



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia
Izotopami**

Agnieszka Zembska

**Rola białka TRAIL i jego wybranych receptorów
oraz polimorfizm genu *TNFRSF10A*
w chorobach autoimmunologicznych tarczycy**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Promotor:
prof. dr hab. n. med. Marek Bolanowski**

Wrocław 2020

Recenzenci:

dr hab. n. med. Agata Baldys-Waligórska prof. nadzw.

Katedra Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych
Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego w Krakowie

prof. dr hab. n. med. Bogdan Marek

Katedra Patofizjologii i Endokrynologii
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

*Serdecznie podziękowania składam Panu Profesorowi
Markowi Bolanowskiemu za pomoc w realizacji projektu,
cenne sugestie i wskazówki podczas pisania tej pracy.*

*Dziękuję pracownikom Katedry i Kliniki Endokrynologii,
Diabetologii i Leczenia Izotopami za okazaną życzliwość i pomoc,
a także mojej rodzinie za cierpliwość i wsparcie.*

Spis treści

Spis tabel	8
Spis rycin.....	10
1. Wprowadzenie.....	12
1.1. Autoimmunologiczne choroby tarczycy.....	12
1.1.1. Zapalenie tarczycy Hashimoto	14
1.1.1. Choroba Gravesa i Basedowa.....	17
1.2. TRAIL	21
1.2.1. Charakterystyka ogólna.....	21
1.2.2. Lokalizacja i budowa białka TRAIL	23
1.2.3. Rola białka TRAIL.....	24
1.2.4. Receptory białka TRAIL.....	25
1.3. Zjawisko apoptozy.....	30
1.4. Znaczenie apoptozy w patogenezie autoimmunologicznych chorób tarczycy.....	34
1.5. Polimorfizm genu <i>TNFRSF10A</i>	38
2. Założenia i cel pracy	41
3. Materiał i metodyka	42
3.1. Charakterystyka badanych grup	42
3.2. Metodyka	44
3.2.1. Metody oceny parametrów gospodarki węglowodanowej, gospodarki lipidowej oraz przeciwciał przeciw tarczycowych, TSH i hormonów tarczycy	44
3.2.2. Metoda oceny stężeń białek sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG	45
3.2.3. Metoda identyfikacji trzech polimorfizmów genu <i>TNFRSF10A</i>	46
3.2.4. Analiza statystyczna	48
4. Wyniki.....	49
4.1. Analiza parametrów antropometrycznych u pacjentów z AITD	49
4.2. Analiza parametrów gospodarki węglowodanowej u pacjentów z AITD.....	50
4.3. Analiza parametrów gospodarki lipidowej u pacjentów z AITD	51
4.4. Analiza parametrów gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD.....	51
4.5. Ocena stężeń sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej.....	55
4.6. Analiza korelacji między stężeniem sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG a wiekiem, BMI, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej u pacjentów z AITD.....	57

4.7.	Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów: rs2230229, rs20576, rs6557634 u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej	62
4.8.	Analiza korelacji występowania genotypów badanych polimorfizmów ze stężeniem sTRAIL i sTRAIL-R1 u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej	65
4.9.	Analiza korelacji częstości występowania polimorfizmów z wiekiem, BMI, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej.....	68
5.	Dyskusja.....	85
5.1.	Porównanie stężeń sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG u pacjentów z AITD	85
5.2.	Analiza korelacji między stężeniami sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG a wiekiem, BMI, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej u pacjentów z AITD.....	90
5.3.	Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów: rs2230229, rs20576, rs6557634 u pacjentów z AITD.....	92
5.4.	Analiza korelacji występowania częstości genotypów badanych polimorfizmów ze stężeniem sTRAIL i sTRAIL-R1 u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej.....	96
5.5.	Analiza korelacji występowania częstości genotypów badanych polimorfizmów z wiekiem, BMI, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej u pacjentów z AITD.....	96
5.6.	Perspektywy kontynuowania omawianych w pracy zagadnień.....	98
5.7.	Zalety i ograniczenia pracy.....	99
6.	Wnioski	100
7.	Streszczenie.....	101
8.	Summary	105
9.	Piśmiennictwo.....	108

Wykaz skrótów

- anty-TG - (*ang. anti-thyroglobulin antibodies*) - przeciwciała przeciw tyreoglobulinie
- anty-TPO - (*ang. anti-thyroid peroxidase antibodies*) - przeciwciała przeciw peroksydazie tarczycowej
- Apaf-1 - (*ang. apoptotic protease-activating factor-1*) - czynnik aktywujący proteazy w apoptozie
- BMI - (*ang. body mass index*) - wskaźnik masy ciała
- cAMP - (*ang. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate*) - cykliczny adenozyno-3',5' monofosforan
- c-FLIP - (*ang. FLICE inhibitory protein*) - białko antyapoptotyczne hamujące kaspazę 8
- DISC - (*ang. death-inducing signaling complex*) – kompleks sygnalizacyjny indukujący śmierć komórki
- DR - (*ang. death receptor*) - receptor śmierci
- FADD - (*ang. Fas associated death domain*) – domena śmierci związana z Fas
- fT₃ - (*ang. free triiodothyronine*) – wolna trijodotyronina
- fT₄ - (*ang. free thyroxine*) – wolna tyroksyna
- GD - (*ang. Graves' disease*) – choroba Gravesa i Basedowa
- GO - (*ang. Graves' Orbitopathy*) - orbitopatia tarczycowa w chorobie Gravesa i Basedowa
- HDL - (*ang. high density lipoprotein*) - lipoproteiny o wysokiej gęstości
- HT - (*ang. Hashimoto's thyroiditis*) - choroba Hashimoto
- IFN- α - (*ang. interferon alfa*) - interferon alfa
- IFN- γ - (*ang. interferon gamma*) - interferon gamma
- LDL - (*ang. low density lipoprotein*) - lipoproteiny o niskiej gęstości
- MAPKs - (*ang. mitogen-activated protein kinases*) – kinazy aktywowane mitogenami
- NF- κ B - (*ang. nuclear factor κ B*) – czynnik jądrowy kappa B
- NIS - (*ang. Na/I symporter*) - symporter sodowo-jodowy
- NK - (*ang. natural killer cells*) - naturalne komórki cytotoksyczne
- PCR - (*ang. polymerase chain reaction*) - łańcuchowa reakcja polimerazowa
- PI3K-AKT - (*ang. phosphoinositide-3-kinase/Akt*) - ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT

RANK - (*ang. receptor activator of NF- κ B*) - receptor aktywujący czynnik jądrowy kappa B

RANKL - (*ang. receptor activator of NF- κ B ligand*) - ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B

Tg - (*ang. thyroglobulin*) - tyreoglobulina

TG - (*ang. triglyceride*) - trójglicerydy

Th - (*ang. T-helper*) - limfocyt T pomocniczy

TNF- α - (*ang. tumor necrosis factor α*) - czynnik martwicy nowotworu alfa

TNFR - (*ang. tumor necrosis factor receptor*) - receptor czynnika martwicy nowotworu

TPO - (*ang. thyroid peroxidase*) - peroksydaza tarczycowa

TRAb - (*ang. thyrotropin receptor antibodies*) - przeciwciała przeciwko receptorowi tyreotropiny

TRADD - (*ang. TNFR-associated death domain*) - białko adaptorowe związana z domeną śmierci receptora TNFR1

TRAIL - (*ang. tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) - ligand martwicy nowotworu indukującego apoptozę

Treg - (*ang. regulatory T cells*) - limfocyty T regulatorowe

TSH - (*ang. thyroid stimulating hormone, thyrotropin*) - tyreotropina

Spis tabel

- Tabela 1. Wartość wskaźnika BMI i jego interpretacja zgodne z WHO.
- Tabela 2. Zakresy referencyjne stężeń glukozy, insuliny i lipidogramu.
- Tabela 3. Parametry testów immunoenzymatycznych ELISA.
- Tabela 4. Sekwencje starterów do reakcji PCR.
- Tabela 5. Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genetycznych.
- Tabela 6. Sekwencje starterów do reakcji minisekwencjonowania.
- Tabela 7. Porównanie parametrów antropometrycznych w grupach badanych i kontrolnej.
- Tabela 8. Stężenia glukozy i insuliny w grupach badanych i grupie kontrolnej.
- Tabela 9. Gospodarka lipidowa w grupach badanych i kontrolnej.
- Tabela 10. Charakterystyka parametrów gospodarki hormonalnej w grupach badanych i kontrolnej.
- Tabela 11. Stężenie oznaczanych białek w grupach badanych i kontrolnej.
- Tabela 12. Wartość współczynnika korelacji Spearmana (r) i poziomu istotności statystycznej między stężeniem oznaczanych białek a wiekiem i wartością BMI w grupie HT i GD.
- Tabela 13. Wartość współczynnika korelacji Spearmana (r) i poziomu istotności statystycznej między stężeniem oznaczanych białek a parametrami gospodarki węglowodanowej w grupie HT i GD.
- Tabela 14. Wartość współczynnika korelacji Spearmana (r) i poziomu istotności statystycznej między stężeniem oznaczanych białek a parametrami gospodarki lipidowej w grupie HT i GD.
- Tabela 15. Wartość współczynnika korelacji Spearmana (r) i poziomu istotności statystycznej pomiędzy stężeniem oznaczanych białek a parametrami gospodarki hormonalnej w grupie HT i GD.
- Tabela 16. Analiza rozkładu genotypów badanych polimorfizmów genu *TNFRSF10A* w grupach badanych oraz kontrolnej.
- Tabela 17. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Tabela 18. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs20576 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Tabela 19. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Tabela 20. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a stężeniem oznaczanych w eksperymencie białek w grupach badanych i grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

- Tabela 21. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a stężeniem oznaczanych w eksperymencie białek w grupach badanych i grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 22. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a stężeniem oznaczanych w eksperymencie białek w grupach badanych i grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 23. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a wiekiem i BMI u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 24. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a wiekiem i BMI u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 25. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a wiekiem i BMI u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 26. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki węglowodanowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 27. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki węglowodanowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 28. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki węglowodanowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 29. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki lipidowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 30. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki lipidowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 31. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki lipidowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 32. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 33. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.
- Tabela 34. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Spis rycin

- Rycina 1. Receptory białka TRAIL (na podstawie [152]).
- Rycina 2. Główne szlaki apoptozy.
- Rycina 3. Porównanie grup badanych i kontrolnej pod względem wieku.
- Rycina 4. Rozkład średnich stężeń TSH dla grup badanych i kontrolnej.
- Rycina 5. Rozkład średnich stężeń fT_3 w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.
- Rycina 6. Rozkład średnich stężeń fT_4 w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.
- Rycina 7. Rozkład średnich mian anty-TG w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.
- Rycina 8. Rozkład średnich mian TRAb w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.
- Rycina 9. Rozkład średnich mian anty-TPO w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.
- Rycina 10. Rozkład średnich stężeń sTRAIL w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 11. Rozkład średnich stężeń sTRAIL-R1 w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 12. Analiza korelacji między stężeniem białka sTRAIL a stężeniem trójglicerydów w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 13. Częstość występowania genotypów polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 14. Częstość występowania genotypów polimorfizmu rs20576 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 15. Częstość występowania genotypów polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 16. Rozkład średnich stężeń cholesterolu całkowitego w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 17. Rozkład średnich mian anty-TG w zależności od genotypu polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 18. Rozkład średnich wartości TRAb w zależności od genotypu polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 19. Rozkład średnich stężeń TSH w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 20. Rozkład średnich stężeń fT_3 w skali logarytmicznej w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

- Rycina 21. Rozkład średnich stężeń fT_4 w skali logarytmicznej w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 22. Rozkład średnich mian anty-TG w skali logarytmicznej w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.
- Rycina 23. Rozkład średnich mian TRAb w skali logarytmicznej w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

1. Wprowadzenie

1.1. Autoimmunologiczne choroby tarczycy

Autoimmunologiczne choroby tarczycy lub autoimmunizacyjne choroby tarczycy (*autoimmune thyroid diseases*, AITDs) to najczęściej występujące specyficzno-narządowe choroby o podłożu autoimmunologicznym, do których zalicza się między innymi zapalenie tarczycy typu Hashimoto (*Hashimoto's thyroiditis*, HT) oraz chorobę Gravesa i Basedowa (*Graves' disease*, GD) [1]. Podstawowym patomechanizmem AITD jest utrata tolerancji immunologicznej na antygeny tarczycy, co skutkuje produkcją autoprzeciwciał w krwioobieg i naciekiem limfocytarnym przez limfocyty T CD4+ i CD8+ [2]. W uszkodzeniu tkanek w autoimmunizacyjnej chorobie tarczycy biorą udział zarówno mechanizmy komórkowe, jak i humoralne [1, 3]. W HT przeważa odpowiedź immunologiczna zależna od limfocytów Th1, a indukcja procesu zapalnego skutkuje uszkodzeniem komórek gruczołu tarczowego za pośrednictwem uwalnianych cytokin oraz apoptotycznej śmierci komórek, co prowadzi do niedoczynności tarczycy [4, 5]. Natomiast w GD nadczynność tarczycy rozwija się głównie na skutek obecności przeciwciał przeciwko receptorom tyreotropiny (*TSH receptor antibody*, TRAb), które stymulują komórki tarczycy do nadprodukcji hormonów [6]. Jednak w obu dysfunkcjach gruczołu tarczowego zauważalny jest brak równowagi immunologicznej pomiędzy limfocytami Th1 a Th2 w zależności od stopnia zaawansowania choroby [7].

U osób z AITD występuje niekompetentna odpowiedź układu odpornościowego skierowana przeciwko własnym tkankom, której towarzyszy przewlekły stan zapalny [6]. AITDs są zaliczane do chorób o złożonej etiologii, ponieważ zaburzenia te rozwijają się w wyniku interakcji między wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi [8, 9]. W około 80% udział w pojawieniu się AITD pełnią czynniki genetyczne, w tym rodzinne predyspozycje genetyczne [1]. Czynnikiem ryzyka pojawienia się AITD jest także niesprawnie działający system apoptozy [10].

Cechą charakterystyczną i decydującą w rozpoznaniu AITD jest obecność we krwi specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko własnym antygenom tarczycowym [11]. W AITD wyróżnia się trzy główne antygeny tarczycowe: tyreoglobulinę (*thyroglobulin*, Tg), peroksydazę tarczycową (*thyroid peroxidase*, TPO) i receptor dla TSH (*thyroid stimulating hormone receptor*, TSH-R) [1]. Czwartym ważnym autoantygenem w AITD są przeciwciała

przeciwko symporterowi sodowo-jodowemu NIS (*Na/I symporter*). Badania wykazały, że przeciwciała hamujące NIS występują u około 33% pacjentów z GD oraz u 15% pacjentów z HT [12], a obecność tych autoprzeciwciał hamuje pobieranie jodu, co w konsekwencji wpływa na pracę tarczycy [13].

Występowanie autoimmunologicznego zapalenia tarczycy jest 5-10 razy częstsze u kobiet niż u mężczyzn [1]. Wykazano, że najbardziej narażone na powstawanie zaburzeń pracy tarczycy są kobiety powyżej 45. roku życia, co może wiązać się ze zmianami hormonalnymi w okresie pokwitania [14]. Subkliniczna postać choroby występuje co najmniej 5 razy częściej w stosunku do formy klinicznie jawnej [15]. Rozwój AITD jest procesem długotrwałym, przebiegającym wieloetapowo. Początek choroby jest zwykle trudny do ustalenia, jednak obecnie istnieje wyraźna tendencja do rozpoznawania stanu chorobowego u coraz młodszych pacjentów, w tym u dzieci [16].

Markerami oceniającymi pracę gruczołu tarczowego są: stężenie wolnych frakcji hormonów tarczycy: trijodotyroniny (*free triiodothyronine*, fT_3) i tyroksyny (*free thyroxine*, fT_4) oraz stężenie hormonu wydzielanego przez przysadkę, a mianowicie tyreotropiny (*thyroid stimulating hormone*, TSH); obecność autoprzeciwciał: anty-TPO, anty-Tg, TRAb. Dodatkowo wykonuje się : badanie ultrasonograficzne tarczycy, scyntyografię, a jeśli podejrzewamy zmiany nowotworowe - biopsję aspiracyjną cienkoigłową [6].

1.1.1. Zapalenie tarczycy Hashimoto

Zapalenie tarczycy typu Hashimoto, zwane również przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy (*chronic autoimmune thyroiditis*, cAIT) stanowi około 30% wszystkich chorób autoimmunologicznych [17]. HT jest najczęstszą przyczyną niedoczynności tarczycy. Częstość występowania tej choroby wynosi od 5 do 10% [18, 19]. Choć częstość występowania choroby Hashimoto zwiększa się z wiekiem - zwłaszcza u osób po 60. roku życia, choroba występuje również u osób młodych i dzieci, często u członków rodziny. Częściej występuje także u pacjentów z innymi chorobami autoimmunizacyjnymi, jak np. cukrzycą typu 1, celiakią, reumatoidalnym zapaleniem stawów, bielactwem, niedokrwistością Addisona i Biermera, a także u osób z defektami chromosomalnymi (np. zespoły Downa, Turnera, Klinefeltera) [20].

Patogeneza choroby Hashimoto

HT jest chorobą o nie do końca znanej patogenezie. W proces destrukcyjny zaangażowane są zarówno mechanizmy humoralne, jak i komórkowe [21, 22]. Choroba charakteryzuje się intensywnym naciekiem komórek jednojądrzastych, głównie limfocytów T i B w śródmiąższu pęcherzyków tarczycy [23]. W wyniku nieprawidłowego pobudzenia układu immunologicznego dochodzi do powstawania przeciwciał przeciw-tarczycowych [24]. Przyczyny rozwoju choroby powiązane są z zaburzoną czynnością limfocytów T. U pacjentów z HT występuje mniejsze stężenie limfocytów T regulatorowych [25]. Powoduje to przewlekłe zapalenie tarczycy, które stopniowo niszczy gruczoł tarczowy doprowadzając do zmniejszenia produkcji hormonów [26]. Ponadto ciągłe stymulowanie przez nieprawidłową prezentację antygenów limfocytom T pomocniczym nasila aktywację limfocytów B, które wytwarzają przeciwciała przeciw komórkom tarczycy. Limfocyty B ulegają aktywacji po rozpoznaniu rozpuszczalnego autoantygeny przez receptory limfocytów B (*B-cell receptor*, BCR). Następnie dochodzi do syntezy i wydzielania określonych autoprzeciwciał przez aktywowane limfocyty B. Po aktywacji limfocyty B prezentują autoantygenu komórkom T CD4+, które oddziałują na komórki B powodując ich przedłużoną aktywność. Autoprzeciwciała, które są wytwarzane poprzez aktywne limfocyty B to: anti-TPO i anti-Tg, co potwierdza patogenną rolę komórek B w uszkodzeniu tyreocytów. W obrębie gruczołu tarczowego są produkowane dwa niezbędne do syntezy hormonów tarczycy białka, a mianowicie: TPO i Tg [27]. Tg służy jako matryca dla produkcji hormonów tarczycy T₃ i T₄, a TPO katalizuje ten proces. W wyniku działania przeciwciał anti-TPO i anti-Tg mechanizm

ten zostaje zaburzony, dochodzi do niewystarczającej produkcji hormonów, co jest przyczyną rozwijającej się niedoczynności gruczołu tarczowego. Wysokie stężenie przeciwciał anty-TPO obecne jest u 90% pacjentów z HT [28].

Autoreaktywne limfocyty T wydzielają wiele różnych cytokin, które zaostwiają proces zapalny, upośledzają funkcję tarczycy i prowadzą do nasilenia apoptozy komórek nabłonka gruczołu tarczowego [29]. W przypadkach ciężkiej postaci HT zauważa się podwyższony stosunek Th1 do Th2, większe stężenie wewnątrz tarczycowych komórek Th17 i IL-17 [30] oraz mniejszy odsetek limfocytów T regulatorowych w porównaniu do Th17 [31]. Warto również wspomnieć o transbłonowym białku typu 1- receptorze martwicy nowotworów indukowanym glukokortykosteroidami (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*, GITR), którego ekspresję możemy wykazać na limfocytach T regulatorowych. GITR wiąże się z ligandem GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein ligand*, GITRL), obecnym na komórkach prezentujących antygen (*antigen-presenting cell*, APC), co skutkuje ustaniem immunosupresji przez limfocyty T regulatorowe, a tym samym „podsycą” autoimmunizację poprzez wzmocnienie komórek Th17 [32]. Udowodniono, że większe stężenie GITRL w surowicy pacjenta z HT dodatnio koreluje z większymi stężeniami komórek Th17 [25]. Liczne doniesienia naukowe wskazują, że w patogenezie HT ważną rolę odgrywa również witamina D [33] oraz IL-21 [34]. W 2020 roku opublikowano wyniki potwierdzające, że stężenie witaminy D w surowicy krwi było mniejsze w grupie pacjentów z HT niż w grupie kontrolnej oraz zaobserwowano ujemną korelację z przeciwciałami anty-TPO i anty-TG. Z drugiej strony, wykazano istotnie większe stężenie IL-21 w grupie pacjentów z HT oraz dodatnią korelację z przeciwciałami anty-TPO, anty-TG oraz TRAb [35].

Etiologia choroby Hashimoto

Choroba Hashimoto ma charakter wieloczynnikowy. Istnieje wiele czynników genetycznych i środowiskowych wpływających na rozwój choroby, przy czym istotne jest też współistnienie innych schorzeń autoimmunizacyjnych [36, 37].

Podatność na HT można łączyć z predyspozycją rodzinną, ponieważ okazuje się, że u 50% członków rodziny chorego stwierdza się obecność przeciwciał przeciwtarczycowych. Ważnym czynnikiem genetycznym mającym wpływ na rozwój HT są określone warianty genów układu HLA (*human leukocyte antigen*). Wskazano na możliwy związek mutacji

w genie HLADR5 z rodzinną predyspozycją do tej postaci zapalenia tarczycy. Udowodniono występowanie zależności pomiędzy obecnością antygenów układu HLA-DR3, DR5, DR2, DQ1 i B8 a podatnością na wystąpienie HT [38]. W rozwoju HT ważną rolę pełnią również polimorfizmy w obrębie genów regulujących układ odpornościowy, takich jak: *CTLA-4*, *CD40*, *PTPN22*, *FOXP3*, *CD25* oraz genów specyficznych dla tarczycy: *TG*, *TSHR*, *TPO*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *DUOX2*, *DUOAXA2* [39, 40, 41].

Czynniki środowiskowe, mające wpływ na rozwój HT to przede wszystkim: nadmierne spożycie jodu, niedobór selenu, niektóre leki o działaniu immunomodelującym, palenie tytoniu, stres, ciąża, infekcje wirusowe i bakteryjne, które inicjują reakcję krzyżową z antygenami tarczycowymi [42].

Rozpoznanie choroby Hashimoto

Rozpoznanie i diagnoza HT opiera się na podstawie objawów klinicznych, obecności przeciwciał przeciwko antygenom tarczycy oraz obrazie ultrasonograficznym gruczołu tarczowego [22].

W chorobie Hashimoto dochodzi do zwiększenia stężenia TSH i zmniejszenia stężenia wolnych hormonów gruczołu tarczowego oraz pojawienia się krążących przeciwciał na antygeny tarczycy (głównie anti-TPO i anti-TG). Z tego względu potwierdzenie rozpoznania choroby Hashimoto opiera się o wyniki badań laboratoryjnych, w których stwierdza się u około 95% pacjentów obecność wysokiego miana przeciwciał anti-TPO [1] i u 60-80% obecność anti-TG [43]. W pełnoobjawowej niedoczynności tarczycy zauważa się zwiększone stężenie TSH w surowicy, oraz niskie stężenia wolnych hormonów obwodowych (fT_4 i fT_3) [44]. W niektórych badaniach wskazywano na istnienie dodatniej korelacji między mianem przeciwciał anti-TPO a nasileniem procesu zapalnego w tarczycy. W badaniach laboratoryjnych z nieprawidłowości, można stwierdzić również niedokrwistość, zwiększone stężenie cholesterolu i hipoglikemie [11]. Natomiast subkliniczna lub utajona niedoczynność tarczycy zwykle przebiega bezobjawowo, a w surowicy krwi można zaobserwować zwiększone stężenie TSH z obecnością prawidłowych wartości fT_3 i fT_4 [44].

1.1.1. Choroba Gravesa i Basedowa

Choroba Gravesa i Basedowa to choroba autoimmunologiczna tarczycy, będąca najczęstszą przyczyną nadczynności gruczołu tarczowego. Inaczej zwana jest rozlanym (miąższowym) wołem toksycznym. GD jest zespołem zaburzeń metabolicznych wynikających z nadmiaru hormonów tarczycy w organizmie [6]. Częstość występowania tego przewlekłego schorzenia wynosi około 1% [45, 46]. Szacuje się, że choroba ta występuje od 4 do 5 razy częściej u kobiet niż u mężczyzn [47], a najwięcej zachorowań przypada na wiek 40-50 lat [48].

Cechą charakterystyczną choroby Gravesa i Basedowa jest obecność różnych typów przeciwciał przeciwko receptorom TSH (TRAb). TRAb są to przeciwciała, które pobudzają działanie tyreocytów, czego skutkiem jest powstanie wola i nadmierna produkcja hormonów tarczycy mimo zahamowania wydzielania TSH przez komórki przysadki [49, 50]. We krwi osób z chorobą Gravesa i Basedowa występują również inne przeciwciała, rozpoznające różne struktury antygenowe komórek pęcherzykowych tarczycy. Do przeciwciał tych należą: anty-TG, anty-TPO, a także przeciwciała przeciwbłonowe [51 - 53]. Przeciwciała anty-TPO są obecne u 75% pacjentów z GD [54], natomiast przeciwciała anty-Tg występują u 30% pacjentów z GD [1]. Ponadto, stwierdza się obecność przeciwciał skierowanych przeciwko determinantom antygenowym, obecnym na komórkach mięśni okołogałkowych oraz fibroblastach tkanki łącznej pozagałkowej. Ostatnie z wymienionych przeciwciał nie uczestniczą prawdopodobnie w patogenezie choroby Gravesa i Basedowa, lecz są syntetyzowane wtórnie, w wyniku procesów zapalnych, toczących się w obrębie pozagałkowej tkanki łącznej [55].

Patomechanizm choroby Gravesa i Basedowa

Powszechnie przyjmuje się, że mechanizm prowadzący do autoimmunizacji u pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa pozostaje nadal słabo poznany [56]. Przyczyną nadczynności tarczycy w GD są krążące przeciwciała stymulujące tarczycę do produkcji hormonów tarczycy [57], a dokładniej autoprzeciwciała skierowane przeciwko TSH-R. TRAb naśladują działanie TSH i nadmiernie aktywują komórki pęcherzykowe tarczycy, co w konsekwencji stymuluje wydzielanie trijodotyroniny i tyroksyny, indukując w ten sposób rozrost i unaczynienie gruczołu tarczowego [58]. Przeciwciała stymulujące tarczycę uczestniczą również w patogenezie jej objawów pozatarczycowych, takich jak oftalmopatia

tarczycowa, obrzęk przedgoleniowy (inaczej dermatopatia tarczycowa) i akropachia tarczycowa [59].

W patogenezie GD w tzw. fazie aktywnej choroby przeważa odpowiedź immunologiczna limfocytów T pomocniczych Th1, natomiast faza nieaktywna związana jest z przewagą odpowiedzi immunologicznej Th2-zależnej [60]. W przebiegu GD dochodzi do upośledzenia nadzoru immunologicznego, polegającego na nieprawidłowym funkcjonowaniu limfocytów T regulatorowych (*regulatory T cells*, Treg) i zmniejszonej zdolności do pobudzenia ich działania. Fizjologicznie limfocyty T regulatorowe, zwane również supresorowymi odpowiedzialne są za usuwanie autoreaktywnych limfocytów T pomocniczych, skierowanych przeciwko strukturalnym antygenom komórek pęcherzykowych tarczycy [61, 62]. Przetrwale nieprawidłowe klony limfocytów T pomocniczych stymulują proliferację i przekształcanie limfocytów B w komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała przeciwtarczycowe, a te łącząc się z TSH-R stymulują wydzielanie hormonów tarczycy [24], a także pobudzają limfocyty T cytotoksyczne, które uszkodzają komórki tarczycy [63]. Utrzymujące się wysokie miano autoantyprzeciwciał skierowanych przeciwko TSH-R stymuluje rozrost komórek pęcherzykowych tarczycy, prowadząc w ten sposób do rozwoju wola i nadczynności tarczycy [50]. Wyróżniamy trzy rodzaje przeciwciał przeciwko receptorom TSH, które mogą powodować różne objawy kliniczne. Przeciwciała stymulujące tarczycę (*Thyroid-Stimulating Antibody*, TSAb) lub immunoglobuliny stymulujące tarczycę (*Thyroid-Stimulating Immunoglobulin*, TSI) działają stymulująco na tyreocyty i powodują nadmierną aktywację czynności komórek pęcherzykowych gruczołu tarczowego, co prowadzi do zwiększonej syntezy hormonów przez tyreocyty. Co ciekawe, TSAb mają zdolność aktywacji receptorów dla TSH przy braku tyreotropiny, a wysokie miano tych przeciwciał przeciwko TSH-R jest charakterystyczną cechą GD [64]. Wiązanie TSAb poprzez epitopy konformacyjne z TSH-R aktywuje odpowiedź komórkową za pośrednictwem cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (3',5'- *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), co przyczynia się do nadmiernej produkcji hormonów tarczycy, a w konsekwencji prowadzi do nadczynności tarczycy, charakteryzującej się większym stężeniem hormonów tarczycy i mniejszym do prawie niewykrywalnego stężeniem TSH. Z tego względu fizjopatologiczny rozwój GD upatruje się w nieustannej stymulacji komórek pęcherzykowych tarczycy poprzez przeciwciała TSAb [65]. Przeciwciała blokujące stymulację tarczycy (*thyroid-stimulation blocking antibody*, TSBAb) lub immunoglobuliny hamujące wiązanie tyreotropiny (*thyrotropin-binding inhibitory immunoglobulins*, TBII) mogą łączyć się z podjednostką α receptora TSH

hamując połączenie TSH z TSH-R w efekcie czego dochodzi do zmniejszenia aktywności gruczołu tarczowego i do rozwoju niedoczynności tarczycy, a nawet do zaniku gruczołu tarczowego [66, 67]. Trzecim rodzajem przeciwciał przeciw tarczycowym są tzw. neutralne TRAb. Mają zdolność do wiązania się z TSH-R, ale nie aktywują tego receptora poprzez szlak sygnałowy cAMP ani też nie hamują działania tyreotropiny [68, 69].

Dodatkowo, pod wpływem cytokin uwalnianych przez autoreaktywne limfocyty T, komórki tarczycy mogą prezentować swoiste autoantygeny tarczycowe poprzez kompleksy cząsteczek zgodności tkankowej MHC klasy II komórkom Th CD4+. Taka zdolność tyreocytów do prezentowania antygenów nie jest fizjologiczną właściwością tych komórek, ponieważ z natury nie posiadają one takiej funkcji [70]. Dodatkowo nieprawidłowa ekspresja kompleksu zgodności tkankowej na komórkach pęcherzykowych tarczycy zwiększa ich zdolność do prezentowania autoantygenów tarczycy w komórkach Th, wzmacniając w ten sposób reakcję immunologiczną [71].

Etiologia choroby Gravesa i Basedowa

Występuje wiele czynników, które mogą pobudzać rozwój GD, w tym czynniki endogenne, zarówno genetyczne, jak i niegenetyczne (wewnątrz tarczycowe) oraz czynniki egzogenne. Jednak według obecnego stanu wiedzy tę chorobę klasyfikuje się jako schorzenie o niewyjaśnionej w pełni etiologii [44].

Choroba Gravesa i Basedowa ma charakter wielogenowy. Za uwarunkowaniem genetycznym omawianego schorzenia przemawia częste występowanie u chorych na GD, antygenów zgodności tkankowej, takich jak: HLA-DRw3, HLA-DRw5, HLA-B8, HLA-Bw35. W badaniach dotyczących choroby Gravesa i Basedowa udowodniono występowanie dodatkowej korelacji między genem HLA klasy II, głównie HLA-DR3 a pojawieniem się objawów chorobowych [72 – 74]. Dobrze udokumentowany jest także udział polimorfizmów w rozwoju GD, do których należy zaliczyć występowanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) w takich genach jak: *TSH-R*, *TG*, *CTLA-4*, *PTPN22*, *CD40*, *CD25*, *FCRL3*, *IL23R* [75]. Genem charakterystycznym dla orbitopatii tarczycowej w chorobie Gravesa i Basedowa (*Graves' Orbitopathy*, GO) jest także *I-23R*. Zauważono związek dwóch SNPs tego genu, a mianowicie rs10889677 oraz rs7530511 z występowaniem GO [76]. Natomiast obecność allela A w polimorfizmie rs179247 w genie kodującym receptor TSH wiąże się z mniejszym ryzykiem ujawnienia się GO wśród młodych

pacjentów z GD [77]. Niedawno skupiono się również na roli polimorfizmów receptora dla witaminy D (*Vitamin D receptor*, VDR) jako czynnika etiologicznym predysponującym do GO. Udowodniono, że występowanie allele C w jednym z polimorfizmów VDR, a dokładnie w rs2228570 (*FokI*) może być czynnikiem ryzyka rozwoju GO [78]. Uważa się jednak, że genetyczne predyspozycje do GD nie są związane tylko z jednym genem o zazwyczaj niewielkim indywidualnym efekcie, a przez zestaw genów [79]. Potwierdzeniem może być istnienie interakcji pomiędzy genami *HLADRB1* i *PTPN22* oraz *HLADRB1* i *CTLA4* a zwiększonym ryzykiem występowania GD u młodych osób [80]. Wiele badań dostarcza także przekonujących dowodów dotyczących występowania genetycznych predyspozycji rodzinnych w rozwoju GD [81]. Co ważne, szacuje się, że u około 17% pacjentów z GD współistnieją również inne schorzenia o podłożu autoimmunologicznym, takie jak: zespół Sjögrena (0,8%), cukrzyca typu 1 (0,9%), bielactwo nabyte (2,6%), przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie żołądka (2,4%), celiakia (1,1%), stwardnienie rozsiane (0,3%), reumatoidalne zapalenie stawów (1,9%), co również dowodzi na uwarunkowanie genetyczne GD [53, 61, 82, 83].

Do niekorzystnych czynników zewnętrznych, mających wpływ na rozwój GD należy zaliczyć przede wszystkim: silny uraz psychiczny, palenie tytoniu, niedobór selenu i witaminy D [84], nadmierną podaż jodu, infekcje wirusowe i bakteryjne [85, 86].

Rozpoznanie choroby Gravesa i Basedowa

Najbardziej charakterystycznym parametrem biochemicznym oznaczanym w celu rozpoznania choroby Gravesa i Basedowa są przeciwciała przeciwko receptorom TSH - TRAb, a ich miano wykazuje związek z nasileniem procesu chorobowego. Rozpoznanie ustala się na podstawie niskiego (lub nieoznaczalnego) stężenia TSH, podwyższonych stężeń w surowicy krwi obwodowych hormonów tarczycy (fT₄, fT₃) [6]. Nieco rzadziej stwierdza się obecność przeciwciał anti-TPO i anti-TG [87]. W badaniu gruczoł tarczowy jest zazwyczaj powiększony. Subkliniczna nadczynność tarczycy jest definiowana jako obniżone stężenie TSH z towarzyszącymi prawidłowymi stężeniami fT₃ i fT₄ [44].

