



Związek pomiędzy polimorfizmami wybranych genów i rozwojem oftalmopatii u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa w populacji polskiej

ROZPRAWA HABILITACYJNA

dr n. med. Tomasz Bednarczuk

Zakład Endokrynologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Streszczenie

Choroba Gravesa-Basedowa (skrót z ang. GD – *Graves' disease*) jest autoimmunologiczną chorobą tarczycy o bardzo złożonej etiopatogenezie. Jej rozwój jest uwarunkowany wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, które nie są jeszcze w pełni poznane. Na podstawie badań bliźniąt oceniono, że udział czynników genetycznych w patogenezie GD wynosi 80%, zaś czynników środowiskowych – 20%. Do najlepiej scharakteryzowanych czynników genetycznych predysponujących do rozwoju GD należą polimorfizmy genów głównego układu zgodności tkankowej (skrót z ang. HLA – *human leukocyte antigen*) (chromosom 6p21) oraz genu kodującego antygen związany z cytotoksycznym limfocytom T-4 (skrót z ang. CTLA-4 – *cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) (2q33). Wśród czynników środowiskowych wpływających na rozwój GD wymienia się: nikotynizm, podaż jodu, infekcje, stres i leki immunomodulujące.

Choroba Gravesa-Basedowa charakteryzuje się różnorodnym obrazem klinicznym, na który składają się różnie nasilone objawy ze strony tarczycy, tkanek oczodołu, skóry przedgoleni oraz dystalnych paliczek rąk i stóp. W leczeniu chorych z GD najtrudniejszym problemem klinicznym jest oftalmopatia tarczycowa (skrót z ang. TAO – *thyroid associated ophthalmopathy*). Choć za pomocą czułych metod diagnostycznych (tomografia komputerowa lub rezonans magnetyczny) pewne cechy oftalmopatii "utajonej" można stwierdzić u prawie wszystkich pacjentów z GD, to tylko u ok. 25% chorych zmiany oczne przyjmują postać oftalmopatii naciekowo-obrzękowej. Objawy kliniczne TAO prowadzą do znacznego pogorszenia jakości życia chorych, a w bardzo ciężkich przypadkach TAO może doprowadzić do utraty wzroku i trwałego inwalidztwa. Brak leczenia przyczynowego powoduje, iż w terapii chorych z ciężką oftalmopatią znajdują zastosowanie nieswoiste metody, takie jak: leczenie kortykosteroidami, radioterapia i zabiegi chirurgiczne dekompresji oczodołu, które są obciążone licznymi działaniami niepożądanymi.

Objawy kliniczne oftalmopatii tarczycowej są skutkiem zmian naciekowo-obrzękowych (tzn. zapalnych) obecnych w okołogałkowej tkance łącznej/tłuszczowej oraz w mięśniach okoruchowych. Przebieg zapalenia w tkankach pozagałkowych może zależeć od szeregu czynników genetycznych, środowiskowych i endogennych. Do najlepiej poznanych czynników nie-genetycznych, wpływających na rozwój lub przebieg oftalmopatii, zalicza się: palenie papierosów, płeć męską, starszy wiek oraz leczenie nadczynności tarczycy radiojodem. Choć podatność genetyczna na rozwój choroby Gravesa-Basedowa jest dobrze udokumentowana, to wpływ konkretnych czynników genetycznych na przebieg tej choroby, w tym na rozwój oftalmopatii, wciąż budzi kontrowersje. Celem

niniejszej pracy było poszukiwanie czynników genetycznych predysponujących do rozwoju oftalmopatii u pacjentów polskiego pochodzenia z chorobą Gravesa-Basedowa.

W poszukiwaniu podłoża genetycznego TAO zastosowano metodę analizy asocjacji z genami "kandydującymi", które mogą potencjalnie brać udział w patogenezie tej choroby. Badania własne oraz innych autorów wskazują, że limfocyty T oraz cytokiny wydzielane w trakcie zapalenia odgrywają kluczową rolę w rozwoju zmian autoimmunologicznych w tkankach pozagałkowych. Dlatego też w pracy tej analizowano polimorfizmy tych genów, które mogą wpływać na funkcję limfocytów T lub na produkcję cytokin. Badanie przeprowadzono na następujących genach:

- antygen-4 związany z limfocytom T cytotoksycznym (skrót z ang. CTLA-4) – polimorfizm pojedynczych nukleotydów (skrót z ang. SNP – *single nucleotide polymorphism*) w pozycji 49 (zamiana A na G, określana dalej jako A49G);
- czynnik martwicy nowotworu (skrót z ang. TNF – *tumor necrosis factor*) – SNP w pozycjach: -1031 (T-1031C), -863 (C-863A), -857 (C-857T), -308 (G-308A) i -238 (G-238A);
- interleukina-6 (IL-6) – SNP w pozycji -174 (G-174C);
- interleukina-13 (IL-13) – SNP w pozycjach: -1112 (C-1112T) i 2044 (G2044A);
- łańcuch β cząsteczki HLA-DR (HLA-DRB1).

Poniższa praca składa się z dwóch części. W pierwszym etapie, porównując częstotliwość występowania wybranych polimorfizmów u chorych i zdrowych ochotników badano, czy wybrane czynniki genetyczne są związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa (ang. *disease susceptibility gene*). W następnym etapie analizowano rozkład polimorfizmów u chorych z GD po podziale według klinicznych objawów oftalmopatii. W ten sposób badano, czy wybrane czynniki genetyczne modyfikują przebieg choroby GD (ang. *disease-modifying gene*), wpływając na rozwój oftalmopatii.

Badaniem objęto 269 chorych z chorobą Gravesa-Basedowa, spośród których u 108 stwierdzono "klinicznie jawną" oftalmopatię (wytrzeszcz, zaburzenie funkcji mięśni okoruchowych, owrzodzenie rogówki lub zajęcie nerwu wzrokowego) oraz 248 zdrowych ochotników. Wykazano, że częstość występowania alleli HLA-DRB1*03 i CTLA-4 49A była znamienne większa w grupie chorych z chorobą Gravesa-Basedowa w porównaniu z grupą zdrowych ochotników, co potwierdziło silny związek polimorfizmów tych genów z podatnością na rozwój GD w populacjach rasy białej. Ponadto, częstość allelu TNF-308A była znamienne większa u chorych z GD w porównaniu ze zdrowymi kontrolami. Jednakże związek TNF G-308A z podatnością na rozwój GD nie był pierwotny, lecz wynikał

z niezrównoważenia sprzężeń z allelem HLA-DRB1*03. Nie znaleziono związku pomiędzy rozwojem choroby GD i badanymi polimorfizmami genów IL-6 oraz IL-13.

Po podziale chorych z GD na grupy w zależności od obecności zmian ocznych stwierdzono, że wśród osób z oftalmopatią było znacznie więcej palaczy papierosów niż wśród chorych z GD bez oftalmopatii. Ponadto u chorych z oftalmopatią choroba GD rozpoczynała się w późniejszym wieku niż u osób bez takich zmian. W badanej grupie chorych z oftalmopatią nie stwierdzono związku pomiędzy rozwojem zmian ocznych a płcią chorego.

Rozkład haplotypów promotora TNF różnił się znacznie u chorych z oftalmopatią tarczycową w porównaniu z chorymi z GD bez zmian ocznych. Czynniki genetyczne zlokalizowane w obrębie układu HLA mogą więc wpływać na fenotyp choroby Gravesa-Basedowa. U chorych z oftalmopatią nie stwierdzono występowania allelu TNF -238A, co sugeruje, że allel ten (lub allel będący w niezrównoważeniu sprzężeń) może pełnić rolę ochronną w rozwoju zmian ocznych w GD. Wpływ polimorfizmu TNF G-238A na rozwój oftalmopatii nie był zależny od alleli HLA-DRB1. Polimorfizm TNF G-238A jest prawdopodobnie istotnym czynnikiem genetycznym modyfikującym przebieg niektórych zapaleń autoimmunologicznych, ponieważ jest on również związany z przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów. U chorych z oftalmopatią nie stwierdzono natomiast częstszego występowania polimorfizmów genów CTLA-4, IL-6 oraz IL-13. Ponadto nie stwierdzono korelacji pomiędzy wybranymi czynnikiem genetycznymi a stopniem zaawansowania zmian ocznych.

Wyniki tej pracy sugerują, że:

- (1) Polimorfizm genu CTLA-4 (A49G) oraz allel HLA-DRB1*03 są silnie związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej.

- (2) Polimorfizm TNF G-308A jest związany z predyspozycją do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa, lecz związek ten jest wtórny w stosunku do HLA-DRB1*03.
- (3) Polimorfizm genu TNF w pozycji -238 (G-238A), lub gen będący w niezrównoważeniu sprzężeń, może modyfikować przebieg choroby Gravesa-Basedowa: allel TNF -238A ma wpływ ochronny przed rozwojem oftalmopatii tarczycowej.
- (4) Polimorfizm genu CTLA-4 (A49G) oraz allele HLA-DRB1 nie są związane z rozwojem klinicznie jawnej oftalmopatii u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa.
- (5) Polimorfizmy genów kodujących IL-6 (G-174C) oraz IL-13 (C-1112T, G2044A) nie są związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa i nie wpływają na rozwój ani na przebieg zmian ocznych.
- (6) Rozwój oftalmopatii tarczycowej jest związany z czynnikami środowiskowymi i endogennymi, takimi jak wiek oraz palenie papierosów.

Poznanie podłoża genetycznego oftalmopatii może przynieść istotny postęp w diagnostyce, profilaktyce i terapii tej choroby. Wyniki tej pracy potwierdzają istotną rolę TNF w patogenezie oftalmopatii i prawdopodobnie leki blokujące TNF będą wprowadzone do terapii zaawansowanych postaci TAO. Ponadto TNF G-238A może okazać się jednym z markerów genetycznych prognozujących rozwój TAO. Konieczne jest jednak powtórzenie wyników asocjacji TNF G-238A z oftalmopatią w innych dobrze scharakteryzowanych populacjach chorych z chorobą Gravesa-Basedowa. Istnieje bowiem możliwość, że rozwój oftalmopatii jest zależny od interakcji wielu genów, które mogą się różnić w różnych populacjach.

(Endokrynol Pol 2004; 3(55): 275-298)

Summary

Graves' disease (GD) is an autoimmune thyroid disorder disease with a very complex etiopathogenesis. The development of GD depends on multiple genetic and environmental factors, which are not fully understood. Twin studies suggest that genetic factors are responsible for 80% of the susceptibility to develop GD, whereas environmental factors contribute the remaining 20%. So far the human leukocyte antigen (HLA) complex (6p21) and the cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene (CTLA-4) (2q33) are generally accepted as susceptibility *loci* to GD. The following environmental factors may account for the development of GD: cigarette smoking, iodine intake, stress and immunomodulatory drugs.

Graves disease is a heterogeneous disorder affecting the thyroid, eyes and skin. Thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) remains the greatest therapeutic dilemma in GD. While some degree of ocular involvement may be detected by sensitive imaging techniques (magnetic resonance or computed tomography) in almost all patients with Graves' disease, clinically apparent ophthalmopathy occurs in only 25% of patients with GD. TAO profoundly impairs the quality of life of affected individuals and in its severe expression, it is a disfiguring and potentially sight threatening disorder. Therapeutic approaches in TAO are generally non-specific, with many adverse effects and consist of: administration of glucocorticoids, radiotherapy and surgical decompression.

