i górnym (Q₃). Statystycznie istotne różnice: grupa badana vs. grupa kontrolna – wartość p.....str.59

Tabela 11. Charakterystyki opisowe analizowanych cech w podgrupie badanej E, pacjentów w stadium eutyreozy z podwyższonymi stężeniami przeciwciał przeciwarczycowych a/TPO i/lub a/Tg (n = 45 osób) oraz grupy kontrolnej (n = 155 osób). Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe (SD), zakres 95 przedziału ufności dla średniej (95%PU), wartości mediany (Me) wraz z kwartylem dolnym (Q₁) i górnym (Q₃). Statystycznie istotne różnice: podgrupa badana vs. grupa kontrolna – wartość p.....str.66

Tabela 12. Charakterystyki opisowe 25OHD3 w grupie badanej chorych z dodatnimi przeciwciałami a/TPO i/lub a/Tg w zróżnicowaniu na pogrupę H- pacjentów z niedoczynnością tarczycy, wymagających terapii l-tyroksyną oraz podgrupę E – osób z HT, będących w eutyreozie, bez leczenia l-tyroksyną.....str.70

Tabela 13. Charakterystyki opisowe stężenia 25OHD3 w grupie badanej w zależności aktywności choroby na podstawie stężeń przeciwciał przeciwarczycowych a/TPO: podgrupa z a/TPO ≤ 35 IU/ml vs. podgrupa z a/TPO > 35 IU/mlstr.73

Tabela 14. Charakterystyki opisowe stężeń 25OHD3 w grupie badanej z chorobą Hashimoto w zależności aktywności choroby na podstawie stężeń przeciwciał przeciwarczycowych a/Tg: podgrupa z a/Tg ≤ 40 IU/ml vs. podgrupa z a/Tg > 40 IU/ml.....str.74

Tabela 15. Analiza częstości występowania alleli genu HLA-DRB1 w badanej grupie 71 pacjentów z chorobą Hashimoto.....str.83

Tabela 16. Stężenie 25OHD3 w zależności od występowania danego allela genu HLA-DRB1str.87

11. PIŚMIENNICTWO

1. Płudowski P., Karczmarewicz E., Bayer M. et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and treatment of deficits in Central Europe – recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynol Pol.* 2013; 64(4): 319-327
2. Płudowski P., Karczmarewicz E., Chlebna-Sokół D. i wsp. Witamina D: Rekomendacje dawkowania w populacji osób zdrowych oraz w grupach ryzyka deficytów – wytyczne dla Europy Środkowej 2013r. *Standardy Medyczne/Pediatrics*, 2013; 10: 573-578.
3. Marcinkowska-Suchowierska E., Walicka M., Tałałałaj M. et al. Vitamin D supplementation in adults – guidelines. *Endokrynol Pol.* 2010; 61(6): 723-729.
4. Napiórkowska L., Budlewski T., Jakubas-Kwiatkowska W. i wsp. Częstość występowania małego stężenia witaminy D w surowicy starszych kobiet w Polsce. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2009; 119: 669-703.
5. Vuolo L., Di Somma C., Faggiano A. et al. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol.* 2012; 3: 58.
6. Kuryłowicz A, Bednarczuk T., Naumann J. i wsp. Wpływ niedoboru witaminy D na rozwój nowotworów i chorób autoimmunologicznych. *Endokrynol Pol.* 2007; 58(2): 140-152.
7. Karczmarewicz E., Czekuć-Kryśkiewicz E., Płudowski P. Effect of vitamin D status on pharmacological treatment efficiency. *Dermatoloendocrinol.* 2013; 5: 1-6.
8. Garland C.F., French C.B., Baggerly L.L. et al. Vitamin D supplement doses and serum 25-hydroxyvitamin D in the range associated with cancer prevention. *Anticancer Res.* 2011; 31(2): 607-611.
9. Garland C.F., Gorham E.D. Mohr S.B. Vitamin D for cancer prevention: Global perspective. *Ann Epidemiol.* 2009; 19(7): 468-483.
10. Hauser K., Walsh D., Shrotriya S. et al. Low 25-hydroxyvitamin D level in people with a solid tumor cancer diagnosis: the tip of the iceberg? *Support Care Cancer.* 2014 Feb 28 [Epub ahead of print].
11. Wang L, Song Y, Manson J.E., et al. Circulating levels of 25 hydroxy-vitamin D and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2012; 5(6): 819-829.