Tarczycyca w badaniu USG jest zwykle równomiernie powiększona, ze zwiększonym unaczynieniem (piekło tarczycowe), z obniżoną niejednorodną echogenicznością [88].

1.2. TRAIL

1.2.1. Charakterystyka ogólna

TRAIL (*Tumor Necrosis Factor related apoptosis-inducing ligand*) to białko należące do nadrodziny białek czynnika martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor*; TNF). Cytokina ta występuje w dwóch postaciach: w postaci związanej z błoną komórkową (*membrane-bound TRAIL*, mTRAIL), jak i w postaci rozpuszczalnej (*soluble TRAIL*, sTRAIL). Białko mTRAIL to glikoproteina typu II, cytokina transbłonowa [89, 90]. Natomiast pochodzenie rozpuszczalnej formy białka TRAIL nie jest do końca poznane. Najprawdopodobniej powstaje ona poprzez cięcie proteolityczne białka TRAIL związanego z błoną komórkową [91]. Białko to zostało odkryte w 1995 roku przez dwa niezależne zespoły badawcze [89, 90]. W odróżnieniu od innych czynników należących do rodziny TNF, które wchodzi w interakcje z jednym lub maksymalnie z dwoma specyficznymi receptorami, cząsteczka TRAIL może wchodzić w interakcje z pięcioma różnymi receptorami. Receptorami dla TRAIL są: TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) oraz osteoprotegeryna (OPG). TRAIL jest czynnikiem proapoptotycznym, a więc może indukować apoptozę przez interakcję z receptorami DR4 i DR5, czyli tzw. receptorami śmierci (*death receptor*, DR). DcR1, DcR2, i OPG nie indukują apoptozy [92]. TRAIL ulega ekspresji na komórkach immunokompetentnych (komórki dendrytyczne, makrofagi, limfocyty T, komórki NK) i wielu tkankach, takich jak: wątroba, płuca, łożysko, nerki, śledziona, serce, mózg, jajnik, jelito cienkie i grube [93-96]. Głównym źródłem sTRAIL są aktywowane monocyty i neutrofile [97]. Cytokina sTRAIL jest zdolna do indukowania apoptozy głównie przez połączenie z TRAIL-R1 [98, 99] i można je oznaczyć w wykrywalnych ilościach w osoczu lub surowicy, a także w innych płynach ustrojowych [100]. Inne nazwy białka TRAIL to: Apo2L (*Apo2 ligand*), TNFRSF10, TL2 (*TNF ligand 2*) CD253, TNLG6A (*TNF ligand gene 6A*) [89].

Glikoproteina TRAIL przyciągnęła wiele uwagi ze względu na zdolność wywołania swoistej indukcji apoptozy w różnych typach komórek nowotworowych poprzez wiązanie z receptorami śmierci i aktywację niezależnego od mitochondrium szlaku przekazywania sygnałów [101]. Co ciekawe, w porównaniu z innymi proapoptotycznymi członkami rodziny TNF, TRAIL ma wyjątkową zdolność do indukowania apoptozy komórek transformowanych, takich jak komórki nowotworowe, jednocześnie nie wykazując lub wykazując niewielką aktywność cytotoksyczną w stosunku do normalnych prawidłowo funkcjonujących komórek i tkanek [102]. Odkrycie tej właściwości zasugerowało, że TRAIL może być obiecującym

czynnikiem selektywnie indukującym apoptozę w komórkach nowotworowych [89, 103]. Chociaż badania przedkliniczne były obiecujące, badania kliniczne z zastosowaniem ludzkiej rekombinowanej TRAIL i przeciwciał agonistycznych, ujawniły jedynie ograniczone korzyści terapeutyczne. Dlatego obecne wysiłki koncentrują się na identyfikacji związków, które silnie i selektywnie uczulają komórki rakowe na apoptozę indukowaną przez TRAIL [103]. Nadekspresja białek antyapoptotycznych i inaktywacja białek proapoptotycznych znacznie zmniejszają apoptozę wywołaną przez TRAIL. Ponowne zrównoważenie pro- i antyapoptotycznych białek oraz zwiększenie regulacji receptorów śmierci za pomocą zewnętrznych i wewnętrznych szlaków apoptotycznych jest konieczne do uwrażliwienia komórek rakowych na leki oparte na TRAIL. Zidentyfikowano wiele mikroRNA (*microRNA*, miRNA), które pozytywnie lub negatywnie regulują apoptotyczną sygnalizację za pośrednictwem TRAIL w komórkach rakowych. Aktualnie wiele zespołów badawczych zajmuje się mechanizmami związanymi z regulacją miRNA w sygnalizacji apoptozy za pośrednictwem TRAIL [104].

Aktualna wiedza dotycząca patomechanizmu chorób powiązanych z TRAIL obejmuje głównie nowotwory, choroby autoimmunologiczne, infekcje wirusowe, choroby metaboliczne i sercowo-naczyniowe [105, 106]. Wykazano, że zwiększone stężenie rozpuszczalnego TRAIL (sTRAIL) jest związane z nowotworzeniem [107], a także z stwardnieniem rozsianym [108], wirusowym zapaleniem wątroby typu B [109] i stłuszczeniem wątroby [110]. Niektóre badania wskazują również na wpływ hormonów tarczycy na ekspresję białka TRAIL w tkankach. Wykazano wzrost ekspresji genu *TRAIL* w mięśniach szkieletowych podczas terapii substytucyjnej L-tyroksyną, a także nadekspresję w liniach komórkowych raka wątroby pod wpływem hormonów tarczycy [111, 112]. Stwierdzono również związek między TRAIL a kilkoma chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego [113], stwardnienie rozsiane [114], toczeń rumieniowaty układowy [115]. Niewiele badań jednak dotyczy wpływu nadczynności tarczycy i niedoczynności tarczycy na stężenie krążącego TRAIL. Bernardi i wsp. w 2017 roku jako pierwsi wykazali związek pomiędzy stężeniami hormonów tarczycy a ekspresją TRAIL *in vivo* i stymulującą ekspresję TRAIL *in vitro* [116].

1.2.2. Lokalizacja i budowa białka TRAIL

Gen kodujący białko TRAIL jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 3 (3q26) [89, 117]. Locus genu *TRAIL* obejmuje około 20 kb, ma pięć segmentów egzonowych, które kodują około 1,77 kb mRNA oraz cztery segmenty intronowe [118, 119].

Białko TRAIL zbudowane jest z 281 aminokwasów. TRAIL związany z błoną komórkową ma masę 33 kDa, natomiast w postaci rozpuszczalnej 20 kDa [120, 121]. Częsteczka TRAIL wykazuje homologię z innymi członkami nadrodziny czynnika martwicy nowotworów. W 28% można zauważyć podobieństwo do liganda białka Fas (*Fas ligand*, FasL), a w 23% homologię do TNF- α [89]. TRAIL składa się z długiej 142-aminokwasowej zewnątrzkomórkowej C-końcowej domeny połączonej domeną transbłonową z krótką 17-aminokwasową N-końcową domeną cytoplazmatyczną [89, 90]. Po cięciu proteolitycznym w domenie transbłonowej poprzez metaloproteiny TRAIL jest uwalniana jako rozpuszczalna cząsteczka o aktywności biologicznej – sTRAIL [91]. Na tym etapie reszta cysteinowa w pozycji 230 (Cys230) pozwala TRAIL oddziaływać i łączyć się z innymi dwiema cząsteczkami TRAIL, tworząc trimeryczny ligand, który stanowi bardziej aktywną biologicznie postać niż monomer [89]. Homotrimery białka TRAIL są proapoptotycznymi agonistami, które wiążą się ze swoistymi receptorami śmierci na powierzchni komórek docelowych i indukują apoptozę. Niezbędne w utrzymaniu aktywności biologicznej, stabilności formy trimerycznej oraz specyficzności działania tej cytokiny, jest obecność na powierzchni białka miejsca wiążącego jon cynku [122].

Gen kodujący białko TRAIL zawiera cztery introny i pięć eksonów, w których zidentyfikowano pięć SNPs. Trzy z nich znajdują się w 3'UTR w loci 1525, 1588 i 1595, podczas gdy dwa pozostałe znajdują się w eksonie 1 w miejscu 1192 i 5912, które nie zmieniają zakodowanej sekwencji aminokwasowej [119]. Badania wykazały, że region 3'UTR *TRAIL*, który nie ulega translacji odgrywa ważną rolę w regulacji genu kodującego białko TRAIL [123]. Polimorfizmy w regionie 3'UTR, w przeciwieństwie do innych polimorfizmów TRAIL, występują częściej w różnych populacjach. Spośród pięciu polimorfizmów w regionie 3'UTR polimorfizmy TRAIL w pozycjach 1525G/A i 1595C/T są funkcjonalnie związane z niektórymi chorobami, takimi jak: rak piersi, prostaty i żołądka, stwardnienie rozsiane i stłuszczenie wątroby [110, 114, 124, 125].

1.2.3. Rola białka TRAIL

Główną funkcją TRAIL jest aktywacja zewnętrznego szlaku apoptotycznego w komórkach nowotworowych po związaniu się z jego specyficznymi receptorami (TRAIL-R1 i TRAIL-R2) [102]. TRAIL jest czynnikiem apoptotycznym i endogennym aktywatorem procesu apoptozy [126]. W badaniach *in vivo* i *in vitro* wykazano, że cząsteczka ta potrafi selektywnie indukować apoptozę w różnych komórkach transformowanych i nowotworowych, ale bez cytotoksycznego wpływu na prawidłowo funkcjonujące komórki i tkanki [127]. Funkcja ta odróżnia białko TRAIL od innych ligandów zaliczanych do rodziny TNF. Uważa się, że prawidłowe komórki posiadają nie jeden, a liczne mechanizmy oporności [128-130]. Przypuszcza się, że komórki prawidłowe mają wyższy stosunek ekspresji receptorów wabików nad receptorami śmierci, ale badania nad tą zależnością nie zostały jeszcze wystarczająco potwierdzone [131].

TRAIL odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego. Jest ważnym czynnikiem, który bierze udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej [132-134]. TRAIL ulega ekspresji w komórkach NK, makrofagach, komórkach T, komórkach dendrytycznych, dlatego uważa się, że uczestniczy w mechanizmie samoobrony poprzez zabijanie komórek zainfekowanych wirusem [14] lub indukowanie apoptozy komórek złośliwych bez wpływu na prawidłowo funkcjonujące komórki. TRAIL pośredniczy również w apoptozie tymocytów i jest ważny w indukcji chorób autoimmunizacyjnych [135]. Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano, że TRAIL posiada zdolność hamowania sygnalizacji receptora komórek T (*T-cell receptor*, TCR) i aktywacji limfocytów T [136], co sugeruje nową rolę immunoregulacyjną TRAIL w chorobach autoimmunologicznych [137].

Aktualne doniesienia naukowe dowodzą, że TRAIL reguluje odpowiedź immunologiczną i homeostazę komórek odpornościowych również poprzez szlak niezależny od apoptozy. TRAIL po związaniu z receptorami śmierci TRAIL-R1 i/lub TRAIL-R2, a także z TRAIL-R4 może zainicjować nie tylko szlak apoptotyczny, ale także przeżycie komórki poprzez aktywację takich cząstek jak: czynnik jądrowy kappaB (NF-kappaB), kinazy aktywowane miogenami MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) czy ścieżkę sygnałową kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (*phosphoinositide-3-kinase/Akt*, PI3K-AKT) [138-141]. Bardzo ważną rolę w tym procesie odgrywa najprawdopodobniej umiejscowienie receptorów dla białka TRAIL w błonie komórkowej. Lokalizacja tych białek w tzw. tratwach lipidowych (*lipid rafts*), czyli domenach w błonie komórkowej wzbogaconych w sterole i inne lipidy prowadzi do formowania kompleksu determinującego

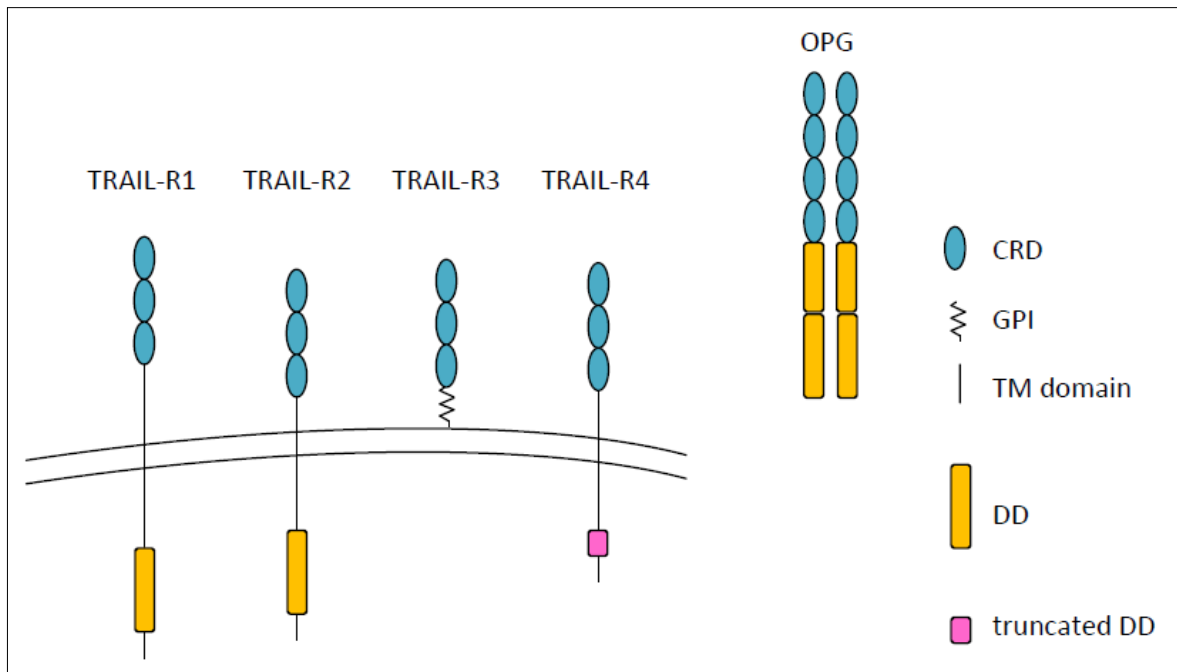
szlak proapoptyczny, natomiast umiejscowienie wyżej wymienionych receptorów TRAIL poza tymi obszarami aktywuje sygnalizację antyapoptyczną [142, 143].

Jak sugerują ostatnie doniesienia naukowe TRAIL ma znaczące działanie metaboliczne. Okazuje się, że cząsteczka ta może być potencjalnym kandydatem do leczenia otyłości i powiązanych z nią chorób. Badania *in vivo* przeprowadzone na myszach wykazały, że osobniki te poddane wysokotłuszczowej diecie przybierają na wadze więcej, jeśli mają niedobór TRAIL [144], a co ciekawe dostarczanie TRAIL znacznie zmniejsza ich masę tłuszczową [145]. Ponadto badania *in vitro* wykazały, że aktywacja TRAIL-R2 blokuje lipogenezę *de novo* w ludzkich adipocytach [146] i że TRAIL hamuje różnicowanie adipocytów [147].

Ostatnie badania sugerują, że TRAIL może również indukować nekroptozę, która jest regulowaną, zaprogramowaną formą martwicy i następuje po związaniu TRAIL z jej specyficznymi receptorami śmierci. Może być użyteczna dla organizmu, gdy komórki stają się odporne na proces apoptozy [148, 149].

1.2.4. Receptory białka TRAIL

TRAIL wchodzi w interakcję z czterema receptorami transbłonowymi TRAIL-R1 do TRAIL-R4 i rozpuszczalnym receptorem osteoprotegeryną. Wszystkie te receptory należą do nadrodziny receptora TNF (*tumor necrosis factor receptor*, TNFR) [150]. TRAIL może indukować lub hamować apoptozę w zależności od rodzaju związanego receptora. Receptory dla białka TRAIL możemy podzielić na te, które uruchamiają aktywację kaskady apoptotycznej oraz te, które hamują ten proces [Rycina 1].



Rycina 1. Receptory białka TRAIL (na podstawie [151]).

Skróty: CRD (*cysteine rich domain*) - domena bogata w cysteinę, GPI (*glycosylphosphatidylinositol*) - glikofosfatydyloinozytol, TM domain (*transmembrane domain*) - domena transbłonowa; DD (*death domain*) - domena śmierci; truncated DD (*truncated death domain*) - skrócona domena śmierci

Receptory dla TRAIL inicjujące apoptozę

Do receptorów białka TRAIL inicjujących apoptozę należą dwa receptory błonowe, a mianowicie TRAIL-R1 i TRAIL-R2, które zawierają domenę cytoplazmatyczną pełnej długości z wewnątrzkomórkową domeną śmierci (*death domain*, DD) [Rycina 1]. Z tego względu TRAIL-R1 i TRAIL-R2 są zdolne do przesyłania sygnału TRAIL do wnętrza komórki inicjując proces apoptozy [152]. Receptory śmierci dla białka TRAIL mogą również występować w formie rozpuszczalnej (*soluble TRAIL receptor*, sTRAIL-R) [98].

Receptory śmierci (*death receptor*; DR) są receptorami na powierzchni komórki, które przekazują sygnały apoptotyczne inicjowane przez przyłączenie się do nich określonych ligandów, takich jak FasL, czynnik martwicy nowotworów alfa (*tumor necrosis factor alpha*; TNF- α) czy TRAIL. Odgrywają one ważną rolę w apoptozie i mogą aktywować kaskadę kaspaz w ciągu kilku sekund od momentu związania z ligandem. Indukcja apoptozy przez ten mechanizm jest zatem bardzo szybka. Wiązanie TRAIL z receptorami DR4 lub DR5 powoduje apoptozę w wielu komórkach. Co ciekawe, istnieją również receptory wabikowe,

które konkurują o wiązanie TRAIL z receptorami DR4 i DR5. Do receptorów śmierci ligandu TRAIL zaliczamy: TRAIL-R1 (DR4) i TRAIL-R2 (DR5) [153].

TRAIL-R1 i TRAIL-R2 są to białka transbłonowe typu I, kodowane przez geny zlokalizowane na krótkim ramieniu chromosomu 8 (8p22-23) [154]. Uważa się, że oba receptory wykazują 58% homologię względem siebie [155]. Receptory te składają się z wewnątrzkomórkowej domeny śmierci (*death domain*, DD) oraz zewnątrzkomórkowej domeny zawierającej powtórzenia bogate w cysteinę [153]. Wykazano, że receptory DR4 i DR5 ulegają ekspresji zarówno w prawidłowo funkcjonujących komórkach, jak i komórkach nowotworowych, a nasilenie ich ekspresji najprawdopodobniej nie ma związku z podatnością komórki do apoptozy [156]. Ekspresja genów kodujących białka TRAIL-R1 i TRAIL-R2 jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne, takie jak: CHOP, AP-1, NF- κ B i FOXO3A [157].

TRAIL-R1 został odkryty w 1997 roku i był pierwszym zidentyfikowanym receptorem śmierci dla białka TRAIL. Inne nazwy receptora TRAIL-R1 to: DR4, TNFRSF10A [158]. TRAIL-R1 jest kodowany przez gen *TNFRSF10A*. TRAIL-R1 zbudowany jest z 486 aminokwasów. Składa się z dwóch pozakomórkowych bogatych w cysteinę, wiążących ligand pseudo-powtórzeń (pętla 50. i 90.), jednej pojedynczej helisy transbłonowej, a także cytoplazmatycznej domeny śmierci wyzwalającej apoptozę. Główne elementy domeny wiążącej ligand DR4 są kodowane przez ekson 3 i 4 [159]. TRAIL-R1 aktywuje apoptotyczne proteazy, które pełnią rolę regulacyjną procesu apoptozy poprzez indukcję oligomeryzacji wewnątrzkomórkowych domen śmierci wymaganych do apoptotycznej transdukcji sygnału [160, 161]. Ekspresję tego receptora, bez obecności DR5, wykazano w komórkach pętli Henlego, nabłonku naczyń oskrzelowych oraz w nabłonku naczyniowym mózgu [96].

TRAIL-R2 został zidentyfikowany również w 1997 roku przez kilka niezależnie działających zespołów badawczych. Inne nazwy receptora TRAIL-R2 to: DR5, TNFRSF10B, Apo2, TRICK2 (*TRAIL receptor inducer of cell killing 2*), KILLER [131, 154, 162, 163]. DR5 jest zbudowane z 440 aminokwasów [162] i jest kodowany przez gen *TNFRSF10B*. Białko to zbudowane jest z części pozakomórkowej, która składa się z typowych dla wszystkich członków rodziny receptorów TNF domen bogatych w cysteinę oraz z części wewnątrzkomórkowej cytoplazmatycznej zawierającej domenę śmierci. Sygnał apoptotyczny indukowany połączeniem się TRAIL z receptorem TRAIL-R2 może być hamowany przez białko fuzyjne TRAIL-R2-Fc. Podobnie jak DR4, TRAIL-R2 aktywuje szlak apoptotyczny zależny od kaspazy, ale w przeciwieństwie do DR4, TRAIL-R2 pośredniczy w apoptozie

poprzez wewnątrzkomórkową cząsteczkę adaptacyjną FADD/ MORT1 [164]. Ekspresję tego receptora, bez obecności DR4, wykazano jedynie w nabłonku dróg żółciowych [96].

Receptory dla TRAIL hamujące apoptozę

Do receptorów hamujących apoptozę dla białka TRAIL należą: TRAIL-R3 [165], TRAIL-R4 [166] i osteoprotegeryna (*osteoprotegerin*, OPG) [167].

Receptor TRAIL-R3 to białko transbłonowe typu III, zbudowane z 259 aminokwasów i kodowane przez gen *TNFRSF10C*. Inne nazwy receptora TRAIL-R3 to: DcR1, TNFRSF10C, TRID (*TRAIL receptor without an Intracellular Domain*), CD263, LIT (*Lymphocyte Inhibitor of TRAIL*) [151]. Cechą charakterystyczną tego receptora jest całkowity brak części wewnątrzkomórkowej i cytoplazmatycznej domeny śmierci [127]. Białko to jest zakotwiczone w błonie plazmatycznej poprzez ugrupowanie glikofosfolipidowe, a dokładniej przez glikofosfatydyloinozytol (*glycosylphosphatidylinositol*, GPI) [163]. Ekspresję tego receptora, bez obecności TRAIL-R4 wykazano w sercu oraz w nabłonku naczyń mózgowych [96].

TRAIL-R4 jest białkiem transbłonowym typu I. Inne nazwy receptora TRAIL-R4 to: DcR2, TNFRSF10D, CD264, TRUNDD (*TRAIL Receptor with truncated Death Domain*) [151]. Wyróżniamy dwa warianty tego białka: TRAIL-R4- α zbudowane z 386 aminokwasów oraz TRAIL-R4- β zbudowane z 348 aminokwasów [168]. Cechą charakterystyczną tego receptora jest skrócona część wewnątrzkomórkowa i brak pełnej cytoplazmatycznej domeny śmierci [169]. Udowodniono, że domena śmierci tego receptora zawiera tylko 24 aminokwasy spośród 76, które budują pełną domenę śmierci receptorów DR4 i DR5 [164]. Ekspresję tego receptora, bez obecności TRAIL-R3 wykazano m.in. w komórkach nabłonka oskrzeli, naczyń krwionośnych płuc i w kanalikach krętych nerki [96].

DcR1 i DcR2 wykazują ścisłą homologię do domen zewnątrzkomórkowych receptorów indukujących apoptozę: DR4 i DR5. Zawierają również domenę cysteinową CRD (*cysteine rich domain*), ale nie posiadają pełnych wewnątrzkomórkowych domen śmierci. Taka budowa sprawia, że receptory te po połączeniu z TRAIL nie powodują aktywacji szlaku apoptozy, a jedynie zmniejszają wysycenie receptorów śmierci białkiem TRAIL, co pośrednio wpływa na zahamowanie zaprogramowanej śmierci komórki [127]. Mogą więc działać jako tzw. receptory wabiki (*decoy receptor*, Dc), chroniące prawidłowe komórki przed apoptozą [170]. Być może wysoka ekspresja tych receptorów ochronnych jest przyczyną oporności

prawidłowo funkcjonujących komórek na proces apoptozy [171]. Ponadto, połączenie TRAIL z TRAIL-R4 może aktywować ścieżkę czynnika jądrowego NF- κ B, co pośrednio chroni komórki przed zaprogramowaną śmiercią [138].

Osteoprotegeryna jest rozpuszczalnym receptorem pozbawionym reszt transbłonowych i cytoplazmatycznych. Częsteczką tą jest białkiem należącym również do rodziny receptorów TNF. OPG jest receptorem zarówno dla liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (*ang. receptor activator of NF-kappa B ligand*, RANKL), a więc wykazuje zdolność wiązania się z RANKL, jak i stanowi rozpuszczalny receptor dla białka TRAIL [172]. OPG jest to glikoproteina zbudowana z 401 aminokwasów i kodowana przez gen *TNFRSF11B*, zlokalizowany na chromosomie 8q24.12. Składa się z 4 domen bogatych w cysteinę oraz dwóch domen śmierci. OPG jest wydzielana przez osteoblasty i reguluje różnicowanie osteoklastów na zasadzie blokowania RANKL [173]. Znaczenie OPG jako receptora dla TRAIL jest jednak niejasne, ponieważ powinowactwo do tego ligandu w temperaturach fizjologicznych jest bardzo niskie [174]. Kilka badań *in vitro* wykazało zdolność OPG do neutralizacji TRAIL. OPG jest zdolna do wiązania się z TRAIL *in vitro*, wykazując działanie antyapoptotyczne prowadzące do blokowania indukowanej przez TRAIL apoptozy. Wydaje się, że OPG – podobnie jak TRAIL-R3 i TRAIL-R4 hamuje apoptozę indukowaną TRAIL przez konkurencyjne blokowanie wiązania TRAIL z jego receptorami śmierci [175]. Ostatnie badania sugerują, że białko to może być zaangażowane w patogenezę chorób sercowo-naczyniowych, rozwój cukrzycy typu 1 i 2 czy choroby nerek. *In vivo* wykazano, że OPG jest czynnikiem propagującym neowaskularyzację względem komórek śródbłonna, a jej stężenie we krwi koreluje ze stopniem zaawansowania procesu miażdżycowego w tętnicach. Hoken i wsp. wykazali, że istnieje ujemna korelacja między stężeniem OPG a zdolnością TRAIL do indukowania apoptozy w komórkach raka prostaty, które endogennie wytwarzały wysoki poziom OPG. Jednak dokładna rola białka TRAIL jako liganda dla OPG jest nadal niejednoznaczna [176].

Ponieważ receptory „wabikowe” wiążą się z TRAIL bez sygnalizowania śmierci komórki, TRAIL-R3, TRAIL-R4 i OPG mogą być receptorami ochronnymi, działającymi jako związane z błoną lub rozpuszczalne antagonistyczne receptory bądź poprzez transdukcję sygnału antyapoptotycznego. Dlatego obecność lub brak TRAIL-R3, TRAIL-R4 i / lub OPG może określać, czy komórka jest odpowiednio oporna lub wrażliwa na indukowaną TRAIL apoptozę [177]. Ponadto wysoką ekspresję tych receptorów wykazano w wielu typach

komórek nowotworowych, co może być przyczyną zmniejszonej aktywności apoptozy w procesie karcynogenezy [178].

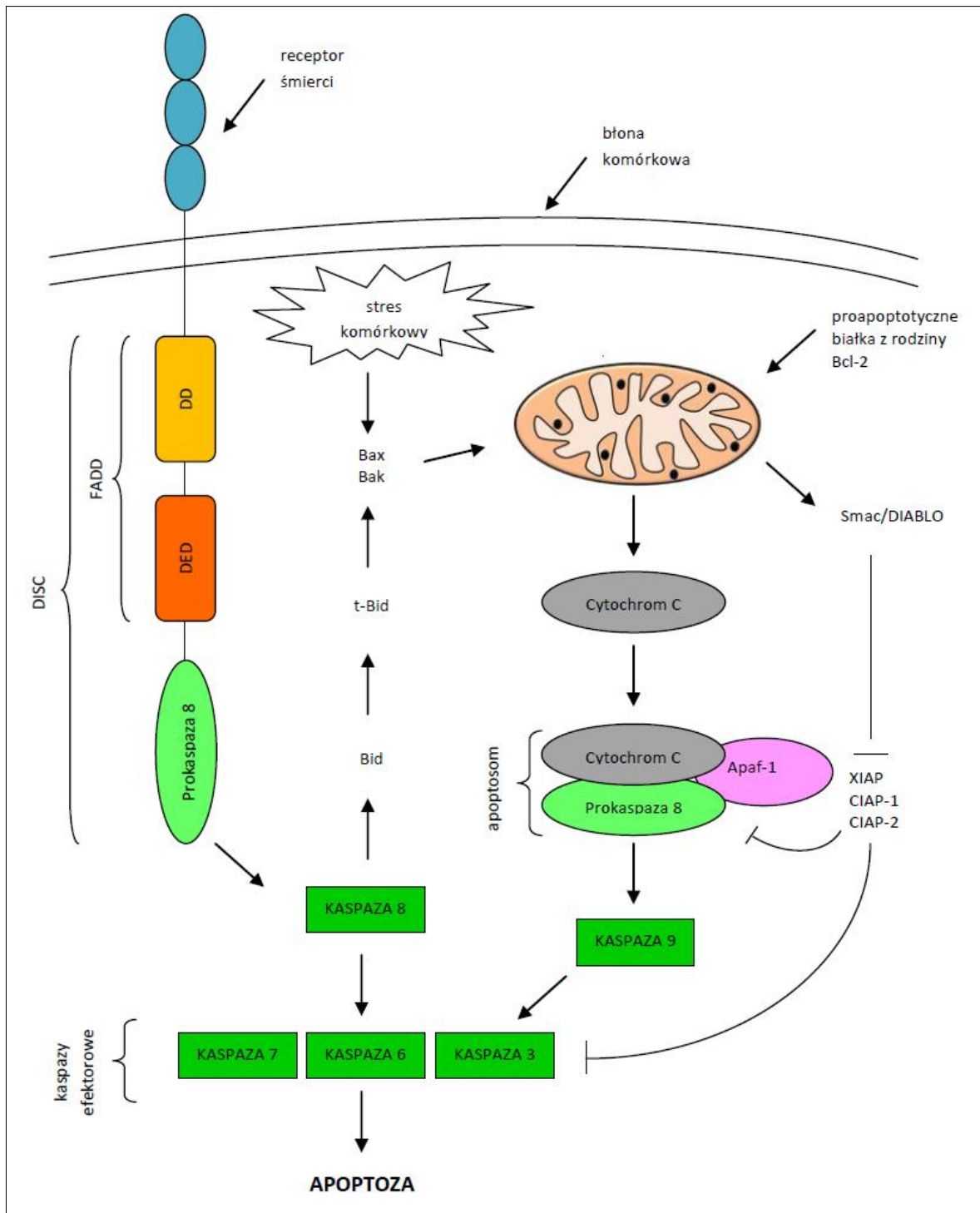
1.3. Zjawisko apoptozy

Apoptoza (gr. *apoptosis* - opadanie liści) nazywana programowaną śmiercią komórki, jest mechanizmem regulacyjnym i obronnym, pozwalającym na usunięcie zarówno komórek nieprawidłowych, jak i wytworzonych w nadmiarze [179]. W ludzkim organizmie każdego dnia około 10 bilionów szkodliwych, zainfekowanych, ale także przestarzałych i niepotrzebnych komórek umiera na drodze apoptozy [180]. Odgrywa ona istotną rolę w procesie homeostazy ustroju zapewniając wzajemną równowagę między namnażaniem i śmiercią komórek. Apoptoza jest fizjologicznym procesem biologicznym niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania każdego organizmu [181]. Pełni ważną funkcję w regulacji odpowiedzi immunologicznej, a uszkodzenie jej mechanizmu może prowadzić do ogólnoustrojowej autoimmunizacji, umożliwiając przetrwanie autoreaktywnych limfocytów T. Zaburzenia procesu apoptozy mają kluczowe znaczenie w karcynogenezie [182]. Kiedy mechanizmy programowanej śmierci komórki nie działają prawidłowo, może to skutkować namnożeniem się patologicznych komórek na obwodzie. Apoptozę mogą indukować cytotoksyczne limfocyty T, komórki naturalnych zabójców (NK), cytokiny, takie jak TNF α i β , lub ograniczenie czynników przeżycia. Apoptoza to forma śmierci komórki odmienna od martwicy, charakteryzująca się segmentacją jąder, kondensacją cytoplazmatyczną, pękaniem błon komórkowych i fragmentacją DNA [21].

Istnieją dwa zasadnicze szlaki apoptozy [183] [Rycina 2]:

- a. **szlak zewnątrzpochodny**, zwany również receptorowym- inicjowany przez aktywację swoistych receptorów śmierci na błonie komórkowej po przyłączeniu liganda, będącego białkiem z rodziny TNF i następnie aktywowaniu kaspazy 8;
- b. **szlak wewnątrzpochodny**, zwany również mitochondrialnym- jest inicjowany przez różne efektory i obejmuje zmiany integralności struktury błony komórkowej mitochondrium, co prowadzi do uwolnienia do cytoplazmy induktorów apoptozy, m.in. cytochromu c, a następnie do aktywacji kaspazy 9.

W dalszej części kaskady przemian oba szlaki zewnątrz-i wewnątrzpochodny łączą się we wspólnym punkcie, jakim jest kaspaza 3 [184] i prowadzą do powstania ciałek apoptotycznych usuwanych w procesie fagocytozy [185].



Rycina 2. Główne szlaki apoptozy.