The clinical signs and symptoms of TAO are the consequence of inflammation in extraocular muscles and surrounding orbital fat/connective tissue. Multiple genetic, environmental and endogenous factors may influence the autoimmune inflammation in retrobulbar tissues. So far, cigarette smoking, advancing age, male sex and radioiodine treatment have been shown to be associated with the development and/or severity

of TAO. While the genetic predisposition to the development of Graves' disease is well established, the role of genetic factors in modifying the disease phenotype, including the development of ophthalmopathy, remains controversial. The aim of this study was to search for genetic factors predisposing to the development of ophthalmopathy in GD patients in the Polish population.

In order to investigate the genetic background of TAO, we performed population-based, case-control association studies with candidate genes, which may contribute to the pathogenesis of the disease. Previous studies suggest that T cells infiltrating retrobulbar tissues and cytokines are likely to play a key role in the initiation and propagation of the autoimmune process in the orbit. Thus, this study analyzed polymorphisms of genes, which may influence the function of T-cells and the production of cytokines. The following genes were investigated:

- cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) – single nucleotide polymorphism (SNP) at position 49 (A to G change, termed as A49G);
- tumor necrosis factor (TNF) – SNP's at positions: -1031 (T-1031C), -863 (C-863A), -857 (C-857T), -308 (G-308A) and -238 (G-238A);
- interleukin-6 (IL-6) – SNP at position -174 (G-174C);
- interleukin-13 (IL-13) – SNP's at positions: -1112 (C-1112T) and 2044 (G2044A);
- HLA-DRB1 encoding the β chain of HLA-DR.

The study consists of two parts. In order to identify disease susceptibility genes, the frequencies of genotypes and alleles were compared between patients with GD and healthy subjects. Secondly, in order to identify disease-modifying gene(s), the distribution of gene polymorphisms were

compared in subgroups of GD patients divided according to clinical eye involvement.

The study groups consisted of 269 patients with Graves' disease, of which 108 had clinically evident ophthalmopathy (proptosis, extraocular-muscle dysfunction, exposure keratitis and optic neuropathy) and 248 healthy subjects. The frequencies of HLA-DRB1*03 alleles and the CTLA-4 49G allele were significantly increased in GD compared to healthy subjects, confirming a strong association of these alleles with susceptibility to Graves' disease in Caucasian populations. Moreover, the frequency of TNF -308A allele was significantly increased in GD compared to healthy controls. However, the association between TNF G-308A and susceptibility to GD resulted from linkage disequilibrium with HLA-DRB1*03. IL6 or IL-13 genes polymorphisms were not associated with susceptibility to GD.

Subdividing patients with Graves' disease according to clinical eye involvement, revealed that in the TAO group there were significantly more cigarette smokers and patients had a older age of onset of disease. In this study, sex did not affect likelihood of development of TAO.

The distribution of TNF promoter haplotypes differed significantly in patients with or without ophthalmopathy. These results suggest that HLA genes may contribute to the disease phenotype in GD. The -238A allele was absent in patients with TAO, suggesting that the this allele (or an allele in linkage disequilibrium) may play a protective role in the development of eye changes in GD. The association of TNF G-238A polymorphism with TAO was independent of HLA-DRB1 alleles. TNF G-238A may have an important modifying effect in certain autoimmune diseases, because G-238A was also associated with the severity of rheumatoid arthritis. IL-6 and IL-13 genes polymorphisms analysis revealed no significant differences in either allelic or genotypic frequencies in TAO. Furthermore, there was no correlation between the severity of TAO and the frequency of IL-6 and IL-13 alleles.

In conclusion, the results of this study suggest that:

- (1) CTLA-4 polymorphism (A49G) and HLA-DRB1*03 alleles are strongly associated with genetic susceptibility to Graves' disease in the Polish population.
- (2) TNF G-308A polymorphism is associated with susceptibility to GD, however this association is not independent of that seen for HLA-DRB1*03.
- (3) TNF G-238A polymorphism, or a gene in linkage disequilibrium, may have an disease-modifying effect in GD; the -238A allele confers a protective role against the development of clinically evident ophthalmopathy.
- (4) CTLA-4 polymorphism (A49G) and HLA-DRB1 alleles are not associated with the development of clinically evident ophthalmopathy in patients with GD.
- (5) IL-6 (G-174C) and IL-13 (C-1112T, G2044A) SNPs do not confer genetic susceptibility to Graves' disease and do not contribute to the development and severity of TAO.
- (6) Different non-genetic factors, such as cigarette smoking and advanced age may contribute to the susceptibility to TAO.

The elucidation of genetics of thyroid-associated ophthalmopathy may lead to a progress in the diagnosis, prevention and treatment of the disease. The results of this study confirm that TNF may play a role in the pathogenesis of ophthalmopathy and soon agents blocking TNF may be introduced in the treatment of severe TAO. Moreover, TNF G-238A polymorphism may serve as one of genetic markers for TAO. However, a further study, of sufficient power is needed to confirm this observation. It is possible that TAO is heterogeneous disorder with different genetic susceptibilities in different ethnic groups.

(Pol J Endocrinol 2004; 3(55): 275-298)

W pracy habilitacyjnej wykorzystano częściowo wyniki wchodzące w skład następujących publikacji:

- 1 Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Fukutani T, Jażdżewski K, Miśiewicz P., Osikowska M., Nauman J. Association of CTLA-4 gene polymorphism and non-genetic factors with Graves' ophthalmopathy in European and Japanese populations. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 13-18
- 2 Bednarczuk T, Placha G, Jażdżewski K, Kuryłowicz A, Kloza M, Makowska U, Hiromatsu Y, Nauman J. Interleukin 13 gene polymorphisms in patients with Graves' disease. *Clin Endocrinol* 2003; 59:519-25
- 3 Bednarczuk T, Kuryłowicz A, Hiromatsu Y, Kiljański J, Telichowska A, Nauman J. Association of G-174C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter with Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity* 2004; 37: 223-226.
- 4 Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Seki N, Płoski R, Fukutani T, Kuryłowicz A, Jażdżewski K, Chojnowski K, Itoh K, Nauman J. Association of tumor necrosis factor (TNF) and HLA-DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Human Immunology* 2004; 65:632-639.
- 5 Płoski R, Bednarczuk T, Hiromatsu Y. Distribution of tumor necrosis factor (TNF)-alpha haplotypes in healthy Caucasians. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2034-2035

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

- CTLA** - (ang. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen*) - antygen związany z limfocytom T cytotoksycznym
- GD** - (ang. *Graves' disease*) - choroba Gravesa-Basedowa.
- HLA** - (ang. *human leukocyte antigen*) - układ zgodności tkankowej
- IFN** - interferon
- IL** - interleukina
- SNP** - (ang. *single nucleotide polymorphism*) - polimorfizm pojedynczych nukleotydów
- TAO** - (ang. *thyroid-associated ophthalmopathy*) - oftalmopatia tarczycowa. Synonimy spotykane w literaturze: oftalmopatia Gravesa (ang. *GO - Graves' ophthalmopathy*), orbitopatia tarczycowa (ang. *TAO - thyroid associated orbitopathy*, *TED - thyroid eye disease*), oftalmopatia naciekowo-obrzękowa lub wytrzeszcz złośliwy
- TNF** - (ang. *tumor necrosis factor*) - czynnik martwicy nowotworu. Synonimy spotykane w literaturze: TNFa, TNFSF2 (ang. *TNF superfamily ligand 2*), kachektyna
- TSH** - (ang. *thyroid stimulating hormone*) - hormon tyreotropowy

Wstęp

Choroba Gravesa-Basedowa (skrót z ang. GD - *Graves' disease*) jest autoimmunologiczną chorobą tarczycy o bardzo złożonej etiopatogenezie. Rozwój GD jest uwarunkowany wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, które nie są jeszcze w pełni poznane [10, 127, 192]. Istotny wpływ czynników genetycznych na rozwój GD potwierdzają badania bliźniąt, w których stwierdzono, że zapadalność na GD jest wyższa wśród bliźniąt monozygotycznych niż wśród bliźniąt dwuzygotycznych [32, 146]. Na podstawie tego typu badań oceniono również, że udział czynników genetycznych w patogenezie GD wynosi 80%, zaś czynników środowiskowych – 20%. W ostatnich latach dokonał się wielki postęp w rozumieniu podłoża genetycznego GD. Obecnie wiadomo, że rozwój tej choroby nie zależy od zmiany w jednym genie, lecz jest uwarunkowany interakcją wielu genów o zmiennej penetracji, które wywołują predyspozycję do GD [22, 170, 174]. Do najlepiej scharakteryzowanych czynników genetycznych predysponujących do rozwoju GD należą polimorfizmy genów głównego układu zgodności tkankowej (skrót z ang. HLA - *human leukocyte antigen*) (chromosom 6p21) oraz genu kodującego antygen-4 związany z cytotoksycznym limfocytym T (skrót z ang. CTLA-4- *cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) (2q33). Należy zwrócić uwagę, że zarówno geny HLA jak i gen CTLA-4 nie są swoistymi genami podatności dla GD, gdyż wpływają również na rozwój innych chorób autoimmunologicznych [40, 55]. Obecnie trwają intensywne badania nad poszukiwaniem czynników genetycznych predysponujących swoiście do rozwoju chorób autoimmunologicznych tarczycy. Jednym z takich czynników mogą być zmiany w genie kodującym tyreoglobulinę, która jest jednym z głównych antygenów w autoimmunologicznych chorobach tarczycy [11]. Wśród czynników środowiskowych wpływających na rozwój GD wymienia się: nikotynizm, dymek jodu, infekcje, stres i leki immunomodulujące [25, 144].

Choroba Gravesa-Basedowa charakteryzuje się różnorodnym obrazem klinicznym, na który składają się w różnym stopniu nasilone objawy ze strony tarczycy, tkanek oczodołu, skóry przedgoleni oraz dystalnych paliczków rąk i stóp [127, 192]. Charakterystycznym objawem GD jest nadczynność tarczycy, która jest wywołana przeciwciałami łączącymi się i stymulującymi receptor dla tyreotropiny (ang. TSH-R - *thyroid stimulating hormone receptor*), w wyniku czego dochodzi do nadmiernej biosyntezy tyroksyny i trijodotyroniny. W leczeniu chorych z GD najtrudniejszym problemem klinicznym nie jest jednak tyreotoksykoza, lecz objawy pozataarczycowe, a zwłaszcza oftalmopatia (skrót z ang. TAO – *thyroid-associated ophthalmopathy*) [13, 202]. Częstość występowania TAO u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa jest trudna do oceny, zależnej od definicji zmian ocznych i od wykonanych badań dodatkowych. Choć za pomocą czułych metod diagnostycznych (tomografia komputerowa lub rezonans magnetyczny) pewne cechy

oftalmopatii w postaci „utajonej” można stwierdzić u prawie wszystkich pacjentów z GD, to tylko u ok. 25% chorych zmiany oczne przyjmują postać oftalmopatii naciekowo-obrzękowej [33, 93]. Objawy kliniczne u tych chorych składają się z nasilonego w różnym stopniu zapalenia tkanek miękkich okołogałkowych, wytrzeszczu lub zaburzeń ruchomości gałek ocznych i prowadzą do znacznego pogorszenia jakości życia chorych [52, 188]. U ok. 5% chorych z GD zmiany oczne przyjmują postać orbitopatii zaawansowanej, która grozi utratą wzroku i trwałym inwalidztwem [28, 129, 134, 162]. Brak leczenia przyczynowego powoduje, iż w terapii chorych z ciężką oftalmopatią znajdują zastosowanie nieswoiste metody, takie jak: leczenie kortykosteroidami, radioterapia i zabiegi chirurgiczne dekompresji oczodołu, które są obarczone licznymi działaniami niepożądanymi [82, 103, 137, 201]. Niestety, wyniki tego leczenia są często niezadowolające i po ustąpieniu aktywnego okresu choroby pacjenci wymagają dalszego leczenia chirurgicznego mającego na celu korekcję ustawienia gałek ocznych lub usunięcie wytrzeszczu [13, 111, 118]. Inne pozataarczycowe objawy GD, takie jak obrzęk przedgoleniowy lub akropatia występują rzadko, zwykle wspólnie z ciężką postacią TAO [44].