12. Pilz S., Tomaschitz A., Marz W. et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol. (Oxf)*. 2011; 75: 575-584.
13. Burgaz A., Orsini N., Larsson S.C. et al. Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens*. 2011; 29(4): 636-645.
14. Khan H., Kunutsor S., Franco O.H. et al. Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc*. 2013; 72(1): 89-97.
15. Littorin B., Blom P., Schölin A. et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 2006; 49(11): 2847-2852.
16. Kivity S, Agmin-Levin N, Zisappl M. et al. Vitamin D and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol*. 2011; 8(3): 243-247.
17. Bozkurt N.C., Karbek B., Ucan B. et al. The association between severity of vitamin D deficiency and Hashimoto's thyroiditis. *Endocr Pract*. 2013; 19 (3):479-484.
18. Ginanjar E., Sumariyono, Setiati S. et al. Vitamin D and autoimmune disease . *Acta Med Indones*. 2007; 39(3): 133-141.
19. Raguwanshi A., Joshi S.S., Christakos S. Vitamin D and multiple sclerosis. *J Cell Biochem*. 2008; 105(2): 338-343.
20. Penckofer S., Kouba J., Byrn M., et al. Vitamin D and depression: where is All the sunshine? *Issues Ment Health Nurs*. 2012; 31(6): 385-393.
21. DeLuca H.F. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep*. 2014 Jan 8; 3: 479.
22. Esvelt R.P., Schoens H.K., DeLuca H.F. Vitamin D₃ from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. *Arch Biochem Biophys*. 1978; 188: 282-286.
23. Holick M.F., Frommer J.E., McNeill S.C. et al. Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1977; 76(1): 107-114.
24. Shoback D., Marcus R., Bikle D. et al. Metabolizm składników mineralnych i choroby metaboliczne kości W: Greenspan F.S., Gardner D.G. *Endokrynologia ogólna i kliniczna*. Czelej, Lublin, 2004: 305-311.
25. Łukaszewicz J., Lorenc R. Homeostaza Wapnia i Fosforanów: Mechanizmy, regulacja i ich etiopatogeneza. W: Milewicz A. i wsp. *Endokrynologia Kliniczna, Tom 2, PTE*, Wrocław, 2012: 169-176.

26. Napiórkowska L., Franek E. Rola oznaczania witaminy D w praktyce klinicznej. *Choroby Serca i Naczyn.* 2009; 6(4): 203-210.
27. Prosser D.E., Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29(12): 664-673.
28. Marcinkowska-Suchowierska E., Walicka M., Tałałaj M. i wsp. Vitamin D supplementation in adults-guidelines. *Endokrynol Pol.* 2010; 61 Suppl 1: 723-729.
29. White P., Cooke N. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11(8): 320-327.
30. Kittson M.T., Roberts S.K. D-livering the message: The importance of vitamin D status chronic liver disease. *J Hepatol.* 2012; 57(4): 897-909.
31. Carlberg C., Campbell M.J. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of well-defined transcription factor. *Steroids.* 2013; 78(2): 127-136.
32. Deeb K.K., Trump D.L., Johnson C.S. Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(9): 684-700.
33. Dusso A.S. Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D and VDR activation. *Kidney Int. Suppl* 2011; 1(4): S136-S141.
34. Nemere I., Farach-Carson M.C., Rohe B. et al. Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)₂D₃ membrane binding protein (1,25D₃-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004; 101(19): 7392-7397.
35. Norman A.W. Minireview: Vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology.* 2006; 147(1):5542-5548.
36. Hsieh J.C., Jurukta P.W., Galligan M.A. et al. Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proc Natl Acad Sci.* 1991; 88:9315-8319.
37. Morelli S., Buitrago C., Boland R. et al. The stimulation MAP kinase by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ in skeletal muscle cell is mediated by protein kinase C and calcium. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 173(1-2): 41-52.
38. McGuire T.F., Trump D.L., Johnson C.S. Vitamin D₃-induced apoptosis of murine squamous cell. Selective induction of caspase-dependent MEK cleavage and up-regulation of MEKK-1. *J Biol Chem.* 2001; 276(28):26365-26373.
39. Fleet J.C. Molecular actions of vitamin D contributing to cancer prevention. *Mol Aspects Med.* 2008; 29(6): 388-396.