Skróty: DD (death domain) - domena śmierci; DED, FADD - białko adaptorowe; DISC (*death-inducing silencing complex*) - kompleks sygnalizacyjny indukujący śmierć komórki; Bid, t-Bid, Bax, Bad, Bcl-2 - białka proapoptotyczne; Smac/DIABLO, XIAP, CIAP-1, CIAP-2 - białka regulujące apoptozę; Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) – czynnik aktywujący proteazy w apoptozie

Droga wewnątrzpochodna wyzwalana jest przez sygnał wewnątrzkomórkowy, taki jak uszkodzenie DNA, zaburzenie cyklu komórkowego, stan niewyrównania metabolicznego, stres oksydacyjny [186]. Warunkiem koniecznym do zainicjowania wewnętrznego szlaku apoptotycznego jest utworzenie trójskładnikowego apoptosomu, którego zadaniem jest aktywacja kaspaz efektorowych, zwanych również wykonawczymi. Początkowo dochodzi do utraty mitochondrialnego potencjału błony komórkowej [187], co może nastąpić np. w warunkach stresowych, które mogą wywołać migrację białka p53 z cytoplazmy do mitochondrium przez co dochodzi do utworzenia kompleksu białka p53 z białkami antyapoptotycznymi Bcl-2 i Bcl-X_L. Należy podkreślić, że szlak mitochondrialny może być także zainicjowany przez białko należące do szlaku zewnątrzkomórkowego, a mianowicie przez kaspazę 8. Częsteczką ta może pośredniczyć w rozszczepieniu białka Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) do jego formy aktywnej tBid (*truncated Bid*). Następnie tBid przenosi sygnał aktywacji do mitochondrium i aktywuje białka proapoptotyczne z rodziny Bcl-2, m.in. Bax i Bad, które wpływają na zaburzenie integralności błony mitochondrialnej [188]. Proces ten powoduje uwolnienie cytochromu c z wnętrza przestrzeni mitochondrialnej przez megakanaly mitochondrialne PTP (*permeability transition pore*) oraz białka Smac/DIABLO (*secondo-mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with low isoelectric point*) do cytoplazmy. Następnie cytochrom c łączy się z adenozylo-5'-trzyfosforanem (*adenosine-5'-triphosphate*, ATP), czynnikiem Araf-1 (*apoptotic peptidase-activating factor 1*) i prokaspazą 9, tworząc w ten sposób apoptosom. Częścią regulatorową apoptosomu jest kompleks składający się z białek proapoptotycznych, a mianowicie z Bak, Bid, Bad, Bik. Kompleks ten łącząc się z kompleksem Bcl-2 i Bcl-X_L dezaktywuje go co w konsekwencji prowadzi do aktywacji prokaspazy-9 do kaspazy 9. Natomiast białko Smac/DIABLO blokuje inhibitory kaspaz, jak na przykład białko XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) czy białka z rodziny cIAP (*cellular inhibitor of apoptosis protein*), umożliwiając w ten sposób aktywację kaspazy 3 i zakończenie procesu apoptozy [189, 190] [Rycina 2].

Droga zewnątrzpochodna wyzwalana jest przez sygnały zewnątrzkomórkowe, takie jak: czynniki chemiczne (np. cytostatyki), czynniki fizyczne (promieniowanie jonizujące, temperatura), zbyt mała ilość czynników wzrostowych czy substancji odżywczych. Przekazywanie sygnałów indukujących zewnątrzpochodną ścieżkę apoptozy odbywa się po związaniu specyficznych ligandów proapoptotycznych z odpowiednim receptorem

blonowym. Aktywacja tego szlaku rozpoczyna się od pobudzenia receptorów śmierci, należących do nadrodziny receptorów TNF: TNF-R1, Fas, TRAIL-R1 i TRAIL-R2 [191, 192]. Połączenie receptora błonowego ze specyficznym ligandem śmierci skutkuje zmianą konformacji receptora i zapoczątkowaniem procesu apoptozy. Dochodzi do trymeryzacji domen śmierci, które łączą się z białkiem adaptorowym FADD (*Fas associated death domain*) jeśli chodzi o pary Fas-FasL oraz TRAIL-TRAIL-R3/-R4, natomiast do domeny śmierci receptora TNFR1 przyłącza się białko adaptorowe TRADD. Następnie białko FADD rekrutuje prokaspazę 8 lub prokaspazę 10. Połączenie tej nieaktywnej kaspazy z FADD jest możliwe dzięki wykonawczej domenie śmierci DED (*death execution domain*). W ten sposób powstaje kompleks sygnalizacyjny indukujący śmierć DISC (*death-inducing signaling complex*), który jest złożony z: receptora śmierci, białka adaptorowego FADD i prokaspazy inicjatorowej 8 lub prokaspazy 10 [193]. Utworzenie DISC powoduje aktywację prokaspazy 8 do kaspazy 8 (lub analogicznie prokaspazy-10 do kaspazy 10). Aktywacja ta zachodzi dzięki cięciu proteolitycznemu. Następnym etapem jest tzw. kaskada kaspaz, czyli proteoliza trzech prokaspaz efektorowych: prokaspazy-3, -6 i -7 [Rycina 2]. Kaspazy te, a przede wszystkim kaspaza 3 odpowiedzialne są za rozpad proteolityczny białek niezbędnych do utrzymania komórkowej integralności [194], jak na przykład: CAD (*caspase-activated deoxyribonuclease*) i PARP (*poly(ADP-ribose)polymerase*) [193]. Formowanie kompleksu DISC podlega kontroli białek c-FLIP (*FLICE-like inhibitory proteins*), których rolą jest hamowanie procesu apoptozy. c-FLIP jest to nieczynny enzymatycznie homolog kaspazy, który łącząc się kompetycyjnie z DISC inaktywuje prokaspazę 8, uniemożliwiając kontynuowanie kolejnych etapów apoptozy [195]. W przypadku pary TNF- α -TNFR1, aby doszło do transdukcji sygnału apoptotycznego ważne jest utworzenie kompleksu TRADD (*TNFR-associated death domain*), w skład którego wchodzi białko FADD oraz prokaspaza-8 [191, 192].

Apoptoza jest procesem aktywnym, a regulacja tego procesu następuje na poziomie receptorów śmierci i ekspresji ich ligandów, białek adaptorowych, kaskady kaspaz oraz czynników mitochondrialnych [196]. Mechanizm apoptozy znajduje się pod ścisłą kontrolą genetyczną i jest regulowany przez rodzinę białek regulatorowych Bcl-2 zlokalizowanych w błonie komórkowej mitochondrium. Są to białka o aktywności pro- i antyapoptotycznej, które mają wpływ na integralność błony mitochondrialnej. Do białek stymulujących apoptozę zaliczamy: Bak, Bax, Bcl -X_S , Bid, Bad, Bik. Natomiast do białek blokujących apoptozę należą: Bcl -2, Bcl -X_L, Bcl-w [197]. Bcl-2 jest protoonkogenem o działaniu

antyapoptotycznym. Jedną z ról białka Bcl-2 jest również utrzymanie integralności funkcji mitochondriów, poprzez regulację wypływu cytochromu c z tego organelum komórkowego [21]. Białko Bcl-2 wraz z Bcl-X_L mogą łączyć się z czynnikiem uwalnianym z mitochondrium - czynnikiem Apaf-1, hamując w ten sposób możliwość powstania apoptosomu, aktywacji prokaspazy 9, co docelowo prowadzi do zablokowania szlaku apoptotycznego [197]. Kolejną rodziną białek mającą wpływ na regulację apoptozy jest rodzina IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), do której należą: cIAP-1, cIAP-2, X-IAP [198]. X-IAP może łączyć się z kaspazą-9 i hamować jej aktywację uniemożliwiając dalsze przekazywanie sygnału apoptotycznego [199]. Należy również wspomnieć o białku Smac/DIABLO. Jest to cząsteczka uwalniana przez mitochondrium razem z cytochromem c podczas zmian przepuszczalności błony komórkowej tego organelum. Jego funkcją jest aktywacja kaspazy 9 poprzez wiązanie z czynnikiem Apaf-1 wchodzącym w skład apoptosomu, a także hamowanie wcześniej wspomnianego białka X-IAP, umożliwiając kontynuowanie szlaku apoptotycznego [189, 190]. Cząsteczkami regulującymi przekazywanie sygnału apoptozy w fazie początkowej są między innymi FAP-1 (*Fas associated phosphatase-1*) oraz FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*). Pierwsze białko uniemożliwia przekazywanie sygnału z receptora śmierci na domeny regulatorowe, natomiast drugie hamuje utworzenie kompleksu adaptacyjnego niezbędnego do kolejnego etapu apoptozy [200].

Apoptoza jest również kontrolowana przez proapoptotyczne receptory śmierci z nadrodziny TNF (Fas, TNFR, TRAIL-R). Etap połączenia liganda do specyficznego receptora inicjuje przekazywanie sygnału śmierci poprzez wiązanie białek adaptorowych, a następnie kaskadę zdarzeń, w której pośredniczy autoproteolityczna aktywacja określonych enzymów zwanych kaspazami. Ta aktywacja enzymów jest ostatecznie odpowiedzialna za rozkład podstawowych struktur jądrowych i cytoplazmatycznych, co w konsekwencji doprowadza do śmierci komórki [201].

1.4. Znaczenie apoptozy w patogenezie autoimmunologicznych chorób tarczycy

Zaburzenia regulacji apoptozy determinują istotny związek patogenezy wielu chorób, w tym specyficznych narządowo chorób autoimmunizacyjnych tarczycy [202]. Rola apoptozy w utrzymaniu komórkowej homeostazy komórek gruczołowych tarczycy jest bardzo ważna w prawidłowym funkcjonowaniu całego organizmu. Apoptoza jest zaangażowana w homeostazę komórek tarczycy, jak również w jej niszczące mechanizmy [203]. Jest

niezbędnym procesem do utrzymania autotolerancji poprzez eliminację autoreaktywnych komórek odpornościowych. Nieprawidłowe działanie tego systemu wiąże się z indukcją i zaostrzeniem chorób autoimmunizacyjnych [204]. Apoptoza uczestniczy w rozwoju i patomechanizmie jednych z najczęściej występujących schorzeń autoimmunologicznych tarczycy, a mianowicie w zapaleniu tarczycy typu Hashimoto oraz w chorobie Gravesa i Basedowa [6].

Badania immunohistochemiczne tarczycy dowodzą, że tempo apoptozy w prawidłowych tyreocytach jest utrzymywane na niskim poziomie [205]. Prawidłowe tyreocyty wykazują stałą ekspresję FasL, ale niski poziom ekspresji Fas [206]. Mimo to, że niezmiennie patologicznie komórki tarczycy wykazują na swojej powierzchni ekspresję receptorów śmierci to nadal pozostają one odporne na apoptozę indukowaną zarówno poprzez cytokinę FasL, jak i TRAIL [10]. Skierowanie prawidłowego tyreocytu na drogę apoptozy, w której biorą udział receptory śmierci Fas oraz TRAIL-R jest możliwe poprzez pobudzenie go za sprawą takich czynników, jak: TNF- α , IFN- γ czy IL-1 β [207]. Należy również podkreślić, że prawidłowy gruczoł tarczowy wykazuje wysoką ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2, co również pełni funkcję ochronną przed apoptozą [134].

Tempo apoptozy ulega jednak podwyższeniu w różnego typu zapaleniach tarczycy, a nasilenie poziomu apoptozy komórek pęcherzykowych tarczycy wykazuje dodatnią korelację z obrazem klinicznym w autoimmunizacyjnych chorobach tarczycy [208]. Naciek limfocytarny komórek tarczycy w AITD inicjuje zaprogramowaną śmierć komórki. Udział mechanizmu Fas i TRAIL jest udowodniony w autoimmunologicznych chorobach tarczycy, a cząsteczki FasL i TRAIL indukujące szlak apoptotyczny mogą odgrywać kluczową rolę w patogenezie tych chorób [198]. Liczne doniesienia naukowe potwierdzają, że nieprawidłowa ekspresja cząstek Fas/FasL występuje zarówno w HT, jak i GD. W AITD w warunkach przeważającego stanu zapalnego ekspresja cytokin proapoptotycznych Fas i jego liganda FasL na komórkach tarczycy i na aktywowanych limfocytach T jest udowodniona przez wielu badaczy [1].

Zaprogramowana śmierć komórki jest mechanizmem, za sprawą którego cytotoksyczne limfocyty T mogą uszkadzać tyreocyty, doprowadzając do niedoczynności tarczycy [209]. W zapaleniu HT stwierdzono wzrost ekspresji Fas/FasL na tyreocytach, w porównaniu do osób zdrowych i z chorobą GD [210], który in vitro może być modulowany przez cytokiny prozapalne [201]. Przewlekły stan w HT wynika głównie z niszczenia

tyreocytów za pośrednictwem Fas , a to prowadzi do stopniowego gromadzenia się naciekających monocytów, powodując włóknienie tego gruczołu [202]. W HT wykazano wysoki poziom apoptozy, szczególnie w zniszczonych pęcherzykach w pobliżu nacieków limfocytarnych w porównaniu z chorobą GD. W badaniach udowodniono aktywną rolę infiltrujących limfocytów T, które również wykazują ekspresję Fas, ale w przeciwieństwie do tyreocytów nie wykazują znaczących stężeń FasL. Podwyższona ekspresja Fas na komórkach pęcherzykowych tarczycy i FasL na limfocytach T może indukować apoptozę [40]. W HT komórki pęcherzykowe tarczycy są indukowane do ekspresji receptora Fas i jego ligandu przez stymulację cytokinami prozapalnymi wydzielanymi przez limfocyty Th1 [5]. Apoptoza komórek pęcherzykowych tarczycy wpływa także na zmniejszone wytwarzanie hormonów w HT. W gruczole tarczowym zaobserwowano, że wiele komórek apoptotycznych znajduje się głównie w obszarach uszkodzonych pęcherzyków, w pobliżu naciekających komórek limfoidalnych [134, 201]. Przeprowadzone badania wykazały znacznie wyższy poziom ekspresji cząsteczek apoptotycznych i białek proapoptotycznych na powierzchni komórek tarczycy, co prowadzi do zniszczenia tyreocytów [19]. W HT ważną rolę odgrywają białka z rodziny Bcl-2. Interakcja Fas-FasL jest jednym z głównych szlaków apoptozy, która bierze udział w patogenezie HT [204]. Limfocyty T cytotoksyczne, głównie CD8⁺ oraz komórki NK wykazują nieustanną ekspresję FasL, a więc mogą indukować apoptozę w komórkach tarczycy, które cechują się obecnością Fas. Apoptoza przebiegająca za pośrednictwem Fas w komórkach tarczycy wymaga indukcji poprzez IFN- γ w połączeniu z IL-1 β lub TNF- α [1]. Co ważne, udowodniono, że znacznie mniejszy odsetek limfocytów docierających do tarczycy wykazuje ekspresję cząsteczek apoptotycznych, natomiast tyreocyty prezentują nadekspresję cząsteczek Fas/FasL. Te dwie składowe powodują zniszczenie mięszu tarczycy. Zaburzenie ekspresji cząstek hamujących apoptozę w komórkach tarczycy również odgrywa istotną rolę w patogenezie i niszczeniu mięszu tarczycy w HT [19]. U pacjentów z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy gruczoł tarczowy wykazuje wysoki poziom apoptozy, bo szacuje się, że wynosi on około 30%, a także obniżoną ekspresję białek z rodziny Bcl-2 [211]. Wykrywa się również zaburzenia w genie antyapoptotycznym *Bcl-X*. Ekspresję *Bcl-X* można obniżyć in vitro poprzez inkubację z cytokinami, co dowodzi, że śmierć tyreocytów nie jest wyłącznie wynikiem specyficznych interakcji między receptorem śmierci a ich ligandami, ale także obejmuje jednocześnie nieprawidłowości w ochronnych genach z rodziny *Bcl-2*. Nadal jednak nie wiadomo czy przyczyną tej dysfunkcji genetycznej są bodźce środowiskowe, czy wewnętrzne zmiany w mitochondrium tyreocytów [201].

Supresja zaprogramowanej śmierci komórki może przyczyniać się do powstania chorób proliferacyjnych tarczycy, w tym choroby Gravesa i Basedowa. W chorobie GD na tyreocytach występuje zmniejszona ekspresja Fas w porównaniu zarówno do komórek prawidłowych tego gruczołu jak i tyreocytów u pacjentów z HT. Jednak w przeciwieństwie do HT, limfocyty naciekające tarczycę w GD wykazują wyższy poziom ekspresji Fas i FasL [202]. W GD większe stężenia IgG zmniejsza ekspresję Fas i jednocześnie wywołuje nadekspresję rodziny cząsteczek antyapoptotycznych Bcl-2 w tyreocytach. W nacieku limfocytarnym komórki T charakteryzują się jednak zmniejszoną ekspresją białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2. W tej jednostce chorobowej zarówno liczba komórek apoptotycznych, jak i wielkość nacieków limfocytarnych są mniejsze w porównaniu z HT [1]. Apoptoza za pośrednictwem Fas jest w znacznym stopniu hamowana przez TRAb, co skutkuje rozrostem komórek pęcherzykowych w gruczole tarczycowym i wpływa na powstanie wola. Z wielu badań wynika, że w patogenezie choroby Gravesa i Basedowa ważną rolę odgrywa forma rozpuszczalna białka Fas. Cząsteczka ta tłumia apoptozę, w której pośredniczy Fas poprzez konkurencyjne wiązanie z FasL. Rozpuszczalny Fas odgrywa kluczową rolę w hamowaniu systemu Fas/FasL u pacjentów z chorobą GD. Stężenie rozpuszczalnego Fas w surowicy u nieleczonych pacjentów z chorobą GD było znacznie większe w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej i uległo zmniejszeniu po 6-8 tygodniach po zastosowaniu leków przeciw-tarczycowych. Ponadto wykazano korelację pomiędzy stężeniem rozpuszczalnego Fas a przeciwciałami TRAb [203].

Informacji dotyczących roli białka TRAIL w procesie apoptozy w chorobach autoimmunologicznych jest dużo mniej w porównaniu do białka Fas. TRAIL wykazuje dużą homologię w stosunku do FasL. Receptory białka TRAIL, a mianowicie TRAIL-R1 i TRAIL-R2 wykazują ekspresję w tyreocytach, a ich ekspresja wzrasta pod wpływem stymulacji wspomnianych cytokin prozapalnych. Także w nacieku limfocytarnym w tarczycy zauważalny jest znaczny wzrost stężenia mRNA TRAIL-R [10]. Nadal jednak brakuje informacji dotyczących udziału rozpuszczalnych form receptorów białka TRAIL w patogenezie AITD. Bretz i wsp. jako pierwsi przedstawili trzy możliwości zaangażowania białka TRAIL w choroby autoimmunizacyjne tarczycy. Pierwsza hipoteza przedstawia to, że tyreocyty niszczone są przez limfocyty wykazujące ekspresję białka TRAIL, druga że napływające limfocyty uszkodzone są przez tyreocyty wykazujące ekspresję TRAIL. Najmniej możliwa wydaje się być trzecia hipoteza, w której cytokiny produkowane przez komórki odpornościowe indukują ekspresję TRAIL i jego receptorów śmierci na tyreocytach,

prowadząc do samozniszczenia. Model ten jest mało prawdopodobny, ponieważ istnieją różnice w regulacji TRAIL, TRAIL-R1 i TRAIL-R2. Natomiast pierwsza hipoteza wydaje się być najbardziej prawdopodobna w patogenezie HT, a druga w GD [212].

Podsumowując, mechanizm apoptozy zarówno w patogenezie choroby HT, jak i GD podlega regulacji nie tylko przez ekspresję cząsteczek Fas/FasL, TRAIL/TRAIL-R a także przez białka z rodziny Bcl-2, które pełnią funkcję antyapoptotyczną dla tyreocytów [213]. W licznych badaniach udowodniono, że w obu tych schorzeniach tarczycy występują różnice w nasileniu stopnia apoptozy [202]. Apoptoza w komórkach pęcherzykowych tarczycy jest bardziej zaznaczona w patomechanizmie HT, a w limfocytach naciekających gruczoł tarczowy w patogenezie GD.

1.5. Polimorfizm genu *TNFRSF10A*

Największy, bo prawie 80% udziału w rozwoju oraz progresji AITD mają czynniki genetyczne, w tym mutacje i polimorfizmy genów związanych z funkcją układu odpornościowego. Jak zostało wcześniej wspomniane receptor TRAIL-R1 zlokalizowany jest na chromosomie 8p21. Spośród różnych nieprawidłowości genomowych delecja alleli w ludzkim chromosomie 8p21 jest stosunkowo częstą mutacją zachodzącą w wielu nowotworach, dlatego w ostatnich latach spotkała się z szerokim zainteresowaniem [214].

Badania polimorfizmu genów mogą być kluczowym markerem do określenia ryzyka i prognozowania ujawnienia się procesu nowotworzenia. Zmiany zachodzące w genach kodujących receptory śmierci mogą zaburzyć funkcjonowanie apoptotycznej sygnalizacji komórkowej, a tym samym przyczynić się do rozwoju komórek nowotworowych. Gen *TNFRSF10A* jest wysoce polimorficzny, a mutację w nim występującą opisano w różnych nowotworach, takich jak nowotwór piersi, żołądka, pęcherza moczowego, rak płuc, a także w endometriozie [215-217].

Istnieje wiele dobrze scharakteryzowanych polimorfizmów w genie kodującym receptor TRAIL-R1, ale najszerszej badanym polimorfizmem jest rs20575. Zmiany w tym polimorfizmie polegają na substytucji C na G w pozycji 626 (C626G) w regionie ektodomeny DR4 i powodują zmianę aminokwasów treoniny na argininę w eksonie 4 (Thr209Arg). Polimorfizm Thr209Arg jest szczególnie interesujący, najprawdopodobniej ze względu na udział w aktywności wiązania ligandu TRAIL do receptora TRAIL-R1 i stymulację szlaków

apoptotycznych [218]. Kolejnymi trzema najczęściej badanymi polimorfizmami są: rs20576 z podstawieniem A na C w pozycji 683 (A683C) w pozakomórkowej bogatej w cysteinę domenie DR4, rs6557634 (G422A) oraz rs2230229 (A1322G) [215, 216].

Ponadto wykazano obecność miejsc polimorficznych w genie *TNFRSF10A* także w chorobie neurodegeneracyjnej Alzheimera, chorobie Crohna, w wirusowym zapaleniu wątroby typu C (*Hepatitis C Virus*, HCV) oraz w wolkach wieloguzkowych tarczycy [219]. Po zbadaniu trzech polimorfizmów ektodomenu receptora DR4, a mianowicie: rs4871857 (C626G), rs17088993 (A683C) i rs2230229 (A1322G) udowodniono, że częstość ich występowania jest zdecydowanie większa w guzach pierwotnych w porównaniu z grupą kontrolną [218]. Körner i wsp. przeanalizowali wpływ polimorfizmów DR4 C626G (rs20575) i A683C (rs20576) na występowanie raka wątrobowokomórkowego (*hepatocellular carcinoma*, HCC) u pacjentów przewlekle zakażonych HCV. Zwiększona częstość występowania allele 626C i homozygotycznego genotypu 683AA u pacjentów zakażonych HCV z HCC sugeruje, że te warianty genetyczne są czynnikiem ryzyka tego nowotworu w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C [220].

Wpływ polimorfizmów genu *TNFRSF10A* na podatność na nowotwór nie jest do końca jednoznaczny, a wyniki badań są niespójne, dlatego wielu badaczy podjęło się przeprowadzenia metaanaliz w tym obszarze. W niektórych analizach próbowano zbadać możliwy związek między polimorfizmami rs4871857, rs20576 i rs2230229 genu *TNFRSF10A* a ryzykiem różnych nowotworów w populacji. W 2009 roku badacze przeprowadzili metaanalizę dotyczącą związku między polimorfizmami rs20575 rs2230229 i rs20576 genu *TNFRSF10A* a ryzykiem raka. Ich badania wykazały, że rs2230229 i rs20576 są związane ze zwiększonym ryzykiem raka [219]. Jednak niektóre badania wskazują na brak związku wyżej wymienionych polimorfizmów z podatnością na zachorowanie na nowotwór złośliwy [215]. Kolejne wyniki metaanalizy opublikowane w 2014 roku przez Chen i wsp. sugerują, że polimorfizmy rs4871857 i rs20576 zamiast rs2230229 są powiązane z ryzykiem raka u rasy białej [216].

W tym samym roku Lu i wsp. również w ramach metaanalizy przeanalizowali identyczne SNPs co zespół z Chin zwiększając zakres o jeden polimorfizm, a mianowicie rs6557634 (G422A). Również udowodnili, że polimorfizm rs2230229 był związany ze znacznie podwyższonym ryzykiem raka, natomiast w odróżnieniu od Chen i wsp. dowiedli, że polimorfizm rs20576 rzadko wiąże się z ryzykiem raka, a polimorfizm rs20575 jest związany ze zwiększonym ryzykiem nowotworzenia. Polimorfizm rs6557634 również nie był związany

z ryzykiem raka we wszystkich modelach genetycznych [221]. Do innych wniosków doszedł zespół naukowców na czele z Geng, który skupił się na jednym polimorfizmie, a mianowicie rs20575 i według zgromadzonych do metaanalizy danych wykazali, że ten polimorfizm nie jest istotnie związany z ogólną podatnością na raka [214]. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki badań, analiz i wnioski z nich wynikające można zaobserwować, że naukowcy poświęcili wiele uwagi na testowaniu hipotezy czy polimorfizmy genu *TNFRSF10A* mogą modulować podatność na nowotwór, jednak żaden zespół badawczy nadal nie dostarczył przekonujących dowodów, a ich wyniki są niejednoznaczne [215, 219, 220, 222].

2. Założenia i cel pracy

Aktualne doniesienia naukowe potwierdzają udział apoptozy w chorobach autoimmunizacyjnych tarczycy, ale rola rozpuszczalnej formy białka TRAIL i jego receptorów w procesie zaprogramowanej śmierci komórki nie jest do końca poznana w tych schorzeniach. Połączenie się białka TRAIL z jego receptorami śmierci, a więc z receptorem DR4 i DR5 prowadzi do pobudzenia sygnału prowadzącego do aktywacji szlaku apoptotycznego. Zaobserwowano, że zwiększone stężenie białka TRAIL występowało w chorobie Gravesa i Basedowa, natomiast mniejsze w chorobie Hashimoto. Nie ma jednak żadnych doniesień naukowych, które wskazywałyby na istnienie związku między polimorfizmem genu *TNFRSF10A* kodującego receptor DR4 z występowaniem choroby autoimmunizacyjnej tarczycy. Białko sTRAIL, jego receptory, a także polimorfizmy genów tych receptorów mogą mieć zatem istotny wpływ na rozwój chorób autoimmunologicznych tarczycy. Założeniem niniejszej pracy doktorskiej jest ocena zależności stężeń białka sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2, OPG oraz częstości występowania alleli polimorfizmów genu *TNFRSF10A* u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi tarczycy oraz wśród osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Analiza tych zależności poszerzy wiedzę dotyczącą etiologii procesów autoimmunologicznych tarczycy w aspekcie regulacji procesu apoptozy.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje wyznaczono następujące cele:

1. Ocenę stężenia białka sTRAIL, jego receptorów: sTRAIL-R1, sTRAIL-R2, OPG w grupach badanych i kontrolnej.
2. Ocenę zależności pomiędzy stężeniem białka sTRAIL, jego receptorami: sTRAIL-R1, sTRAIL-R2, OPG a wybranymi parametrami klinicznymi oraz biochemicznymi w grupach badanych i kontrolnej.
3. Analizę częstości występowania alleli polimorfizmów genu *TNFRSF10A* kodującego białko TRAIL-R1 w odniesieniu do grup badanych i kontrolnej.
4. Analiza zależności pomiędzy częstością występowania alleli polimorfizmów genu *TNFRSF10A* kodującego białko TRAIL-R1 a stężeniem białka sTRAIL i sTRAIL-R1 w grupach badanych i kontrolnej.
5. Określenie korelacji częstości występowania badanych polimorfizmów genetycznych z parametrami klinicznymi oraz biochemicznymi w grupach badanych i kontrolnej.

3. Materiał i metodyka

3.1. Charakterystyka badanych grup

Do badań zakwalifikowano 133 osoby w wieku od 20 do 81 lat (średnia wieku $53,5 \pm 14,5$ lat; 109 kobiet, 24 mężczyzn) hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami w latach 2018-2019. Grupę badaną stanowiło 92 pacjentów z chorobą autoimmunologiczną tarczycy, natomiast grupę kontrolną stanowiło 41 pacjentów bez chorób tarczycy. Kwalifikowanie pacjentów do grup następowało po zebraniu danych klinicznych oraz spełnieniu kryteriów włączenia i wyłączenia przedstawionych poniżej. Na przeprowadzenie badań została udzielona zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu Nr KB528/2018. Wszyscy pacjenci zostali poinformowani o celu oraz zakresie przeprowadzanych badań i wyrazili na nie świadomą, pisemną zgodę.

Grupę badaną stanowili pacjenci z chorobą autoimmunizacyjną tarczycy w wieku 20-81 lat ($n=92$; średnia wieku $51,5 \pm 15,2$ lata; 82 kobiety, 10 mężczyzn). W celu dokładnej analizy wpływu stężenia białka sTRAIL i badanych polimorfizmów genetycznych na występowanie AITD grupę badaną podzielono na dwie podgrupy: pacjentów z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto ($n=23$; średnia wieku $44,4 \pm 18,6$ lat; 20 kobiet, 3 mężczyzn) oraz pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa ($n=69$, średnia wieku $53,9 \pm 13,1$ lat; 59 kobiet, 10 mężczyzn).

Kryteria włączenia do grup badanych:

- a. pacjenci z chorobą Hashimoto potwierdzoną przez:
 - 1) wykładniki kliniczne niedoczynności tarczycy;
 - 2) wykładniki hormonalne (podwyższone TSH, obniżone fT_3 , obniżone fT_4);
 - 3) wykładniki autoimmunologiczne (dotądnie miano anty-TPO i/lub anty-TG);
 - 4) badanie ultrasonograficzne tarczycy;
- b. pacjenci z chorobą Gravesa i Basedowa potwierdzoną przez:
 - 1) wykładniki kliniczne nadczynności tarczycy;
 - 2) wykładniki hormonalne (obniżone TSH, podwyższone fT_3 , podwyższone fT_4);
 - 3) wykładniki autoimmunologiczne (dotądnie miano TRAb);
 - 4) badanie ultrasonograficzne tarczycy.

Grupę kontrolną stanowili pacjenci w wieku 30-78 lat (n=41; średnia wieku 57,4±12,8 lat; 30 kobiet, 11 mężczyzn). Kryteriami włączenia do grupy kontrolnej był stan pacjentów w eutyreozy klinicznej i hormonalnej, bez wola i z ujemnymi przeciwciałami przeciwarczycowymi. Natomiast kryteriami wyłączenia pacjentów zarówno z grup badanych, jak i kontrolnej była: cukrzyca, przewlekła choroba zapalna lub układowa, niedawna lub aktualna choroba infekcyjna, brak zgody na badanie.

U wszystkich pacjentów na podstawie dokumentacji medycznej analizowane były wyniki laboratoryjne oraz dane kliniczne, takie jak: wiek, wzrost, masa ciała.

Oznaczano wskaźnik masy ciała BMI (*body mass index*). Wskaźnik BMI obliczono wg wzoru:

$$BMI = \frac{\text{masa ciała [kg]}}{\text{wzrost [m]}^2} \times 100$$

Zgodnie z aktualnymi wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization*, WHO) przyjęte przedziały kwalifikacji osób wg wskaźnika BMI ("*BMI classification*". *World Health Organization. Retrieved 15 February 2014*) przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wartość wskaźnika BMI i jego interpretacja zgodne z WHO.

Wartość wskaźnika BMI	Interpretacja
18,9–24,9 kg/m ²	prawidłowa masa ciała
25,0-29,9 kg/m ²	nadwaga
30,0–34,9 kg/m ²	otyłość
≥ 35,0 kg/m ²	nadmierna otyłość

Wszystkie dane kliniczne oraz laboratoryjne zostały zebrane w utworzoną bazę danych i poddane analizie statystycznej, a jej efekty przedstawiono w rozdziale Wyniki.

3.2. Metodyka

3.2.1. Metody oceny parametrów gospodarki węglowodanowej, gospodarki lipidowej oraz przeciwciał przeciwarczycowych, TSH i hormonów tarczycy

Krew do badań biochemicznych pobierano na czczo w godzinach rannych z żyły łokciowej. Oznaczenia parametrów gospodarki węglowodanowej, lipidowej, TSH, hormonów tarczycy oraz przeciwciał przeciwarczycowych zostało wykonane przez Centralne Laboratorium Analityczne Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu w ramach badań rutynowych.

W surowicy krwi oznaczono następujące wskaźniki oceny gospodarki węglowodanowej: glukoza i insulina na czczo oraz wskaźniki oceny gospodarki lipidowej: cholesterol całkowity, cholesterol frakcji LDL i HDL, trójglicerydy (TG). Stężenie glukozy oznaczono za pomocą metody heksokinazowej z zastosowaniem odczynników firmy Abbott Diagnostics. Natomiast oznaczenie stężenia insuliny wykonano przy użyciu metody chemiluminescencyjnej, korzystając z testów komercyjnych firmy Siemens. Oznaczenia lipidogramu wykonano przy użyciu rutynowych metod enzymatycznych, wykorzystując testy komercyjne firmy Abbott Diagnostics. Stężenie cholesterolu frakcji LDL wyliczono ze wzoru Friedewalda: $LDL = TC - HDL - c - TG/5$ (mg/dl). Zakresy referencyjne stężeń powyższych parametrów zostały przedstawione w Tabeli 2.

Tabela 2. Zakresy referencyjne stężeń glukozy, insuliny i lipidogramu.

Parametr	Zakres referencyjny
Glukoza	70-99 [mg/dl]
Insulina	<29 [μ IU/ml]
Cholesterol całkowity	<190 [mg/dl]
HDL	>40 [mg/dl]
LDL	0-135 [mg/dl]
Trójglicerydy	<150 [mg/dl]

Oznaczenie stężenia hormonu tyreotropowego (TSH), wolnej tyroksyny (fT₄) oraz wolnej trijodotyroniny (fT₃) w surowicy przeprowadzono metodą chemiluminescencji za

pomocą testów firmy Siemens z wykorzystaniem analizatora VIDAS firmy BioMerieux. Wartości prawidłowe dla TSH: 0,4-4,0 μ IU/ml, fT_3 : 2,76-6,45 pmol/l, fT_4 : 10,3-24,4 pmol/l.

Miana przeciwciał antyperoksydazowych i antytyreoglobulinowych zostały oznaczone metodą chemiluminescencyjną z zastosowaniem odczynników firmy Siemens Healthineers. Wartości prawidłowe dla a-TG <40 IU/ml ; anty-TPO <35 IU/ml. Natomiast oznaczenie mian przeciwciał przeciwireceptorowych TRAb przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Niemcy), w której wartość niższa niż 1 U/l oznaczała wynik ujemny; od 1,1 do 1,5 U/l wynik granicznie pozytywny (tzw. strefa szara); wartości wyższe niż 1,5 U/l wynik dodatni.

3.2.2. Metoda oceny stężeń białek sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG

Pomiaru stężenia białka sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2, OPG dokonano za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA typu „sandwich”, używając do tego gotowych zestawów testowych, zgodnie z zaleceniami producenta.

Każda próbka materiału biologicznego była badana w powtórzeniach. Oznaczenia stężeń białek zostały wykonane w Pracowni Endokrynologii Molekularnej przy Katedrze i Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Do badania wykorzystano krew żyłą pobraną z żyły łokciowej do próbki z aktywatorem wykrzepiania. Materiałem do badań immunoenzymatycznych była surowica, którą otrzymano poprzez odwirowanie krwi (2000 x g / 10 minut) w temperaturze pokojowej. Odseparowaną surowicę zabezpieczono w kilku próbkach i do czasu zebrania odpowiedniej ilości materiału biologicznego przechowywano w temperaturze -70°C .

Stężenie sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 oznaczono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA firmy Diaclone (Besancon Cedex, Francja). Stężenie OPG oznaczono przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA firmy Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG (Wiedeń, Austria). Parametry reakcji ELISA dla poszczególnych białek podano w Tabeli 3.

Tabela 3. Parametry testów immunoenzymatycznych ELISA.