Intensywne badania prowadzone na przestrzeni ostatnich lat pozwoliły lepiej zrozumieć patogenezę oftalmopatii [9, 17, 118]. TAO jest obecnie uważane za autoimmunologiczne schorzenie zapalne mięśni ocznych i okołogałkowej tkanki łącznej/tłuszczowej. Główne zmiany histopatologiczne stwierdzane w tkankach pozagałkowych polegają na nacieczeniu przez komórki jednojądrowe (głównie limfocyty T), aktywacji fibroblastów, akumulacji glikozaminoglikanów oraz obrzęku [73, 131]. Szczególny związek pomiędzy tyreotoksykozą a oftalmopatią w chorobie Gravesa-Basedowa może być wytłumaczony występowaniem wspólnego autoantygeny, znajdującego się w tarczycy i w tkankach pozagałkowych. Wiele badań sugeruje, że wspólnym antygenem może być receptor dla TSH, znajdujący się na powierzchni subpopulacji fibroblastów oczodołowych – preadipocytów (komórki posiadające zdolność do różnicowania się w komórki tłuszczowe) [9, 21]. Zapalenie w tkankach oczodołowych może być inicjowane przez klony autoreaktywnych limfocytów T i przeciwciała skierowanych przeciwko TSH-R [20]. W trakcie rozwoju zapalenia odpowiedź immunologiczna, zarówno komórkowa jak i humoralna, staje się poliklonalna i jest skierowana przeciwko białkom tkanki łącznej oraz antygenom komórek mięśniowych [18, 19, 92, 125]. Rola autoantygenów tkanki łącznej i mięśni okoruchowych w patogenezie zapalenia w TAO pozostaje nieznaną [57, 126]. Pobudzone poprzez antygeny limfocyty wydzielają do środowiska różne cytokiny. W okresie „aktywnym” zapalenia leukocyty wydzielają głównie cytokiny z grupy Th1: czynnik martwicy nowotworu (skrót z ang. TNF – *tumor necrosis factor*), interferon- γ (IFN- γ), interleukinę-1 α (IL-1 α) i leukoregulinę, które są odpowiedzialne za rozwój odpowiedzi typu komórkowego [69, 106, 185]. Ponadto cytokiny te pobudzają fibroblasty do wydzielania glikozaminoglikanów

Rycina 1.

Pathogeneza objawów klinicznych w oftalmopatii naciekowo-obrzękowej.

- A. Nacieki komórek jednojądrowych (limfocytów T) w mięśniach okoruchowych.
 B. W badaniu MR oczodołów stwierdza się powiększenie objętości (obrzęk) mięśni okoruchowych oraz wytrzeszcz.
 C. Objawy kliniczne zaawansowanej oftalmopatii.

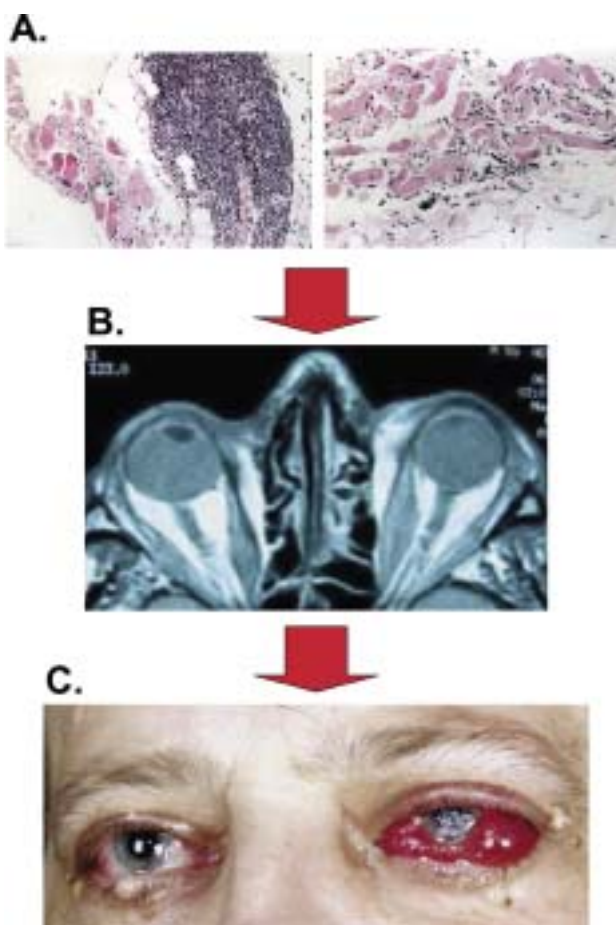
Zdjęcia opublikowano dzięki uprzejmości dr J. Kiljańskiego i dr Y. Hiromatsu.

Figure 1.

Pathogenesis of ocular signs in thyroid-associated ophthalmopathy.

- A. T-lymphocytes infiltration in eye muscles
 B. MRI shows enlargement of eye muscles (oedema) and proptosis
 C. Clinical signs of severe ophthalmopathy

Kindly provided by dr J Kiliański and dr Y. Hiromatsu



do macierzy pozakomórkowej, co doprowadza do obrzęku tkanek pozagałkowych [70]. U chorych z TAO stwierdza się również rozpleniwanie tkanki tłuszczowej [9, 21]. Skutkiem wzrostu objętości tkanek pozagałkowych oraz następczego wzrostu ciśnienia śródoczołowego jest postępujący wytrzeszcz, obrzęk spojówek, podwójne widzenie oraz pogorszenie ostrości wzroku (ryc. 1) [81]. W większości przypadków zapalenie w oczodole ulega częściowej remisji. Mechanizmy odpowiedzialne za „wygasanie” zapalenia w tkankach

pozagałkowych są niejasne. W późniejszym okresie choroby limfocyty wydzielają głównie cytokiny odpowiedzialne za rozwój odpowiedzi typu humoralnego (cytokiny Th2): IL-4, IL-10 i IL-13 [5]. W trakcie ustępowania zapalenia dochodzi do włóknienia mięśni ocznych i tkanki łącznej okołogałkowej [98].

Pomimo znacznego postępu w rozumieniu patogenyzy oftalmopatii, jej rozwój, przebieg i stopień zaawansowania są nadal trudne do przewidzenia [13, 157]. Wcześniejsza identyfikacja chorych zagrożonych nasiloną postacią TAO jest istotna, gdyż skuteczna (być może radykalna) terapia nadczynności tarczycy, dokładna obserwacja i intensywne leczenie wczesnych zmian ocznych może znacznie złagodzić przebieg oftalmopatii. Dotychczas najlepiej udokumentowany jest związek TAO z czynnikami środowiskowymi i endogennymi, takimi jak: palenie papierosów, podeszły wiek, płeć męska, terapia radiojodem [33]. Największą uwagę przywiązuje się do palenia papierosów, ponieważ wykazano związek pomiędzy ilością wypalanych papierosów a ciężkością oftalmopatii i wynikami leczenia immunosupresyjnego [41, 59, 123]. Zawsze należy pouczyć pacjenta z GD o konieczności bezwzględnego zaprzestania palenia tytoniu. Takie postępowanie można uznać za profilaktykę rozwoju TAO, jak i leczenie wspomagające klinicznie jawnej oftalmopatii. Opisane są również różnice rasowe w TAO: ryzyko rozwoju oftalmopatii u chorych z GD rasy białej jest 6 razy większe w porównaniu do chorych pochodzących z Azji [167]. Zaawansowana postać orbitopatii jest rzadko obserwowana u dzieci, podczas gdy znacznie częściej występuje u osób powyżej 50 roku życia [135]. Ponadto, stosunkowo więcej mężczyzn niż kobiet choruje na ciężką oftalmopatię [135]. Nie wiadomo jednak, czy jest to związane z ich trybem życia (np. paleniem papierosów), czy z czynnikami genetycznymi predysponującymi mężczyzn do zmian ocznych. Metoda leczenia nadczynności tarczycy może również wpływać na przebieg oftalmopatii. Obecnie uważa się, że leczenie radiojodem nie predysponuje do rozwoju TAO, ale może pogorszyć przebieg już istniejącej oftalmopatii [12]. Leczenie zachowawcze tyreostatykami i leczenie chirurgiczne nie wpływają w istotny sposób na rozwój oftalmopatii [112]. Istotne jest jednak osiągnięcie trwałej eutyreozы, gdyż zarówno niedoczynność tarczycy jak i nawrót nadczynności mogą wpływać na nasilenie dolegliwości ze strony oczu [94, 157].

Wpływ czynników genetycznych na rozwój oftalmopatii pozostaje dotychczas niewyjaśniony [22, 170, 174]. Najwięcej badań analizowało związek między allelami HLA oraz CTLA-4 a rozwojem oftalmopatii u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa. Niestety, wyniki tych badań są niejednoznaczne (tab. 9 i 10). Istnieją pojedyncze doniesienia opisujące asocjację między częściami HLA-B8, HLA-DP2.1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7 oraz polimorfizmami genów kodujących: CTLA-4, receptor dla TSH, TNF, IFN- γ , cząsteczkę adhezji międzykomórkowej-1 (skrót z ang. ICAM - *intercellular adhesion molecule*) a rozwojem lub stopniem zaawansowania TAO [8, 50, 51, 89, 102, 152, 156, 175]. Wyniki tych badań sugerują, że testy genetyczne mogą

pomóc w identyfikacji chorych zagrożonych rozwojem klinicznie jawnej oftalmopatii. Niestety, wyniki powyższych badań nie zostały potwierdzone lub oczekują na potwierdzenie w innych populacjach [4, 6, 16, 91, 180, 189]. Ponadto wyniki badań analizujących związek pomiędzy TAO z polimorfizmami innych genów immunoregulacyjnych kodujących: łańcuchy ciężkie immunoglobuliny G (IgG), receptor limfocyту T oraz receptor dla interleukiny1 – wskazywały na brak znamiennej asocjacji [36, 77, 122, 190].

Założenia i cel pracy

Objawy kliniczne oftalmopatii tarczycowej (TAO) są skutkiem zmian naciekowo-obrzękowych zlokalizowanych w okołogałkowej tkance łącznej/tłuszczowej oraz w mięśniach okoruchowych (ryc. 1) [9, 17]. Choć za pomocą czułych metod diagnostycznych pewne cechy zapalenia można stwierdzić u prawie wszystkich pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (GD), to tylko u 25% chorych rozwinię się klinicznie „jawna” oftalmopatia, która może wymagać intensywnego leczenia [33]. Dotychczas czynniki wpływające na przebieg zapalenia w TAO, a co za tym idzie na rozwój objawów klinicznych, pozostają niejasne. Podstawowym założeniem tej pracy jest hipoteza, że zarówno czynniki środowiskowe jak i endogenne – w tym czynniki genetyczne - warunkują przebieg zapalenia w tkankach pozagałkowych (ryc. 2).