40. Seubwai W., Wongkham C., Puapairoy A. et al. Overexpression of vitamin D receptor indicates a good prognosis for cholangiocarcinoma: implications for therapeutics. *Cancer*. 2007; 109(12):2497-2505.
41. Tuohimaa P. Vitamin D, aging, and cancer. *Nutr.Rev.*2008; 66(Suppl.2): S147-152.
42. Lizis-Kolus K. Hubalewska-Dydejczyk A., Trofimiuk-Muldner M. i wsp. Ocena stężenia 25(OH)D3 w grupie chorych z rakiem brodawkowym tarczycy w porównaniu do chorych z chorobą Hashimoto. *Przegląd Lek.* 2013; 70: 920-925.
43. Bolanowski M. Regulacja hormonalna metabolizmu mineralnego i kostnego. W: Antczak A., Myśliwiec M , Pruszczyk P. Zgliczyński W., red. *Wielka Interna cz.I, Medical Tribune, Warszawa, 2011: 352-355.*
44. Christakos S., DeLuca H. Minireview: Vitamin D: Is there a role in extraskeletal health? *Endocrinology*. 2011; 158(8): 2930-2936.
45. Krishnan A.V., Moreno J., Nonn L. et al. Calcitriol as a chemopreventive and therapeutic agent in prostate cancer: role of anti-inflammatory activity. *J Bone Miner Res.* 2007; 22:(Suppl 2), V74-V80.
46. Lucia M.S. Inflammation as a target for prostate cancer chemoprevention: pathological and laboratory rational. *J Urol.* 2004; 171(2 Pt 2): S30-34.
47. Khadz Kou K., Buchwald P., Westin G. et al. 25-hydroxyvitamin D3 1- α -hydroxylase and vitamin D receptor expression in papillary thyroid carcinoma. *J. Histochem Cytochem.* 2006; 54(3): 355-361.
48. Raimondi S., Johansson H., Maisonneuve P. et al. Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. *Carcinogenesis*.2009; 30(7): 1170-1180.
49. Chen L., Davey Smith G., Evans D.M.et al. Genetic variants in the vitamin D receptor are associated with advanced prostate cancer at diagnosis: findings from the prostate testing for cancer and treatment study and systemic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*2009; 18(11): 2874-2881.
50. Köstner K., Denzer N., Müller C.S. et al. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res.* 2009; 29(9): 3511-3536.
51. Holick M.F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80(6): 1678-1688.
52. Boscoe F.P., Schymura M.J. Solar ultraviolet B exposure and cancer incidence and mortality in the United States. *BMC Cancer.* 2006; 10(6): 264-314.