Białko	Limit detekcji	Precyzja w serii CV (%)	Precyzja między seriami CV (%)
sTRAIL	<64 pg/ml	5,5	3,8
sTRAIL-R1	<8 pg/ml	7,57	13,87
sTRAIL-R2	<6 pg/ml	3,2	7,4
OPG	0,07 pmol/l	3	5

Pomiaru absorbancji przy długości fali 450 nm dokonano w czytniku płytkowym EL 800 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Stężenie badanych parametrów odczytano poprzez sporządzenie krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem oprogramowania KC Junior (Bio-Tek Instruments, Inc.).

3.2.3. Metoda identyfikacji trzech polimorfizmów genu *TNFRSF10A*

Analiza genetyczna przeprowadzona była w Pracowni Endokrynologii Molekularnej w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Od każdego pacjenta, który został zakwalifikowany do badania zarówno do grup badanych, jak i grupy kontrolnej pobrano około 4 ml krwi żyłnej podczas rutynowych badań laboratoryjnych do probówek z antykoagulantem EDTA. Izolację genomowego DNA z krwi obwodowej przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen (Hilden, Niemcy) zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

U każdego pacjenta analizie poddano częstość występowania trzech polimorfizmów genu *TNFRSF10A* kodującego receptor TRAIL-R1: rs2230229, rs20276, rs6557634.

Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu zestawu TaKaRa Taq DNA Polymerase Amplification Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan). Startery do reakcji PCR dla polimorfizmów genu *TNFRSF10A* zaprojektowano samodzielnie, natomiast ich synteza została wykonana przez firmę Generi Biotech s.r.o. (Hradec Kralove, Czechy). Sekwencje starterów zostały przedstawione w Tabeli 4. W skład mieszaniny reakcji PCR wchodziło: 10 µM starterów, 1 x PCR bufor, 2 jednostki polimerazy Taq, 200 ng DNA, woda. PCR bufor zawierał: 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs. Objętość mieszaniny do reakcji PCR wynosiła 20 µl.

Tabela 4. Sekwencje starterów do reakcji PCR.

Polimorfizm	Sekwencja starterów (5'→3')		Produkt PCR [pz]
rs2230229	Fw	CAGAGCCTGTGCCATCTTCT	154
	Rv	TGCTGATGAAATGGGTCAAC	
rs20576	Fw	CTGCTGGTCCCTGTCTCCT	145
	Rv	CCTCCCTCCCTGTGTGTACC	
rs6557634	Fw	AGCTGTACATGGGAGGCAAG	159
	Rv	TCTGGGAACCTCTGTGGCAAT	

W celu optymalizacji metody i określenia temperatury przyłączania poszczególnych primerów wykonano serię reakcji PCR z zastosowaniem termocyklera TPersonal Thermocykler (Biometra GmbH, Gö ttingen, Niemcy) w zakresie temperatur 50-62⁰C. Ustalono, że najbardziej optymalną temperaturą annealingu będzie 59⁰C.

Amplifikację badanych fragmentów przeprowadzono w termocyklerze TPersonal Thermocykler (Biometra GmbH, Gö ttingen, Niemcy). Warunki reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genetycznych.

Etap reakcji PCR		Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja		95 ⁰ C	5 min.
35 cykli	Denaturacja	95 ⁰ C	30 sek.
	Przyłączenie starterów	59 ⁰ C	45 sek.
	Wydłużanie łańcucha	72 ⁰ C	45 sek.
Końcowe wydłużanie		72 ⁰ C	5 min.

Następnie oczyszczono powielone fragmenty DNA z nadmiaru starterów i niezwiązanych nukleotydów (dNTPs) z zastosowaniem egzonukleazy (ExoI) i fosfatazy alkalicznej (SAP) (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wyżej wymienionych enzymów stosowano jako mieszaninę sporządzoną w stosunku 1:2.

W kolejnym etapie w celu identyfikacji badanych polimorfizmów zastosowano technikę minisekwencjonowania (SNaPshot). Postępowano zgodnie z protokołem zestawu ABI PRISM SNaPshotTM Multiplex Kit (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Startery do reakcji minisekwencjonowania zaprojektowano samodzielnie, natomiast ich

syntezę wykonała firma Generi Biotech s.r.o. (Hradec Kralove, Czechy). Sekwencje starterów zostały przedstawione w Tabeli 6.

Tabela 6. Sekwencje starterów do reakcji minisekwencjonowania.

Polimorfizm	Forward starter (5'→3')
rs2230229	ATGCATGCATGCATGCATGCATGCACCGGTTACAGGCTCCAGGA
rs20576	ATGCATGCCTGATTCTTTGTGGACACAC
rs6557634	ATGCATGCATGCATGCAGAGGTCCTGAATCTTCTCT

Amplifikacja składała się z 3 etapów: denaturacja (10 min., 95⁰C), przyłączanie starterów (5 sek., 50⁰C), wydłużanie łańcucha (30 sek, 60⁰C) i przeprowadzono ją w termocyklerze TPersonal Thermocykler (Biometra GmbH, Gö ttingen, Niemcy). Rozdział elektroforetyczny w denaturującym żelu poliakrylamidowym został przeprowadzony z użyciem sekwenatora ABI PRISM 3100 Generic Analyzer (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w obecności standardu wewnętrznego LIZ120. Analizę uzyskanych wielkości produktów wykonano za pomocą oprogramowania GENE MAPPER Software, v.4.0 (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną otrzymanych w pracy wyników badań przeprowadzono w pakiecie statystycznym R (wersja 4.0). Otrzymane wyniki zostały przedstawione w tabelach lub/i na wykresach z podaniem wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), mediany, przedziału kwartylowego (kwartył pierwszy, kwartył trzeci). Analizę statystyczną przeprowadzono z dwóch niezależnych powtórzeń eksperymentu. Cechy ilościowe w przypadku dwóch grup zostały porównane za pomocą testu U Manna Whitneya, a w przypadku trzech grup zastosowano analizę wariancji ANOVA z analizą post hoc metodą Tukeya (*Aligned ranks transformation ANOVA, ART ANOVA*). Natomiast w celu porównania cech jakościowych w badanych grupach wykorzystano test Fishera. Test Spearmana zastosowano do analizy istniejących korelacji. W wykorzystanych w analizie statystycznej testach za minimalny poziom istotności przyjęto $p < 0,05$. Równowaga Hardy'ego-Weinberga została zweryfikowana za pomocą testu chi-kwadrat i poprzez oszacowanie oczekiwanych częstości genotypu na podstawie kwadratu dwumianu dla tych polimorfizmów.

4. Wyniki

4.1. Analiza parametrów antropometrycznych u pacjentów z AITD

W badaniu uczestniczyło 133 osoby, w tym 92 osoby z grup badanych i 41 z grupy kontrolnej. Charakterystykę grup badanych i grupy kontrolnej pod względem wieku i BMI przedstawiono w Tabeli 7 (średnia \pm SD, mediana (przedział kwartylowy)).

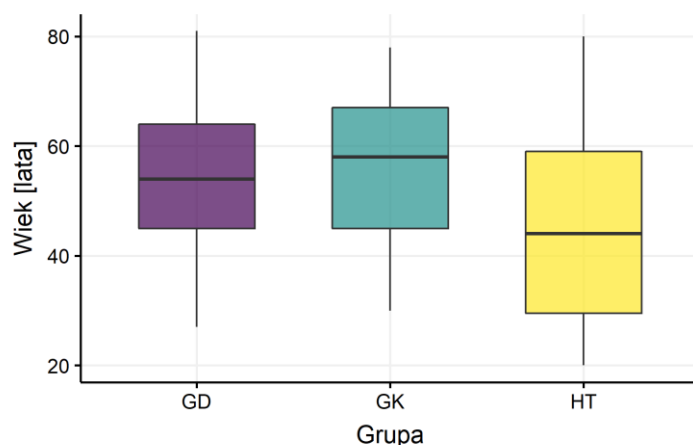
Średni wiek pacjentów z grup badanych GD i HT oraz grupy kontrolnej wynosił odpowiednio $53,9 \pm 13,1$ lat vs. $44,4 \pm 18,6$ vs. $57,4 \pm 12,8$ lat [Rycina 3].

Grupy badane, jak i grupa kontrolna nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wartości BMI ($p=0,07$). Największe wartości BMI zaobserwowano w grupie kontrolnej ($26,91 \pm 4,08$ kg/m²). Zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia dotyczącymi klasyfikacji BMI nadwagę miało ponad 63% pacjentów z chorobą GD, 45,8% z grupy HT oraz 73,8% z grupy kontrolnej.

Tabela 7. Porównanie parametrów antropometrycznych w grupach badanych i kontrolnej.

Analizowana zmienna	Grupa GD (n=69)	Grupa HT (n=23)	Grupa GK (n=41)	p
Wiek (lata)	$53,9 \pm 13,1$	$44,4 \pm 18,6$	$57,7 \pm 12,8$	$p^1=0,06$
	54 (45-64)	44 (29,5-59)	58 (45-67)	$p^2=0,21$
				$p^3=0,02$
BMI (kg/m ²)	$26,68 \pm 5,37$ 26,84 (21,26-29,78)	$24,79 \pm 5,46$ 24,16 (20,85-26,81)	$26,91 \pm 4,08$ 27,10 (24,81-29,18)	0,07

Stosowane skróty: GD - choroba Gravesa i Basedowa, HT - choroba Hashimoto, GK - grupa kontrolna, p - poziom istotności statystycznej, p¹ - różnica między grupami GD-HT, p² - różnica między grupami GD-GK, p³ - różnica między grupami HT-GK



Rycina 3. Porównanie grup badanych i kontrolnej pod względem wieku.

4.2. Analiza parametrów gospodarki węglowodanowej u pacjentów z AITD

Charakterystykę parametrów gospodarki węglowodanowej przedstawiono w Tabeli 8. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniem glukozy ($p=0,9$) i insuliny ($p=0,3$) w grupach badanych i kontrolnej. Średnie stężenie glukozy na czczo wynosiło dla grup badanych GD, HT oraz kontrolnej odpowiednio $94,18 \pm 29,08$; $89,30 \pm 11,12$ i $91,34 \pm 13,62$ mg/dl. Zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego dotyczącymi prawidłowego stężenia glukozy na czczo u ponad 77% pacjentów z GD, 92% z HT oraz 79% pacjentów z grupy kontrolnej stwierdzono prawidłową glikemię na czczo, a więc stężenie glukozy w surowicy poniżej 100 mg/dl. We wszystkich grupach nie zaobserwowano stężeń insuliny na czczo większego niż zakres referencyjny dla tego parametru, a więc powyżej 29 μ IU/ml.

Tabela 8. Stężenia glukozy i insuliny w grupach badanych i grupie kontrolnej.

Analizowana zmienna	Grupa GD (n=69)	Grupa HT (n=23)	Grupa GK (n=41)	p
Glukoza (mg/dl)	$94,18 \pm 29,08$ 89 (81,00-97,25)	$89,30 \pm 11,12$ 87 (83,00-93,00)	$91,34 \pm 13,62$ 86 (83,00-94,00)	0,9
Insulina (μIU/ml)	$10,65 \pm 5,94$ 8,95 (6,60-15,35)	$8,71 \pm 7,38$ 6,07 (3,01-12,55)	$10,06 \pm 7,75$ 7,99 (4,10-13,60)	0,3

4.3. Analiza parametrów gospodarki lipidowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej

W Tabeli 9 przedstawiono charakterystykę lipidogramu w grupach badanych oraz grupie kontrolnej. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy stężeniem cholesterolu całkowitego ($p=0,4$), cholesterolu frakcji HDL ($p=0,08$), cholesterolu frakcji LDL ($p=0,6$) oraz trójglicerydów ($p=0,1$) w grupach badanych i kontrolnej. Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego prawidłowe stężenie cholesterolu całkowitego występowało u 47,2% vs. 50% vs. 33,3%, HDL 80,5% vs. 100% vs. 78,6%, LDL 66,7% vs. 58,3% vs. 61,9%, trójglicerydów 65,3% vs. 100% vs. 76,2%, odpowiednio w grupie GD, HT i GK.

Tabela 9. Gospodarka lipidowa w grupach badanych i kontrolnej.

Analizowana zmienna	Grupa GD (n=69)	Grupa HT (n=23)	Grupa GK (n=41)	P
Cholesterol całkowity (mg/dl)	199,6 ± 56,27 196 (157,8-242,0)	196,3 ± 40,90 189 (173,0-229,5)	210,7 ± 36,88 208 (180,0-315,0)	0,4
HDL (mg/dl)	52,21 ± 13,61 50 (43,75-60,0)	58,22 ± 10,48 57 (49,50-63,00)	56,39 ± 14,71 56 (45,00-66,00)	0,08
LDL (mg/dl)	122,5 ± 48,16 119 (83,0-163,8)	120,2 ± 33,74 117 (99,5-150,5)	129,4 ± 33,70 122 (105,0-154,0)	0,6
TG (mg/dl)	124,66 ± 73,17 101 (79,5-165,0)	89,74 ± 32,65 88 (67,5-121,5)	122,12 ± 61,30 106 (82,0-149,0)	0,1

Stosowane skróty: HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości, LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości, TG - trójglicerydy.

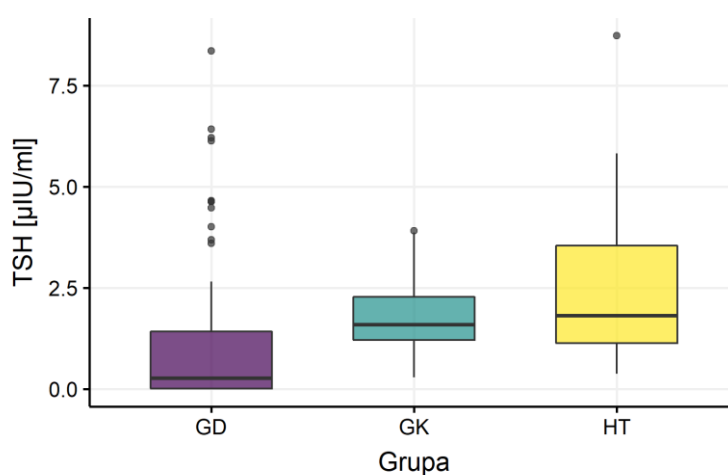
4.4. Analiza parametrów gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej

Analizę profilu hormonalnego badanych grup oraz grupy kontrolnej przedstawiono w Tabeli 10. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej zaobserwowano, że istnieje różnica istotna statystycznie w wartości stężenia TSH pomiędzy grupą GD a HT oraz GD i GK ($p<0,0001$). Istotnie większe stężenie TSH występowało w grupie HT ($2,51\pm 2,04$ $\mu\text{IU/ml}$), natomiast mniejsze w grupie GD ($1,23\pm 1,92$ $\mu\text{IU/ml}$) [Rycina 4].

Tabela 10. Charakterystyka parametrów gospodarki hormonalnej w grupach badanych i kontrolnej.

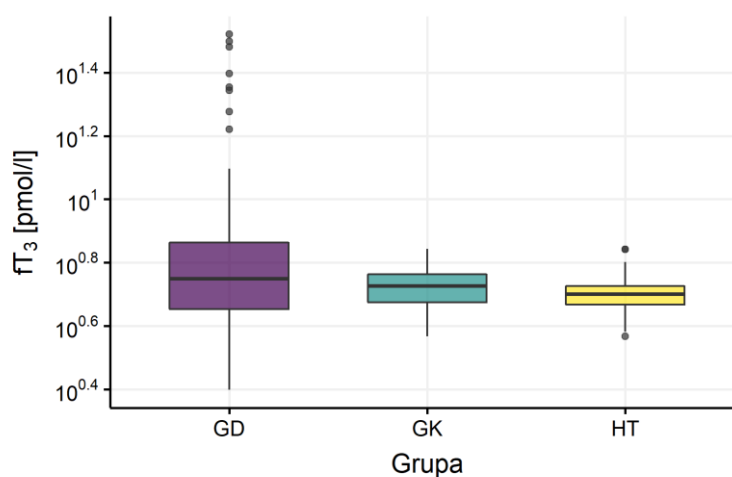
Analizowana zmienna	Grupa GD (n=69)	Grupa HT (n=23)	Grupa GK (n=41)	p
TSH (μ IU/ml)	1,23 \pm 1,92	2,51 \pm 2,04	1,74 \pm 0,81	p ¹ < 0,0001
	0,26 (0,005-1,42)	1,81 (1,14-3,54)	1,59 (1,21-2,27)	p ² < 0,0001
				p ³ = 0,53
fT₃ (pmol/l)	8,11 \pm 6,74	5,10 \pm 0,87	5,35 \pm 0,77	p ¹ = 0,028
	5,61 (4,50-7,30)	5,01 (4,65-5,33)	5,33 (4,73-5,79)	p ² = 0,14
				p ³ = 0,26
fT₄ (pmol/l)	20,53 \pm 15,64	14,71 \pm 2,54	13,53 \pm 2,07	p ¹ = 0,22
	15,3 (12,90-20,60)	14,3 (12,95-16,15)	13,8 (12,50-15,20)	p ² = 0,003
				p ³ = 0,22
Anty-TG (IU/ml)	128,6 \pm 499,0	438,7 \pm 944,7	<20,0 \pm 0,0	p ¹ = 0,007
	20 (20,00-20,00)	20 (20,00-56,65)	20 (20,00-20,00)	p ² = 0,007
				p ³ < 0,0001
Anty-TPO (IU/ml)	262,1 \pm 358,3	373,0 \pm 358,3	12,4 \pm 4,33	p ¹ = 0,08
	42,8 (10,2-412,1)	280,0 (31,2-610,5)	10,0 (10,0-13,5)	p ² < 0,0001
				p ³ < 0,0001
TRAb (U/l)	19,31 \pm 17,29	1,10 \pm 0,44	0,24 \pm 0,43	p ¹ < 0,0001
	9,56 (4,35-37,35)	0,99 (0,83-1,21)	0,001 (0,001-0,210)	p ² < 0,0001
				p ³ = 0,003

Stosowane skróty: p¹ - różnica między grupami GD-HT, p² - różnica między grupami GD-GK, p³ - różnica między grupami HT-GK

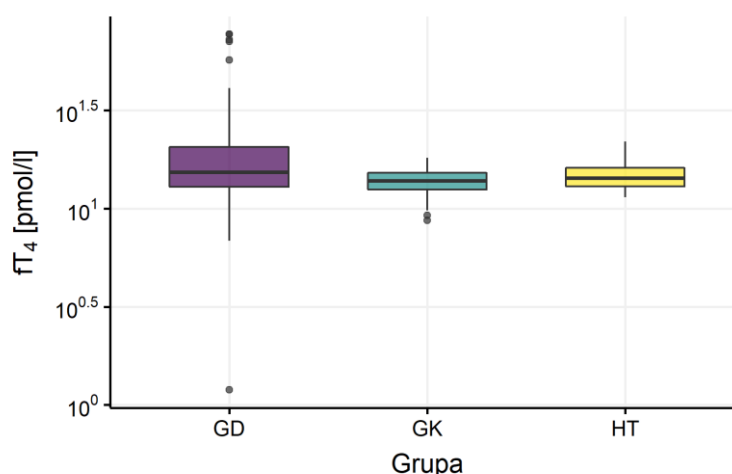


Rycina 4. Rozkład średnich stężeń TSH dla grup badanych i kontrolnej.

Analiza statystyczna wykazała również istotną statystycznie różnicę w stężeniach fT_3 pomiędzy grupą GD a HT ($p=0,028$) [Rycina 5] oraz w stężeniach fT_4 pomiędzy grupą GD a GK ($p=0,003$) [Rycina 6]. Większe stężenia fT_3 i fT_4 występowały w grupie GD, odpowiednio $8,11\pm 6,74$ i $20,53\pm 15,64$ pmol/l, natomiast w grupie HT zaobserwowano istotnie mniejsze wartości stężeń fT_3 ($5,10\pm 0,87$ pmol/l) w stosunku do grupy GD. W grupie GK średnie wartości stężeń fT_4 wynosiły $13,53\pm 2,07$ pmol/l i były również znacząco mniejsze niż w grupie GD.



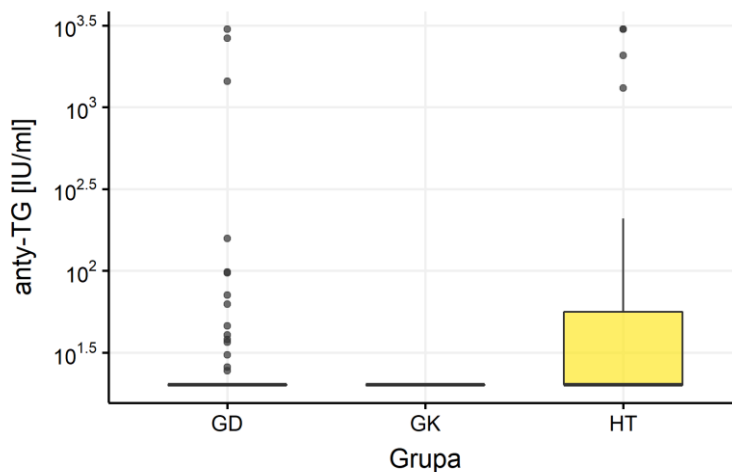
Rycina 5. Rozkład średnich stężeń fT_3 w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.



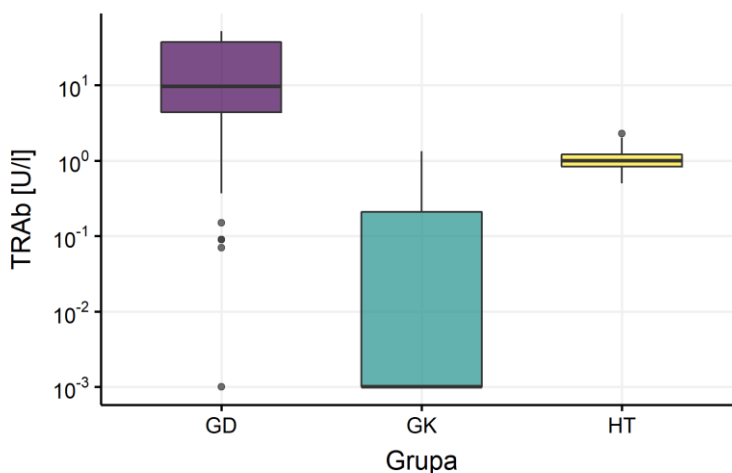
Rycina 6. Rozkład średnich stężeń fT_4 w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.

Różnice istotne statystycznie wykazano także pomiędzy wszystkimi grupami w mianach anty-TG i TRAb. Grupa GD charakteryzowała się większym mianem TRAb

($19,31 \pm 17,29$ U/l), a grupa HT większym mianem anti-TG ($438,7 \pm 944,7$ IU/ml). Grupa kontrolna prezentowała mniejsze miana obu parametrów, odpowiednio $0,24 \pm 0,43$ U/l i $20,0 \pm 0,0$ IU/ml. Rozkład średnich mian anti-TG i TRAb przedstawiono na Rycinie 7 i 8. U ponad 90% pacjentów z grupy GD wartość miana TRAb była powyżej 1,5 U/l.



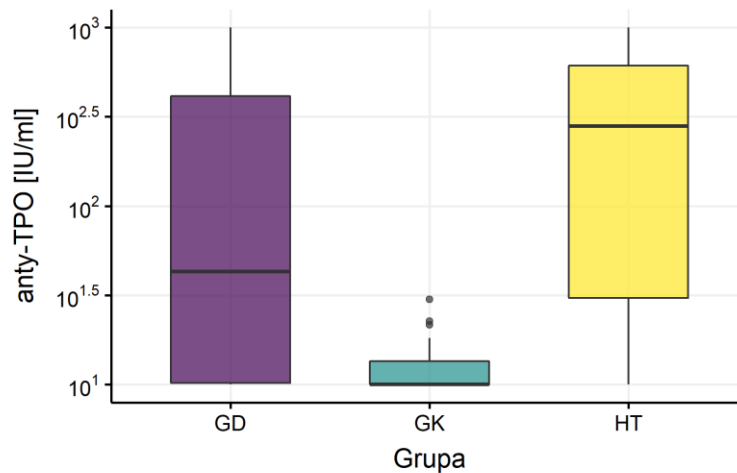
Rycina 7. Rozkład średnich mian anti-TG w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.



Rycina 8. Rozkład średnich mian TRAb w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.

Analizując wartości anti-TPO między grupami zaobserwowano różnice istotne statystycznie ($p < 0,0001$) dotyczące znacząco większych mian tych przeciwciał w grupie HT względem grupy GK oraz GD względem grupy GK. Średnie wartości miana anti-TPO w HT

wynosiły $373,0 \pm 358,3$ IU/ml, w grupie GD $262,1 \pm 358,3$ IU/ml, a w grupie GK $12,4 \pm 4,33$ IU/ml [Rycina 9]. U 80% pacjentów z grupy HT i u 26% pacjentów z GD miano anty-TPO było powyżej zakresu referencyjnego tego parametru, a więc powyżej 35 IU/ml.



Rycina 9. Rozkład średnich mian anty-TPO w skali logarytmicznej dla grup badanych i kontrolnej.

4.5. Ocena stężeń sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej

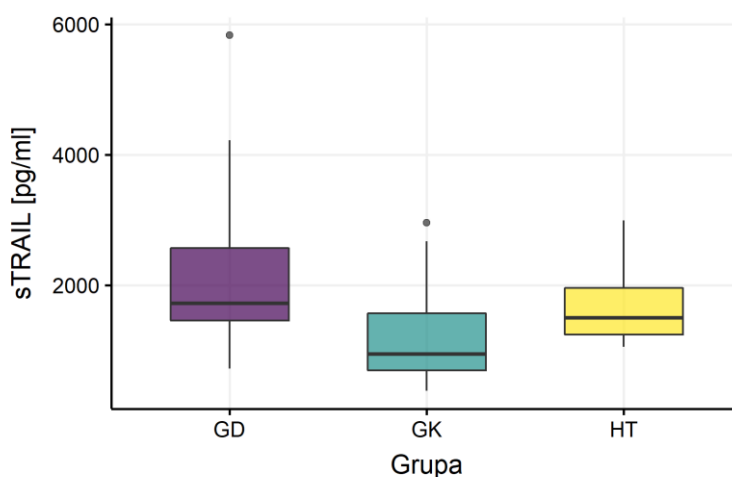
W surowicy krwi wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badania zostały oznaczone stężenia sTRAIL i trzech jego receptorów: sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 oraz OPG. W Tabeli 11 przedstawiono ocenę stężeń badanych białek.

Pacjenci z grupy GD i HT charakteryzowali się istotnie większymi stężeniami sTRAIL względem grupy GK ($1164 \pm 672,2$ pg/ml). Średnia wartość stężeń sTRAIL w grupie GD wynosiła ($2047 \pm 903,1$ pg/ml), a w HT ($1638 \pm 472,2$ pg/ml) i nie zauważono różnicy istotnej statystycznie między stężeniami oznaczanego białka w obu tych grupach ($p= 0,115$) [Rycina 10].

Tabela 11. Stężenie oznaczanych białek w grupach badanych i kontrolnej.

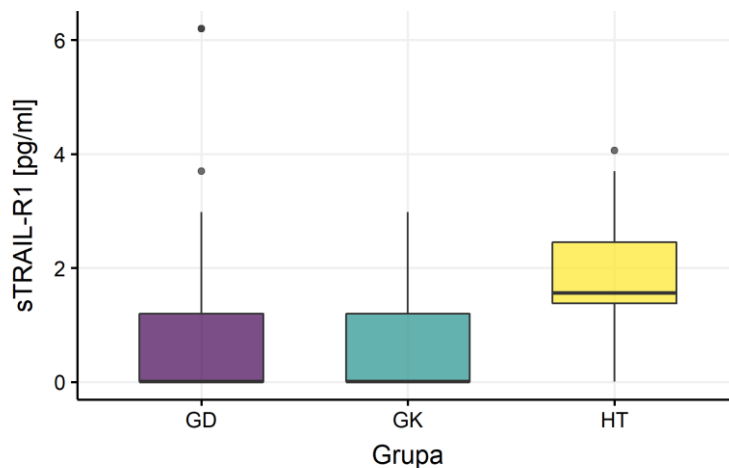
Analizowana zmienna	Grupa GD (n=69)	Grupa HT (n=23)	Grupa GK (n=41)	p
sTRAIL (pg/ml)	2047 ± 903,1	1638 ± 472,2	1164 ± 672,2	p ¹ =0,12
	1722 (1456,1-2565)	1496 (1240,6-1954)	939 (693,8-1565)	p ² <0,0001
				p ³ =0,01
sTRAIL-R1 (pg/ml)	0,81 ± 1,42	1,92 ± 0,93	0,57 ± 0,91	p ¹ <0,0001
	0,001 (0,001-1,20)	1,56 (1,38-2,45)	0,001 (0,001-1,20)	p ² =0,68
				p ³ <0,0001
sTRAIL-R2 (pg/ml)	3,26 ± 14,12 0,001 (0,001-0,66)	2,93 ± 6,79 0,001 (0,001-0,001)	2,66 ± 4,37 0,001 (0,001-4,46)	0,4
OPG (pmol/l)	3,59 ± 1,44 3,54 (2,73-4,66)	3,14 ± 1,35 3,0 (2,39-4,12)	3,98 ± 1,30 3,84 (3,01-4,79)	0,08

Stosowane skróty: p¹ - różnica między grupami GD-HT, p² - różnica między grupami GD-GK, p³ - różnica między grupami HT-GK



Rycina 10. Rozkład średnich stężeń sTRAIL w grupach badanych i kontrolnej.

Analiza statystyczna wykazała znacząco większe stężenie sTRAIL-R1 w grupie HT, w porównaniu do GD (p<0,0001) i GK (p<0,0001). Średnie wartości stężeń receptora sTRAIL-R1 w grupie pacjentów z HT wynosiły 1,92±0,93 pg/ml, a w grupie GD 0,81±1,42 pg/ml. Wszystkie otrzymane wartości w tym oznaczeniu były poniżej progu czułości testu, który dla sTRAIL-R1 wynosi 8 pg/ml, a wyniki uzyskano poprzez tzw. ekstrapolowanie. Charakterystykę badanych grup pod względem średnich stężeń sTRAIL-R1 przedstawiono na Rycinie 11.



Rycina 11. Rozkład średnich stężeń sTRAIL-R1 w grupach badanych i kontrolnej.

Oceniając stężenie receptora sTRAIL-R2 w badanych grupach nie wykazano istotnej różnicy w wartościach stężenia tego receptora pomiędzy grupami ($p=0,4$). U 82% pacjentów stężenie tego białka było poniżej progu czułości testu, który wynosił 6 pg/ml, a otrzymane wyniki oznaczeń były ekstrapolowane.

Różnica pomiędzy grupami a stężeniem receptora OPG pozostawała na granicy istotności statystycznej ($p=0,08$). Średnie stężenie OPG w grupie GD wynosiło $3,59 \pm 1,44$ pmol/l i było większe względem grupy HT ($3,14 \pm 1,35$ pmol/l). Największe stężenia OPG prezentowała grupa kontrolna $3,98 \pm 1,30$ pmol/l.

4.6. Analiza korelacji między stężeniem sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG a wiekiem, BMI, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej u pacjentów z AITD

Analizując zależności pomiędzy wartościami stężeń oznaczanych białek a wiekiem zaobserwowano istotną dodatnią korelację związaną ze stężeniem OPG w grupie GD ($r=0,52$; $p<0,0001$). Natomiast w grupie HT wykazano istotną, dodatnią korelację między wartością BMI a stężeniem białka sTRAIL ($r=0,46$; $p=0,03$) oraz receptora sTRAIL-R1 ($r=0,49$; $p=0,02$). Otrzymane wyniki analizy statystycznej przedstawiono w Tabeli 12.

Tabela 12. Wartość współczynnika korelacji Spearmana (r) i poziomu istotności statystycznej między stężeniem oznaczanych białek a wiekiem i wartością BMI w grupie HT i GD.

Analizowana zmienna	AITD (n= 92)	sTRAIL (pg/ml)	sTRAIL-R1 (pg/ml)	sTRAIL-R2 (pg/ml)	OPG (pmol/l)
Wiek (lata)	GD (n= 69)	r= -0,12 p= 0,317	r= -0,09 p= 0,47	r= -0,14 p= 0,267	r= 0,52 p= <0,0001
	HT (n= 23)	r= -0,06 p= 0,80	r= 0,09 p= 0,69	r= -0,33 p= 0,12	r= 0,28 p= 0,20
BMI (kg/m ²)	GD (n= 69)	r= -0,05 p= 0,80	r= -0,04 p= 0,81	r= 0,08 p= 0,65	r= 0,07 p= 0,70
	HT (n= 23)	r= 0,46 p= 0,03	r= 0,49 p= 0,02	r= -0,02 p= 0,94	r= 0,19 p= 0,39

Stosowane skróty: sTRAIL - forma rozpuszczalna białka TRAIL; sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 – formy rozpuszczalne receptorów śmierci dla białka TRAIL; OPG- osteoprotegeryna

Oceniając zależności pomiędzy stężeniem sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 oraz OPG a parametrami gospodarki węglowodanowej wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację jedynie pomiędzy stężeniem receptora OPG a stężeniem insuliny w grupie GD (r=-0,36; p=0,006) [Tabela 13].

Tabela 13. Wartość współczynnika korelacji Spearmana (r) i poziomu istotności statystycznej między stężeniem oznaczanych białek a parametrami gospodarki węglowodanowej w grupie HT i GD.

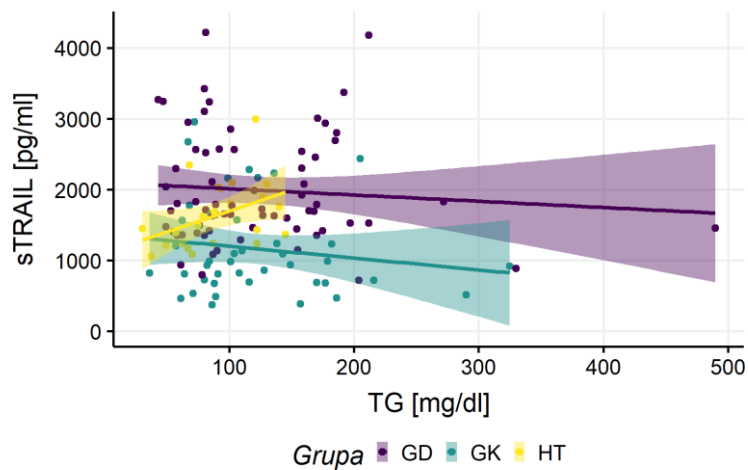
Analizowana zmienna	AITD (n= 92)	sTRAIL (pg/ml)	sTRAIL-R1 (pg/ml)	sTRAIL-R2 (pg/ml)	OPG (pmol/l)
Glukoza (mg/dl)	GD (n= 69)	r= 0,19 p= 0,13	r= 0,15 p= 0,23	r= -0,19 p= 0,12	r= 0,18 p= 0,15
	HT (n= 23)	r= 0,14 p= 0,53	r= 0,39 p= 0,06	r= -0,31 p= 0,15	r= 0,15 p= 0,50
Insulina (μIU/ml)	GD (n= 69)	r= 0,02 p= 0,90	r= -0,31 p= 0,06	r= 0,36 p= 0,0536	r= -0,36 p= 0,006
	HT (n= 23)	r= 0,24 p= 0,26	r= 0,11 p= 0,60	r= 0,11 p= 0,60	r= 0,19 p= 0,38

Analizując korelacje pomiędzy stężeniem sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 oraz OPG a parametrami gospodarki lipidowej wykazano istotną, dodatnią korelację pomiędzy stężeniem białka sTRAIL a stężeniem trójglicerydów w grupie HT ($r=0,48$; $p=0,02$) [Rycina 12]. Analiza pozostałych parametrów nie wykazała statystycznie istotnych różnic w grupach GD oraz HT. Otrzymane wyniki analizy statystycznej zostały przedstawione w Tabeli 14.