Choć istotna rola czynników genetycznych w etiologii choroby Gravesa-Basedowa jest udowodniona na podstawie badań bliźniąt, to wpływ czynników genetycznych na przebieg tej choroby, w tym na rozwój oftalmopatii, nadal budzi kontrowersje [22, 170, 174]. Celem niniejszej pracy było poszukiwanie

czynników genetycznych predysponujących do rozwoju oftalmopatii u pacjentów polskiego pochodzenia z GD. W poszukiwaniu podłoża genetycznego TAO zastosowano metodę analizy asocjacji z genami „kandydującymi” (ang. *candidate gene association study*), które mogą potencjalnie brać udział w patogenezie tej choroby. Wyboru genów „kandydujących” dokonano na podstawie poprzednich własnych badań wskazujących, że limfocyty T naciekające tkanki pozagałkowe oraz cytokiny wydzielane w trakcie zapalenia odgrywają kluczową rolę w patogenezie TAO [20, 70]. W badaniach *in situ* stwierdzono bowiem, że poziom ekspresji mRNA dla części zmiennych łańcucha β receptora limfocytów T oraz cytokin był związany z aktywnością i stopniem zaawansowania TAO [20, 69]. Wśród badanych cytokin, poziom mRNA dla TNF korelował z powiększeniem mięśni okoruchowych, poziom mRNA dla interleukiny-6 (IL-6) korelował z objętością tkanek pozagałkowych, zaś podwyższona ekspresja cytokin Th2 była charakterystyczna dla okresu „wygasania” zapalenia w tkankach pozagałkowych. Z uwagi na fakt, że nadmierna aktywność limfocytów T oraz produkcja cytokin może być uwarunkowana genetycznie, badaniem objęto zarówno polimorfizmy genów należących do układu HLA:

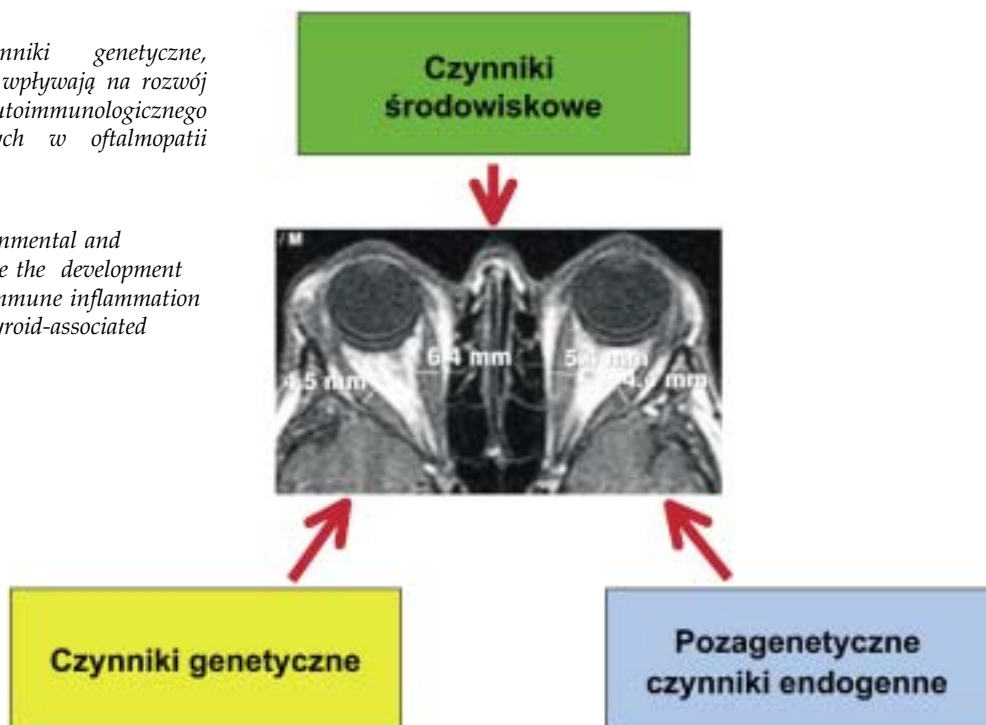
- czynnik martwicy nowotworu (TNF) – polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (skrót z ang. SNP – *single nucleotide polymorphism*) w regionie promotora, w pozycjach: -1031 (zamiana T na C, określana dalej jako T-1031C), -863 (C-863A), -857 (C-857T), -308 (G-308A) i -238 (G-238A);
 - łańcuch β cząsteczki HLA-DR (HLA-DRB1);
- jak i polimorfizmy genów nie należących do układu HLA:

Rycina 2.

Założenie pracy: czynniki genetyczne, środowiskowe i endogenne wpływają na rozwój i przebieg zapalenia autoimmunologicznego w tkankach pozagałkowych w oftalmopatii tarczycowej.

Figure 2.

Hypothesis: Genetic, environmental and endogenous factors influence the development and the course of the autoimmune inflammation in retrobulbar tissues in thyroid-associated ophthalmopathy.



- antygen-4 związany z limfocytom T cytotoksycznym (CTLA-4): SNP w eksonie 1, w pozycji 49 (A49G);
- interleukina-6 (IL-6) – SNP w regionie promotora, w pozycji -174 (G-174C);
- interleukina-13 (IL-13) – SNP w regionie promotora, w pozycji -1112 (C-1112T) oraz w eksonie 4, w pozycji 2044 (G2044A).

Poniższa praca składa się z dwóch części. W pierwszym etapie, porównując częstotliwość występowania wybranych polimorfizmów u chorych i zdrowych ochotników badano, czy wybrane czynniki genetyczne są związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa (ang. *disease susceptibility gene*). W następnym etapie analizowano rozkład polimorfizmów u chorych z GD po podziale według klinicznych objawów oftalmopatii. W ten sposób badano, czy wybrane czynniki genetyczne modyfikują przebieg choroby GD (ang. *disease-modifying gene*), wpływając na rozwój oftalmopatii.

Materiały i metody

Grupy badane

Badaniem objęto 269 niespokrewnionych chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) (209 kobiet, 60 mężczyzn) w wieku od 16 do 78 lat (mediana 43), którzy pozostawali pod opieką Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Akademii Medycznej w Warszawie. Rozpoznanie choroby GD zostało postawione na podstawie objawów nadczynności tarczycy potwierdzonych badaniami hormonalnymi (TSH, fT4 i fT3), obecności przeciwciał przeciwko receptorowi dla tyreotropiny (TRAK Lumitest, B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH, Niemcy), typowego wola mięszonego i/lub badania scyntygraficznego. Czas trwania choroby wynosił od 0,5 do 49 lat (średnia \pm odchylenie standardowe, $3,8 \pm 5,9$ lat). Zgodnie ze standardami Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego, objawy oczne u pacjentów z GD były oceniane według klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Tyreologicznego (klasyfikacja

NOSPECS) przez endokrynologa i konsultującego okulistę [161, 194]. Na podstawie tej klasyfikacji, chorych z GD podzielono na dwie grupy (tab. 1):

- GD z oftalmopatią tarczycową (TAO) (n=108). Chorych z wytrzeszczem (NOSPECS klasa III, n=58), zaburzeniami funkcji mięśni okoruchowych (klasa IV, n=41), zajęciem rogówki (klasa V, n=3) oraz neuropatią (klasa VI, n=6) zakwalifikowano do grupy klinicznie jawnej TAO.
- GD bez klinicznie jawnej oftalmopatii (n=161). Chorych bez objawów oftalmopatii lub tylko z oznakami oftalmopatii (zwanymi również objawami ocznymi łagodnymi, np. retrakcja powiek) (NOSPECS klasy 0-I, n=131) oraz chorych z zajęciem tkanek miękkich (klasa II, n=30) zakwalifikowano do grupy GD bez klinicznie ewidentnej oftalmopatii.

Zdrowi ochotnicy (n=248) zostali wybrani z grupy honorowych dawców krwi, po wykluczeniu chorób tarczycy lub innych chorób autoimmunologicznych. Wywiad rodzinny ochotników z grupy kontrolnej był również negatywny w kierunku wymienionych chorób. Projekt badań został zaakceptowany przez Komisję Nadzoru nad Dokonywaniem Badań na Ludziach i Zwierzętach IMDiK PAN. Wszyscy ochotnicy zostali poinformowani o charakterze badań i wyrazili pisemną zgodę na badania genetyczne.

Analiza polimorfizmów genów CTLA-4, IL-6, IL-13 oraz TNF

Genomowe DNA zostało wyizolowane z pełnej krwi, zgodnie z uprzednio opisaną metodą [138]. W celu powielenia fragmentu DNA o polimorficznej sekwencji wykorzystano łańcuchową reakcję polimerazy (skrót z ang. PCR – *polymerase chain reaction*) (tab. 2). Następnie produkty reakcji PCR zostały analizowane za pomocą trawienia z enzymami restrykcyjnymi (skrót z ang. RFLP – *restriction fragment length polymorphism*, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), badania konformacji pojedynczych nici DNA (skrót z ang. SSCP – *single strand conformation polymorphism*) lub hybrydyzacji ze znakowanymi sondami o specy-

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (skrót z ang. GD – Graves' disease) z oftalmopatią oraz bez klinicznie jawnej oftalmopatii.

Table 1. Clinical characteristics of patients with Graves' disease (GD) with ophthalmopathy and without clinically evident ophthalmopathy.

	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=161)	GD z oftalmopatią GD with ophthalmopathy (n=108)
Mężczyźni / Male	35 (22%)	25 (23%)
Wiek zachorowania na GD (lata) * Age of onset of GD	37 [13-77]	43 [13-70] ^a
Nikotynizm ** Cigarette smokers	58 (39%)	52 (52%) ^b
Leczenie nadczynności tarczycy: Therapy for hyperthyroidism: antithyroid drugs	77 (48%)	44 (41%)
Radiojod / radioiodine	66 (41%)	34 (31%)
Strumektomia / thyroidectomy	18 (11%)	30 (28%) ^c

*Wiek zachorowania na GD został przedstawiony jako mediana [zakres].
**Informacje dotyczące palenia papierosów były dostępne od 100 chorych z oftalmopatią tarczycową oraz 150 chorych z GD bez oftalmopatii.
^atest Manna-Whitneya P=0,002, ^btest χ^2 P=0,04, ^ctest χ^2 P=0,0005

^aAge of onset is presented as median [range].

**Information concerning cigarette smoking were available from 100 patients with ophthalmopathy and 150 patients with GD without ophthalmopathy.

^aMann-Whitney test P=0,002, ^btest χ^2 P=0,04, ^ctest χ^2 P=0,0005

ficznej sekwencji (skrót z ang. SSOP – *sequence specific oligonucleotide probe*) (ryc. 3A-3C) [23, 24, 27, 47, 54, 68,

172]. Poprawność metod analizy polimorfizmów została potwierdzona za pomocą sekwencjonowania DNA.

