

## Wstęp

Białko TRAIL (ang. *tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*) to glikoproteina należąca do rodziny TNF (ang. *tumor necrosis factor*) mająca zdolność indukowania apoptozy po związaniu się z receptorem śmierci. Cytokina ta może łączyć się z pięcioma receptorami, w tym jedynie dwa z nich: TRAIL-R1 i TRAIL-R2 posiadają tzw. domeny śmierci niezbędne do transdukcji sygnału apoptotycznego. Rola apoptozy indukowanej TRAIL w patomechanizmie chorób autoimmunologicznych tarczycy (ang. *autoimmune thyroid diseases*, AITD), do których należy choroba Gravesa i Basedowa (*Graves' disease*, GD) oraz choroba Hashimoto (*Hashimoto's disease*, HT) nie do końca jest poznana, a polimorfizmy genu *TNFRSF10A* kodującego receptor TRAIL-R1 nie były dotąd analizowane w odniesieniu do AITD.

## Cel pracy

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena stężeń białek sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG oraz częstości występowania alleli polimorfizmów genu *TNFRSF10A* u pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi tarczycy oraz wśród osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej.

## Materiały

Do badania zakwalifikowano 133 pacjentów w wieku od 20 do 81 lat. Grupę badaną stanowiło 92 osoby, w tym 69 osoby z GD oraz 23 osoby z HT, hospitalizowane w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Grupa kontrolna liczyła 41 osób zdrowych, w eutyreozie klinicznej i hormonalnej, bez wola i z ujemnymi przeciwciałami przeciwtrzcycowymi. Od pacjentów zakwalifikowanych do obu grup po wyrażeniu świadomej zgody została pobrana krew do badań genetycznych, biochemicznych oraz oznaczeń immunoenzymatycznych.

## Metody

U każdej osoby zakwalifikowanej do badania dokonano pomiarów antropometrycznych oraz wykonano badania biochemiczne oceniające gospodarkę węglowodanową (glukoza i insulina na czczo), lipidową (cholesterol całkowity, frakcja cholesterolu HDL, frakcja cholesterolu LDL, trójglicerydy), hormonalnej (TSH, fT<sub>3</sub>, fT<sub>4</sub>, anty-TPO, anty-TG, TRAb). Stężenia białek: sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 oraz OPG

oznaczono w surowicy metodą immunoenzymatyczną ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Z krwi obwodowej wyizolowano genomowe DNA, a celu identyfikacji badanych polimorfizmów zastosowano technikę PCR oraz minisekwencjonowanie metodą SNaPshot. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w pakiecie statystycznym R (wersja 4.0).

### Wyniki

W GD oraz HT występują istotnie większe stężenia sTRAIL niż u zdrowych osób. Pacjenci z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto mieli znacząco większe stężenia sTRAIL-R1 w porównaniu do pacjentów z chorobą GD oraz osób z grupy kontrolnej.

Wyniki wykazały, że większe stężenie białka OPG występują u ludzi starszych z chorobą GD, a większym stężeniom OPG towarzyszy również mniejsze stężenie insuliny. W tej grupie stwierdzono także, że im większe stężenie białek sTRAIL i sTRAIL-R1 tym mniejsze stężenia TSH oraz większe  $fT_3$ . U pacjentów otyłych z HT wykazano większe stężenia sTRAIL i sTRAIL-R1. Osoby z tej grupy z podwyższonym stężeniem trójglicerydów również prezentowały większe stężenia białka sTRAIL, a podwyższonemu mianu przeciwciał anti-TPO towarzyszyły mniejsze stężenia sTRAIL-R2 i większe OPG.

Analiza korelacji pomiędzy polimorfizmem rs6557634 a stężeniem cholesterolu całkowitego i frakcją cholesterolu LDL wykazała, że większe stężenia cholesterolu całkowitego i LDL występują u homozygot GG z grupy GD oraz u homozygot AA z grupy HT.

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że w grupie GD głównie nosiciele genotypu GA w polimorfizmie rs6557634 prezentowali znacząco mniejsze stężenie TSH, a w grupie HT homozygoty AA charakteryzowały się większymi wartościami TSH. W grupie GD heterozygoty GA i homozygoty AA miały większe stężenia  $fT_3$  i  $fT_4$ , natomiast z w grupie HT homozygoty AA prezentowały mniejsze stężenia obu hormonów tarczycy. Wariant polimorficzny GA w grupie HT charakteryzował się istotnie największym mianem anti-TG w stosunku do genotypów GG i AA oraz względem grup GD i GK. W grupie GD homozygoty AA prezentowały statystycznie większe wartości TRAb w porównaniu do grupy HT i grupy kontrolnej.

## Wnioski

1. W chorobie Gravesa i Basedowa oraz chorobie Hashimoto występują większe stężenia sTRAIL niż u osób zdrowych. Pacjenci z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto mieli znacząco większe stężenia sTRAIL-R1 w porównaniu do pacjentów z chorobą GD oraz osób z grupy kontrolnej, co może świadczyć o zaangażowaniu tego receptora w proces apoptozy.
2. W grupie GD wykazano, że im większe stężenie białek sTRAIL i sTRAIL-R1 tym mniejsze stężenia TSH oraz większe  $fT_3$ . Uzyskane wyniki świadczą o potencjalnym udziale badanych białek w patogenezie GD.
3. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów nie różniła się znacząco pomiędzy grupami, co może świadczyć o braku ich związku z etiopatogenezą AITD.
4. Nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy polimorfizmami rs2230229, rs20576, rs6557634 a stężeniami białka sTRAIL oraz receptora sTRAIL-R1.
5. Istnieje korelacja polimorfizmu rs6557634 ze stężeniami cholesterolu całkowitego i frakcją cholesterolu LDL u pacjentów z grupy HT i GD, co może wskazywać na potencjalny udział tego polimorfizmu w rozwoju hipercholesterolemii u pacjentów z AITD.
6. Analiza wyników pracy wskazuje na możliwy związek polimorfizmu rs6557634 z zaburzeniami hormonalnymi u pacjentów z AITD.