53. Ali M.M., Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J. Cancer Res Ther.* 2007; 3(4): 225-230.
54. Holick M.F. Sunlight and Vitamin D for bone, health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular diseases. *Am J Clin Nutr.*2004; 80(6 Suppl): S1678-1688.
55. Goel R.K., Harbans Lal. Role of Vitamin D Supplementation in Hypertension. *Ind. J.Clin. Biochem.* 2011; 26(1): 88-90.
56. Reddy Vanga S., Good M., Howard P.A. et al. Role of vitamin D in cardiovascular health. *Am J Cardiol.* 2010; 106: 798-805.
57. Kim D.H., Sabour S., Sagar U.N. et al. Prevalence of hypovitaminosis D in cardiovascular diseases (from National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2004). *Am J Cardiol.* 2008; 102(11): 1540-1544.
58. Adams J.S., Hewison M. Update in Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010(2); 95: 471-478.
59. Boucher B. Vitamin D, obesity, and risk of diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 2(5): 361-362.
60. Kremer R., Campbel P.P., Reinhardt T. et al. Vitamin D status and its relationship to body fat, final height, and peak bone mass in young women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(1): 67-73.
61. Li J., Byrne M.E., Chang E. et al. Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 112(1-3): 122-126.
62. Harel M., Shoenfeld Y. Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality? *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1069: 322-345.
63. Prietl B., Treiber G.,Prieber T.R. et al. Vitamin D and immune function. *Nutrients.* 2013; 5(7): 2502-2521.
64. Arnson Y., Amital H., Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(9): 1137-1142.
65. Chen S., Sims G.P., Chen X.X. et al. Modulatory effects of 1,2-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J. Immunol.*2007; 179(3): 1634-1647.
66. Aranow C. Vitamin D and Immune System. *J Investig Med.* 2011; 59(6): 881-886.
67. Sigmundsdottir H., Pan J., Debes G.F. et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL 27. *Nat Immunol.* 2007; 8(3): 285-293.
68. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol.* 2012; 76(3): 315-325.

69. Jeffery L.E., Burke F., Mura M. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and interleukin-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 2009; 183(9): 5458-5467.
70. Rudensky A.Y. Regulatory T cells and FoxP3. *Immunol Rev.* 2011; 241(1): 260-268.
71. Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A. et al. *In vitro* generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1) - and Th2- inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002; 195 (5): 603-616.
72. Chun R.F., Adanis J.S., Hewison M. Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *J. Endocrinol.* 2008; 198: 261-269.
73. Ginde A.A., Mansbach J.M., Camargo Jr C.A. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med.* 2009; 169(4): 384-390.
74. Grant W.B., Cross H.S., Garland C.F. et al. Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in western Europe. *Prog Biophys Mol Biol.* 2009; 99(2-3):104-113.
75. Marcinkowska-Suchowierska E., Walicka M. Niedobory witaminy D - narastający problem społeczny. *Fam Med. Prim Care Rev.* 2009; 11: 691-698.
76. Bruyere O., Malaise O., Neuprez A. et al. Prevalence of vitamin D inadequacy in European postmenopausal women. *Curr Med Res Opin.* 2007; 23(8): 1939-1944.
77. Gaugris S., Heaney R.P., Boonen S. et al. Vitamin D inadequacy among postmenopausal women: a systematic review. *Q J M.* 2005; 98(9): 667-676.
78. Merlo C., Ross C., Trummel M. et al. Prevalence and symptoms of vitamin D deficiency in general practice. *Praxis (Bern 1994).* 2012; 101(22): 1417-1422.
79. Kramer J., Diehl A., Lehnert H. Epidemiological study on the dimension of vitamin D deficiency in North Germany. *Dtsch Med Wochenschr.* 2014; 139(10): 470-475.
80. Valtueña J., Gonzales-Gross M., Hybrechts I. et al. Factors associated with vitamin D deficiency in European adolescents: the Helena Study. *J Nutr Sci Vitaminol. (Tokyo)* 2013; 59(3): 161-171.
81. Kaehler S.T., Baumgartner H., Jeske M. et al. Prevalence of hypovitaminosis D and folate deficiency in healthy young female Austrian students in a health care profession. *Eur J Nut.* 2012; 51(8): 1021-1031.