Tabela 2. Analiza polimorfizmów genów kodujących antygen-4 związany z limfocytym T cytotoksycznym (CTLA-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-13 (IL-13) oraz czynnik martwicy nowotworu (TNF).

Table 2. Analysis of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-13 (IL-13) and tumor necrosis factor (TNF) genes polymorphisms.

Polimorfizm Polymorphism	Warunki PCR / PCR conditions			Analiza Analysis	Piśmiennictwo Reference
	Startery / Primers	°C *	MgCl ₂		
CTLA-4: A49G	5'-CCACGGCTTCCTTTCTCGTA-3' 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3'	60	2 mM	RFLP Enzym <i>Bst</i> 71I ^a	[172]
IL-6: G-174C	5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTGCT-3' 5'-GCCTCAGACATCTCCAGTCC-3'	60	2 mM	RFLP Enzym <i>Hsp</i> 92 II ^a	[47]
IL-13: C-1112T	5'-TCTGAGCGGGAATCCAGCAT-3' 5'-AATGAGTGCTGTGGAGGGCG-3'	64	1.5 mM	SSCP	[24]
IL-13: G2044A	5'-CTTCCGTGAGGACTGAATGAGACGGTC-3' ^{**} 5'-GCAAATAATGATGCTTTCGAAGTTTCAGTGA-3	63	2 mM	RFLP Enzym <i>Bsp</i> LI ^b	[54]
TNF	5'-GCTTGTGTGTGTGTGTCTGG-3' 5'-GGACACACAAGCATCAAGG-3'	55	1.5 mM	SSOP	[68]

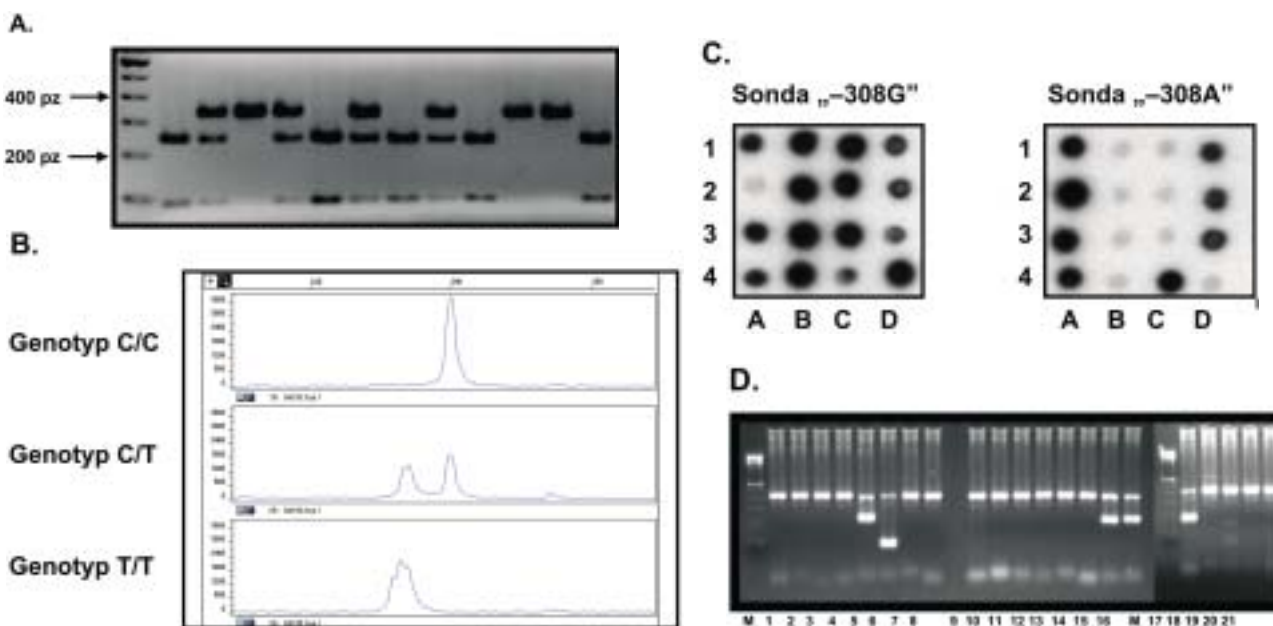
PCR- reakcja łańcuchowa polimerazy, RFLP- polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, SSCP- polimorfizm konformacji pojedynczych nici DNA, SSOP- sondy o specyficznej sekwencji. * Temperatura przyłączania starterów, ** Podkreślone zasady zostały zmienione aby powstało miejsce restrykcyjne dla enzymu *Bsp*LI (*Nla*IV); ^aPromega Corporation, Madison, USA; ^b MBI Fermentas Inc., USA

PCR – polymerase chain reaction, RFLP – restriction fragment length polymorphism, SSCP – single strand conformational polymorphism, SSOP – sequence-specific oligonucleotide probes, * annealing temperature, ** underlined nucleotides were modified to create a *Bsp*LI (*Nla*IV) restriction site; ^a Promega Corporation, Madison, USA; ^b MBI Fermentas Inc., USA

Rycina 3. Metody badania polimorfizmów genów.

Figure 3. Different methods analysing gene polymorphisms.

- Analiza polimorfizmu genu CTLA-4 (A49G) za pomocą trawienia z enzymami restrykcyjnymi (ang. RFLP- *restriction fragment length polymorphism*) Linia 1- marker wielkości DNA, Linia 2- genotyp G/G, Linia 3- genotyp A/G, Linia 4 genotyp A/A.
- Badanie polimorfizmu promotora IL-13 (C-1112T) za pomocą analizy konformacji pojedynczych nici DNA (skrót z ang. SSCP- *single strand conformation polymorphism*).
- Analiza polimorfizmu promotora TNF (G-308A) za pomocą hybrydyzacji ze znakowanymi sondami o specyficznej sekwencji (skrót z ang. SSOP- *sequence specific oligonucleotide probe*). Punkty B1- genotyp G/G, Punkty A3- genotyp G/A, Punkty A2- genotyp A/A.
- Typowanie alleli HLA-DRB1 metodą amplifikacji z użyciem starterów o sekwencjach specyficznych dla poszczególnych alleli (ang. PCR-SSP - *polymerase chain reaction with sequence specific primers*). Specyficzne produkty otrzymano dla mieszanin starterów: 5, 6, 15, 16, 17, charakterystycznych dla alleli HLADRB1*03 i HLADRB1*11.



Analiza alleli HLA-DRB1

Allele układu HLA-DRB1 typowano metodą namnażania PCR ze specyficznymi starterami (skrót z ang. PCR-SSP – *polymerase chain reaction with sequence specific primers*) używając testu Dynal All Set SSP DR (Dynal Biotech Ltd., Bromborough, Wielka Brytania) (ryc. 3D) [26, 138]. Za pomocą tego testu typowano grupy alleli HLA-DRB1, które zostały oznaczone według obowiązującego mianownictwa następującymi numerami: HLA-DRB1*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15 i *16 [114].

Analiza statystyczna

Rozkład alleli i genotypów porównywano pomiędzy badanymi grupami za pomocą testu chi-kwadrat – χ^2 (z poprawką Yatesa, jeżeli to było zasadne) lub dokładnego testu Fishera, z użyciem tablic 2x2. Porównując częstości genotypów stosowano poprawkę Bonferroniego, mnożąc uzyskaną wartość P przez liczbę wykonanych porównań. Wartość Pc (ang. *corrected P*) poniżej <0.05 została uznana za statystycznie znaczącą. Dla oceny potencjalnego związku przyczynowo-skutkowego obliczono iloraz szans (skrót z ang. OR – *odds ratio*), który określa ile razy częściej stwierdza się chorobę u nosiciela cechy genetycznej niż u osoby która jej nie odziedziczyła. Iloraz szans >1 sugeruje, że badany allel zwiększa ryzyko wystąpienia choroby, zaś OR<1 sugeruje, że badany allel zmniejsza ryzyko wystąpienia choroby („allel ochronny” – ang. *protective allele*). OR obliczano według metody Woolfa, a gdy jeden element z tablicy 2x2 wynosił 0, stosowano wówczas wzór Haldana: $OR = (2a+1)(2d+1)/(2b+1)(2c+1)$ [60, 196]. Kombinacje różnych alleli genu lub genów z określonego locus mogą nie być przypadkowe, gdyż niektóre allele

mogą być ze sobą sprzężone (ang. *linkage disequilibrium* – nieodróżnowanie sprzężeń). To nielosowe sprzężenie dwóch alleli badano metodą Mittala i wartość $t > 2$ wskazywała na znamienne nieodróżnowanie sprzężeń [119]. Prawdopodobny rozkład haplotypów (grupa alleli z określonego locus o ścisłym sprzężeniu) promotora TNF ustalono na podstawie wyników genotypowania, używając programu PHASE wersja 2.02 [164, 165]. Test równowagi Hardy-Weinberga (ang. *Hardy-Weinberg equilibrium*) wykonano za pomocą programu Arlequin wersja 2.000. Zaburzenie równowagi Hardy-Weinberga może wskazywać między innymi na błąd selekcji w badanej grupie (np. osoby różnych populacji) lub na błąd w metodzie analizy polimorfizmu [71]. W tej pracy, rozkłady genotypów CTLA-4, IL-6, IL-13 oraz TNF pozostawały w zgodzie z równowagą Hardy-Weinberga we wszystkich badanych grupach ($P > 0,05$). Do oceny statystycznej pozostałych wyników zastosowano nieparametryczny, niesparowany test U Manna-Whitneya.

Wyniki**Związek między polimorfizmami wybranych genów a rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD)****Polimorfizmy genów HLA: TNF oraz HLA-DR**

Rozkład genotypów TNF przedstawiono w tabeli 3. Częstość występowania genotypów -308 A/A oraz G/A była znamienne większa u chorych z GD w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami ($P=0,0004$, $P_c=0,006$, $OR=2,0$). U chorych z GD stwierdzono również tendencję do zmniejszonej częstości występowania genotypów -238 A/A i G/A ($P=0,018$, $P_c=0,27$, $OR=0,4$).

Tabela 3. Częstość występowania genotypów polimorfizmów promotora TNF u zdrowych osobników i chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) z oftalmopatią oraz bez klinicznie jawnej oftalmopatii.

Table 3. Genotype frequencies of TNF promoter polymorphisms in healthy subjects and in patients with Graves' disease (GD) with or without ophthalmopathy.