Tabela 14. Wartość współczynnika korelacji Spearmana (r) i poziomu istotności statystycznej między stężeniem oznaczanych białek a parametrami gospodarki lipidowej w grupie HT i GD.

Analizowana zmienna	AITD (n= 92)	sTRAIL (pg/ml)	sTRAIL-R1 (pg/ml)	sTRAIL-R2 (pg/ml)	OPG (pmol/l)
Cholesterol całkowity (mg/dl)	GD (n= 69)	$r= 0,02$ $p= 0,84$	$r= -0,06$ $p= 0,64$	$r= 0,005$ $p= 0,97$	$r= 0,18$ $p= 0,15$
	HT (n= 23)	$r= 0,17$ $p= 0,43$	$r= 0,18$ $p= 0,42$	$r= 0,005$ $p= 0,98$	$r= 0,2$ $p= 0,37$
HDL (mg/dl)	GD (n= 69)	$r= 0,10$ $p= 0,40$	$r= 0,09$ $p= 0,44$	$r= -0,18$ $p= 0,15$	$r= -0,004$ $p= 0,98$
	HT (n= 23)	$r= -0,30$ $p= 0,17$	$r= -0,37$ $p= 0,08$	$r= 0,18$ $p= 0,41$	$r= -0,28$ $p= 0,19$
LDL (mg/dl)	GD (n= 69)	$r= 0,005$ $p= 0,97$	$r= -0,06$ $p= 0,65$	$r= 0,07$ $p= 0,56$	$r= 0,15$ $p= 0,23$
	HT (n= 23)	$r= 0,21$ $p= 0,34$	$r= 0,29$ $p= 0,19$	$r= -0,35$ $p= 0,07$	$r= 0,25$ $p= 0,25$
TG (mg/dl)	GD (n= 69)	$r= -0,02$ $p= 0,88$	$r= -0,02$ $p= 0,89$	$r= 0,014$ $p= 0,91$	$r= 0,20$ $p= 0,11$
	HT (n= 23)	$r= 0,48$ $p= 0,02$	$r= 0,35$ $p= 0,11$	$r= -0,01$ $p= 0,95$	$r= 0,37$ $p= 0,08$

Stosowane skróty: HDL- lipoproteiny o wysokiej gęstości, LDL- lipoproteiny o niskiej gęstości, TG- trójglicerydy



Rycina 12. Analiza korelacji między stężeniem białka sTRAIL a stężeniem trójglicerydów w grupach badanych i kontrolnej.

W odniesieniu do parametrów hormonalnych wykazano istotną, ujemną korelację pomiędzy sTRAIL a stężeniem TSH w grupie GD ($r=-0,35$; $p=0,0033$). W grupie GD wykazano również istotną, dodatnią korelację pomiędzy sTRAIL i sTRAIL-R1 a stężeniem fT_3 , odpowiednio ($r=0,40$; $p=0,0008$) i ($r=0,38$; $p=0,0014$). Natomiast w grupie HT zaobserwowano także istotną, ujemną korelację między stężeniem sTRAIL-R2 oraz mianem anty-TPO i dodatnią korelację między stężeniem OPG oraz mianem anty-TPO, odpowiednio ($r=-0,47$; $p=0,025$) i ($r=0,42$; $p=0,048$). Korelacje między profilem hormonalnym badanych grup przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Wartość współczynnika korelacji Spearmana (r) i poziomu istotności statystycznej pomiędzy stężeniem oznaczanych białek a parametrami gospodarki hormonalnej w grupie HT i GD.

Analizowana zmienna	AITD (n= 92)	sTRAIL (pg/ml)	sTRAIL-R1 (pg/ml)	sTRAIL-R2 (pg/ml)	OPG (pmol/l)
TSH (μ IU/ml)	GD (n= 69)	r= -0,35 p= 0,0033	r= -0,23 p= 0,0587	r= -0,08 p= 0,51	r= 0,22 p= 0,07
	HT (n= 23)	r= -0,20 p= 0,36	r= -0,06 p= 0,80	r= -0,38 p= 0,08	r= 0,31 p= 0,15
fT₃ (pmol/l)	GD (n= 69)	r= 0,40 p= 0,0008	r= 0,38 p= 0,0014	r= 0,02 p= 0,85	r= 0,08 p= 0,52
	HT (n= 23)	r= -0,17 p= 0,44	r= -0,0631 p= 0,77	r= -0,07 p= 0,74	r= 0,06 p= 0,78
fT₄ (pmol/l)	GD (n= 69)	r= 0,09 p= 0,48	r= 0,05 p= 0,68	r= 0,19 p= 0,12	r= -0,20 p= 0,09
	HT (n= 23)	r= -0,10 p= 0,63	r= -0,13 p= 0,56	r= 0,02 p= 0,92	r= -0,24 p= 0,27
anty-TG (IU/ml)	GD (n= 69)	r= 0,15 p= 0,21	r= 0,13 p= 0,29	r= -0,11 p= 0,38	r= -0,19 p= 0,12
	HT (n= 23)	r= 0,0008 p= 0,99	r= 0,33 p= 0,12	r= -0,36 p= 0,09	r= -0,05 p= 0,81
anty-TPO (IU/ml)	GD (n= 69)	r= 0,10 p= 0,42	r= 0,18 p= 0,14	r= 0,01 p= 0,90	r= 0,006 p= 0,96
	HT (n= 23)	r= 0,21 p= 0,33	r= 0,25 p= 0,26	r= -0,47 p= 0,025	r= 0,42 p= 0,048
TRAb (U/l)	GD (n= 69)	r= 0,10 p= 0,41	r= 0,09 p= 0,46	r= 0,09 p= 0,45	r= 0,10 p= 0,41
	HT (n= 23)	r= 0,20 p= 0,36	r= 0,07 p= 0,77	r= 0,04 p= 0,85	r= -0,009 p= 0,97

Stosowane skróty: TSH- tyreotropina, fT₃- trijodotyronina, fT₄- tyroksyna, anty-TG- przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie, anty-TPO- przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycy, TRAb- przeciwciała przeciwko receptorowi TSH

4.7. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów: rs2230229, rs20576, rs6557634 u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej

Część analizy statystycznej związanej z polimorfizmami genu *TNFRSF10A* rozpoczęto od określenia czy częstość występowania genotypów jest zgodna z prawem Hardy-Weinberga (HW). Po przeprowadzeniu szeregu obliczeń nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy porównywanymi rozkładami liczebności genotypów [Tabela 16]. Częstość alleli wszystkich badanych polimorfizmów genu *TNFRSF10A* zarówno w grupach badanych, jak i w grupie kontrolnej była zgodna z prawem HW.

Tabela 16. Analiza rozkładu genotypów badanych polimorfizmów genu *TNFRSF10A* w grupach badanych oraz kontrolnej.

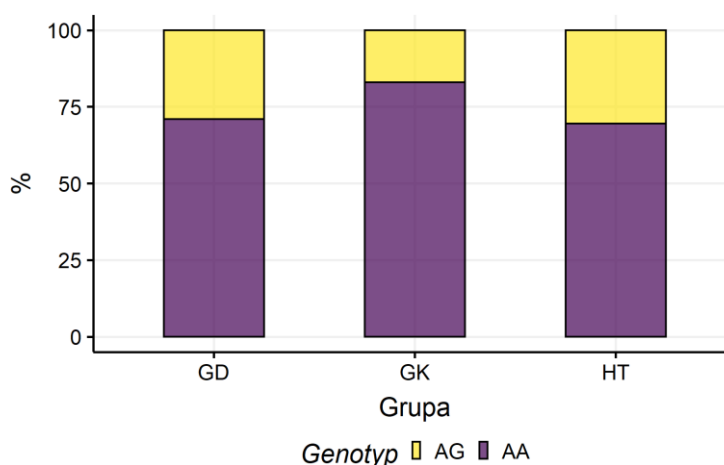
Polimorfizm	Grupa GD (n= 69)	Grupa HT (n= 23)	Grupa GK (n= 41)
rs2230229	p = 0,159	p = 0,389	p = 0,550
rs20576	p = 0,136	p = 0,183	p = 0,321
rs6557634	p = 0,738	p = 0,505	p = 0,168

p>0,05 zgodne z prawem HW

Po przeprowadzeniu analizy statystycznej z zastosowaniem testu Fishera nie zaobserwowano różnicy istotnej statystycznie dotyczącej częstości występowania genotypów polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* pomiędzy grupami GD, HT i GK (p= 0,33) [Tabela 17] [Rycina 13]. W każdej z badanych grup dominują homozygoty AA, natomiast w żadnej z badanych grup nie stwierdzono obecności homozygoty GG. Analizując częstość występowania alleli zauważono, że we wszystkich grupach dominuje allel ochronny A (85,51% vs. 84,78% vs. 91,46%) nad allelem ryzyka G (14,49% vs. 15,22% vs. 8,54%).

Tabela 17. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

Analizowana zmienna	Grupa GD (n= 69)	Grupa HT (n= 23)	Grupa GK (n= 41)	p
Genotyp AA	49 (71,01%)	16 (69,57%)	34 (82,93%)	0,33
Genotyp AG	20 (20,99%)	7 (30,43%)	7 (17,07%)	
Genotyp GG	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Allel A	118 (85,51%)	39 (84,78%)	75 (91,46%)	X
Allel G	20 (14,49%)	7 (15,22%)	7 (8,54%)	

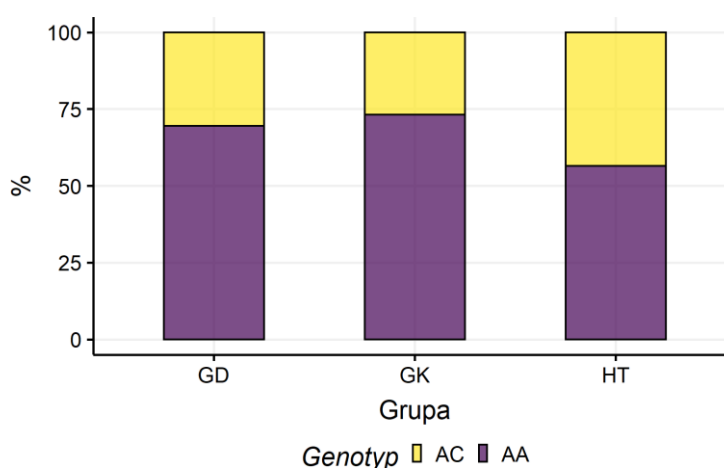


Rycina 13. Częstość występowania genotypów polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

Wyniki analizy statystycznej z użyciem testu Fishera polimorfizmu rs20576 genu *TNFRSF10A* były podobne do rezultatów uzyskanych w toku analizy polimorfizmu rs2230229. W tym przypadku również nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów w grupach GD, HT i GK ($p= 0,39$) [Tabela 18] [Rycina 14]. Dominującym genotypem w tym polimorfizmie była homozygota AA, a homozygot CC w ogóle nie zaobserwowano w eksperymencie. Allelem ochronnym we wszystkich grupach był allel A (84,78% vs. 78,26% vs. 86,59%), a allel C stanowił allel ryzyka (15,22% vs. 21,74% vs. 13,41%).

Tabela 18. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs20576 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

Analizowana zmienna	Grupa GD (n= 69)	Grupa HT (n= 23)	Grupa GK (n= 41)	p
Genotyp AA	48 (69,57%)	13 (56,52%)	30 (73,17%)	0,39
Genotyp AC	21 (30,43%)	10 (43,48%)	11 (26,83%)	
Genotyp CC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Allel A	117 (84,78%)	36 (78,26%)	71 (86,59%)	X
Allel C	21 (15,22%)	10 (21,74%)	11 (13,41%)	

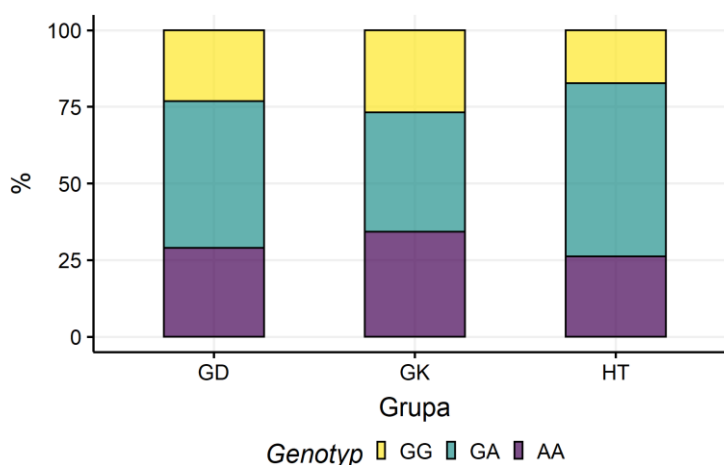


Rycina 14. Częstość występowania genotypów polimorfizmu rs20576 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

Analizując częstość występowania genotypów polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* zaobserwowano występowanie wszystkich trzech możliwych genotypów, co jest cechą odróżniającą od pozostałych dwóch polimorfizmów. Ponadto nie zauważono różnic istotnych statystycznie pod względem częstości występowania genotypów tego polimorfizmu w grupach GD, HT i GK ($p=0,76$) [Tabela 19] [Rycina 15]. We wszystkich grupach najczęściej występowały heterozygoty GA (47,83% vs. 56,52% vs. 39,02%). Natomiast częstość występowania homozygot AA, jak i GG była zbliżona. Częstość występowania zarówno allela ochronnego A (52,90% vs. 54,35% vs. 53,66%), jak i allela ryzyka G (47,10% vs. 45,65% vs. 46,34%) we wszystkich grupach były podobne.

Tabela 19. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

Analizowana zmienna	Grupa GD (n=69)	Grupa HT (n=23)	Grupa GK (n=41)	P
Genotyp AA	20 (28,99%)	6 (26,09%)	14 (34,15%)	0,76
Genotyp GA	33 (47,83%)	13 (56,52%)	16 (39,02%)	
Genotyp GG	16 (23,19%)	4 (17,39%)	11 (26,83%)	
Allel A	73 (52,90%)	25 (54,35%)	44 (53,66%)	X
Allel G	65 (47,10%)	21 (45,65%)	38 (46,34%)	



Rycina 15. Częstość występowania genotypów polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

4.8. Analiza korelacji występowania genotypów badanych polimorfizmów ze stężeniem sTRAIL i sTRAIL-R1 u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej

Na podstawie analizy statystycznej nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy polimorfizmami rs2230229, rs20576, rs6557634 a stężeniem białka sTRAIL oraz receptora sTRAIL-R1 [Tabela 20-22].

Tabela 20. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a stężeniem oznaczanych w eksperymencie białek w grupach badanych i grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AG	AA			
sTRAIL (pg/ml)	GD	1994 ± 890,2 1760,8 (1389,9-2474)	2068 ± 916,5 1721,7 (1495,2-2567)	<0,0001	0,46	0,79
	HT	1806 ± 617,5 1681,3 (1343,7-2022)	1564 ± 394,5 1461,7 (1234,2-1822)			
	GK	1134 ± 615,7 929,0 (707,7-1388)	1170 ± 691,8 958,8 (693,1-1483)			
sTRAIL-R1 (pg/ml)	GD	0,49 ± 0,81 0,001 (0,001-1,20)	0,94 ± 1,59 0,001 (0,001-2,27)	<0,0001	0,78	0,99
	HT	2,07 ± 0,79 1,91 (1,38-2,81)	1,86 ± 1,00 1,56 (1,47-2,00)			
	GK	0,51 ± 0,67 0,001 (0,001-1,02)	0,58 ± 0,96 0,001 (0,001-1,34)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem

Tabela 21. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a stężeniem oznaczanych w eksperymencie białek w grupach badanych i grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AC	AA			
sTRAIL (pg/ml)	GD	2268 ± 936,7 1990,6 (1462,0-2938)	1950 ± 880,3 1703,5 (1419,7-2296)	<0,0001	0,11	0,27
	HT	1593 ± 609,4 1378,6 (1240,6-1618)	1672 ± 356,9 1754,2 (1446,8-2010)			
	GK	1349 ± 720,6 1090,3 (840,8-1865)	1096 ± 653,0 1921,7 (685,4-1228)			
sTRAIL-R1 (pg/ml)	GD	1,04 ± 1,62 0,001 (0,001-2,27)	0,70 ± 1,33 0,001 (0,001-1,20)	<0,0001	0,41	0,61
	HT	1,72 ± 0,82 1,56 (1,56-2,18)	2,08 ± 1,01 1,56 (1,20-2,98)			
	GK	0,77 ± 0,99 0,001 (0,001-1,55)	0,49 ± 0,89 0,001 (0,001-0,90)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - różnica między analizowaną zmienną, grupą i genotypem

Tabela 22. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a stężeniem oznaczanych w eksperymencie białek w grupach badanych i grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana Zmienna	Grupa	Genotyp			p ¹	p ²	p ³
		AA	GA	GG			
sTRAIL (pg/ml)	GD	1972 ± 662,5 1747,9 (1525,4-2187)	2228 ± 993,9 1825,0 (1634,8-2802)	1807 ± 886,7 1544,6 (1249,5-2341)	<0,0001	0,12	0,30
	HT	1648 ± 382,5 1672,3 (1388,8-1932)	1650 ± 540,5 1495,8 (1240,6-1797)	1604 ± 436,3 1561,2 (1272,5-1997)			
	GK	1024 ± 706,8 682,6 (480,1-1437)	1153 ± 667,1 983,1 (794,4-1213)	1286 ± 678,2 10,35,6 (806,6-1632)			
sTRAIL-R1 (pg/ml)	GD	0,75 ± 1,66 0,001 (0,001-0,39)	0,88 ± 1,26 0,001 (0,001-2,27)	0,74 ± 1,54 0,001 (0,001-0,93)	<0,0001	0,11	0,76
	HT	1,56 ± 0,29 1,56 (1,57-1,65)	2,10 ± 1,14 1,91 (1,20-2,98)	1,80 ± 0,62 1,56 (1,56-1,82)			
	GK	0,43 ± 0,74 0,001 (0,001-0,60)	0,42 ± 0,86 0,001 (0,001-0,21)	0,85 ± 1,07 0,001 (0,001-1,82)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - różnica między analizowaną zmienną, grupą i genotypem

4.9. Analiza korelacji częstości występowania polimorfizmów z wiekiem, BMI, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej

Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *TNFRSF10A* a BMI i parametrami gospodarki węglowodanowej wśród pacjentów zakwalifikowanych do grup badanych oraz do grupy kontrolnej. Wykazano, że w polimorfizmie rs20576 w grupie GD osoby o genotypie AC było młodsze od osób z genotypem AA, a w grupie HT osoby z genotypem AA były młodsze od osób z genotypem AC. Homozygoty AA w HT były również młodsze od homozygot AA w grupie GK [Tabela 24]. W polimorfizmie rs6557634 homozygoty AA i heterozygoty GA w grupie HT były młodsze od homozygot AA w grupie GD i GK [Tabela 25]. Wyniki analizy statystycznej zależności częstości występowania polimorfizmów względem wieku, BMI i gospodarki węglowodanowej zostały przedstawione w Tabelach 23-28.

Tabela 23. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a wiekiem i BMI u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AG	AA			
Wiek (lata)	GD	54,40 ± 12,76 54,5 (44,50-65,50)	53,71 ± 13,39 53,0 (45,00-64,00)	0,016	0,51	0,73
		HT	41,00 ± 21,18 37,0 (22,00-59,00)			
	GK		55,0 ± 16,25 46,0 (44,0-68,5)			
BMI (kg/m ²)	GD	30,85 ± 4,81 27,46 (27,29-35,82)	25,56 ± 5,02 24,99 (19,38-28,98)	0,07	0,40	0,10
		HT	24,62 ± 7,29 22,03 (21,00-24,32)			
	GK		27,26 ± 5,76 27,72 (25,14-28,32)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, BMI - wskaźnik masy ciała

Tabela 24. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a wiekiem i BMI u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AC	AA			
Wiek (lata)	GD	49,14 ± 11,96 50,0 (40,00-56,00)	56,00 ± 13,18 55,5 (47,25-65,25)	0,006	0,72	0,004
		HT	54,30 ± 18,63 58,5 (44,25-67,75)			
	GK		56,55 ± 14,67 61,00 (44,50-65,00)			
BMI (kg/m ²)	GD	28,06 ± 6,40 27,42 (22,65-34,07)	26,09 ± 4,89 26,04 (22,24-28,83)	0,10	0,47	0,81
		HT	25,70 ± 6,24 25,36 (21,16-28,01)			
	GK		27,54 ± 4,38 27,10 (26,40-27,86)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, BMI - wskaźnik masy ciała

Tabela 25. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a wiekiem i BMI u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana Zmienna	Grupa	Genotyp			p ¹	p ²	p ³
		AA	GA	GG			
Wiek (lata)	GD	57,44 ± 14,46 59,5 (48,25-66,0)	53,88 ± 12,92 53,0 (45,0-64,0)	51,15 ± 12,32 52,5 (43,75-60,0)	0,003	0,43	0,021
	HT	32,25 ± 14,73 29,0 (20,75-40,5)	41,69 ± 19,91 33,0 (27,0-54,0)	58,33 ± 8,26 59,0 (55,0-64,5)			
	GK	61,00 ± 11,79 63,0 (53,0-69,5)	55,94 ± 12,51 56,5 (45,25-64,0)	56,29 ± 14,32 59,5 (45,00-66,5)			
BMI (kg/m ²)	GD	28,89 ± 3,33 27,51 (27,07-29,57)	26,31 ± 5,14 26,84 (22,35-29,56)	25,48 ± 7,45 21,05 (20,80-30,02)	0,09	0,09	0,47
	HT	22,44 ± 3,50 22,03 (20,60-24,08)	25,01 ± 5,75 25,00 (20,70-26,99)	25,49 ± 6,09 23,58 (21,75-27,33)			
	GK	28,93 ± 3,76 29,18 (27,54-29,73)	26,40 ± 4,42 26,25 (23,46-28,71)	25,91 ± 3,61 27,05 (25,02-27,68)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, BMI - wskaźnik masy ciała

Tabela 26. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki węglowodanowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AG	AA			
Głukoza (mg/dl)	GD	93,75 ± 24,89 88,5 (81,75-91,25)	94,35 ± 30,90 89,5 (80,75-98,25)	0,95	0,71	0,67
	HT	85,43 ± 4,12 85,00 (82,50-87,00)	91,00 ± 12,82 89,50 (85,25-94,00)			
	GK	92,86 ± 13,91 87,00 (82,50-99,00)	91,03 ± 13,75 86,00 (83,00-93,75)			
Insulina (μIU/ml)	GD	8,35 ± 4,80 6,91 (6,64-8,93)	11,11 ± 6,12 9,19 (6,58-15,40)	0,25	0,63	0,56
	HT	6,58 ± 4,91 5,67 (3,01-8,14)	9,64 ± 8,20 6,91 (3,00-14,55)			
	GK	10,63 ± 6,60 8,56 (6,60-13,39)	9,94 ± 8,05 7,47 (3,19-13,53)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem

Tabela 27. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki węglowodanowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AC	AA			
Głukoza (mg/dl)	GD	93,29 ± 23,62 88,0 (81,0-94,0)	94,57 ± 31,44 89,0 (81,5-98,0)	0,90	0,68	0,81
	HT	88,40 ± 7,21 88,5 (86,0-93,0)	90,00 ± 13,65 87,0 (82,0-92,0)			
	GK	89,55 ± 12,53 86,0 (81,5-93,5)	92,00 ± 14,15 87,5 (83,0-96,3)			
Insulina (μIU/ml)	GD	11,01 ± 6,51 8,70 (6,92-14,43)	10,47 ± 5,81 8,06 (6,54-15,25)	0,24	0,48	0,92
	HT	8,29 ± 5,24 8,12 (3,66-10,44)	9,03 ± 8,89 5,67 (2,28-14,20)			
	GK	10,58 ± 6,40 8,13 (6,86-16,20)	9,87 ± 8,29 7,26 (3,40-13,18)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem

Tabela 28. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki węglowodanowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana Zmienna	Grupa	Genotyp			p ¹	p ²	p ³
		GG	GA	AA			
Glukoza (mg/dl)	GD	82,56 ± 11,23 82,0 (77,50-89,00)	98,88 ± 36,19 92,0 (86,75-99,25)	95,95 ± 24,32 90,0 (83,25-99,25)	0,95	0,08	0,05
	HT	83,25 ± 5,50 84,5 (80,50-87,25)	87,77 ± 12,08 86,0 (83,00-90,00)	96,67 ± 8,64 93,5 (92,25-97,75)			
	GK	92,00 ± 13,20 86,0 (83,50-98,50)	94,12 ± 16,88 88,5 (82,75-98,75)	87,64 ± 9,14 85,0 (82,00-93,75)			
Insulina (μIU/ml)	GD	11,84 ± 8,04 10,87 (5,99-16,73)	11,59 ± 5,63 9,52 (8,35-15,55)	7,93 ± 5,46 6,67 (4,60-8,52)	0,26	0,18	0,45
	HT	11,57 ± 10,51 6,66 (5,97-12,26)	6,95 ± 5,79 4,51 (2,28-9,04)	10,60 ± 8,61 9,32 (4,30-13,38)			
	GK	13,37 ± 9,81 12,50 (5,69-17,15)	10,36 ± 7,53 7,99 (6,13-12,93)	7,11 ± 5,17 6,23 (2,59-9,15)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem

W analizie zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami a parametrami gospodarki lipidowej [Tabele 29-31] zaobserwowano istotną korelację jedynie między polimorfizmem rs6557634 a stężeniem cholesterolu całkowitego w grupach ($p=0,048$). W grupie HT homozygoty AA charakteryzowały się istotnie większym stężeniem cholesterolu całkowitego ($236,7 \pm 18,91$ mg/dl) w porównaniu do homozygot AA w grupie GD ($190,7 \pm 63,90$ mg/dl). Natomiast homozygoty GG w grupie GD miały znacząco większe stężenie cholesterolu całkowitego ($223,5 \pm 42,20$ mg/dl) niż w grupie HT ($186,0 \pm 65,83$ mg/dl) [Rycina 16].

Tabela 29. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki lipidowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AG	AA			
Cholesterol całkowity (mg/dl)	GD	200,9 ± 60,41 198,0 (154,2-246,0)	199,1 ± 55,12 195,0 (160,2-238,8)	0,41	0,16	0,27
	HT	181,0 ± 44,19 189,0 (169,0-199,5)	202,9 ± 38,94 203,5 (173,0-231,0)			
	GK	183,0 ± 31,27 179,0 (167,0-180,5)	216,4 ± 35,69 212,5 (196,2-231,2)			
HDL (mg/dl)	GD	30,85 ± 4,81 27,46 (27,29-35,82)	25,56 ± 5,02 24,99 (20,89-28,98)	0,07	0,40	0,10
	HT	24,62 ± 7,29 22,03 (21,00-24,32)	24,87 ± 4,68 25,00 (20,96-27,51)			
	GK	27,26 ± 5,76 27,72 (25,14-28,32)	26,84 ± 3,76 27,05 (24,88-29,31)			
LDL (mg/dl)	GD	122,2 ± 54,63 119,0 (83,0-164,0)	122,6 ± 45,82 116,5 (85,8-163,8)	0,56	0,18	0,42
	HT	103,1 ± 30,22 105,0 (91,50-115,0)	127,6 ± 33,31 133,5 (100,75-154,5)			
	GK	112,1 ± 26,61 103,0 (98,5-110,0)	133,0 ± 34,23 130,5 (112,0-157,0)			
Trójglicerydy (mg/dl)	GD	146,85 ± 96,13 156,5 (80,00-169,5)	115,42 ± 60,0 94,0 (75,50-155,5)	0,07	0,61	0,09
	HT	86,86 ± 32,30 91,0 (75,50-107,0)	91,00 ± 33,78 83,0 (67,75-123,0)			
	GK	89,71 ± 23,17 82,0 (75,50-110,0)	128,79 ± 64,72 109,0 (85,25-166,8)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości, LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości, TG - trójglicerydy

Tabela 30. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki lipidowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

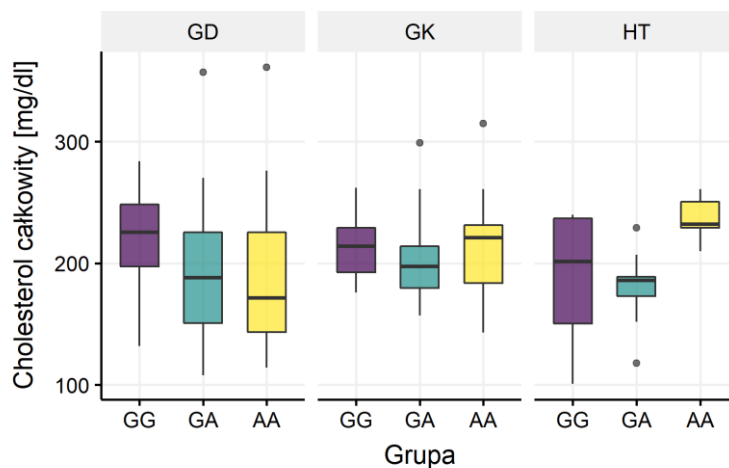
Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AC	AA			
Cholesterol całkowity (mg/dl)	GD	205,0 ± 67,09 197 (158,0-224,0)	197,2 ± 51,34 195 (158,0-243,0)	0,40	0,96	0,86
	HT	201,8 ± 32,18 198 (181,2-224,2)	192,0 ± 47,39 189 (169,0-234,0)			
	GK	206,5 ± 33,68 203 (178,0-228,0)	212,2 ± 38,41 208 (181,5-228,8)			
HDL (mg/dl)	GD	28,06 ± 6,40 27,42 (22,65-34,07)	26,09 ± 4,89 26,04 (22,24-28,83)	0,10	0,47	0,81
	HT	25,70 ± 6,24 25,36 (21,16-28,01)	24,03 ± 4,86 23,05 (21,15-26,16)			
	GK	27,54 ± 4,38 27,10 (26,40-27,86)	26,68 ± 4,02 27,15 (23,80-29,31)			
LDL (mg/dl)	GD	127,3 ± 59,89 117,0 (88,0-148,0)	120,3 ± 42,46 119,0 (83,0-164,5)	0,57	0,86	0,95
	HT	122,3 ± 26,11 118,5 (101,2-140,8)	118,5 ± 39,61 113,0 (99,0-151,0)			
	GK	127,4 ± 30,15 127,0 (104,5-152,0)	130,2 ± 35,37 121,0 (105,8-152,5)			
Trójglicerydy (mg/dl)	GD	145,10 ± 101,79 109,0 (84,0-171,0)	115,53 ± 54,93 92,0 (75,0-159,0)	0,09	0,42	0,99
	HT	94,70 ± 30,42 87,5 (68,5-121,8)	85,92 ± 34,99 91,0 (63,0-102,0)			
	GK	121,73 ± 37,08 116,0 (102,5-146,0)	122,27 ± 68,62 96,0 (80,5-152,2)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości, LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości, TG - trójglicerydy

Tabela 31. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki lipidowej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp			p ¹	p ²	p ³
		GG	GA	AA			
Cholesterol całkowity (mg/dl)	GD	223,5 ± 42,20 225,5 (197,2-248,2)	193,2 ± 55,61 188,0 (150,8-225,2)	190,7 ± 63,90 175,5 (143,5-225,2)	0,36	0,04	0,048
	HT	186,0 ± 65,83 201,5 (150,5-237,0)	180,8 ± 26,90 186,0 (173,0-189,0)	236,7 ± 18,91 232,0 (229,2-250,5)			
	GK	213,2 ± 27,88 214,0 (192,5-229,0)	203,4 ± 37,62 197,5 (179,8-214,0)	217,1 ± 42,86 221,0 (183,5-231,2)			
HDL (mg/dl)	GD	28,89 ± 3,33 27,51 (27,07-29,57)	26,31 ± 5,14 26,84 (22,35-29,56)	25,48 ± 7,45 21,05 (20,80-30,02)	0,09	0,09	0,47
	HT	22,44 ± 3,50 22,03 (20,60-24,08)	25,01 ± 5,75 25,00 (20,70-26,99)	25,49 ± 6,09 23,58 (21,75-27,33)			
	GK	28,93 ± 3,76 29,18 (27,54-29,73)	26,40 ± 4,42 26,25 (23,46-28,71)	25,91 ± 3,61 27,05 (25,02-27,68)			
LDL (mg/dl)	GD	140,4 ± 37,12 141,0 (119,00-169,8)	118,3 ± 48,06 113,0 (80,75-151,5)	114,8 ± 54,40 104,5 (78,50-147,2)	0,54	0,058	0,14
	HT	113,5 ± 50,03 121,5 (82,25-152,8)	108,2 ± 25,33 105,0 (99,00-120,0)	150,5 ± 21,38 152,0 (142,50-159,2)			
	GK	132,9 ± 27,15 132,0 (116,00-154,0)	122,5 ± 30,35 112,0 (102,25-136,2)	134,6 ± 42,04 135,0 (110,25-161,8)			
Trójglicerydy (mg/dl)	GD	131,38 ± 54,76 152,0 (78,25-168,5)	110,47 ± 54,13 94,0 (75,50-154,2)	142,00 ± 105,06 99,5 (83,25-171,0)	0,10	0,09	0,56
	HT	74,25 ± 43,43 70,0 (44,25-100,0)	81,38 ± 24,41 79,0 (67,00-93,0)	118,17 ± 28,05 126,0 (107,00-137,5)			
	GK	139,91 ± 72,80 123,0 (88,50-167,0)	108,69 ± 53,53 92,5 (71,75-139,2)	123,50 ± 60,72 113,0 (86,50-143,8)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości, LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości, TG - trójglicerydy.



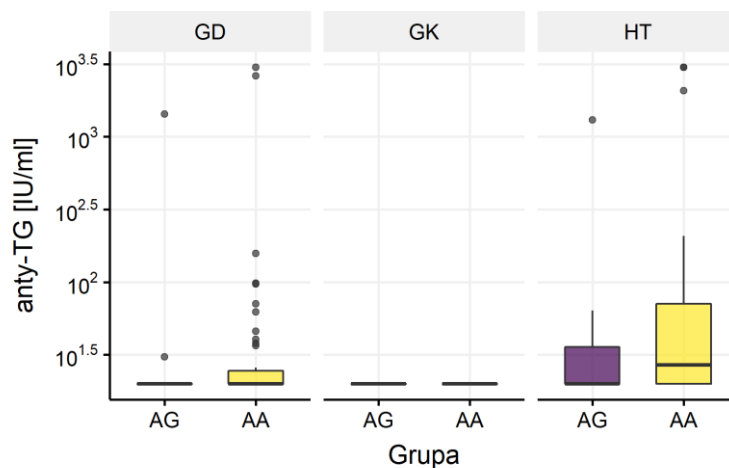
Rycina 16. Rozkład średnich stężeń cholesterolu całkowitego w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

W Tabelach 32-34 przedstawiono analizę korelacji między badanymi polimorfizmami a parametrami gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD oraz w grupie kontrolnej. Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono istotną zależność pomiędzy polimorfizmem rs2230229 a mianem anty-TG ($p < 0,0001$). Homozygoty AA zarówno w grupie GD, jak i HT charakteryzowały się większym mianem anty-TG niż heterozygoty AG [Rycina 17]. Ponadto wykazano korelację pomiędzy rs2230229 a mianem TRAb ($p = 0,007$). W grupie GD heterozygoty AG miały większe miano TRAb niż homozygoty AA, odpowiednio $22,02 \pm 19,52$ U/l i $18,20 \pm 16,38$ U/l, a w grupie HT homozygoty AA charakteryzowały się większym mianem TRAb w porównaniu do osób z genotypem AG, odpowiednio $1,14 \pm 0,51$ U/l i $1,01 \pm 0,24$ U/l [Rycina 18].