82. Vandevijvere S., Amsalkhir S., Van Oyen H. et al. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant women: a national cross-sectional survey. *PLoS. One.* 2012; 7: e 43868.doi: 10.1371/journal.pone.0043868. Epub 2012 Aug 24.
83. Bartoszewicz Z., Kondracka A., Krasnodębska-Kiljańska M. et al. Vitamin D insufficiency in healthy pregnant women living in Warsaw. *Ginekol Pol.* 2013; 84(5): 363-367.
84. Andersen R., Brot C., Ovesen L. Towards a strategy for optimal vitamin D fortification (OPTIFORD). *Nutr Metab Dis.* 2001; 11(4 suppl.): 74-77.
85. Napiórkowska L., Budlewski T., Jakubas-Kwiatkowska. i wsp. Częstość występowania małego stężenia witaminy D w surowicy starszych kobiet w Polsce. *Pol Arch Med. Wewn.* 2009; 119: 669.
86. Chlebna-Sokół D., Golec J. Kalarus J. Vitamin D supplementation in children and adolescents in Poland. *Standardy Medyczne. Pediatria (Napoli).* 2012; 9: 701-704.
87. Kaczmarewicz E., Kryśkiewicz E., Skorupa E at al. Ocena zaopatrzenia organizmu w witaminę D w prezentowanej grupie dzieci polskich. *Standardy Medyczne. Pediatria (Napoli).* 2012; 9: 727.
88. Czech-Kowalska J. Płudowski P., Dobrzańska A. et al. Wpływ suplementacji witaminy D na stężeni 25-hydroksywitaminy D u noworodków urodzonych o czasie. *Standardy Medyczne. Pediatria (Napoli).* 2012; 9: 729.
89. Płudowski P., Socha P., Kaczmarewicz E. et al. Vitamin D supplementation and 25-hydroxyvitamin D in infants – a prospective cohort observational study. *J Ped Gastroenterol Nutr.* 2011; 93-99.
90. Napiórkowska L., Budlewski T., Jakubas-Kwiatkowska W. et al. Prevalence of low serum vitamin D concentration in an urban population of elderly women in Poland. *Pol Arch Med Wewn.* 2009; 119(11): 699-703.
91. Żmijewska M.A., Kmiec P., Waszak P.M. et al. Vitamin D deficiency in population of pomeranian region of Poland. *Standardy Medyczne. Pediatria (Napoli).* 2012; 9:735.
92. Holick M.F. Vitamin D status: Measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol.* 2009; 19(2): 74-78.
93. Łącka K., Maciejewski A. Współczesne poglądy na temat etiopatogenezy autoimmunologicznego zapalenia tarczycy (choroby Hashimoto). *Pol Merk Lek.* 2011; XXX,176: 132-138.
94. Kochman M. Zapalenia tarczycy. W: Antczak A., Myśliwiec M., Pruszczyk P., Zgliczyński W., red. *Wielka Interna cz.I. Medical Tribune, Warszawa, 2011: 280-285.*