Polimorfizm TNF TNF polymorphism	Genotypy Genotype	Zdrowi ochotnicy Healthy subjects (n=248)	GD- cała grupa GD - total (n=228)	GD bez oftalmopatii GD - without ophthalmopathy (n=122)	GD z oftalmopatią GC - with ophthalmopathy (n=106)
T-1031C	C/C	5 (2.0%)	5 (2,2%)	4 (3.3%)	1 (0.9%)
	T/C	76 (30.6%)	69 (30.3%)	39 (32.0%)	30 (28.3%)
	T/T	167 (67.3%)	154 (67.5%)	79 (64.8%)	75 (70.8%)
C-863A	A/A	5 (2.0%)	2 (0.9%)	1 (0.8%)	1 (0.9%)
	C/A	53 (21.4%)	63 (27.6%)	33 (27.0%)	30 (28.3%)
	C/C	190 (76.6%)	163 (71.5%)	88 (72.1%)	75 (70.8%)
C-857T	T/T	9 (3.6%)	2 (0.9%)	2 (1.6%)	0 (0%)
	C/T	64 (25.8%)	61 (26.8%)	34 (27.9%)	27 (25.5%)
	C/C	175 (70.6%)	165 (72.4%)	86 (70.5%)	79 (74.5%)
G-308A	A/A	4 (1.6%)	10 (4.4%)	5 (4.1%)	5 (4.7%)
	G/A	72 (29.0%)	96 (42.1%)	52 (42.6%)	44 (41.5%)
	G/G	172 (69.4%)	122 (53.5%) ^a	65 (53.3%)	57 (53.8%)
G-238A	A/A	1 (0.4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	G/A	22 (8.9%)	8 (3.5%)	8 (6.6%)	0 (0%)
	G/G	225 (90.7%)	220 (96.5%) ^b	114 (93.4%)	106 (100%) ^{c,d}

Wartości P zostały policzone za pomocą testu χ^2 lub testu Fishera i pomnożone (Pc) przez liczbę wykonanych porównań (n=15). OR- iloraz szans. GD vs zdrowi ochotnicy: ^a $P=0.0004$, $P_c=0.006$, $OR=2.0$; ^b $P=0.018$, $P_c=0.27$, $OR=0.4$; GD z oftalmopatią vs GD bez oftalmopatii: ^c $P=0.008$, $P_c=0.12$, $OR=0.1$; GD z oftalmopatią vs zdrowi ochotnicy: ^d $P=0.0003$, $P_c=0.0045$, $OR=0.05$.

P values were calculated with the use of χ^2 test or Fisher's exact probability test and corrected (Pc) for the number of tests performed (n=15). OR- odds ratio. GD vs healthy subjects: ^a $P=0.0004$, $P_c=0.006$, $OR=2.0$; ^b $P=0.018$, $P_c=0.27$, $OR=0.4$; GD with ophthalmopathy vs GD without ophthalmopathy: ^c $P=0.008$, $P_c=0.12$, $OR=0.1$; GD with ophthalmopathy vs healthy subjects: ^d $P=0.0003$, $P_c=0.0045$, $OR=0.05$.

Częstość występowania alleli HLA-DRB1 przedstawiono w tabeli 4. Stwierdzono silną asocjację między allelami HLA-DRB1*03 a podatnością na rozwój GD ($P=0,00001$, $P_c=0,0004$, $OR=2,9$). Częstość występowania pozostałych alleli HLA-DRB1 nie różniła się znamienne (P<0,05) między chorymi z GD a zdrowymi ochotnikami.

Allel TNF -308A występuje w silnym niezrównoważeniu sprzężeń z haplotypem HLA A*01-Cw*0701-B*0801-DRB1*0301-DQB1*0201 [195]. Aby ocenić samodzielny wpływ alleli TNF i HLA-DR na rozwój choroby, z grupy GD i zdrowych ochotników wyodrębniono nosicieli (ang. *carrier*) alleli -308A oraz DRB1*03 (tab. 5). Jedynie częstość występowania nosicieli posiadających zarówno allel -308A jak i DRB1*03 była zwiększona u chorych z GD w porównaniu ze skontrolowanymi osobami zdrowymi. Liczba osób posiadających jedynie allel -308A była mniejsza w

grupie GD w porównaniu z grupą kontrolną ($OR=0,6$). Powyższe wyniki sugerują, że związek pomiędzy polimorfizmem TNF G-308A a podatnością na rozwój GD może być wtórny w stosunku do HLA-DRB1*03.

Polimorfizmy genów CTLA-4, IL-6 oraz IL-13

Polimorfizm genu CTLA-4 A49G był związany ze zwiększoną podatnością na rozwój GD (tab. 6). Częstość występowania genotypów CTLA-4 G/G oraz A/G była znamienne większa w grupie GD w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami ($P=0,001$, $P_c=0,012$, $OR=2,0$). Nie stwierdzono znamienych asocjacji między polimorfizmami genów IL-6 (G-174C) oraz IL-13 (C-1112T i G2044A) a rozwojem GD (tab. 6). W badanych grupach, allele genu IL-13: -1112T i 2044A pozostawały względem siebie w niezrównoważeniu sprzężeń (test Mittala: GD - $t=10,7$; zdrowi ochotnicy - $t=7,8$). Częstość występowania haplotypu

Tabela 4. Częstość występowania alleli HLA-DRB1 u zdrowych osobników i chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) z oftalmopatią, oraz bez klinicznie jawnej oftalmopatii.*

Table 4. HLA-DRB1 carrier frequencies in healthy subjects and in patients with Graves' disease (GD) with or without ophthalmopathy.

HLA-DRB1	Zdrowi ochotnicy Healthy subjects (n=125)	GD- cała grupa GD - total (n=228)	GD bez oftalmopatii GD – without ophthalmopathy (n=122)	GD z oftalmopatią GD with ophthalmopathy (n=106)
01	22 (17.6%)	30 (13.2%)	16 (13.1%)	14 (13.2%)
15	28 (22.4%)	60 (26.3%)	30 (24.6%)	30 (28.3%)
16	6 (4.8%)	20 (8.8%)	9 (7.4%)	11 (10.4%)
03	26 (20.8%)	98 (43.0%) ^a	52 (42.6%)	46 (43.4%)
04	27 (21.6%)	36 (15.8%)	16 (13.1%)	20 (18.9%)
11	30 (24.0%)	62 (27.2%)	33 (27.0%)	29 (27.4%)
12	12 (9.6%)	8 (3.5%) ^b	5 (4.1%)	3 (2.8%)
13	38 (30.4%)	55 (24.1%)	35 (28.7%)	20 (18.9%) ^c
14	6 (4.8%)	12 (5.3%)	4 (3.3%)	8 (7.5%)
07	27 (21.6%)	37 (16.2%)	23 (18.9%)	14 (13.2%)
08	8 (6.4%)	17 (7.5%)	10 (8.2%)	7 (6.6%)
09	2 (1.6%)	3 (1.3%)	1 (0.8%)	2 (1.9%)
10	1 (0.8%)	3 (1.3%)	2 (1.6%)	1 (0.9%)

*W tabeli przedstawiono liczbę osób posiadających określone allele (ang. *phenotype frequencies*). Wartości P zostały obliczone za pomocą testu χ^2 lub testu Fishera i pomnożone (P_c) przez liczbę wykonanych porównań (n=39). OR- iloraz szans. GD vs zdrowi ochotnicy: ^a $P=0,00001$, $P_c=0,0004$, $OR=2,9$; ^b $P=0,033$, $P_c=1,0$, $OR=0,3$; GD z oftalmopatią vs zdrowi ochotnicy: ^c $P=0,044$, $P_c=1,0$, $OR=0,5$

*P values were calculated with the use of χ^2 test or Fisher's exact probability test and corrected (P_c) for the number of tests performed (n=39). OR- odds ratio. GD vs healthy subjects: ^a $P=0,00001$, $P_c=0,0004$, $OR=2,9$; ^b $P=0,033$, $P_c=1,0$, $OR=0,3$; GD with ophthalmopathy vs healthy subjects: ^c $P=0,044$, $P_c=1,0$, $OR=0,5$.

Tabela 5. Częstość występowania alleli HLA-DRB1*03 oraz TNF-308A u zdrowych ochotników oraz chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) z oftalmopatią oraz bez klinicznie jawnej oftalmopatii.

Table 5. Distribution of HLA-DRB1*03 and TNF-308A carriers in healthy subjects and patients with Graves' disease (GD) with or without ophthalmopathy.

Nosiciele* Carriers*		Zdrowi ochotnicy Healthy subjects	GD – cała grupa GD - total	OR_1	GD bez oftalmopatii GD – without ophthalmopathy	GD z oftalmopatią GD – with ophthalmopathy	OR_2
HLA-DRB1*03	TNF-308A	(n=125)	(n=228)		(n=122)	(n=106)	
-	-	79 (63.2%)	108 (47.4%)	0.5 ^a	56 (45.9%)	52 (49.1%)	1.1
+	-	5 (4.0%)	14 (6.1%)	1.6	9 (7.4%)	5 (4.7%)	0.6
-	+	20 (16.0%)	22 (9.7%)	0.6	14 (11.5%)	8 (7.5%)	0.6
+	+	21 (16.8%)	84 (36.8%)	2.9 ^b	43 (35.2%)	41 (38.7%)	1.2

* W tabeli przedstawiono liczbę osób (nosicieli) posiadających określone allele. Iloraz szans (skrót z ang. OR- *odds ratio*) został obliczony zgodnie z metodą Woolfa, porównując GD vs zdrowi ochotnicy (OR_1) oraz GD z oftalmopatią vs GD bez oftalmopatii (OR_2). Podane poniżej wartości P zostały obliczone za pomocą testu χ^2 lub testu Fishera: ^a $P=0,004$; ^b $P=0,0001$.

* The frequencies of subjects carrying the given allele are presented. Odds ratios (OR) were calculated according to Woolf's method, comparing GD- total vs healthy subjects (OR_1) and GD with ophthalmopathy vs GD without ophthalmopathy (OR_2). P values given below, were calculated with the use of χ^2 test or Fisher's exact probability test: ^a $P=0,004$; ^b $P=0,0001$.

-1112T/2044A w GD (19%) nie różniła się znacząco w stosunku do zdrowych ochotników (17%, $P=0,5$). Rozkład genotypów CTLA-4, IL-6 i IL-13 nie różnił się znacząco pomiędzy kobietami a mężczyznami w badanych grupach (wyników nie przedstawiono).

Związek między czynnikami środowiskowymi i endogennymi a rozwojem oftalmopatii tarczycowej (TAO)

Po podziale chorych z GD na podgrupy w zależności od zmian ocznych stwierdzono, że wśród chorych z TAO było w istotnym stopniu więcej palaczy papierosów w porównaniu z chorymi z GD bez klinicznie jawnej oftalmopatii ($P=0,04$, $OR=1,7$) (tab. 1). Ponadto chorzy z TAO charakteryzowali się późniejszym wiekiem zachorowania na GD ($P=0,002$). U chorych bez oftalmopatii nadczynność tarczycy była leczona głównie tyreostatykami lub radiojodem, zaś u chorych z TAO nadczynność tarczycy była znacząco częściej leczona chirurgicznie ($P=0,0005$).

Związek między polimorfizmami wybranych genów a rozwojem oftalmopatii tarczycowej (TAO)

Polimorfizmy genów HLA: TNF oraz HLA-DR

Po podziale chorych z GD na grupy w zależności od obecności klinicznych objawów oftalmopatii stwierdzono znaczące różnice w występowaniu polimorfizmu TNF G-238A (tab. 3). Wśród chorych z TAO nie stwierdzono występowania genotypów -238 A/A i G/A, co sugeruje, że allel -238A może pełnić rolę ochronną w rozwoju zmian ocznych w GD (TAO vs GD bez oftalmopatii: $P=0,008$, $P_c=0,12$, $OR=0,1$; TAO vs zdrowi ochotnicy: $P=0,0003$,

$P_c=0,0045$, $OR=0,05$). Pozostałe polimorfizmy TNF: T-1031C, G-868A, C-857T i G-308A nie były związane z rozwojem klinicznych objawów oftalmopatii, nawet po podziale chorych na podgrupy w zależności od płci, palenia papierosów oraz wieku zachorowania na GD (wyników nie przedstawiono). Nie stwierdzono również związku pomiędzy stopniem zaawansowania zmian ocznych a częstością występowania alleli TNF: -1031C (NOSPECS klasy 0-I - 20%, klasa II - 19%, klasa III - 19% i klasy IV-VI - 11%); -868A (14%, 19%, 19%, 11%); -857T (14%, 23%, 13% i 13%) oraz -308A (25%, 27%, 26% i 25%).