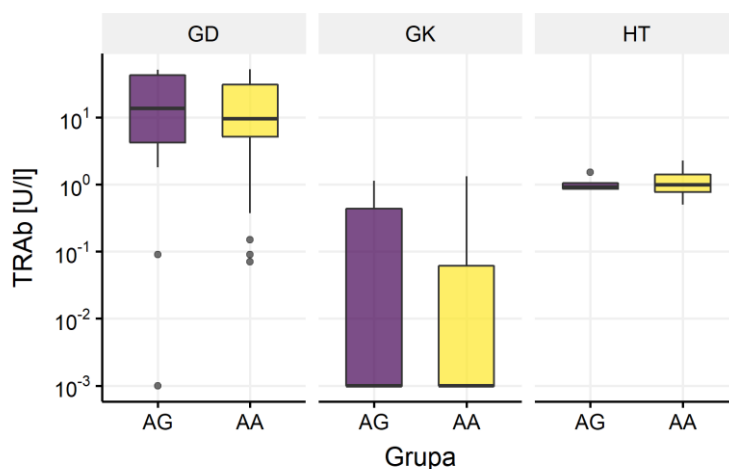
Tabela 32. Korelacje między polimorfizmem rs2230229 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AG	AA			
TSH (μIU/ml)	GD	1,85 ± 2,70 0,23 (0,07-3,86)	0,98 ± 1,46 0,26 (0,004-1,29)	<0,0001	0,83	0,76
	HT	2,65 ± 3,0 1,42 (0,84-3,18)	2,45 ± 1,58 1,92 (1,14-3,33)			
	GK	1,96 ± 0,42 1,84 (1,78-2,18)	1,70 ± 0,86 1,55 (1,07-2,27)			
fT ₃ (pmol/l)	GD	8,37 ± 7,74 5,59 (4,08-7,07)	8,01 ± 6,37 5,81 (4,67-8,74)	0,02	0,94	0,92
	HT	4,91 ± 0,68 4,75 (4,59-5,01)	5,19 ± 0,95 5,02 (4,67-5,53)			
	GK	5,40 ± 0,80 5,59 (4,89-5,98)	5,33 ± 0,78 5,32 (4,77-5,78)			
fT ₄ (pmol/l)	GD	20,65 ± 18,30 14,80 (12,12-18,1)	20,48 ± 14,63 15,30 (13,50-20,8)	0,001	0,45	0,57
	HT	15,70 ± 3,19 15,30 (13,65-16,6)	14,28 ± 2,17 14,25 (12,38-15,7)			
	GK	14,73 ± 0,77 15,20 (14,15-15,3)	13,28 ± 2,17 13,05 (12,30-14,0)			
Anty-TG (IU/ml)	GD	91,33 ± 316,5 20,0 (20-20,00)	143,86 ± 558,8 20,0 (20-24,50)	0,07	<0,0001	0,13
	HT	210,41 ± 484,7 20,0 (20-41,95)	538,62 ± 1086,3 28,1 (20-89,05)			
	GK	<20,0 ± 0,0 20,0 (20-20,00)	<20,0 ± 0,0 20,0 (20-20,00)			
Anty-TPO (IU/ml)	GD	201,65 ± 303,57 23,4 (10,0-282,75)	286,78 ± 378,51 51,8 (12,0-412,10)	<0,0001	0,76	0,39
	HT	313,46 ± 341,40 252,0 (93,1-373,00)	399,01 ± 373,25 311,5 (34,2-624,00)			
	GK	13,86 ± 7,26 10,8 (10,0-13,10)	12,10 ± 3,55 10,0 (10,0-13,25)			
TRAb (U/l)	GD	22,02 ± 19,52 14,91 (4,22-42,34)	18,20 ± 16,38 9,56 (5,13-30,66)	<0,0001	0,007	0,08
	HT	1,01 ± 0,24 0,91 (0,86-1,05)	1,14 ± 0,51 0,99 (0,77-1,40)			
	GK	0,32 ± 0,49 0,001 (0,001-0,55)	0,22 ± 0,42 0,001 (0,001-0,06)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, TSH - tyreotropina, fT₃ - trijodotyronina, fT₄ - tyroksyna, anty-TG - przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie, anty-TPO - przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycy, TRAb - przeciwciała przeciwko receptorowi TSH



Rycina 17. Rozkład średnich mian anti-TG w zależności od genotypu polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.



Rycina 18. Rozkład średnich wartości TRAb w zależności od genotypu polimorfizmu rs2230229 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

W toku analizy zaobserwowano istotną statystycznie zależność pomiędzy polimorfizmem rs20576 a mianem anti-TG w grupach GD i HT oraz HT i GK [Tabela 33]. Grupa HT prezentowała większe miano anti-TG we wszystkich genotypach w porównaniu do grupy GD, jak i do GK.

Tabela 33. Korelacje między polimorfizmem rs20576 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp		p ¹	p ²	p ³
		AC	AA			
TSH (μIU/ml)	GD	0,84 ± 1,59 0,24 (0,004-0,64)	1,41 ± 2,04 0,38 (0,006-2,07)	<0,0001	0,94	0,83
	HT	2,46 ± 1,52 1,86 (1,20-3,73)	2,56 ± 2,43 1,81 (1,00-3,11)			
	GK	1,82 ± 0,96 1,61 (1,29-2,18)	1,71 ± 0,76 1,58 (1,13-2,27)			
fT ₃ (pmol/l)	GD	9,44 ± 7,87 6,19 (4,87-8,90)	7,53 ± 6,18 5,60 (4,50-7,09)	0,008	0,06	0,11
	HT	5,19 ± 1,06 5,13 (4,66-5,37)	5,03 ± 0,74 4,93 (4,64-5,02)			
	GK	5,33 ± 0,79 5,30 (4,94-5,87)	5,35 ± 0,78 5,39 (4,75-5,72)			
fT ₄ (pmol/l)	GD	24,56 ± 19,85 15,30 (14,40-27,40)	18,77 ± 13,27 15,25 (12,82-19,15)	0,0004	0,07	0,11
	HT	14,01 ± 2,04 13,85 (12,50-14,30)	15,25 ± 2,82 15,30 (13,80-16,90)			
	GK	14,00 ± 1,77 13,60 (12,40-15,35)	13,36 ± 2,17 13,80 (12,50-14,82)			
Anty-TG (IU/ml)	GD	21,83 ± 5,80 20,0 (20,0-20)	175,35 ± 594,05 20,0 (20,0-24,80)	0,06	0,74	<0,0001
	HT	232,23 ± 646,18 20,0 (20,0-43,42)	597,58 ± 1122,63 20,2 (20,0-208)			
	GK	<20,0 ± 0,0 20,0 (20,0-20)	<20,0 ± 0,0 20,0 (20,0-20)			
Anty-TPO (IU/ml)	GD	227,73 ± 353,97 41,1 (10,00-238,00)	277,14 ± 362,88 43,8 (10,57-456,78)	<0,0001	0,40	0,28
	HT	278,25 ± 216,66 266,0 (158,50-320,75)	445,84 ± 432,39 456,0 (20,0-1000,0)			
	GK	11,39 ± 3,49 10,0 (10,0-10,50)	12,77 ± 4,60 10,0 (10,0-13,97)			
TRAb (U/l)	GD	20,66 ± 17,86 10,50 (5,77-37,35)	18,72 ± 17,19 8,96 (3,85-34,88)	<0,0001	0,12	0,19
	HT	0,97 ± 0,27 0,88 (0,79-1,07)	1,20 ± 0,53 0,99 (0,87-1,65)			
	GK	0,42 ± 0,59 0,001 (0,001-1,03)	0,17 ± 0,34 0,001 (0,001-0,06)			

Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, TSH - tyreotropina, fT₃ - trijodotyronina, fT₄ - tyroksyna, anty-TG - przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie, anty-TPO - przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycy, TRAb - przeciwciała przeciwko receptorowi TSH

Wyniki analizy statystycznej dotyczące korelacji pomiędzy polimorfizmem rs6557634 a parametrami gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej zostały przedstawione w Tabeli 34. Zaobserwowano istotną zależność między tym polimorfizmem a niemal wszystkimi analizowanymi parametrami hormonalnymi.

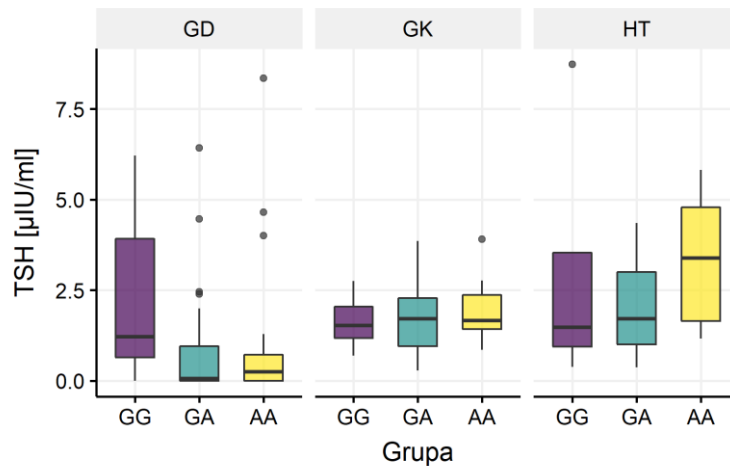
Tabela 34. Korelacje między polimorfizmem rs6557634 genu *TNFRSF10A* a parametrami gospodarki hormonalnej u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej obliczone ART ANOVA.

Analizowana zmienna	Grupa	Genotyp			p ¹	p ²	p ³
		GG	GA	AA			
TSH (μIU/ml)	GD	2,30 ± 2,21 1,21 (0,64-3,93)	0,79 ± 1,44 0,06 (0,004-0,95)	1,10 ± 2,14 0,25 (0,04-0,72)	<0,0001	0,04	0,04
	HT	3,01 ± 3,85 1,47 (0,94-3,54)	1,98 ± 1,27 1,71 (1,0-3,0)	3,35 ± 1,94 3,39 (1,65-4,79)			
	GK	1,65 ± 0,66 1,52 (1,18-2,05)	1,67 ± 0,92 1,72 (0,96-2,29)	1,90 ± 0,81 1,67 (1,42-2,37)			
fT ₃ (pmol/l)	GD	5,05 ± 1,14 5,36 (4,12-5,57)	8,77 ± 6,68 6,76 (5,10-8,86)	9,49 ± 8,69 5,73 (4,39-9,11)	0,004	0,003	0,07
	HT	5,49 ± 0,72 5,46 (4,95-5,99)	5,13 ± 0,81 5,02 (4,65-5,24)	4,80 ± 1,12 4,49 (4,17-4,87)			
	GK	5,26 ± 0,52 5,16 (5,04-5,53)	5,38 ± 0,85 5,40 (4,61-5,97)	5,36 ± 0,89 5,51 (4,77-5,88)			
fT ₄ (pmol/l)	GD	15,14 ± 7,44 13,70 (12,12-15,32)	19,58 ± 11,99 15,70 (14,40-21,90)	26,40 ± 22,97 15,60 (14,18-23,73)	<0,0001	0,01	0,01
	HT	17,55 ± 3,33 17,25 (16,27-18,52)	14,77 ± 1,88 14,30 (13,50-16,00)	12,70 ± 1,37 12,10 (11,70-13,47)			
	GK	12,77 ± 2,28 12,80 (11,30-13,75)	13,70 ± 1,86 13,85 (12,68-14,70)	13,93 ± 2,13 14,55 (12,35-15,28)			

Anty-TG (IU/ml)	GD	123,0 ± 351,8 20,0 (20,0-38,88)	118,0 ± 517,8 20,0 (20,0-20,0)	150,6 ± 584,1 20,0 (20,0-20,0)	<0,0001	0,0009	0,35
	HT	342,3 ± 644,5 20,1 (20,0-342,40)	430,3 ± 954,7 36,0 (20,0-63,90)	521,2 ± 1214,4 20,0 (20,0-40,55)			
	GK	<20,0 ± 0,0 20,0 (20,0-20,0)	<20,0 ± 0,0 20,0 (20,0-20,0)	<20,0 ± 0,0 20,0 (20,0-20,0)			
Anty-TPO (IU/ml)	GD	181,51 ± 317,94 17,35 (10,00-110,40)	326,41 ± 399,65 80,80 (10,10-621,00)	220,47 ± 310,21 66,80 (16,55-3112,98)	<0,0001	0,39	0,57
	HT	507,55 ± 568,65 510,10 (17,65-1000)	308,76 ± 301,60 252,0 (37,20-466,0)	422,38 ± 352,81 368,0 (201,25-573,75)			
	GK	12,16 ± 2,92 10,0 (10,0-14,10)	13,36 ± 5,69 10,40 (10,0-13,53)	11,49 ± 3,41 10,0 (10,0-10,75)			
TRAb (U/l)	GD	15,63 ± 15,48 8,09 (5,14-24,37)	18,90 ± 17,78 10,50 (3,86-30,66)	22,92 ± 17,97 24,50 (5,74-42,34)	<0,0001	0,01	0,04
	HT	0,89 ± 0,15 0,86 (0,82-0,93)	1,23 ± 0,49 1,02 (0,91-1,52)	0,98 ± 0,42 0,92 (0,78-1,06)			
	GK	0,08 ± 0,24 0,001 (0,001-0,02)	0,30 ± 0,45 0,001 (0,001-0,58)	0,30 ± 0,50 0,001 (0,001-0,61)			

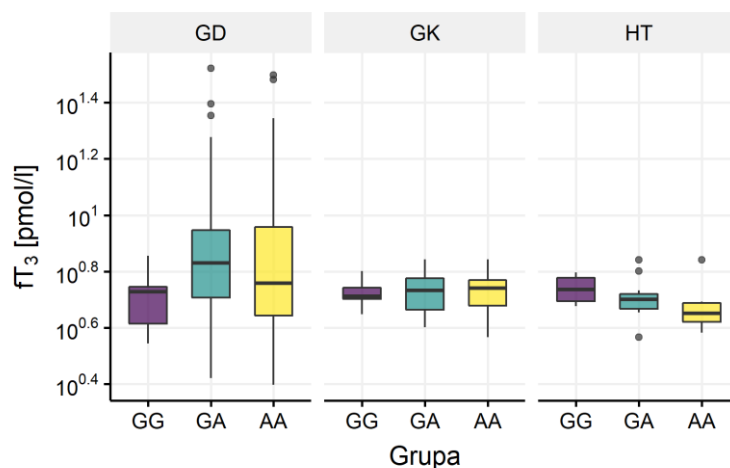
Stosowane skróty: p¹ - różnica między analizowaną zmienną a grupą, p² - różnica między analizowaną zmienną a genotypem, p³ - interakcja między analizowaną zmienną, grupą i genotypem, TSH - tyreotropina, fT₃ - trijodotyronina, fT₄ - tyroksyna, anty-TG - przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie, anty-TPO - przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycy, TRAb - przeciwciała przeciwko receptorowi TSH

W grupie GD nosiciele genotypu GA prezentowali znacząco mniejsze stężenie TSH ($0,79 \pm 1,44 \mu\text{IU/ml}$) względem pozostałych genotypów oraz w porównaniu z grupami HT i GK. Natomiast w grupie HT homozygoty AA charakteryzowały się większymi wartościami tego hormonu ($3,35 \pm 1,94 \mu\text{IU/ml}$) w porównaniu do genotypów GG i GA z tej grupy [Rycina 19].

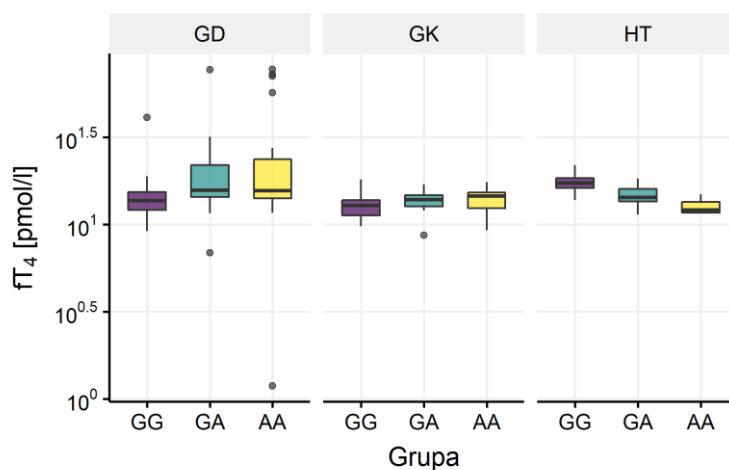


Rycina 19. Rozkład średnich stężeń TSH w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

W grupie GD heterozygoty GA i homozygoty AA miały większe stężenia fT_3 i fT_4 niż osoby z genotypem GG. Natomiast w grupie HT homozygoty AA miały statystycznie mniejsze stężenia fT_3 i fT_4 niż pacjenci z genotypem zarówno GG, jak i GA [Ryciny 20-21].

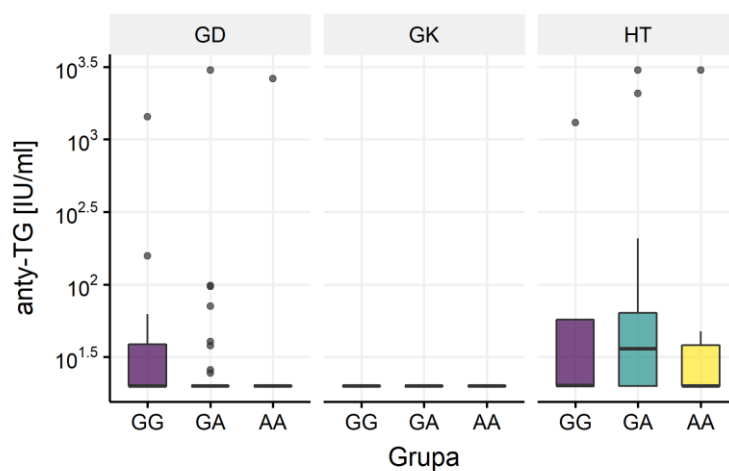


Rycina 20. Rozkład średnich stężeń fT_3 w skali logarytmicznej w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.



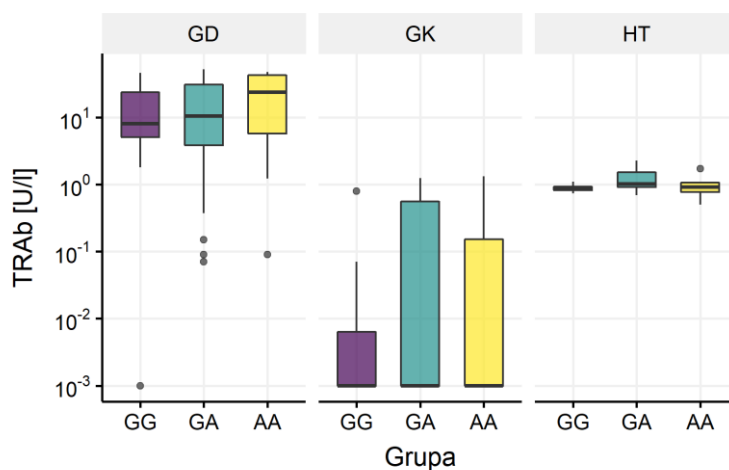
Rycina 21. Rozkład średnich stężeń fT_4 w skali logarytmicznej w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

Heterozygoty GA w grupie HT miały istotnie największe miana anty-TG w stosunku do genotypów GG i AA oraz względem grup GD i GK [Rycina 22].



Rycina 22. Rozkład średnich mian anty-TG w skali logarytmicznej w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

W grupie GD homozygoty AA charakteryzowały się statystycznie większymi wartościami mian TRAb niż homozygoty GG, heterozygoty GA oraz pacjenci zakwalifikowani do grup HT i GK [Rycina 23].



Rycina 23. Rozkład średnich mian TRAb w skali logarytmicznej w zależności od genotypu polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* w grupach badanych i kontrolnej.

5. Dyskusja

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie roli rozpuszczalnej formy białka TRAIL (*soluble TRAIL*, sTRAIL), jego receptorów sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 oraz OPG, a także polimorfizmów genu *TNFRSF10A* w chorobach autoimmunologicznych tarczycy. Zagadnienie to jest nowatorskim aspektem, ponieważ biorąc pod uwagę dotychczas opublikowane doniesienia naukowe nie znaleziono informacji dotyczących badań o podobnym zakresie.

Białko TRAIL, jego receptory, a także polimorfizm genu *TNFRSF10A* są bardzo dobrze opisane w wielu nowotworach, natomiast informacji dotyczących roli tego białka w chorobach autoimmunizacyjnych tarczycy jest niewiele, a wyniki otrzymane przez różne zespoły badawcze nie są jednoznaczne. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki korelują z rezultatami kilku prac badawczych, ale również część z nich różni się od wcześniej opublikowanych.

5.1. Porównanie stężeń sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG u pacjentów z AITD

W ramach pracy doktorskiej zostały zbadane stężenia rozpuszczalnej postaci białka TRAIL, dwóch receptorów śmierci dla białka TRAIL, a także stężenie osteoprotegeryny. Glikoproteina sTRAIL to białko, które powstaje poprzez proteolityczne cięcie białka TRAIL związanego z błoną komórkową (*membrane-bound TRAIL*, mTRAIL). Obie formy tego białka wykazują aktywność biologiczną [170].

Ostatnie zgromadzone dowody wskazują na rosnącą rolę TRAIL w modulowaniu odpowiedzi immunologicznych [137]. Badacze zasugerowali, że białko TRAIL może należeć do podrodziny inhibitorów chorób autoimmunologicznych, które hamują zapalenie [19]. Wzrastająca liczba badań ukazuje to, że TRAIL ma działanie przeciwzapalne [146, 223-226]. W modelach zwierzęcych badacze udowodnili, że TRAIL może chronić tarczycę przed zwłóknieniem. Myszy poddane neutralizacji endogennego TRAIL miały zwiększone stężenie cytokin prozapalnych (interferon- γ , TNF- α , IL-17 lub TGF- β), które biorą udział w procesie zwłóknienia. Miały także zmniejszoną ekspresję cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 i IL-13, zwiększone poziomy białek FasL i cząsteczek apoptotycznych FLIP i Bcl-xL na komórkach zapalnych w tarczycy, a jednocześnie obniżone poziomy w tyreocytach [19].

W literaturze nie znaleziono jednak żadnych doniesień dotyczących oznaczenia receptorów śmierci białka TRAIL w AITD. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej pierwszy raz dotyczą tej tematyki.

W pracy własnej wykazano, że 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 w AITD.

Wyniki niniejszej pracy korelują z częścią badań przeprowadzonych przez Boktagirową i wsp., gdzie również udowodniono tendencję do większych stężeń TRAIL w surowicy pacjentów z nadczynnością tarczycy, mniejszych u osób z chorobą Hashimoto i najmniejszych w grupie kontrolnej. Badacze ci założyli, że większe stężenia TRAIL mogą świadczyć o przewadze nekrozy nad apoptozą, natomiast mniejsze stężenie tego białka u chorych z HT może wynikać z wysokiego stężenia TRAIL-R2, z którym łączy się TRAIL, zmniejszając stężenie tej cytokiny w surowicy [227]. Badania przeprowadzone w ramach tej pracy doktorskiej przedstawiają jednak większe stężenie formy rozpuszczalnej receptora TRAIL-R1, a nie TRAIL-R2 u pacjentów z chorobą Hashimoto, świadcząc raczej o większym udziale tego receptora w procesie apoptozy w HT.

Mikoś i wsp. wykazali, że TRAIL jest czułym markerem nadczynności tarczycy, przydatnym w różnicowaniu dzieci z nadczynnością oraz niedoczynnością tarczycy. Przebadano 44 dzieci z chorobą autoimmunizacyjną tarczycy, w tym 22 z chorobą Hashimoto oraz 22 z chorobą Gravesa i Basedowa, natomiast grupę kontrolną stanowiło 20 dzieci zdrowych. Wykazano, że stężenie TRAIL było większe w grupie z GD w porównaniu z grupą HT i grupą kontrolną [228].

Polscy badacze z Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu ocenili stężenie sTRAIL, sTRAIL-R1 oraz sTRAIL-R2 u pacjentek z rakiem jajnika, torbielakogruczolakiem surowiczym, dojrzałym potworniakiem jajnika oraz u pacjentek z grupy kontrolnej. Średnie stężenie białka sTRAIL u kobiet z rakiem jajnika było znacznie większe w porównaniu do pozostałych grup. Udowodnili również, że większe stężenie sTRAIL-R1 występuje w dojrzałych potworniakach jajnika, a większe stężenie sTRAIL-R2 występuje w torbielakogruczolakach surowiczym [98]. Opierając się o wyżej wymienione wyniki, badacze postawili hipotezę, że cytokiny te są zaangażowane w ogólnoustrojowe zaburzenia

układu odpornościowego. W pracy własnej większość wartości stężeń badanych receptorów była poniżej progu czułości testu, co pokrywa się z doniesieniami Mielczarek-Palacz i wsp., którzy również zaobserwowali taką tendencję, ale tylko w grupie kontrolnej [98].

Bernardi i wsp. udowodnili, że pacjenci z nadczynnością tarczycy charakteryzują się większymi stężeniami sTRAIL w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas gdy pacjenci z niedoczynnością tarczycy znacząco mniejszymi stężeniami tego białka. Zauważono również, że stężenie sTRAIL ulega normalizacji w obu grupach po osiągnięciu stanu eutyreozy [116].

Macher-Goeppinger i wsp. wykazali, że wysoka ekspresja TRAIL występująca w raku nerki (*renal cell carcinoma*, RCC) związana jest z gorszymi rokowaniami pacjentów [229]. Toiyama i wsp. jako pierwsi dowiedli, że u pacjentów z RCC występuje mniejsze stężenie TRAIL w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast po całkowitej resekcji chirurgicznej guza nowotworowego stężenie TRAIL wzrosło. Ponadto wykazali istnienie ujemnej korelacji pomiędzy stężeniem TRAIL w surowicy a rozwojem i agresywnością RCC. Stwierdzili, że mniejsze stężenie TRAIL w surowicy może przyczyniać się do uniknięcia nadzoru immunologicznego i apoptozy w RCC [95].

Zhou i wsp. wykazali, że stężenie sTRAIL było znacznie większe u pacjentów z zapaleniem wielomięśniowym i skórno-mięśniowym. Badacze wykazali również dodatnią korelację pomiędzy sTRAIL a aktywnością choroby. Stężenie sTRAIL ulegało zmniejszeniu po zastosowaniu leczenia. Ponadto było większe u pacjentów z dysfagią, ale mniejsze u pacjentów z pozytywnym wynikiem autoprzeciwciał Jo-1. Co ważne, wykazano, że częstość występowania mTRAIL (*membrane-bound TRAIL*) na krążących limfocytach T korelowała ze stężeniem sTRAIL [230].

Verin i wsp. zaobserwowali korelację między stężeniem białka sTRAIL a stadium zaawansowania choroby u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani (*laryngeal squamous cell carcinoma*, LSCC) [231]. Badacze postawili hipotezę, że być może niskie stężenie sTRAIL jest powiązane z zaburzeniem procesu regulacji apoptozy w zaawansowanym stadium LSCC. Natomiast badania obejmujące pacjentów z rakiem jamy ustnej potwierdziły większe stężenie sTRAIL przed leczeniem i mniejsze po zastosowaniu leczenia [232]. U kobiet z endometriozą stężenie sTRAIL było znacząco mniejsze względem kobiet bez tego schorzenia, ale nie zaobserwowano zależności między stężeniem tego białka a stopniem zaawansowania endometriozy [233]. Yilidiz i wsp. zbadali, że nie ma różnicy w

stężeniu sTRAIL, TRAIL-R1 oraz TRAIL-R2 w surowicy u pacjentów z przerzutami w raku jelita grubego przed i po leczeniu chemioterapeutycznym z wykorzystaniem bewacyzumabu [231]. Do innych wniosków doszli Bisgin i wsp., ponieważ ich badania wykazały, że w tej samej jednostce chorobowej i po zastosowaniu leczenia bewacyzumabem stężenie sTRAIL było skorelowane z większym prawdopodobieństwem przeżycia pacjenta [234]. Han i wsp. wskazali, że wyższa ekspresja sTRAIL jest związana z większym uszkodzeniem wątroby, a apoptoza indukowana TRAIL może być jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za uszkodzenie tego narządu w wirusowym zapaleniu wątroby typu B [235].

Zwiększone stężenie rozpuszczalnej formy białka TRAIL zostało wykazane przez kilka zespołów badawczych także w stwardnieniu rozsianym [108] oraz w stłuszczeniowej chorobie wątroby [110].

TRAIL-R2 odgrywa istotną rolę w regulacji procesu apoptozy i jest związany z rozwojem i progresją karcynogenezy. Ekspresja TRAIL-R2 jest niezależnym prognostycznym wskaźnikiem w raku pęcherza moczowego i jest skorelowana z lepszą odpowiedzią na leczenie [236]. Yao i wsp. wykazali istnienie korelacji między stężeniem TRAIL-R2 a stopniem zaawansowania LSCC [231]. W 2019 roku Wan i wsp. wykazali prognostyczne znaczenie stężenia TRAIL-R2 w raku drobnokomórkowym płuc (*small-cell lung cancer*, SCLC). Stężenie tego białka przed leczeniem było istotnie większe niż w grupie kontrolnej i dodatnio korelowało ze stopniem zaawansowania choroby, wielkością guza oraz przerzutami w węzłach limfatycznych. Po leczeniu stężenie TRAIL-R2 uległo obniżeniu. Większa ekspresja białka TRAIL-R2 była związana z gorszym rokowaniem w raku nerkowokomórkowym [237]. Ponadto Macher-Goeppinger i wsp. przedstawili, że nie tylko wysoka ekspresja TRAIL-R2, ale również niska ekspresja TRAIL-R4 w RCC ma związek z gorszymi rokowaniami [229].

Natomiast Zhou i wsp. wykazali, że stężenie receptorów śmierci: TRAIL-R1 i TRAIL-R2 było znacznie podwyższone u pacjentów z zapaleniem wielomięśniowym oraz skórno-mięśniowym w porównaniu do grupy kontrolnej [230].

Osteoprotegeryna początkowo zidentyfikowana była jako rozpuszczalny receptor należący do rodziny TNF, hamujący osteoklastogenezę aktywowaną przez RANKL, a więc regulujący metabolizm kostny, ale kilka badań przeprowadzonych *in vitro* wykazało również jej zdolność do neutralizowania TRAIL [167, 174, 238]. Wykazano, że cząsteczka OPG bierze także udział w procesie zapalnym, ponieważ między innymi w reumatoidalnym

zapaleniu stawów OPG blokuje TRAIL wykazując działanie antyapoptotyczne i przez to może przyczynić się do zmniejszenia apoptozy komórek błony maziowej, co prowadzi do hiperplazji tych komórek [239].

Nieprawidłowa praca tarczycy wpływa na zaburzenia równowagi homeostazy kostnej [240]. W toku analizy nie stwierdzono różnic pomiędzy stężeniem białka OPG a grupami badanymi i grupą kontrolną. Obserwacje te są zgodne z wynikami badań przeprowadzonych również w grupie osób z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy przez Bernardi i wsp. [116]. Są jednak w opozycji do wyników uzyskanych po operacji tarczycy u pacjentów z GD. W badaniu tym udowodniono, że poziom ekspresji mRNA dla OPG w tkance tarczycowej był trzykrotnie większy niż w chorobie HT [241]. Mimo to podwyższone stężenie OPG w grupie GD nie dowodzi temu, że białko to może stanowić marker obrotu kostnego w chorobie Gravesa i Basedowa [242]. W badaniu własnym zauważono, że stężenie OPG w grupie GD jest większe niż w grupie HT, ale zależność ta jest na granicy istotności statystycznej ($p=0,08$), co częściowo korelowało z obserwacjami Hofbauer i wsp. [241] oraz Amato i wsp. [243]. Wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy oraz doniesienia przedstawione przez innych autorów prac sugerują, że osteoprotegeryna może wykazywać działanie w grupie GD. Natomiast w niedoczynności tarczycy w materiale własnym zaobserwowano mniejsze stężenie OPG w stosunku do grupy GD, jednak zależność ta nie była istotna statystycznie. W dotychczasowych badaniach potwierdzono jednak, że stężenie OPG w tej grupie jest podwyższone i zmniejsza się do wartości prawidłowych po zastosowaniu L-tyroksyny i osiągnięciu eutyreozy [224].

5.2. Analiza korelacji między stężeniami sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2 i OPG a wiekiem, BMI, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej u pacjentów z AITD

W pracy własnej nie wykazano różnic pomiędzy stężeniem białka sTRAIL, sTRAIL-R1 oraz sTRAIL-R2 a wiekiem uczestników badania. Otrzymane wyniki są zgodne z doniesieniami opublikowanymi przez Bernardi i wsp. [116] oraz Choi i wsp. [245]. Identyczne zależności stwierdzili włoscy badacze, którzy nie wykazali korelacji pomiędzy sTRAIL a wiekiem u pacjentów z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy [116]. Własne wyniki zgadzają się również z tymi otrzymanymi przez Tisaio i wsp., którzy wśród osób z demencją oraz łagodnymi zaburzeniami poznawczymi także nie wykazali różnic pomiędzy stężeniem sTRAIL a wiekiem pacjentów [246].

W toku analizy odnotowałam, że pacjenci otyli z grupy HT prezentowali większe stężenia sTRAIL oraz sTRAIL-R1 niż pacjenci z grupy GD oraz z grupie kontrolnej. Choi i wsp. również wykazali pozytywną korelację pomiędzy stężeniem krążącego TRAIL a BMI wśród osób zdrowych [245]. Do innych wniosków doszedł Bernardi i wsp., którzy nie wykazali korelacji pomiędzy sTRAIL a BMI u pacjentów z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy [116]. W dostępnych danych literaturowych nie znaleziono natomiast informacji dotyczących zależności pomiędzy stężeniem sTRAIL-R1 a BMI, można jednak wysnuć przypuszczenia, że sTRAIL wykazuje swoje funkcje apoptotyczne u pacjentów z HT łącząc się głównie z receptorem TRAIL-R1.