95. Zaletel K, Gaberšček S. Hashimoto's thyroiditis: from genes to the disease. *Curr Genomics*. 2011;12(8): 576-588.
96. Czarnocka B, Ruf J, Fernand M et al. Purification on human thyroid peroxidase and its identification as microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett*.1985;190:147-152.
97. Hollowell J.G., Staehling N.W., Flanders W.D. et al. Serum TSH, T(4) and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*.2002; 87: 489-499.
98. Bjoro T., Holmen J., Krüger O. et al. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The Health Study of Nord-Trøndelag (HUNT). *Eur J Endocrinol*. 2000; 143(5):639-647.
99. Kasagi K., Takahashi N., Inoue G. et al. Thyroid function in Japanese adults as assessed by general health checkup system in relation with thyroid-related antibodies and other clinical parameters. *Thyroid*. 2009; 19: 937- 944.
100. Effraimidis G., Wiersinga W.M. Autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol*. 2014; 170(6):R 241-R 252.
101. Koopmans M., Kremer Hovinga I.C., Bealde H.J. et al. Chimerism occurs in thyroid, lung, skin, lymph nodes of women with sons. *J Reprod Immunol*. 2008; 78: 68-75.
102. Segni M., Wood J. Pucarelli I. et al. Clustering of autoimmune thyroid diseases in children and adolescents: a study of 66 families. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001; 14: 1271-1275.
103. Marwaha R.K., Sen S., Tandon N. et al. Familial aggregation of autoimmune thyroiditis in first-degree relatives of patients with juvenile autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2003; 13:297-300.
104. Philips D.I., Shields D.C., Dugoujon J.M. et al. Complex segregation analysis of thyroid autoantibodies: are they inherited as an autosomal dominant trait? *Hum Hered*. 1993; 43: 141-146.
105. Villanueva R, Greenberg D.A. Davies T.F. et al. Sibling recurrence risk in autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2003; 13: 761-764.
106. Dittmar M., Libich C. Brenzel T.,et al. Increased familial clusterin of autoimmune thyroid diseases. *Horm. Metab. Res*. 2011; 43: 200-204.

107. Brix T.H., Hansen P.S. Kyvik K.O. et al. Aggregation of thyroid autoantibodies in first-degree relatives of patients with autoimmune thyroid disease is mainly due to genes: a twin study. *Clin Endocrinol. (Oxf)*. 2004; 60: 329-334.
108. Jabrocka-Hybel A., Skalniak A., Piątkowski J. et al. How far are we from understanding the genetic basis of Hashimoto's thyroiditis? *Intern Rev Immunol*. 2013; 32(3): 337-354.
109. Xie M., Li J., Jiang T. Accurate HLA type inference using a weighted similarity graph. *BMC Bioinformatics*. 2010 Dec 14;11 Suppl 11:S10.
110. Barret J.C., Hansoul S., Nicola M.D. et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008; 40 (8): 955-962.
111. 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): 439-445.
112. Sakai K., Shirasawa S., Ishikawa N. et al. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 2001 10 (13): 1379-1386.
113. Collins J., Heward J.M., Carr-Smith J. et al. Association of rare thyroglobulin gene microsatellite variant with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88 (10): 5039-5042.
114. Ban Y., Tozaki T., Taniyama M et al. Association of thyroglobulin gene polymorphism with Hashimoto's thyroiditis in the Japanese population. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2004; 61: 263-268.
115. Belguith-Maalej S., Rebuffat S.A., Charfeddine I. et al. SLC26A4 expression among autoimmune thyroid tissues. *Immunobiology*. 2011; 216(5): 571-578.
116. Yoshida A., Hisatome I., Taniguchi S. et al. Pendrin is a novel autoantigen recognized by patients with autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94 (2): 442-448.
117. Ito C., Watanabe M., Okuda N. et al. Association between the severity of Hashimoto's disease and the functional +847A/T polymorphism in the interferon-gamma gene. *Endocr J*. 2006; 53: 473-478.
118. Yamada H., Watanabe M., Nanba T. et al. The +869T/C polymorphism in the transforming growth factor-beta1 gene is associated with the severity and intractability of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*. 2008; 151: 379-382.