Na podstawie wyników genotypowania odtworzono prawdopodobne haplotypy promotora TNF (tab. 7). We wszystkich badanych grupach, zmienność genetyczna promotora TNF mogła zostać wyjaśniona poprzez występowanie 5-6 haplotypów, które w sumie były odpowiedzialne za 99%-100% wszystkich możliwych haplotypów. Częstość występowania haplotypów TNF w grupie zdrowych ochotników była podobna do opisanej ostatnio przez Zegginego *et al.* [140, 200]. Rozkład haplotypów TNF różnił się u chorych z oftalmopatią w porównaniu z chorymi z GD bez oftalmopatii ($P=0,002$) oraz w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami ($P=0,004$). U chorych z TAO nie stwierdzono występowania haplotypu zawierającego allele -1031C i -238A (TAO vs GD bez oftalmopatii: $OR=0,07$) oraz haplotypu zawierającego tylko allel -1031C ($OR=0,1$). Haplotyp zawierający jedynie allel -1031C nie występował również u zdrowych dawców i może być uznany jako „specyficzny” dla nadczynności tarczycy w przebiegu GD bez oftalmopatii.

Tabela 6. Częstość występowania genotypów polimorfizmów genów dla CTLA-4, IL-6 i IL-13 u zdrowych osobników i chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) z oftalmopatią oraz bez klinicznie jawnej oftalmopatii.

Table 6. Genotype frequencies of CTLA-4, IL-6 and IL-13 polymorphisms in healthy subjects and in patients with Graves' disease (GD) with or without ophthalmopathy.

Polimorfizm Polymorphism	Genotypy Genotype	Zdrowi ochotnicy Healthy subjects (n=152)	GD- cała grupa GD - total (n=269)*	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=161)*	GD z oftalmopatią GD with ophthalmopathy (n=108)*
CTLA-4: A49G	G/G	23 (15.1%)	70 (26.0%) ^a	38 (23.6%)	32 (29.6%)
	A/G	61 (40.1%)	121 (45.0%)	76 (47.2%)	45 (41.7%)
	A/A	68 (44.7%)	78 (29.0%)	47 (29.2%)	31 (28.7%)
IL-6: G-174C	C/C	21 (13.8%)	53 (19.7%)	31 (19.3%)	22 (20.4%)
	G/C	83 (54.6%)	134 (49.8%)	83 (51.6%)	51 (47.2%)
	G/G	48 (31.6%)	82 (30.5%)	47 (29.2%)	35 (32.4%)
IL-13: C-1112T	T/T	14 (9.2%)	26 (10.2%)	13 (8.1%)	13 (13.8%)
	C/T	53 (34.9%)	104 (40.9%)	67 (41.9%)	37 (39.4%)
	C/C	85 (55.9%)	124 (48.8%)	80 (50.0%)	44 (46.8%)
IL-13: G2044A	A/A	8 (5.3%)	19 (7.5%)	11 (6.9%)	8 (8.5%)
	G/A	54 (35.5%)	90 (35.4%)	56 (35.0%)	34 (36.2%)
	G/G	90 (59.2%)	145 (57.1%)	93 (58.1%)	52 (55.3%)

* Polimorfizmy genu dla IL-13 zostały oznaczone u 254 chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (160 chorych bez oftalmopatii i 94 chorych z oftalmopatią). Wartości P zostały obliczone za pomocą testu χ^2 lub testu Fishera i pomnożone (P_c) przez liczbę wykonanych porównań ($n=12$). OR -iloraz szans. GD vs zdrowi ochotnicy: * $P=0,001$, $P_c=0,012$, $OR=2,0$.

* IL-13 gene polymorphisms were analysed in 254 patients with GD (160 without ophthalmopathy and 94 with ophthalmopathy). P values were calculated with the use of χ^2 test or Fisher's exact probability test and corrected (P_c) for the number of tests performed ($n=12$). GD vs healthy subjects: * $P=0,001$, $P_c=0,012$, $OR=2,0$.

Częstość występowania alleli HLA-DRB1 nie różniła się znacząco u chorych z TAO w porównaniu z chorymi z GD bez oftalmopatii (tab. 4). Częstość występowania nosicieli alleli HLA-DRB1*03 oraz TNF-308A była podobna w grupie TAO i GD bez oftalmopatii (Tab. 5). W poprzednich pracach opisano asocjację allelu HLA-DRB1*07 z rozwojem oftalmopatii tarczycowej [7, 43]. W tej pracy, liczba osób z allelem DRB1*07 była mniejsza w grupie TAO w porównaniu z grupą zdrowych ochotników, lecz różnica ta nie była statystycznie znamienna ($P=0,08$, $OR=0,5$). Istnieją również doniesienia sugerujące niezrównoważenie sprzężeń między allelami HLA-DRB1*07 i TNF -238A [29, 141]. Aby ocenić, czy

związek polimorfizmu promotora TNF z oftalmopatią był zależny od alleli HLA-DRB1*07, z grupy GD i zdrowych ochotników wyodrębniono nosicieli alleli -238A oraz DRB1*07 (tab. 8). Liczba osób posiadających allel -238A bez allelu DRB1*07 [238A(+)/DRB1*07(-)] była znacząco mniejsza w grupie TAO w porównaniu z GD bez oftalmopatii ($P=0,04$, $OR=0,1$) oraz ze zdrowymi ochotnikami ($P=0,02$, $OR=0,1$). Ponadto, po wyłączeniu z analizy nosicieli alleli DRB1*07, rozkład haplotypów TNF nadal różnił się u chorych z TAO w porównaniu z GD bez oftalmopatii ($P=0,012$). Powyższe wyniki sugerują, że asocjacja polimorfizmu TNF G-238A z rozwojem TAO była niezależna od alleli HLA-DRB1*07.

Tabela 7. Częstość występowania haplotypów promotora TNF u zdrowych osobników i chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) z oftalmopatią lub bez klinicznie jawnej oftalmopatii.

Table 7. TNF promoter haplotype frequencies in healthy subjects and in patients with Graves' disease (GD) with or without ophthalmopathy.

Haplotypy promotora TNF* TNF promoter haplotype					Zdrowi ochotnicy Healthy subjects (n=248)	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=122)	GD z oftalmopatią Gd with ophthalmopathy (n=106)	OR ₁	OR ₂
-1031	-863	-857	-308	-238					
T	C	C	G	G	50.5%	39.8%	46.7%	0.9	1.3
T	C	T	G	G	16.3%	15.6%	12.7%	0.7	0.8
T	C	C	A	G	15.6%	25.4%	25.5%	1.9	1.0
C	A	C	G	G	12.0%	14.3%	15.1%	1.3	1.1
C	C	C	G	A	4.6%	3.3%	0%	0.05	0.07
C	C	C	G	G	0%	1.6%	0%	1.0	0.1
				SUMA	99%	100%	100%		

* Pogrubienie wskazuje na rzadszy allel. Przedstawiono haplotypy które występują z częstością >1%. Iloraz szans (skrót z ang. OR- odds ratio) został obliczony zgodnie z metodą Woolfa (z modyfikacją Haldana, jeżeli to było zasadne), porównując GD z oftalmopatią vs zdrowi ochotnicy (OR₁) oraz GD z oftalmopatią vs GD bez oftalmopatii (OR₂). Wartości P podane niżej zostały obliczone za pomocą testu nieparametrycznego (ang. case-control permutation test), porównując rozkład haplotypów w GD z oftalmopatią vs zdrowi ochotnicy ($P=0,004$) i GD z oftalmopatią vs GD bez oftalmopatii ($P=0,002$).

* Boldface indicates the less common allele. Only haplotypes which occurred with a frequency >1% in at least one studied group are shown. Odds ratios (OR) were calculated according to Woolf's method (with Haldane's modification where appropriate), comparing GD with ophthalmopathy vs healthy subjects (OR₁) and GD with ophthalmopathy vs GD without ophthalmopathy (OR₂). P values given below were estimated using a case-control permutation test, comparing the distribution of TNF haplotypes in GD with ophthalmopathy vs healthy subjects ($P=0,004$) and GD with ophthalmopathy vs GD without ophthalmopathy ($P=0,002$).

Tabela 8. Częstość występowania alleli HLA-DRB1*07 i TNF-238A u zdrowych ochotników i chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) z oftalmopatią lub bez klinicznie jawnej oftalmopatii.

Table 8. Distribution of HLA-DRB1*07 and TNF-238A carriers in healthy subjects and patients with Graves' disease (GD) with or without ophthalmopathy.

Nosiciele* Carriers*		Zdrowi ochotnicy Healthy subjects (n=125)	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=122)	GD z oftalmopatią GD with ophthalmopathy (n=106)	OR ₁	OR ₂
HLA-DRB1*07	TNF-238A					
-	-	92 (73.6%)	94 (77.0%)	92 (86.8%)	2.4 ^a	2.0
+	-	23 (18.4%)	20 (16.4%)	14 (13.2%)	0.7	0.8
-	+	6 (4.8%)	5 (4.1%)	0 (0%)	0.1 ^b	0.1 ^c
+	+	4 (3.2%)	3 (2.5%)	0 (0%)	0.1	0.2

* W tabeli przedstawiono liczbę osób (nosicieli) posiadających określone allele. Iloraz szans (skrót z ang. OR- odds ratio) został obliczony zgodnie z metodą Woolfa (z modyfikacją Haldana, jeżeli to było zasadne), porównując GD z oftalmopatią vs zdrowi ochotnicy (OR₁) oraz GD z oftalmopatią vs GD bez oftalmopatii (OR₂). Podane poniżej wartości P zostały obliczone za pomocą testu χ^2 lub testu Fishera: ^a $P=0,01$; ^b $P=0,02$; ^c $P=0,04$.

* The frequencies of subjects carrying the given allele are presented. Odds ratios (OR) were calculated according to Woolf's method (with Haldane's modification where appropriate), comparing GD with ophthalmopathy vs healthy subjects (OR₁) and GD with ophthalmopathy vs GD without ophthalmopathy (OR₂). P values given below, were calculated with the use of χ^2 test or Fisher's test: ^a $P=0,01$; ^b $P=0,02$; ^c $P=0,04$.

Polimorfizmy genów CTLA-4, IL-6 oraz IL-13

U chorych z TAO nie stwierdzono znamiennej częstszego występowania polimorfizmów genów CTLA-4 (A49G), IL-6 (G-174C) oraz IL-13 (C-1112T, G2044A) (tab. 6). Z uwagi na możliwe interakcje między czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, chorych z TAO oraz chorych z GD bez oftalmopatii podzielono na podgrupy w zależności od płci, nikotynizmu oraz wieku zachorowania na GD. W poszczególnych grupach nie stwierdzono jednak znamiennej asocjacji między wybranymi czynnikami genetycznymi a rozwojem oftalmopatii (wyników nie przedstawiono). Ponadto nie stwierdzono korelacji pomiędzy stopniem zaawansowania zmian ocznych a częstością występowania alleli: CTLA-4 49A (NOSPECS klasy 0-I: 46%, klasa II: 55%, klasa III: 56%, klasy IV-VI: 43%), IL-6 -174C (45%, 45%, 50% i 38%), IL-13 -1112T (30%, 23%, 33% i 33%) oraz IL-13 2044A (25%, 20%, 26% i 28%).