## 5. Summary

### Introduction

The TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand) protein is a glycoprotein belonging to the TNF (tumor necrosis factor) superfamily member that has the ability to induce apoptosis after binding to the death receptor. This cytokine can connect to five receptors, including only two of them: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have so-called death domains necessary for transduction of apoptotic signal. Role of TRAIL-mediated apoptosis in the pathomechanism of autoimmune thyroid diseases (AITD), which includes Graves' disease (GD) and Hashimoto's disease (HT) is not fully understood, and polymorphisms of the *TNFRSF10A* gene encoding the TRAIL-R1 receptor have not yet been analyzed for AITD.

### Purpose

The aim of this doctoral dissertation was to assess the concentration of sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2, OPG proteins and the frequency of occurrence of alleles of the *TNFRSF10A* gene polymorphisms among patients with autoimmune thyroid diseases and in the control group.

### Material

133 patients aged between 20 and 81 were qualified for the study. The study group consisted of 92 people, including 69 people with GD and 23 people with HT, hospitalized in the Department and Clinic of Endocrinology, Diabetes and Isotope Therapy at the Wrocław Medical University. The control group consisted of 41 healthy people, in clinical and hormonal euthyroidism, without goiter and with negative thyroid antibodies. After receiving an informed consent, patients qualified for both groups received blood for genetic, biochemical and immunoassay tests.

### Methods

Each person qualified for the study underwent anthropometric measurements and biochemical tests assessing carbohydrate (fasting glucose and fasting insulin), lipid (total cholesterol, HDL cholesterol fraction, LDL cholesterol fraction, triglycerides), hormonal (TSH, fT<sub>3</sub>, fT<sub>4</sub>, anti-TPO, anti-TG, TRAb). The sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 and OPG concentrations were evaluated in serum by the enzyme-linked immunosorbent assay method

(ELISA). Genomic DNA was isolated from peripheral blood. PCR and SNaPshot minisequencing method were used to identify the polymorphisms studied. Statistical analysis of the results was carried out in the statistical package R (version 4.0).

## Results

There are significantly higher sTRAIL levels in GD and HT than in healthy people. Patients with Hashimoto's thyroiditis had significantly higher concentrations of TRAIL-R1 compared to patients with GD disease and control group.

The results showed that higher levels of OPG protein occur in older people with GD disease, and higher levels of OPG are also accompanied by lower levels of fasting insulin. In this group it was also found that the higher the concentration of sTRAIL and sTRAIL-R1 proteins, the lower the TSH concentration and the higher  $fT_3$ . Higher levels of sTRAIL have been shown in obese patients with HT and sTRAIL-R1. People in this group with elevated triglyceride levels also showed higher concentrations of sTRAIL protein, and increased anti-TPO antibody titers were accompanied by lower concentrations of sTRAIL-R2 and higher OPG.

Analysis of the correlation between rs6557634 polymorphism and total cholesterol and the LDL cholesterol fraction showed that higher levels of total and LDL cholesterol occur in GG homozygotes from the GD group and in AA homozygotes from the HT group.

The study showed that in the GD group mainly carriers of the GA genotype in the rs6557634 polymorphism they showed significantly lower TSH concentration, and in the HT group AA homozygotes were characterized by higher TSH values. In the GD group, GA homozygotes had significantly higher concentrations of  $fT_3$  and  $fT_4$ , while in the HT group, AA homozygotes showed lower concentrations of both thyroid hormones. Polymorphic variant GA in the HT group, the highest anti-TG titer was significantly higher compared to the GG and AA genotypes and in the GD and GK groups. In the GD group, homozygotes AA showed statistically higher TRAb values compared to the HT group and the control group.

## Conclusions

1. In Graves' disease and Hashimoto's disease there are higher concentrations of sTRAIL than in healthy people. Patients with Hashimoto's thyroiditis had significantly higher concentrations of sTRAIL-R1 compared to patients with GD disease and control group, which may indicate the involvement of this receptor in the process of apoptosis.
2. In the GD group it was shown that the higher concentration of sTRAIL and sTRAIL-R1 proteins, the lower TSH concentration and the higher  $fT_3$ . The obtained results testify to the potential participation of the studied proteins in the pathogenesis of GD.
3. The frequency of genotypes and alleles of the polymorphisms studied did not differ significantly between groups, which may indicate a lack of association with AITD etiopathogenesis.
4. No statistical significance was demonstrated between the rs2230229, rs20576, rs6557634 polymorphisms and the concentrations of the sTRAIL protein and the sTRAIL-R1 receptor.
5. There is a correlation between rs6557634 polymorphism and total cholesterol and LDL cholesterol fraction in HT and GD patients, which may indicate the potential role of this polymorphism in the development of hypercholesterolemia in patients with AITD.
6. Analysis of the results of the study indicates a possible relationship between rs6557634 polymorphism and hormonal disorders in patients with AITD.