119. Ban Y., Taniyama M., Ban Y. Vitamin D receptor gene polymorphisms in Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid*. 2001; 11: 607-608.
120. Lin W.Y., Wan L., Tsai C.H. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with risk of Hashimoto's thyroiditis in Chinese patients in Taiwan. *J Clin Lab Anal*. 2006; 20: 109-112.
121. Stefanič M., Papič S., Suver M. et al. Association of vitamin D receptor gene 3'-variants with Hashimoto thyroiditis in the Croatian population. *Int J Immunogenet*. 2008; 35: 125-131.
122. Tomer Y. Hepatitis C and interferon induced thyroiditis. *J Autoimmun*. 2010; 34: J322-326.
123. Barbesino G. Drugs affecting thyroid function. *Thyroid*. 2010; 20: 763-770.
124. Nanba T., Watanabe M., Inoue N. et al. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Grave's disease. *Thyroid*. 2009; 19: 495-501.
125. Stasi G., De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2002; 2: 195-204.
126. Łącka K., Maciejewski A. Udział witaminy D w etiopatogenezie autoimmunologicznego zapalenia tarczycy. *Pol Merk Lek*. 2013; XXXIV,203: 281-285.
127. Adams J.S., Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008; 4(2): 80-90.
128. Yang C.Y., Leung P.S., Adamopoulos I.E. The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;45(2): 217-226.
129. Mazopakis E.E., Dimitrios A. et al. Hashimoto's autoimmune thyroiditis and vitamin D deficiency. Current aspects. *Hell. J. Nucl. Med*. 2014; 17(1): 37-40.
130. Antico A., Tampoia M., Tozzoli R. et al. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases ? A systematic review of the literature. 2012; 12(2): 127-136.
131. Tamer G. Arik S., Tamer I. et al. Relative vitamin D insufficiency in Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid* 2011; 21(8): 891-896.
132. Shin D.Y, Kim K.J., Kim D. et al. Low serum vitamin D is associated with anti-thyroid peroxidase antibody in autoimmune thyroiditis. *Yonsei Med J*. 2014; 55(2): 476-481.

133. Mansournia N., Mansournia M.A., Saeedi S. et al. The association between serum 25OHD levels and hypothyroid Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest.* 2014; 37(5): 437-436.
134. Camurdan O.M., Döğer E., Bideci A. et al. Vitamin D status in children with Hashimoto thyroiditis. *J Pediatr Metab.* 2012; 25(5-6): 467-470.
135. Choi Y.M., Kim W.G., Kim T.Y. et al. Low levels of serum vitamin D3 are associated with autoimmune thyroid disease in pre-menopausal women. *Thyroid.* 2014; 24(4): 655-661.
136. Goswami R., Marwaha R.K., Gupta N. et al. Prevalence of vitamin D deficiency and its relationship with thyroid autoimmunity in Asian Indians: a community-based survey. *Br J Nutr.* 2009; 102(3): 382-386.
137. Effraimidis G., Badenhop K., Tijssen J.G. et al. Vitamin D deficiency is not associated with early stages of thyroid autoimmunity. *Eur J Endocrinol.* 2012; 167(1): 43-48.
138. Chailurkit L.O., Aekplakorn W., Ongphiphadhanakul B. High vitamin D status in younger individuals is associated with low circulating thyrotropin. *Thyroid.* 2013; 23(1): 25-30.
139. Zhang Q., Wang Z., Sun M. et al. Association of high vitamin D status with low circulating thyroid-stimulating hormone independent of thyroid hormone levels in middle-aged and elderly males. *Int J Endocrinol.* 2014; 2014: 631819. doi: 10.1155/2014/631819. Epub 2014 Feb 16.
140. Zaidman V.E., Maceiras M., Lazzati J.M. et al. High prevalence of anti-thyroid antibodies associated with a low vitamin D status in pediatric cohort. *Clin. Chem Lab Med.* 2014; 52(6): 119-122.
141. Mackawy A.M.H., Al-Ayed B.M., Al-Rashidi B.M. Vitamin D deficiency and its association with thyroid disease. *Int J Health Sci (Qassim).* 2013; 7(3): 267-275.
142. Anderson L., Middleton W.D., Teefey S.A et al. Hashimoto thyroiditis: Part 1, sonographic analysis of the nodular form of Hashimoto thyroiditis. *AJR Am J Roentgenol.* 2010; 195: 208-15.
143. Ceylan I., Yener S., Bayraktar F. et al. Roles of ultrasound and power Doppler ultrasound for diagnosis of Hashimoto thyroiditis in anti-thyroid marker-positive euthyroid subjects. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* (<http://www.amepc.org/qims>) Vol 4, No 4 (August 2014).