W badaniu własnym nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem sTRAIL, sTRAIL-R1 oraz sTRAIL-R2 a stężeniem glukozy oraz insuliny u pacjentów z chorobą autoimmunizacyjnych tarczycy. Do identycznych wnioski doszli Bernardi i wsp. badając tą samą zależność u pacjentów z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy [116]. Tisato i wsp. również nie stwierdzili związku pomiędzy stężeniem sTRAIL a stężeniem glukozy na czczo u pacjentów z demencją i łagodnymi zaburzeniami poznawczymi [246]. W piśmiennictwie naukowym brakuje jednak doniesień na temat udziału receptorów śmierci białka TRAIL w odniesieniu do stężeń glukozy oraz insuliny w AITD, a uzyskane w niniejszej pracy wyniki mogą sugerować brak zależności pomiędzy tymi parametrami biochemicznymi a oznaczanymi białkami w AITD.

W pracy własnej nie wykazano związku między stężeniem sTRAIL, sTRAIL-R1 oraz sTRAIL-R2 a stężeniem cholesterolu całkowitego oraz frakcji cholesterolu LDL i HDL. Wyniki te korelowały z rezultatami otrzymanymi w badaniach przeprowadzonych przez

Bernardi i wsp., którzy także tej korelacji nie wykazali u pacjentów z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy [116]. Wyniki kilku badań są jednak w opozycji do otrzymanych w niniejszej pracy. Naukowcy bowiem przedstawili, że stężenie sTRAIL jest znacznie większe u osób z podwyższonym stężeniem cholesterolu całkowitego oraz LDL [245-247]. Brombo i wsp. wykazali korelację tylko pomiędzy stężeniem TRAIL w surowicy a stężeniem frakcji cholesterolu LDL [248]. Natomiast w badaniu własnym zaobserwowano jedynie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sTRAIL a stężeniem trójglicerydów w grupie HT. Obserwacje te są zgodne z wynikami koreańskich [245] oraz egipskich uczonych [246].

Pierwsze badania dotyczące zależności pomiędzy stężeniem hormonów tarczycy a stężeniem krążącego TRAIL zostały przeprowadzone w 2017 roku. Udowodniono, że w nadczynności tarczycy występują większe stężenia TRAIL i mniejsze w niedoczynności tego gruczołu [116].

W materiale własnym u pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa zauważono, że im większe stężenie białka sTRAIL i sTRAIL-R1 tym mniejsze stężenia TSH oraz większe fT_3 , jednak zależność między stężeniem sTRAIL-R1 a TSH znajdowała się na granicy istotności statystycznej ($p=0,0587$). Do identycznych wniosków doszli Bernardi i wsp., potwierdzając istnienie korelacji między stężeniem sTRAIL a TSH i fT_3 , obserwując dodatkowo występowanie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem sTRAIL a stężeniem tyroksyny u pacjentów z nadczynnością tarczycy. W badaniach *in vitro* również potwierdzili otrzymane wcześniej wyniki. Ponadto zauważyli, że trijodotyronina wywiera silniejszy efekt na wydzielanie sTRAIL niż tyroksyna. Badania te potwierdzają stymulujący wpływ hormonów tarczycy na wzrost ekspresji TRAIL. Postawili hipotezę, że sTRAIL jest cząsteczką pośredniczącą w efektach obwodowych trijodotyroniny [116].

Mikoś i wsp. wykazali, że w grupie GD stężenie TRAIL w surowicy korelowało dodatnio z przeciwciałami TRAb, a w grupie HT stwierdzono istotne korelacje pomiędzy TRAIL i fT_3 oraz między TRAIL i fT_4 [228]. W pracy własnej nie zaobserwowano tych korelacji.

Ponadto w niniejszej pracy zaobserwowano, że pacjenci z chorobą Hashimoto z mniejszymi stężeniami sTRAIL-R2 prezentowali większe miano przeciwciał anti-TPO, co również może potwierdzić stawianą przeze mnie hipotezę, że w chorobie HT, w której miano anti-TPO jest znacząco większe, receptor TRAIL-R2 pełni mniej ważną rolę niż receptor TRAIL-R1.

W materiale własnym wykazano, że większe stężenia białka OPG występują u ludzi starszych z chorobą GD. Wraz z wiekiem wzrasta stężenie tego białka, a zależność ta jest dobrze udokumentowana [249]. Jednak badania przeprowadzone przez Varga i wsp. negują uzyskane w pracy własnej wyniki, przedstawiając, że dodatnia korelacja między stężeniem OPG a wiekiem nie występuje u pacjentów z GD [250].

W materiale własnym wykazano, że większym stężeniom OPG w grupie GD towarzyszy również mniejsze stężenie insuliny, natomiast nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem tego białka a stężeniem glukozy na czczo, co zostało również zaobserwowane w badaniach prowadzonych przez Chang i wsp. w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 z albuminurią [251].

W przedstawionej pracy wykazano, że pacjenci z chorobą Hashimoto z mniejszymi stężeniami OPG prezentowali większe miano przeciwciał anti-TPO. Amato i wsp. wykazali tą zależność, ale nie w grupie HT, a w grupie GD [243]. Natomiast Bernardi i wsp. nie stwierdzili takich zależności zarówno u osób z nadczynnością, jak i niedoczynnością tarczycy [116]. W innym badaniu potwierdzono, wpływ OPG na wydzielanie hormonów tarczycy, ponieważ udowodniono, że tyroksyna i trijodotyronina wpływają na wzrost stężenia OPG w grupie kontrolnej [250]. Nagasaki i wsp. wykazali, że w grupie HT stężenie OPG dodatnio koreluje ze stężeniem TSH [244], obserwacje te nie zostały jednak potwierdzone w niniejszej pracy.

5.3. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów: rs2230229, rs20576, rs6557634 u pacjentów z AITD

Polimorfizmy genów mogą być ważnymi markerami określającymi ryzyko i rokowania w nowotworach. Zmiany polimorficzne w genach kodujących określone białka mogą wpływać na ich ekspresję. Gen *TNFRSF10A* jest wysoce polimorficzny, a supresja sygnalizacji śmierci komórki wywołana zmianami w jego obrębie obejmuje rozregulowanie proliferacji komórkowej i czyni podatnym na nowotwór [252]. W ramach pracy doktorskiej zostały przeanalizowane trzy polimorfizmy genu *TNFRSF10A*, a mianowicie rs2230229, rs20576, rs6557634. Polimorfizmy w genie *TNFRSF10A* zlokalizowanym na chromosomie 8p21-22, który koduje białko jednego z receptorów białka TRAIL zostały zaobserwowane w wielu różnych typach raków, m.in. w raku płuca, głowy, szyi, pęcherza moczowego i piersi, żołądka, chłoniaku niezłośliwym [231]. Jednak jak zostało opisane we wstępie pracy, wyniki

otrzymane przez zespoły badawcze nie są jednoznaczne. Niektóre z nich potwierdzają, a niektóre negują udział polimorfizmów genu *TNFRSF10A* w procesie nowotworzenia. Jednak nadal aktualna wydaje się być hipoteza mówiąca o tym, że polimorfizmy w tym genie mogą zmniejszać zdolność do apoptozy i prowadzić do nadmiernej proliferacji zmienionych patologicznie komórek [253].

Związek polimorfizmów genu *TNFRSF10A*, kodującego receptor TRAIL-R1 w chorobach autoimmunologicznych tarczycy nie został wystarczająco udokumentowany. Nie znaleziono żadnych doniesień naukowych dotyczących tego zagadnienia względem AITD, dlatego jednym z celów niniejszej pracy doktorskiej była analiza częstości występowania alleli polimorfizmów genu *TNFRSF10A* w grupie pacjentów z tą dysfunkcją tarczycy.

W badaniach własnych analiza częstości występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów rs2230229, rs20576, rs6557634 genu *TNFRSF10A* nie różniła się znacząco między grupami badanymi oraz grupą kontrolną. Może to świadczyć o braku związku z etiopatogenezą chorób AITD. We wszystkich badanych polimorfizmach genu *TNFRSF10A* zarówno w grupach badanych, jak i grupie kontrolnej dominuje allel A, co może potwierdzać ochronną rolę tego allela w chorobach autoimmunologicznych tarczycy. Ze względu na brak danych literaturowych opisujących badane polimorfizmy w AITD nie ma możliwości porównania częstości występowania określonych genotypów uzyskanych w pracy własnej.

Polimorfizm rs2230229 genu *TNFRSF10A* jest zlokalizowany w domenie śmierci receptora TRAIL-R1 [219]. Martinez-Ferrandis i wsp. nie wykazali związku pomiędzy polimorfizmem rs2230229 a rakiem piersi u kobiet w populacji hiszpańskiej [254], ten sam wynik otrzymano u pacjentów z rakiem płuc w populacji tureckiej [215]. Natomiast badania przeprowadzone przez Fernandez i wsp. udowodniły, że polimorfizm rs2230229 był istotnie częstszy u pacjentów z chłoniakiem komórek płaszczka i przewlekłą białaczką limfocytową niż u osób zdrowych [255]. Wyniki dwóch innych metaanaliz są względem siebie sprzeczne, ponieważ metaanaliza przeprowadzona przez Lu i wsp. potwierdziła, że polimorfizm rs2230229 jest związany z większym prawdopodobieństwem zachorowania na raka [221], a Chen i wsp. zanegowali związek polimorfizmu z tym ryzykiem [219].

Polimorfizm rs20576 genu *TNFRSF10A* występuje w zewnątrzkomórkowej domenie receptora TRAIL-R1 bogatej w cysteinę [219]. Jak potwierdzają liczne badania polimorfizm rs20576 w genie *TNFRSF10A* ma znaczenie w wielu nowotworach. Körner i wsp. wykazali wpływ polimorfizmu rs20576 genu *TNFRSF10A* na zwiększenie ryzyka zachorowania na

raka wątrobowokomórkowego (*hepatocellular carcinoma*, HCC) wywołanego zapaleniem wątroby typu C. Badacze stwierdzili tendencję do częstszego występowania allelu A w grupie chorych w porównaniu do grupy kontrolnej, co nie pokrywa się z wynikami uzyskanymi w pracy własnej. W innym badaniu większa częstość genotypu CC korelowała z większą złośliwością przewlekłej białaczki limfatycznej, chłoniaka z komórek płaszczka, raka prostaty, raka płaskonabłonkowego głowy i szyi oraz raka pęcherza moczowego [256]. Do innych wniosków doszli Frank i wsp., którzy analizowali ten polimorfizm u pacjentek z rakiem piersi bez mutacji w genie *BRCA1* oraz *BRCA2* i wykazali w tej grupie większą częstość występowania genotypu AA [257]. Natomiast Dick i wsp. analizowali polimorfizm rs20576 u pacjentek z mutacją w genie *BRCA1* i *BRCA2*. Wykazali, że allel C u nosicielek mutacji w genie *BRCA1* wiąże się z większym ryzykiem rozwoju raka jajnika [258]. Engünlü i wsp. nie stwierdzili zależności między polimorfizmem rs20576 a ryzykiem zachorowania na chorobę Alzheimera (*Alzheimer's disease*, AD) [259]. W niniejszej pracy analizując polimorfizm rs20576 nie wykazano u żadnego pacjenta genotypu CC, co w większości pokrywa się z badaniami przeprowadzonymi przez Tastemir-Korkmaz i wsp., gdzie ten genotyp występował tylko u dwóch osób z grupy kontrolnej [215]. Metaanaliza przeprowadzona przez Chen i wsp. wskazała, że polimorfizm rs20576 prawdopodobnie wpływa na podwyższone ryzyko zachorowania na raka [219].

Polimorfizm rs6557634 genu *TNFRSF10A* znajduje się w ektodomenie receptora TRAIL-R1 [219]. Engünlü i wsp. wykazali znaczące różnice w częstości występowania genotypów polimorfizmu rs6557634 w pacjentów z chorobą Alzheimera a grupą kontrolną. Wykazali, że genotyp GA w tym polimorfizmie może odgrywać rolę czynnika ochronnego przed AD [259]. W badaniu własnym stwierdzono, że genotyp ten częściej występuje w pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa oraz Hashimoto niż w grupie kontrolnej, ale zależność ta nie była istotna statystycznie. Fisher i wsp. wykazali, że polimorfizm rs6557634 prawdopodobnie wpływa na podwyższenie ryzyka zachorowania na raka płuc, raka płaskonabłonkowego głowy i szyi oraz gruczolakoraka żołądka [218]. Natomiast Horak i wsp. nie udowodnili, aby polimorfizm rs6557634 przyczynił się do zwiększenia ryzyka zachorowania na raka jajnika [260]. Wyniki metaanalizy przeprowadzonej przez chińskich uczonych sugerują jednak, że polimorfizm rs6557634 nie jest związany z większym prawdopodobieństwem zachorowania na raka [221].

5.4. Analiza korelacji występowania częstości genotypów badanych polimorfizmów ze stężeniem sTRAIL i sTRAIL-R1 u pacjentów z AITD i w grupie kontrolnej

Na podstawie własnych badań nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy badanymi polimorfizmami: rs2230229, rs20276 i rs6557634 a stężeniem sTRAIL oraz sTRAIL-R1. Badana w ramach niniejszej pracy doktorskiej zależność w tej jednostce chorobowej jest zagadnieniem nowym i poruszającym tą tematykę po raz pierwszy. Brakuje doniesień na temat wpływu polimorfizmów genu *TNFRSF10A* na stężenie białka sTRAIL oraz jego receptora sTRAIL-R1, dlatego nie ma możliwości porównania otrzymanych w materiale własnym wyników do tych literaturowych. Analiza uzyskanych rezultatów wskazuje na brak potencjalnego wpływu wyżej wymienionych polimorfizmów na stężenie białka sTRAIL oraz sTRAIL-R1 zarówno w grupie pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa, jak i z chorobą Hashimoto. Niemniej jednak hipoteza ta wymaga weryfikacji w postaci powtórzenia badania na większej liczbie osób.

5.5. Analiza korelacji występowania częstości genotypów badanych polimorfizmów z wiekiem, BMI, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej i hormonalnej u pacjentów z AITD

Jak zostało wcześniej wspomniane - nie znaleziono danych literaturowych dotyczących analizy korelacji polimorfizmów genu *TNFRSF10A* w chorobach autoimmunizacyjnych tarczycy, dlatego trudno porównywać otrzymane w niniejszej pracy wyniki do innych doniesień naukowych.

W pracy własnej nie stwierdzono różnic pomiędzy częstością występowania genotypów badanych polimorfizmów genu *TNFRSF10A* a BMI i parametrami gospodarki węglowodanowej wśród pacjentów zakwalifikowanych do grup badanych oraz do grupy kontrolnej. Wykazano natomiast, że w polimorfizmie rs20576 w grupie GD osoby młodsze posiadały genotyp AC, a w grupie HT genotyp AA. Natomiast w polimorfizmie rs6557634 homozygoty AA i heterozygoty GA w grupie HT były młodsze od homozygot AA w grupie GD i GK.

W analizie zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami a parametrami gospodarki lipidowej wykazano istotną korelację jedynie między polimorfizmem rs6557634 a stężeniem cholesterolu całkowitego w grupach. Na granicy istotności statystycznej znajdowała się zależność pomiędzy polimorfizmem rs6557634 a stężeniem frakcji cholesterolu LDL

($p=0,0058$). Homozygoty AA w grupie HT oraz homozygoty GG w grupie GD charakteryzowały się istotnie większym stężeniem cholesterolu całkowitego. W chorobach autoimmunologicznych tarczycy u niektórych pacjentów występują zaburzenia gospodarki lipidowej, a warianty polimorficzne AA w grupie HT oraz GG w grupie GD być może wydają się predysponować tych pacjentów do rozwoju hipercholesterolemii.

Analizując zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami a parametrami gospodarki hormonalnej wykazano wiele różnic w badanych grupach. Na podstawie analizy własnych danych stwierdzono istotną zależność pomiędzy polimorfizmem rs2230229 a mianem anti-TG i TRAb. Homozygoty AA w grupie HT charakteryzowały się większym mianem anti-TG i TRAb w porównaniu do genotypów AG i GG. W grupie GD pacjenci z wariantem polimorficznym AA również posiadali większe miano anti-TG, ale w odróżnieniu do grupy HT heterozygoty AG prezentowały większe miano TRAb. W toku analizy wykazano istotą statystycznie zależność pomiędzy polimorfizmem rs20576 a mianem anti-TG w grupach GD i HT oraz HT i GK. Grupa HT prezentowała większe miano anti-TG we wszystkich genotypach w porównaniu do grupy GD, jak i do GK. W analizie statystycznej obu polimorfizmów nie wykazano jednak zależności pomiędzy częstością występowania konkretnego genotypu badanego polimorfizmu genu *TNFRSF10A* a stężeniem TSH oraz hormonów tarczycy, wskazując raczej na niewielki wpływ tych zmian polimorficznych na gospodarkę hormonalną u pacjentów z AITD.

Ponadto wykazano istotną zależność między polimorfizmem rs6557634 a niemal wszystkimi analizowanymi parametrami hormonalnymi. W grupie GD głównie nosiciele genotypu GA prezentowali znacząco mniejsze stężenie TSH, a w grupie HT homozygoty AA charakteryzowały się większymi wartościami TSH. W grupie GD zarówno heterozygoty GA, jak i homozygoty AA miały znacząco większe stężenia fT_3 i fT_4 , natomiast w grupie HT homozygoty AA prezentowały mniejsze stężenia obu hormonów tarczycy. Warianty polimorficzne GA w grupie HT charakteryzowały się istotnie większymi mianami anti-TG w stosunku do genotypu GG w tej grupie, jak i w grupach GD oraz GK. W grupie GD homozygoty AA charakteryzowały się statystycznie większymi wartościami mian TRAb niż homozygoty GG, heterozygoty GA oraz pacjenci zakwalifikowani do grup HT i GK.

Uzyskane w ramach niniejszej pracy dane sugerują, że głównie polimorfizm rs6557634 genu *TNFRSF10A* może być częściowo odpowiedzialny za rozregulowanie szlaku sygnałowego indukowanego przez TRAIL. Wykazano, że chorobie Gravesa i Basedowa

największe znaczenie wydają się mieć warianty polimorficzne GA i AA, który prezentowały osoby z niskimi stężeniami TSH, wyższymi stężeniami fT₃ i fT₄, a także z większym mianem przeciwciał TRAb. Natomiast pacjenci z HT o genotypie AA prezentowali wysokie stężenia TSH i niskie stężenia fT₃ i fT₄. Związek polimorfizmu rs6557634 genu *TNFRSF10A* kodującego TRAIL-R1 w AITD można byłoby potwierdzić bardziej precyzyjnie jeśli zostaną przeanalizowane i ocenione razem oraz w większej grupie pacjentów z AITD: polimorfizm tego genu, jego ekspresja, a także stężenie białka TRAIL w surowicy. Niemniej jednak wnioski płynące z niniejszej pracy z pewnością stanowią podstawę do kontynuowania badań.

5.6. Perspektywy kontynuowania omawianych w pracy zagadnień

Niektóre badania wskazują, że TRAIL nie wykazuje swojej fizjologicznej funkcji, a więc nie „kieruje” komórek na drogę apoptozy, ponieważ jedna z hipotez mówi, że być może białko to jest konkurencyjnie wiązane przez receptory wabikowe, uniemożliwiając w ten sposób połączenie z receptorem śmierci, co docelowo doprowadza do śmierci komórki. Aby uzyskać możliwie pełny obraz roli białka sTRAIL i jego receptorów w AITD warto byłoby oznaczyć dodatkowo stężenie receptorów wabikowych dla białka sTRAIL. Analiza zarówno receptorów hamujących apoptozę, jak i stymulujących ten proces mogłaby wnieść nowe informacje dotyczące znaczenia mechanizmu TRAIL/TRAILR w patogenezę AITD.

Dodatkowo można byłoby się skupić na oznaczeniu białka TRAIL związanego z błoną komórkową i sprawdzić czy stężenie zarówno postaci rozpuszczalnej, jak i związanej z błoną komórkową korelują z sobą w chorobach autoimmunizacyjnych tarczycy.

Kolejnym elementem mogącym wzbogacić obraną przeze mnie tematykę mogłoby być oznaczenie stężenia białka sTRAIL i jego receptorów u pacjentów ze świeżo rozpoznaną chorobą i przed wprowadzeniem leczenia. Miałoby to na celu określenie wpływu leczenia na stężenie wyżej wymienionych białek u pacjentów z AITD.

Jak zostało wspomniane - TRAIL wykazuje swoją apoptotyczną funkcję po związaniu z receptorem śmierci, dlatego też tak ważny wydaje się aspekt dokładnego określenia zależności związku pomiędzy polimorfizmami genu *TNFRSF10A*, który koduje receptor śmierci dla białka TRAIL w chorobach autoimmunizacyjnych tarczycy, mając na uwadze to, że część doniesień innych autorów potwierdza udział tych polimorfizmów w patogenezie

niektórych nowotworów. Dodatkowo wskazane jest oznaczenie polimorfizmu rs20575 (C626G), który jest najczęściej badanym polimorfizmem genu *TNFRSF10A*.

Podsumowując, obrana w niniejszej pracy tematyka wydaje się być podstawą do dalszych badań na większej liczbie osób, co umożliwiłoby potwierdzenie lub nie udziału białka sTRAIL, jego receptorów, a także polimorfizmów genu *TNFRSF10A* w patogenezie AITD.

5.7. Zalety i ograniczenia pracy

Zagadnienia podjęte w niniejszej pracy doktorskiej są innowacyjnym aspektem dotyczącym roli rozpuszczalnej formy białka TRAIL, receptorów sTRAIL-R1, sTRAIL-R2, OPG oraz polimorfizmów genu *TNFRSF10A* w chorobach autoimmunizacyjnych tarczycy. Praca jednak posiada kilka ograniczeń.

Głównym ograniczeniem pracy jest stosunkowo mała liczebność grup badanych oraz kontrolnej. Choroby autoimmunizacyjne tarczycy nie należą do chorób rzadkich, w związku z tym 92 osobowa grupa pacjentów zakwalifikowanych do analizy wydaje się być niewielka w porównaniu do innych badań dotyczących chorób autoimmunologicznych tarczycy, ale nadal jest reprezentatywna. Ilość osób włączona do badania wynikała z ograniczeń finansowych i dotacji, która została przeznaczona na realizację tego projektu.

Podstawowym ograniczeniem wynikającym z metodyki jest czułość testów ELISA do oznaczenia stężenia dwóch receptorów białka TRAIL, a mianowicie sTRAIL-R1 oraz sTRAIL-R2 w surowicy krwi. Większość otrzymanych w badaniu wyników receptorów śmierci białka TRAIL była poniżej progu wykrywalności testu.

6. 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.

7. Streszczenie

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 przeciw-tarczycowymi. 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_3 , fT_4 , 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 anty-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 anty-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.

8. 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, fT₃, fT₄, 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.

9. Piśmiennictwo

1. Rahman S, Archana A, Jan AT, i wsp. Molecular insights into the relationship between autoimmune thyroid diseases and breast cancer: A critical perspective on autoimmunity and ER stress. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.00344
2. Iwatani Y, Watanabe M. Normal mechanisms for self-tolerance. *Autoimmune Endocrinopathies.* Published online 1999:1-30. doi:10.1007/978-1-59259-704-8_1
3. Kralem Z, Baron E, Kahana L, Sadeh O, Shelinfeld M. Changes in stimulating and blocking TSH receptor antibodies in a patient undergoing three cycles of transition from hypo to hyper- thyroidism and back to hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1992;36(2):211-214. doi:10.1111/j.1365-2265.1992.tb00960.x
4. Brown R, Francis GL. Autoimmune thyroid disorders. *J Thyroid Res.* 2011;2011:2-4. doi:10.4061/2011/432890
5. Rydzewska M, Jaromin M, Pasierowska IE, Stozek K, Bossowski A. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Thyroid Res.* 2018;11(1):1-11. doi:10.1186/s13044-018-0046-9
6. Bossowski A, Otto-Buczowska E. Schorzenia tarczycy o podłożu autoimmunologicznym. W: *Pediatrics - co nowego?* Wyd. med. Cornetis. 2007:108-120. ISBN 83-919540-7-2.
7. Ajjan RA, Watson PF, Weetman AP. Cytokines and thyroid function. *Adv Neuroimmunol.* 1996;6(4):359-386. doi:10.1016/S0960-5428(97)00027-7
8. Hadj-Kacem H, Rebuffat S, Mnif-Féki M, Belguith-Maalej S, Ayadi H, Péraldi-Roux S. Autoimmune thyroid diseases: Genetic susceptibility of thyroid-specific genes and thyroid autoantigens contributions: Review Article. *Int J Immunogenet.* 2009;36(2):85-96. doi:10.1111/j.1744-313X.2009.00830.x
9. Marinò M, Latrofa F, Menconi F, Chiovato L, Vitti P. Role of genetic and non-genetic factors in the etiology of Graves' disease. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(3):283-294. doi:10.1007/s40618-014-0214-2
10. Bretz JD, Rymaszewski M, Arscott PL, i wsp. TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23627-23632. doi:10.1074/jbc.274.33.23627
11. Salata I, Saluk J. Zaburzenia procesów hemostazy w autoimmunizacyjnych chorobach tarczycy. *Chor Serca i Naczyń.* 2016;13(3):214-221.
12. Ajjan RA, Findlay C, Metcalfe RA, i wsp. The modulation of the human sodium iodide symporter activity by Graves' disease sera. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(4):1217-1221. doi:10.1210/jcem.83.4.4701
13. Raspe E, Costagliola S, Ruf J, Mariotti S, Dumont JE, Ludgate M. Identification of the thyroid Na⁺/I⁻ cotransporter as a potential autoantigen in thyroid autoimmune disease. *Eur J Endocrinol.* 1995;132(4):399-405. doi:10.1530/eje.0.1320399
14. Fountoulakis S, Vartholomatos G, Kolaitis N, Frilingos S, Philippou G, Tsatsoulis A.

- Differential expression of Fas system apoptotic molecules in peripheral lymphocytes from patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(6):853-859. doi:10.1530/EJE-08-0092
15. Jacobson EM, Tomer Y. The genetic basis of thyroid autoimmunity. *Thyroid.* 2007;17(10):949-961. doi:10.1089/thy.2007.0153
 16. Wang SH, Chen GH, Fan Y, Van Antwerp M, Baker JR. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits experimental autoimmune thyroiditis by the expansion of CD4 +CD25 + regulatory T cells. *Endocrinology.* 2009;150(4):2000-2007. doi:10.1210/en.2008-1389
 17. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG. Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid.* 2002;12(10):839-847. doi:10.1089/105072502761016458
 18. Hollowell JG, Staehling NW, Dana Flanders W, i wsp. Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):489-499. doi:10.1210/jcem.87.2.8182
 19. Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: What do we know so far? *J Immunol Res.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/979167
 20. Chistiakov DA. Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis. *J Autoimmune Dis.* 2005;2(1). doi:10.1186/1740-2557-2-1
 21. Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG, Goode AW, Bottazzo GF, Mirakian R. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *J Pathol.* 1997;182(2):138-144. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<138::AID-PATH810>3.0.CO;2-F
 22. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4-5):391-397. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.007
 23. Popko K, Górska E. The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(4):470-476. doi:10.5114/ceji.2015.56971
 24. Pujol-Borrell R, Todd I, Londei M, Feldmann M, Bottazzo GF. New ideas in thyroid autoimmunity. *Horm Res Paediatr.* 1987;26(1-4):118-124. doi:10.1159/000180690
 25. Liu Y, Tang X, Tian J, i wsp. Th17/Treg cells imbalance and GITRL profile in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Int J Mol Sci.* 2014;15(12):21674-21686. doi:10.3390/ijms151221674
 26. Ben-Skowronek I. Hashimoto's thyroiditis – interactions of lymphocytes, thyroid cells and fibroblasts. W: *Autoimmune Disorders - Pathogenetic Aspects.* InTech; 2011. doi:10.5772/23899
 27. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedüs L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: A population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):930-934. doi:10.1210/jc.86.2.930

28. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1253-1259. doi:10.1172/JCI14321
29. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity*. 1995;20(4):231-236. doi:10.3109/08916939508995700
30. Li D, Cai W, Gu R, i wsp. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. *Clin Immunol*. 2013;149(3 PB):411-420. doi:10.1016/j.clim.2013.10.001
31. Wang S, Baidoo SE, Liu Y, i wsp. T cell-derived leptin contributes to increased frequency of T helper type 17 cells in female patients with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol*. 2013;171(1):63-68. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04670.x
32. Wang S, Shi Y, Yang M, i wsp. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein exacerbates collagen-induced arthritis by enhancing the expansion of Th17 cells. *Am J Pathol*. 2012;180(3):1059-1067. doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.018
33. Kim D. Low vitamin D status is associated with hypothyroid Hashimoto's thyroiditis. *Hormones*. 2016;15(3). doi:10.14310/horm.2002.1681
34. Guan L juan, Wang X, Meng S, i wsp. Increased IL-21/IL-21R expression and its proinflammatory effects in autoimmune thyroid disease. *Cytokine*. 2015;72(2):160-165. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.005
35. Feng Y, Qiu T, Chen H, i wsp. Association of serum IL-21 and vitamin D concentrations in Chinese children with autoimmune thyroid disease. *Clin Chim Acta*. 2020;507(February):194-198. doi:10.1016/j.cca.2020.04.030
36. Dilas LT, Icin T, Paro JN, Bajkin I. Autoimmune thyroid disease and other non-endocrine autoimmune diseases. *Med Pregl*. 2011;64(3-4):183-187. doi:10.2298/mpns1104183t
37. Boelaert K, Newby PR, Simmonds MJ, i wsp. Prevalence and relative risk of other autoimmune diseases in subjects with autoimmune thyroid disease. *Am J Med*. 2010;123(2). doi:10.1016/j.amjmed.2009.06.030
38. Brix TH, Kyvik KO, Hegedüs L. A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(2):536-539. doi:10.1210/jcem.85.2.6385
39. Zaletel K, Gaberscek S. Hashimotos thyroiditis: From genes to the disease. *Curr Genomics*. 2011;12(8):576-588. doi:10.2174/138920211798120763
40. Hiromatsu Y, Satoh H, Amino N. Hashimoto's thyroiditis: history and future outlook. *Hormones*. 2013;12(1):12-18. doi:10.1007/bf03401282
41. Cortés JMR, Zerón HM. Genetics of thyroid disorders. *Folia Med (Plovdiv)*. 2019;61(2):172-179. doi:10.2478/folmed-2018-0078
42. Duntas LH. Environmental factors and autoimmune thyroiditis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(8):454-460. doi:10.1038/ncpendmet0896

43. McLachlan SM, Rapoport B. Why measure thyroglobulin autoantibodies rather than thyroid peroxidase autoantibodies? *Thyroid*. 2004;14(7):510-520. doi:10.1089/1050725041517057
44. Daroszewski J. Niedoczynność tarczycy u osób dorosłych. W: *Endokrynologia Kliniczna. Podręcznik dla studentów. Pod red. A. Milewicza*. Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich; 2012:45-54.
45. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NMH. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;84(3):223-243. doi:10.1006/clin.1997.4412
46. Dong YH FD. Autoimmune thyroid disease: mechanism, genetics and current knowledge. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;18 (23):3611-3618. Dostęp 6.06.2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25535130/>
47. Carlé A, Bü Low Pedersen I, Knudsen N, i wsp. Epidemiology of subtypes of hyperthyroidism in Denmark: a population-based study. *Eur J Endocrinol*. 164:801-809. doi:10.1530/EJE-10-1155
48. Cappa M, Bizzarri C, Crea F. Autoimmune thyroid diseases in children. *J Thyroid Res*. 2011;2011. doi:10.4061/2011/675703
49. Iddah MA, Macharia BN, Hu J-F, Skafar DF. Autoimmune thyroid disorders. *Corp ISRN Endocrinol*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/509764
50. Menconi F, Marcocci C, Marinò M. Diagnosis and classification of Graves' disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):398-402. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.013
51. Ando T, Davies TF. Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor. *Clin Dev Immunol*. 2005;12(2):137-143. doi:10.1080/17402520500078238
52. Bjoro T, Holmen J, Kruger O, i wsp. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The health study of Nord-Trondelag (HUNT). *Eur J Endocrinol*. 2000;143(5):639-647. doi:10.1530/eje.0.1430639
53. Rees Smith B. Thyroid autoantibodies. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*; 2001;61:45-52. doi:10.1080/003655101753352040
54. Surks MI, Hollowell JG. Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the U.S. population: Implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4575-4582. doi:10.1210/jc.2007-1499
55. Bahn RS, Heufelder AE. Orbital connective tissue in endocrine ophthalmopathy. *Dev Ophthalmol*. 1993;25:46-57. doi:10.1159/000422423
56. Li H, Wang T. The autoimmunity in Graves's disease. *Front Biosci*. 2013;18(2):782-787. doi:10.2741/4141
57. Łacheta D, Miśkiewicz P, Głuszko A, i wsp. Immunological aspects of Graves' ophthalmopathy. *Biomed Res Int*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/7453260

58. Lin J-D, Yang S-F, Wang Y-H, i wsp. Associations of melatonin receptor gene polymorphisms with Graves' disease. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185529. doi:10.1371/journal.pone.0185529
59. Antonelli A, Fallahi P, Elia G, i wsp. Graves' disease: clinical manifestations, immune pathogenesis (cytokines and chemokines) and therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Published online 2020:1-13. doi:10.1016/j.beem.2020.101388
60. Fallahi P, Ferrari SM, Ragusa F, Ruffilli I, Elia G, Paparo SR, Antonelli A. Th1 chemokines in autoimmune endocrine disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(4). doi:10.1210/clinem/dgz289
61. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev*. 2003;24(6):802-835. doi:10.1210/er.2002-0020
62. Ghali H, Drissi M, Citerne J, Fouad Hanna V. Numerical simulation of a virtual matched load for the characterization of planar discontinuities. *IEEE MTT-S Int Microw Symp Dig*. 1992;2(1):1119-1122. doi:10.1109/mwsym.1992.188190
63. Akamizu T. Antithyrotropin receptor antibody: an update. *Thyroid*. 2001;11(12):1123-1134. doi:10.1089/10507250152740966
64. Weetman AP. Graves' disease. *N Engl J Med*. 2000;343(17):1236-1248. doi:10.1056/NEJM200010263431707
65. Smith TJ, Hegedüs L. Graves' disease. *N Engl J Med*. 2016;375(16):1552-1565. doi:10.1056/NEJMra1510030
66. Davies T, Marians R, Latif R. The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest*. 2002;110(2):161-164. doi:10.1172/JCI0216234
67. Diana T, Olivo PD, Kahaly GJ. Thyrotropin receptor blocking antibodies. *Horm Metab Res*. 2018;50(12):853-862. doi:10.1055/a-0723-9023
68. Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TSH receptor autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2009;9(2):113-116. doi:10.1016/j.autrev.2009.03.012
69. Kahaly GJ, Diana T, Kanitz M, Frommer L, Olivo PD. Prospective trial of functional thyrotropin receptor antibodies in Graves disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(4):1006-1014. doi:10.1210/clinem/dgz292
70. Möst J, Knapp W, Wick G. Class II antigens in Hashimoto thyroiditis. I. Synthesis and expression of HLA-DR and HLA-DQ by thyroid epithelial cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986;41(2):165-174. doi:10.1016/0090-1229(86)90100-5
71. Bottazzo GF, Hanafusa T, Pujol-Borrell R, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet*. 1983;322(8359):1115-1119. doi:10.1016/S0140-6736(83)90629-3
72. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid*. 2010;20(7):715-725. doi:10.1089/thy.2010.1644
73. Jacobson EM, Tomer Y. The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and

- PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future. *J Autoimmun.* 2007;28(2-3):85-98. doi:10.1016/j.jaut.2007.02.006
74. Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J Autoimmun.* 2009;32(3-4):231-239. doi:10.1016/j.jaut.2009.02.007
 75. Bahn RS. Current insights into the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Horm Metab Res.* 2015;47(10):773-778. doi:10.1055/s-0035-1555762
 76. Huber AK, Jacobson EM, Jazdzewski K, Concepcion ES, Tomer Y. Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(3):1077-1081. doi:10.1210/jc.2007-2190
 77. Jurecka-Lubieniecka B, Ploski R, Kula D, i wsp. Association between polymorphisms in the TSHR gene and Graves' orbitopathy. Saruhan-Direskeneli G, ed. *PLoS One.* 2014;9(7):e102653. doi:10.1371/journal.pone.0102653
 78. Maciejewski A, Kowalczyk MJ, Gasińska T, i wsp. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in thyroid-associated orbitopathy. *Ocul Immunol Inflamm.* 2019;28(3):354-361. doi:10.1080/09273948.2019.1629605
 79. Ploski R, Szymanski K, Bednarczuk T. The genetic basis of Graves' disease. *Curr Genomics.* 2011;12(8):542-563. doi:10.2174/138920211798120772
 80. Jurecka-Lubieniecka B, Bednarczuk T, Ploski R, i wsp. Differences in gene-gene interactions in Graves' disease patients stratified by age of onset. *PLoS One.* 2016;11(3). doi:10.1371/journal.pone.0150307
 81. Tomer Y, Ban Y, Concepcion E, i wsp. Common and unique susceptibility loci in Graves' and Hashimoto diseases: Results of whole-genome screening in a data set of 102 multiplex families. *Am J Hum Genet.* 2003;73(4):736-747. doi:10.1086/378588
 82. Ferrari SM, Fallahi P, Ruffilli I, i wsp. The association of other autoimmune diseases in patients with Graves' disease (with or without ophthalmopathy): review of the literature and report of a large series. *Autoimmun Rev.* 2019;18(3):287-292. doi:10.1016/j.autrev.2018.10.001
 83. Kalmann R, Mourits MP. Diabetes mellitus: a risk factor in patients with Graves' orbitopathy. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(4):463-465. doi:10.1136/bjo.83.4.463
 84. Altieri B, Muscogiuri G, Barrea L, i wsp. Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. *Rev Endocr Metab Disord.* 2017;18(3). doi:10.1007/s11154-016-9405-9
 85. Valtonen V V, Ruutu P, Varis K, Ranki M, Malkamäki M, Mäkelä PH. Serological evidence for the role of bacterial infections in the pathogenesis of thyroid diseases. *Acta Med Scand.* 1986;219(1):105-111. doi:10.1111/j.0954-6820.1986.tb03283.x
 86. Holm IA, Manson JE, Michels KB, Alexander EK, Willett WC, Utiger RD. Smoking and other lifestyle factors and the risk of Graves' hyperthyroidism. *Arch Intern Med.* 2005;165(14):1606-1611. doi:10.1001/archinte.165.14.1606
 87. Chardès T, Chapal N, Bresson D, i wsp. The human anti-thyroid peroxidase

- autoantibody repertoire in Graves' and Hashimoto's autoimmune thyroid diseases. *Immunogenetics*. 2002;54(3):141-157. doi:10.1007/s00251-002-0453-9
88. Reid JR. Hyperthyroidism: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2005;15(72(4)):623-630. www.aafp.org/afp.
 89. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, i wsp. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3(6):673-682. doi:10.1016/1074-7613(95)90057-8
 90. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 1996;271(22):12687-12690. doi:10.1074/jbc.271.22.12687
 91. Mariani SM. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol*. 1998;28(3). doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<973::AID-IMMU973>3.0.CO;2-T
 92. Song K, Chen Y, Göke R, i wsp. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med*. 2000;191(7):1095-1103. doi:10.1084/jem.191.7.1095
 93. Mérino D, Lalaoui N, Morizot A, Solary E, Micheau O. TRAIL in cancer therapy: Present and future challenges. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(10):1299-1314. doi:10.1517/14728222.11.10.1299
 94. Prasad S, Kim JH, Gupta SC, Aggarwal BB. Targeting death receptors for TRAIL by agents designed by Mother Nature. *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35(10):520-536. doi:10.1016/j.tips.2014.07.004
 95. Toiyama D, Takaha N, Shinnoh M, Ueda T, Kimura Y NT et. al. Significance of serum tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand as a prognostic biomarker for renal cell carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(1):69-74. doi:10.3892/mco.2012.35
 96. Spierings DC, De Vries EG, Vellenga E, i wsp. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(6):821-831. doi:10.1369/jhc.3A6112.2004
 97. Tecchio C, Huber V, Scapini P, i wsp. IFN-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*. 2004;103(10):3837-44. doi:10.1182/blood-2003
 98. Mielczarek-Palacz A, Sikora J, Kondera-Anasz Z. Assessment of concentrations of sTRAIL ligand and its receptors sTRAIL-R1 and sTRAIL-R2 - Markers monitoring the course of the extrinsic pathway of apoptosis induction: potential application in ovarian cancer diagnostics. *Arch Med Sci*. 2017;13(3):624-628. doi:10.5114/aoms.2015.53144
 99. Mühlenbeck F, Schneider P, Bodmer JL, i wsp. The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *J Biol Chem*. 2000;275(41):32208-32213. doi:10.1074/jbc.M000482200
 100. Zauli G, Celeghini C, Monasta L, i wsp. Soluble TRAIL is present at high

- concentrations in seminal plasma and promotes spermatozoa survival. *Reproduction*. 2014;148(2):191-198. doi:10.1530/REP-14-0144
101. Walczak H, Miller RE, Ariail K, i wsp. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*. 1999;5(2):157-163. doi:10.1038/5517
 102. Ashkenazi A, Herbst RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest*. 2008;118(6):1979-1990. doi:10.1172/JCI34359
 103. Lemke J, Von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ*. 2014;21(9):1350-1364. doi:10.1038/cdd.2014.81
 104. Fayyaz S, Javed Z, Attar R, Farooqi AA, Yaylim I, Ahmad A. MicroRNA regulation of TRAIL mediated signaling in different cancers: control of micro steering wheels during the journey from bench-top to the bedside. *Semin Cancer Biol*. 2019;58(January):56-64. doi:10.1016/j.semcancer.2019.01.007
 105. Bernardi S, Milani D, Fabris B, Secchiero P, Zauli G. TRAIL as biomarker and potential therapeutic tool for cardiovascular diseases. *Curr Drug Targets*. 2012;13(9):1215-1221. doi:10.2174/138945012802002357
 106. Harith HH, Morris MJ, Kavurma MM. On the TRAIL of obesity and diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(11):578-587. doi:10.1016/j.tem.2013.07.001
 107. Yildiz R, Benekli M, Buyukberber S, i wsp. The effect of bevacizumab on serum soluble FAS/FASL and TRAIL and its receptors (DR4 and DR5) in metastatic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(10):1471-1476. doi:10.1007/s00432-010-0803-1
 108. Wandinger KP, Lünemann JD, Wengert O, i wsp. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet*. 2003;361(9374):2036-2043. doi:10.1016/S0140-6736(03)13641-0
 109. Han L-H, Sun W-S, Ma C-H, i wsp. Detection of soluble TRAIL in HBV infected patients and its clinical implications. *World J Gastroenterol World J Gastroenterol*. 2002;8(6):1077-1080. www.wjgnet.com
 110. Yan X, Xu L, Qi J, i wsp. STRAIL levels and TRAIL gene polymorphisms in Chinese patients with fatty liver disease. *Immunogenetics*. 2009;61(8):551-556. doi:10.1007/s00251-009-0389-4
 111. Chi HC, Chen SL, Liao CJ, i wsp. Thyroid hormone receptors promote metastasis of human hepatoma cells via regulation of TRAIL. *Cell Death Differ*. 2012;19(11):1802-1814. doi:10.1038/cdd.2012.58
 112. Visser WE, Heemstra KA, Swagemakers SMA, i wsp. Physiological thyroid hormone levels regulate numerous skeletal muscle transcripts. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;3015(9):3487-3496. doi:10.1210/jc.2009-0782
 113. Jiang Y, Lin XQ, Cao SG, i wsp. Correlations of genetic polymorphisms of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene and its plasma phenotype with ulcerative colitis. *Natl Med J China*. 2012;92(18):1244-1248. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2012.18.007

114. Kikuchi S, Miyagishi R, Fukazawa T, Yabe I, Miyazaki Y, Sasaki H. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005;167(1-2):170-174. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.06.021
115. Lub-De Hooge MN, De Vries EGE, De Jong S, Bijl M. Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(6):854-858. doi:10.1136/ard.2004.029058
116. Bernardi S, Bossi F, Toffoli B, i wsp. Association between thyroid hormones and TRAIL. *Clin Biochem.* 2017;50(16-17):972-976. doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.05.011
117. Manzo F, Nebbioso A, Miceli M, i wsp. TNF-related apoptosis-inducing ligand: Signalling of a “smart” molecule. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(3):460-466. doi:10.1016/j.biocel.2007.12.012
118. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett.* 2003;139:89-97. doi:10.1016/S0378-4274(02)00422-8
119. Gray HL, Sorensen EL, Hunt JS, Ober C. Three polymorphisms in the 3' UTR of the TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) gene. *Genes Immun.* 2001;2(8):469-470. doi:10.1038/sj.gene.6363806
120. Mellier G, Huang S, Shenoy K, Pervaiz S. TRAILing death in cancer. *Mol Aspects Med.* 2010;31(1):93-112. doi:10.1016/j.mam.2009.12.002
121. Pennarun B, Meijer A, de Vries EGE, Kleibeuker JH, Kruyt F, de Jong S. Playing the DISC: Turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2010;1805(2):123-140. doi:10.1016/j.bbcan.2009.11.004
122. Hymowitz SG, O'Connell MP, Ultsch MH, i wsp. A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry.* 2000;39(4):633-640. doi:10.1021/bi992242l
123. Luo J, Xiong J, Wu J, Ye X. Genetic polymorphisms and haplotypes of TRAIL gene correlate with NSCLC susceptibility in a group of Chinese patients. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(9):16223-16230. Dostęp 25.05.2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629137>
124. Mi Y, Zhu L, Feng N. Polymorphism analysis of TRAIL gene and correlation TRAIL expression in prostate cancer. W: *Prostate Cancer - Original Scientific Reports and Case Studies.* InTech; 2011. doi:10.5772/26302
125. Wang C, Xu S, Yi F, i wsp. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand gene polymorphisms are correlated with gastric cancer in central China. *Pharm Res.* 2015;32(3):762-768. doi:10.1007/s11095-013-1217-y
126. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(10):782-798. doi:10.1038/nrc2465
127. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene.* 2003;22:8628-8633. doi:10.1038/sj.onc.1207232

128. Van Dijk M, Halpin-McCormick A, Sessler T, Samali A, Szegezdi E. Resistance to TRAIL in non-transformed cells is due to multiple redundant pathways. *Cell Death Dis.* 2013;4(7). doi:10.1038/cddis.2013.214
129. Song JJ, Jee YA, Yong TK, Lee YJ. Evidence for two modes of development of acquired tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance: Involvement of Bcl-xL. *J Biol Chem.* 2007;282(1):319-328. doi:10.1074/jbc.M608065200
130. Song JH, Bellail A, Tse MCL, Yong VW, Hao C. Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *J Neurosci.* 2006;26(12):3299-3308. doi:10.1523/JNEUROSCI.5572-05.2006
131. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, i wsp. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science.* 1997;277(5327):818 LP - 821. doi:10.1126/science.277.5327.818
132. Martinez-Lostao L, Marzo I, Anel A, Naval J. Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(11):1475-1483. doi:10.1016/j.bcp.2011.12.036
133. Azab NA, Rady HM, Marzouk SA. Elevated serum TRAIL levels in scleroderma patients and its possible association with pulmonary involvement. *Clin Rheumatol.* 2012;31(9):1359-1364. doi:10.1007/s10067-012-2023-3
134. Su HW, Cao Z, Wolf JM, Van Antwerp M, Baker JR. Death ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits experimental autoimmune thyroiditis. *Endocrinology.* 2005;146(11):4721-4726. doi:10.1210/en.2005-0627
135. Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nat Immunol.* 2003;4(3):255-260. doi:10.1038/ni894
136. Lehnert C, Weiswange M, Jeremias I, i wsp. TRAIL⁻-receptor costimulation inhibits proximal TCR signaling and suppresses human T cell activation and proliferation. *J Immunol.* 2014;193(8):4021-4031. doi:10.4049/jimmunol.1303242
137. Chyuan IT, Tsai HF, Wu CS, Sung CC, Hsu PN. TRAIL-mediated suppression of T cell receptor signaling inhibits T cell activation and inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Immunol.* 2018;9:1-14. doi:10.3389/fimmu.2018.00015
138. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* 1997;7(6):813-820. doi:10.1016/S1074-7613(00)80399-4
139. Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, i wsp. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation.* 2003;107(17):2250-2256. doi:10.1161/01.CIR.0000062702.60708.C4
140. Zauli G, Sancilio S, Cataldi A, Sabatini N, Bosco D, Di Pietro R. PI-3K/Akt and NF- κ B/I κ B α pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment. *J*

Cell Physiol. 2005;202(3):900-911. doi:10.1002/jcp.20202

141. Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters GJ, De Jong S, Kruyt FAE. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: Discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* 2013;20(7):858-868. doi:10.1038/cdd.2013.28
142. Hunter I, Nixon GF. Spatial compartmentalization of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1-dependent signaling pathways in human airway smooth muscle cells: Lipid rafts are essential for TNF- α -mediated activation of RhoA but dispensable for the activation of the NF- κ B and MAPK pathways. *J Biol Chem.* 2006;281(45):34705-34715. doi:10.1074/jbc.M605738200
143. Song JH, Tse MCL, Bellail A, i wsp. Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptotic and nonapoptotic signals in non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 2007;67(14):6946-6955. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3896
144. Di Bartolo BA, Chan J, Bennett MR, i wsp. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protects against diabetes and atherosclerosis in Apoe $-/-$ mice. *Diabetologia.* 2011;54(12):3157-3167. doi:10.1007/s00125-011-2308-0
145. Bernardi S, Zauli G, Tikellis C, i wsp. TNF-related apoptosis-inducing ligand significantly attenuates metabolic abnormalities in high-fat-fed mice reducing adiposity and systemic inflammation. *Clin Sci.* 2012;123(9):547-555. doi:10.1042/CS20120176
146. Keuper M, Wernstedt Asterholm I, Scherer PE, i wsp. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) regulates adipocyte metabolism by caspase-mediated cleavage of PPARgamma. *Cell Death Dis.* 2013;4(1):e474-e474. doi:10.1038/cddis.2012.212
147. Zoller V, Funcke JB, Keuper M, i wsp. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) inhibits human adipocyte differentiation via caspase-mediated downregulation of adipogenic transcription factors. *Cell Death Dis.* 2016;7(10):e2412-11. doi:10.1038/cddis.2016.286
148. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(12):3448-3459. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.001
149. Davidovich P, Kearney CJ, Martin SJ. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biological Chemistry.* 2014;1163-1171. doi:10.1515/hsz-2014-0164
150. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501. doi:10.1016/S0092-8674(01)00237-9
151. Danish L, Stöhr D, Scheurich P, Pollak N. TRAIL-R3/R4 and inhibition of TRAIL signalling in cancer. W: *TRAIL, Fas Ligand, TNF and TLR3 in Cancer.* Springer, Cham; 2017:27-57. doi:10.1007/978-3-319-56805-8_2
152. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res.* 2000;256(1):58-66. doi:10.1006/excr.2000.4840
153. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(2):255-260. doi:10.1016/S0955-0674(99)80034-9

154. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 1997;272(41):25417-25420. doi:10.1074/jbc.272.41.25417
155. Van Roosmalen IAM, Quax WJ, Kruyt FAE. Two death-inducing human TRAIL receptors to target in cancer: similar or distinct regulation and function? *Biochem Pharmacol*. 2014;91(4):447-456. doi:10.1016/j.bcp.2014.08.010
156. Lee SH, Shin MS, Kim HS, i wsp. Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2001;20(3):399-403. doi:10.1038/sj.onc.1204103
157. Wagner J, Kline CL, El-Deiry W. Resistance to TRAIL pathway-targeted therapeutics in cancer. W: *TRAIL, Fas Ligand, TNF and TLR3 in Cancer*. Springer, Cham; 2017:1-25. doi:10.1007/978-3-319-56805-8_1
158. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, i wsp. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*. 1997;276(5309):111-113. doi:10.1126/science.276.5309.111
159. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281(5381):1305 LP - 1308. doi:10.1126/science.281.5381.1305
160. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, i wsp. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277(5327):818-821. doi:10.1126/science.277.5327.818
161. Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, i wsp. Triggering cell death: The crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell*. 1999;4(4):563-571. doi:10.1016/S1097-2765(00)80207-5
162. Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol*. 1997;7(9):693-696. doi:10.1016/S0960-9822(06)00297-1
163. Pan G, Ni J, Wei Y-F, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*. 1997;277(5327):815 LP - 818. doi:10.1126/science.277.5327.815
164. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, i wsp. TRAIL-R2: A novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*. 1997;16(17):5386-5397. doi:10.1093/emboj/16.17.5386
165. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, i wsp. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*. 1997;186(7):1165-1170. doi:10.1084/jem.186.7.1165
166. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, i wsp. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol*. 1997;7(12):1003-1006. doi:10.1016/S0960-9822(06)00422-2
167. Zauli G, Melloni E, Capitani S, Secchiero P. Role of full-length osteoprotegerin in tumor cell biology. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(5):841-851. doi:10.1007/s00018-008-8536-x

168. Krieg A, Schulte am Esch J, Ramp U, i wsp. TRAIL-R4- β : A new splice variant of TRAIL-receptor 4 lacking the cysteine rich domain 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(1):115-121. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.031
169. Griffith T, James B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptotic pathways in cancer immunosurveillance: molecular mechanisms and prospects for therapy. *Res Reports Biochem.* 2015;5:1-10. doi:10.2147/rrbc.s59123
170. Testa U. TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies. *J Cell Biochem.* 2010;110(1):n/a-n/a. doi:10.1002/jcb.22549
171. Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, Van Den Brink MRM, Yagita H. Nature's TRAIL - On a path to cancer immunotherapy. *Immunity.* 2003;18(1):1-6. doi:10.1016/S1074-7613(02)00502-2
172. Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The role of osteoprotegerin and its ligands in vascular function. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3). doi:10.3390/ijms20030705
173. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-342. doi:10.1038/nature01658
174. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, i wsp. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 1998;273(23):14363-14367. doi:10.1074/jbc.273.23.14363
175. Staniek J, Lorenzetti R, Heller B, i wsp. TRAIL-R1 and TRAIL-R2 mediate TRAIL-dependent apoptosis in activated primary human B lymphocytes. *Front Immunol.* 2019;10:1-13. doi:10.3389/fimmu.2019.00951
176. Candido R. The osteoprotegerin/tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand axis in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014;23(1):69-74. doi:10.1097/01.mnh.0000437611.42417.7a
177. Griffith TS, Rauch CT, Smolak PJ, i wsp. Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1999;162(5):2597-2605. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072501>
178. Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* 2004;14(5):359-372. doi:10.1038/sj.cr.7290236
179. Halaby R. Apoptosis and autoimmune disorders. W: *Autoimmune Diseases - Contributing Factors, Specific Cases of Autoimmune Diseases, and Stem Cell and Other Therapies.* InTech; 2012. doi:10.5772/48164
180. Elrod HA, Fan S, Muller S, i wsp. Analysis of death receptor 5 and caspase-8 expression in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma and their prognostic impact. *PLoS One.* 2010;5(8). doi:10.1371/journal.pone.0012178
181. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88(3):355-365. doi:10.1016/S0092-8674(00)81874-7
182. Takano Y, Saegusa M, Ikenaga M, Mitomi H, Okayasu I. Apoptosis of colon cancer: Comparison with Ki-67 proliferative activity and expression of p53. *J Cancer Res Clin*

- Oncol.* 1996;122(3):166-170. doi:10.1007/BF01366957
183. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):420-430. doi:10.1038/nrc821
 184. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell.* 2010;140(5):619-630. doi:10.1016/j.cell.2010.02.014
 185. Bossi F, Bernardi S, Zauli G, Secchiero P, Fabris B. TRAIL modulates the immune system and protects against the development of diabetes. *J Immunol Res.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/680749
 186. Bernardi S, Secchiero P, Zauli G. State of art and recent developments of anti-cancer strategies based on TRAIL. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2012;7(2):207-217. doi:10.2174/157489212799972927
 187. James BR, Griffith TS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptotic pathways in cancer immunosurveillance: molecular mechanisms and prospects for therapy. *Res Reports Biochem.* 2015;5:1-10. doi:10.2147/RRBC.S59123
 188. Zhao J, Lu Y, Shen HM. Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett.* 2012;314(1):8-23. doi:10.1016/j.canlet.2011.09.040
 189. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102(1):33-42. doi:10.1016/S0092-8674(00)00008-8
 190. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, i wsp. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000;102(1):43-53. doi:10.1016/S0092-8674(00)00009-X
 191. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25(34):4798-4811. doi:10.1038/sj.onc.1209608
 192. Sayers TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(8):1173-1180. doi:10.1007/s00262-011-1008-4
 193. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* 2000;12(6):611-620. doi:10.1016/S1074-7613(00)80212-5
 194. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
 195. Algeciras-Schimmich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya CV. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 1999;162(9):5205-5211. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10227994/>
 196. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995;267(5203):1445 LP - 1449. doi:10.1126/science.7878463
 197. Paduch R, Klatka M, Klatka J. Rodzaje śmierci komórki. *Pom J Life Sci.* 2015;61:4.

198. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med.* 2001;40(4):275-284. doi:10.2169/internalmedicine.40.275
199. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, i wsp. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998;17(8): 2215–2223. doi: 10.1093/emboj/17.8.2215.
200. Tsatsoulis A. The role of apoptosis in thyroid disease. *Minerva Med.* 2002;93(3):169-180. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12094148/>
201. Palazzo FF, Hammond LJ, Goode AW, Mirakian R. Death of the autoimmune thyrocyte: Is it pushed or does it jump? *Thyroid.* 2000;10(7):561-572. doi:10.1089/thy.2000.10.561
202. Salmaso C, Bagnasco M, Pesce G, i wsp. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: Insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:496-501. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04253.x
203. Lin J. Clinical review The role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders and thyroid cancer. *BMJ.* 2001;322(7301):1525-1527. doi:10.1136/bmj.322.7301.1525
204. Inoue N, Watanabe M, Ishido N, i wsp. Involvement of genes encoding apoptosis regulatory factors (FAS, FASL, TRAIL, BCL2, TNFR1 and TNFR2) in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Hum Immunol.* 2016;77(10):944-951. doi:10.1016/j.humimm.2016.07.232
205. Sreelekha TT, Pradeep VM, Vijayalakshmi K, i wsp. In situ apoptosis in the thyroid. *Thyroid.* 2000;10(2):117-122. doi:10.1089/thy.2000.10.117
206. Sera N, Kawakami A, Nakashima T, i wsp. Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease. *Clin Exp Immunol.* 2001;124(2):197-207. doi:10.1046/j.1365-2249.2001.01476.x
207. Su HW, Van Antwerp M, Kuick R, i wsp. Microarray analysis of cytokine activation of apoptosis pathways in the thyroid. *Endocrinology.* 2007;148(10):4844-4852. doi:10.1210/en.2007-0126
208. Baker JR. The nature of apoptosis in the thyroid and the role it may play in autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 2001;11(3):245-247. doi:10.1089/105072501750159633
209. Bretz JD, Rymaszewski M, Arscott PL, i wsp. TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23627-23632. doi:10.1074/JBC.274.33.23627
210. Łącka K, Maciejewski A. Rola procesu apoptozy w etiopatogenezie autoimmunologicznego zapalenia tarczycy. *Pol Merkur Lek.* 2012;32(188):87-92.
211. Fountoulakis S, Tsatsoulis A. On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: A unifying hypothesis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;60(4):397-409. doi:10.1046/j.1365-2265.2004.01978.x
212. Bretz JD, Baker JR. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: Following a TRAIL to

- thyroid destruction? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(1):1-11. doi:10.1046/j.1365-2265.2001.01345.x
213. Hammond LJ, Palazzo FF, Shattock M, Goode AW, Mirakian R. Thyrocyte targets and effectors of autoimmunity: A role for death receptors? *Thyroid*. 2001;11(10):919-927. doi:10.1089/105072501753210975
214. Geng P, Li J, Wang N, i wsp. Genetic association between TRAIL-R1 Thr209Arg and cancer susceptibility. *Sci Rep*. 2015;5:1-7. doi:10.1038/srep10382
215. Taştemir-Korkmaz D, Demirhan O, Kuleci S, Hastürk S. There is no significant association between death receptor 4 (DR4) gene polymorphisms and lung cancer in Turkish population. *Pathol Oncol Res*. 2013;19(4):779-784. doi:10.1007/s12253-013-9643-z
216. Chen W, Tang WR, Zhang M, Chang K, Wei YL. Association of DR4 (TRAIL-R1) polymorphisms with cancer risk in Caucasians: an updated meta-analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(6):2889-2892. doi:10.7314/APJCP.2014.15.6.2889
217. Zayed SA, Zahran NM, Khorshied MM, i wsp. Genetic variations in death receptor domain 4 gene and the susceptibility to hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *J Med Virol*. 2019;91(8):1537-1544. doi:10.1002/jmv.25476
218. Fisher MJ, Virmani AK, Wu L, i wsp. Nucleotide substitution in the ectodomain of TRAIL receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(6):1688 LP - 1697.
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/7/6/1688.abstract>
219. Chen B, Liu S, Wang XL, i wsp. TRAIL-R1 polymorphisms and cancer susceptibility: an evidence-based meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45(14):2598-2605. doi:10.1016/j.ejca.2009.06.023
220. Körner C, Riesner K, Krämer B, i wsp. TRAIL receptor I (DR4) polymorphisms C626G and A683C are associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma (HCC) in HCV-infected patients. *BMC Cancer*. 2012;12(1):85. doi:10.1186/1471-2407-12-85
221. Lu J, Qin Q, Zhan LL, i wsp. Association of four polymorphisms in the death receptor 4 gene with cancer risk: an updated meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014;35(6):5149-5158. doi:10.1007/s13277-014-1667-9
222. Rai R, Sharma KL, Sharma S, Misra S, Kumar A, Mittal B. Death receptor (DR4) haplotypes are associated with increased susceptibility of gallbladder carcinoma in north indian population. *PLoS One*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0090264
223. Li J, Hsu HC, Yang PA, i wsp. Treatment of arthritis by macrophage depletion and immunomodulation: testing an apoptosis-mediated therapy in a humanized death receptor mouse model. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1098-1109. doi:10.1002/art.33423
224. Marcuzzi A, Secchiero P, Crovella S, Zauli G. TRAIL administration down-modulated the acute systemic inflammatory response induced in a mouse model by muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *Cytokine*. 2012;60(1):43-46. doi:10.1016/j.cyto.2012.06.001

225. Secchiero P, Rimondi E, Di Iasio MG, i wsp. C-reactive protein downregulates TRAIL expression in human peripheral monocytes via an Egr-1-dependent pathway. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):1949-1959. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3027
226. Walczak H. Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(5). doi:10.1101/cshperspect.a008698
227. Biktagirova EM, Sattarova LI, Vagapova GR, i wsp. Biochemical and immunological markers of autoimmune thyroiditis. *Biochem Suppl Ser B Biomed Chem.* 2015;9(2):151-158. doi:10.1134/S1990750815020031
228. Mikoś H, Mikoś M, Niedziela M. Znaczenie diagnostyczne stężenia cytokin IL-1 β (interleukina 1 beta) i TRAIL (związany z TNF-ligand indukujący apoptozę) w surowicy dzieci z autoimmunologiczną chorobą tarczycy. *Endokrynol Pediatryczna.* 2015;1(14). doi:10.18544/EP-02.14.01.1593
229. Macher-Goeppinger S, Aulmann S, Tagscherer KE, i wsp. Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):650-659. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0284
230. Zhou H, Wang Y, Bi K, i wsp. Serum-soluble TRAIL: a potential biomarker for disease activity in myositis patients. *Clin Rheumatol.* 2019;38(5):1425-1431. doi:10.1007/s10067-018-04418-9
231. Verim A, Turan S, Farooqi AA, i wsp. Association between laryngeal squamous cell carcinoma and polymorphisms in tumor necrosis factor related apoptosis induce ligand (TRAIL), TRAIL receptor and sTRAIL levels. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(24):10697-10703. doi:10.7314/APJCP.2014.15.24.10697
232. Jabłońska E, Jabłoński J, Marcinczyk M, Grabowska Z, Piotrowski L. The release of soluble forms of TRAIL and DR5 by neutrophils of oral cavity cancer patients. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(2):177-183. doi:10.2478/v10042-008-0027-2
233. Kim H, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Kim JH, Kim JG. Association between endometriosis and polymorphisms in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptor and osteoprotegerin genes and their serum levels. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286(1):147-153. doi:10.1007/s00404-012-2263-0
234. Bisgin A, Kargi A, Yalcin AD, i wsp. Increased serum sTRAIL levels were correlated with survival in bevacizumab-treated metastatic colon cancer. *BMC Cancer.* 2012;12. doi:10.1186/1471-2407-12-58
235. Han LH, Sun WS, Ma CH, i wsp. Detection of soluble TRAIL in HBV infected patients and its clinical implications. *World J Gastroenterol.* 2002;8(6):1077-1080. doi:10.3748/wjg.v8.i6.1077
236. Li Y, Jin X, Li J, i wsp. Expression of TRAIL, DR4, and DR5 in bladder cancer: Correlation with response to adjuvant therapy and implications of prognosis. *Urology.* 2012;79(4):968.e7-968.e15. doi:10.1016/j.urology.2011.11.011
237. Wan Z, Zhang X, Yu X, Hou Y. Prognostic significance of serum soluble DR5 levels in small-cell lung cancer. *Int J Med Sci.* 2019;16(3):403-408. doi:10.7150/ijms.28814

238. Miyashita T, Kawakami A, Nakashima T, i wsp. Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells. *Clin Exp Immunol.* 2004;137(2):430-436. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02534.x
239. Köhler BM, Günther J, Kaudewitz D, Lorenz H-M. Current therapeutic options in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Clin Med.* 2019;8(7):938. doi:10.3390/jcm8070938
240. Bassett JHD, O'Shea PJ, Sriskantharajah S, i wsp. Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism. *Mol Endocrinol.* 2007;21(5):1095-1107. doi:10.1210/me.2007-0033
241. Hofbauer LC, Kluger S, Kühne CA, i wsp. Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *J Cell Biochem.* 2002;86(4):642-650. doi:10.1002/jcb.10242
242. Mochizuki Y, Banba N, Hattori Y, Monden T. Correlation between serum osteoprotegerin and biomarkers of bone metabolism during anti-thyroid treatment in patients with Graves' disease. *Horm Res.* 2006;66(5):236-239. doi:10.1159/000095068
243. Amato G, Mazziotti G, Sorvillo F, i wsp. High serum osteoprotegerin levels in patients with hyperthyroidism: Effect of medical treatment. *Bone.* 2004;35(3):785-791. doi:10.1016/j.bone.2004.04.021
244. Nagasaki T, Inaba M, Jono S, i wsp. Increased levels of serum osteoprotegerin in hypothyroid patients and its normalization with restoration of normal thyroid function. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(3):347-353. doi:10.1530/eje.1.01870
245. Choi JW, Song JS, Pai SH. Associations of serum TRAIL concentrations, anthropometric variables, and serum lipid parameters in healthy adults. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34(4):400-404.
246. Tisato V, Rimondi E, Brombo G, i wsp. Serum soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand levels in older subjects with dementia and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2016;41(5-6):273-280. doi:10.1159/000446275
247. Cheng W, Liu F, Wang Z, i wsp. Soluble TRAIL concentration in serum is elevated in people with hypercholesterolemia. *PLoS One.* 2015;10(12):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0144015
248. Zoller V, Funcke JB, Keuper M, i wsp. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) inhibits human adipocyte differentiation via caspase-mediated downregulation of adipogenic transcription factors. *Cell Death Dis.* 2016;7(10):e2412-e2412. doi:10.1038/cddis.2016.286
249. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone.* 2003;32(6):681-686. doi:10.1016/S8756-3282(03)00090-5
250. Varga F, Spitzer S, Klaushofer K. Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int.* 2004;74(4):382-387. doi:10.1007/s00223-003-0033-5

251. Chang YH, Lin K Der, He SR, Hsieh MC, Hsiao JY, Shin SJ. Serum osteoprotegerin and tumor necrosis factor related apoptosis inducing-ligand (TRAIL) are elevated in type 2 diabetic patients with albuminuria and serum osteoprotegerin is independently associated with the severity of diabetic nephropathy. *Metabolism*. 2011;60(8):1064-1069. doi:10.1016/j.metabol.2010.11.002
252. Frank B, Shanmugam KS, Beckmann L, i wsp. Death receptor 4 variants and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(10):2002-2005. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0053
253. Mittal RD, Mandal RK, Singh A, Srivastava P. Death receptor 4 variants enhanced prostate cancer risk in North Indian population. *Tumor Biol*. 2015;36(7):5655-5661. doi:10.1007/s13277-015-3239-z
254. Martinez-Ferrandis JI, Rodríguez-López R, Milne RL, i wsp. Polymorphisms in TRAIL receptor genes and risk of breast cancer in Spanish women. *Cancer Biomarkers*. 2007;3(2):89-93. doi:10.3233/CBM-2007-3203
255. Fernández V, Jares P, Beà S, i wsp. Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms. *Haematologica*. 2004;89(11):1322-1331. Dostęp 08.06.2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531454>
256. Wolf S, Mertens D, Pscherer A, i wsp. Ala228 variant of trail receptor 1 affecting tee ligand binding site is associated with chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, prostate cancer, head and neck squamous cell carcinoma and bladder cancer. *Int J Cancer*. 2006;118(7):1831-1835. doi:10.1002/ijc.21502
257. Frank B, Hemminki K, Shanmugam KS, i wsp. Association of death receptor 4 haplotype 626C-683C with an increased breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2005;26(11):1975-1977. doi:10.1093/carcin/bgi164
258. Dick MG, Versmold B, Engel C, i wsp. Association of death receptor 4 variant (683A>C) with ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers. *Int J Cancer*. 2012;130(6):1314-1318. doi:10.1002/ijc.26134
259. Edgünlü TG, Özge A, Yalin OÖ, Kul S, Erdal ME. A study of the impact of death receptor 4 (DR4) gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *Balkan Med J*. 2013;30(3):268-272. doi:10.5152/balkanmedj.2013.7455
260. Horak P, Pils D, Roessler M, i wsp. Common death receptor 4 (DR4) polymorphisms do not predispose to ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2005;97(2):514-518. doi:10.1016/j.ygyno.2005.01.021