144. Kawahara M., Iwasaki Y., Sakaguchi K. et al. Predominant role of 25OHD in the negative regulation of PTH expression: clinical relevance for hypovitaminosis D. *Life Sci.* 2008; 82(13-14): 677-683.
145. Ignjatovic V.D., Matovic M.D., Vukomanovic V.R. et al. Is there a link between Hashimoto's thyroiditis and primary hyperparathyroidism? A study of serum parathormone and anti-TPO antibodies in 2267 patients. *Hell J Nucl Med.* 2013; 16(2): 86-90.
146. Valcour A., Blocki F., Hawkins M. et al. Effects of age and serum 25-OH-vitamin D on serum parathyroid hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(11): 3989-3995.
147. Soliman A.T., De Sanctis V., Elalaily R. et al. Vitamin D deficiency in adolescents. *Indian J Endocrinol Metabol.* 2014; 18 (Suppl 1):S9-16.
148. Ruchała M., Szczepanek E. Thyroid ultrasound – a piece of cake? *Endokrynol Pol.* 2010 May-Jun; 61(3): 330-44.
149. Yamashiro I., Saito O.C., Chammas M.C. et al. Ultrasound findings.in thyroiditis. *Radiol Bras.* 2007; 40 (2): 75-79.
150. Anderson L., Middleton W.D., Sharlene A.T. et al. Hashimoto thyroiditis: Part 2, Sonographic analysis of benign and malignant nodules in patients with diffuse Hashimoto thyroiditis. *AJR Am J Roentgenol.* 2010; 195: 216-222.
151. Vassilatou E., Economopoulos T. Coexistence of differentiated thyroid carcinoma with primary thyroid lymphoma in a background of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 709-712 .
152. Franco M., Chavez E., Perez-Mendez O. Pleiotropic Effects of Thyroid Hormones: Learning from Hypothyroidism. *J Thyroid Res.* 2011;2011:321030. doi: 10.4061/2011/321030. Epub 2011 Jun 27.
153. Bizzaro G., Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases: facts and unresolved questions. *Immunol Res.* 2014; Nov 19 [Epub ahead of print].
154. Müller-Hilke B., Mitchinson N.A. The role of HLA promoters in autoimmunity. *Curr Pham Des.* 2006; 12(29): 3743-3752.
155. Brand O. Gough S., Heward J. HLA , CTL-4 and PTPN22: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev Mol Med.* 2005; 17;7(23): 1-15.
156. Menconi F., Monti M.C. Greenberg D.A. et al. Molecular amino-acid signatures in the MHC class II peptide-binding protein pocket predispose to autoimmune thyroiditis in humans and in mice. *Proc Natl Sci USA.* 2008; 105(37): 14034-14039.

157. Jacobson E.M., Yang H., Menconi F. et al. Employing a recombinant HLA-DR3 expression system to dissect major histocompatibility complex II-thyroglobulin peptide dynamism: A genetic, biochemical, and reverse immunological perspective. *J Biol. Chem.* 2009; 284(49): 34231-34243.
158. Kokaraki G., Daniilidis M, Yiangou M et al. Major histocompatibility complex class II (DRB1*, DQA1*, and DQB1*) and DRB1*04 subtypes' associations of Hashimoto's thyroiditis in a Greek population. *Tissue Antigens.* 2009; 73(3): 199-205.
159. Giza S, Galli-Tsinopoulou A, Lazidou P et al. HLA-DQB1*05 association with Hashimoto's thyroiditis in children of Northern Greek origin. *Indian Pediatr.* 2008; 45(6):493-496.
160. Bougacha-Elleuch N, Rebai A, Mnif M. et al. Analysis of MHC genes in a Tunisian isolate with autoimmune thyroid diseases: implication of TNF – 308 gene polymorphism. *J Autoimmun.* 2004 Aug; 23(1):75-80.
161. Schönland S.O., Lopez C., Widmann T. et al. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100 (23): 13471-13476.