Dyskusja**Wpływ wybranych czynników genetycznych na rozwój choroby Gravesa-Basedowa.**

Badania z ostatnich lat pozwoliły znacznie lepiej zrozumieć podłoże genetyczne choroby Gravesa-Basedowa (GD), która charakteryzuje się wieloczynnikowym modelem dziedziczenia (podobnie jak inne choroby autoimmunologiczne) [32]. Badania analizy sprzężeń (ang. *linkage analysis*) prowadzone przez różne światowe ośrodki wykazały, że istnieje wiele *loci* na różnych chromosomach związanych z GD, chorobą Hashimoto lub autoimmunologicznymi chorobami tarczycy [22, 170, 174]. Dotychczas opisane *loci* wymagają powtórzenia wyników w niezależnych badaniach i dalszego scharakteryzowania. Do najlepiej scharakteryzowanych czynników genetycznych predysponujących do rozwoju GD w populacjach rasy białej należą polimorfizmy genów głównego układu zgodności tkankowej (HLA) oraz genu kodującego antygen-4 związany z cytotoksycznym limfocytom T (CTLA-4). Należy jednak zwrócić uwagę, że GD jest chorobą heterogenną genetycznie – to znaczy, że interakcje pomiędzy wieloma różnymi genami o zmiennej penetracji mogą wywoływać predyspozycję do rozwoju choroby. Ponadto, podłoże genetyczne GD może się różnić w poszczególnych rasach lub populacjach [181]. Z tego powodu, w pierwszym etapie tej pracy analizowano związek między polimorfizmami wybranych genów a rozwojem GD w polskiej populacji, koncentrując się na uprzednio opisanych genach podatności dla GD dla rasy białej. Potwierdzenie asocjacji pomiędzy polimorfizmami genów HLA i CTLA-4 a podatnością na rozwój GD w badanej grupie jest bardzo ważne, gdyż stanowi podstawę do dalszych badań w celu poszukiwania czynników predysponujących do rozwoju GD lub modyfikujących przebieg choroby i porównywania wyników z innymi populacjami europejskimi.

Polimorfizm genów układu HLA: TNF oraz HLA-DRB1
Główny układ zgodności tkankowej (HLA) (chromosom 6p21) składa się z ponad 100 genów

i należy do najbardziej polimorficznych regionów ludzkiego genomu [90, 139]. Produkty genów układu HLA można podzielić na cząsteczki klasy I (m.in. HLA-A, -B, -C), cząsteczki klasy II (m.in. HLA-DP, -DQ, -DR) oraz cząsteczki klasy III. Do czynników immunoregulujących, należących do cząsteczek klasy III, zalicza się między innymi: geny kodujące składowe dopełniacza, białka szoku termicznego-70 (skrót z ang. HSP - *heat shock protein*), białka transportujące peptydy do siateczki śródplazmatycznej (skrót z ang. TAP - *transporter associated with antigen processing*) oraz trzy cytokiny – czynnik martwicy nowotworów oraz limfotoksyny α i β .

Obecność pewnych cząsteczek HLA jest związana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niektórych chorób, w szczególności o podłożu autoimmunologicznym [90]. Znaczącą rolę genów HLA w rozwoju GD potwierdziło szereg badań i obecnie allele układu HLA klasy I i II, takie jak: A*01, B*0801, DRB1*0301, DRB1*0304, DQA1*0501, uważane są za markery podatności na GD dla populacji rasy białej [4, 6, 35, 65, 136, 153, 191]. Najlepiej udowodniony jest związek GD z allelami DRB1*03, kodującymi cząsteczkę HLA-DR3 (nazwa serologiczna) [7, 37, 48, 78, 113, 152]. Względne ryzyko zachorowania na GD u osób posiadających cząsteczkę HLA-DR3 wynosi od 2,0 do 7,6, w zależności od badanej populacji [170, 174]. Dotychczasowa charakterystyka immunogenetyczna pacjentów GD polskiego pochodzenia, opierająca się głównie na testach serologicznych, wykazała, że wśród chorych dominują antygeny HLA-A1, -B8, -B15, -B35 i -Cw3 [56, 109]. Obecnie typowanie HLA oparte jest głównie na metodach analizy DNA, które są prostsze i dokładniejsze od analizy na poziomie białka. W obecnej pracy wykazano silną asocjację między allelami HLA-DRB1*03 a podatnością na rozwój GD. Iloraz szans (OR) rozwoju choroby związany z obecnością alleli DRB1*03 wyniósł 2,9 i był zbliżony do opisywanych poprzednio w innych populacjach europejskich.

Pomimo, że asocjacje poszczególnych cząsteczek HLA z chorobą Gravesa-Basedowa są dobrze udokumentowane, mechanizmy odpowiedzialne za te powiązania pozostają nieznanne [170, 174]. Podstawową funkcją cząsteczek HLA klasy I i II jest wiązanie oraz prezentowanie antygenów limfocytom T, co warunkuje rozwój odpowiedzi immunologicznej. Poszczególne cząsteczki HLA różnią się między sobą czynnościowo, ponieważ wiążą różne peptydy. Istnieją prace sugerujące, że zmiany w strukturze pierwszorzędowej miejsca wiążącego antygen cząsteczek HLA-DR mogą mieć istotny wpływ na rodzaj prezentowanego antygeny limfocytom T i na nasilenie odpowiedzi immunologicznej, a w konsekwencji mogą zwiększać (HLA-DR3) lub zmniejszać (HLA-DR7) ryzyko rozwoju GD [113]. Dotychczas nierozwiązany pozostaje problem, czy same allele DRB1*03 zwiększają podatność na rozwój GD, czy dopiero rozszerzony haplotyp DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*02 wpływa w istotny sposób na rozwój GD [65, 78, 136]. Należy również podkreślić, że w regionie HLA występuje bardzo silne niezrównoważenie sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*), powodujące, że leżące

blisko siebie allele są dziedziczone wspólnie, nawet u osób niespokrewnionych. W związku z tym może mieć miejsce sytuacja, w której patogenny efekt może nie być wywierany przez allel lub haplotyp HLA, lecz przez produkt nieznanego, zlokalizowanego w pobliżu genu [158].

Jednym z interesujących kandydatów na gen predysponujący do GD, zlokalizowanym w obrębie układu HLA, jest gen kodujący czynnik martwicy nowotworów (TNF). TNF jest jednym z głównych mediatorów zapalenia i odgrywa istotną rolę w patogenezie autoimmunologicznych chorób tarczycy [100, 184]. TNF należy do głównych cytokin stymulujących migrację leukocytów z krwiobiegu do miejsca toczącego się zapalenia, co dokonuje się poprzez indukcję ekspresji cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna [64]. Ponadto TNF ma również istotny wpływ na interakcję leukocytów z tyreocytami lub z fibroblastami oczodołowymi, poprzez indukcję ekspresji cząsteczek adhezyjnych oraz cząsteczek HLA klasy I i II [63, 192]. W badaniach *in situ* u pacjentów z GD stwierdzono wysokie stężenia mRNA dla TNF w tarczycy i tkankach okołogłokowych [69, 106, 185]. Fakt, że produkcja i sekrecja TNF jest uwarunkowana genetycznie i jest związana z antygenami HLA klasy II, a zwłaszcza z DR3, dodatkowo potwierdzał założenie, że gen kodujący TNF może wpływać na rozwój i przebieg choroby GD [79, 195].

W obecnej pracy analizowano pięć polimorfizmów promotora genu dla TNF, które polegają na zamianie pojedynczych nukleotydów w pozycjach: -238 od miejsca rozpoczęcia transkrypcji (zamiana G na A, G-238A), -308 (G-308A), -857 (C-857T), -863 (C-863A) i -1031 (T-1031C) [68]. Jedynie polimorfizm TNF G-308A był znamienne związane z podatnością na rozwój GD (OR=2,0), potwierdzając wyniki poprzednich prac [78, 105]. Choć TNF G-308A jest związany z rozwojem i przebiegiem wielu chorób zapalnych o różnym podłożu, funkcja tego SNP w regulacji transkrypcji genu nie jest całkowicie wyjaśniona [15, 116, 147, 187]. Wiele prac sugeruje, że allel -308A zwiększa produkcję TNF, lecz również wiele prac nie mogło potwierdzić bezpośredniej roli polimorfizmu G-308A w regulacji transkrypcji genu [14, 38, 53, 61, 79, 86, 115, 195]. Te sprzeczne wyniki mogą wskazywać, że nasza wiedza na temat funkcji różnych regionów promotora TNF jest niepełna, a metody badania funkcji promotorów *in vitro* są wciąż niedoskonałe [96]. Region promotorowy genu dla TNF obejmuje sekwencje docelowe dla wielu czynników transkrypcyjnych, między innymi: AP-1 (ang. *activating protein*), AP-2, NF-κB (ang. *nuclear factor*), NF-AT, STAT1 (ang. *signal transducers and activators of transcription*) i SP-1 (ang. *specificity protein*), co wskazuje na złożoność regulacji ekspresji tego genu [166]. Ponadto, badania nad polimorfizmem TNF G-308A są bardzo utrudnione z uwagi na silne niezrównoważenie sprzężeń z haplotypem HLA-A*01-B*0801-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201, który sam może być związany z podatnością na rozwój chorób autoimmunologicznych [195]. W celu uzyskania odpowiedzi na pytanie, czy TNF G-308A stanowi dodatkowy, niezależny

czynnik podatności na rozwój GD, w grupach chorych z GD i zdrowych ochotników wyodrębniono nosicieli alleli HLA-DRB1*03 oraz TNF-308A. Wyniki tej analizy sugerują, że asocjacja pomiędzy TNF G-308A i GD jest wtórna w stosunku do DRB1*03, co potwierdza wyniki pracy Hunta i współautorów [78]. Z uwagi jednak na małą liczbę osób posiadających jedynie allel -308A lub DRB1*03, konieczne jest ponowne wykonanie tej analizy na znacznie większych grupach chorych z GD i zdrowych ochotników [128].

Polimorfizm genu CTLA-4

Wśród genów nie należących do kompleksu HLA, najsilniejsze powiązanie znaleziono pomiędzy GD a genem kodującym antygen związany z cytotoksycznym limfocytom T-4 (CTLA-4) [40, 66, 171, 173, 199]. Aktywacja limfocyta T wymaga nie tylko prezentacji antygeny przez cząsteczki HLA, ale również dodatkowych sygnałów stymulujących (kostymulatorów). Cząsteczka CTLA-4 znajduje się na powierzchni aktywowanych limfocytów T i posiada właściwości łączenia się z cząsteczką kostymulacyjną B7, znajdującą się na komórkach prezentujących antygen. Zablockowanie cząsteczki B7 prowadzi do zahamowania aktywacji limfocytów T i do ich apoptozy [170, 174]. Zaburzenia funkcji CTLA-4 mogą więc prowadzić do nadmiernej odpowiedzi immunologicznej i rozpoczęcia zjawisk autoagresji [99].

Gen kodujący cząsteczkę CTLA-4 jest zlokalizowany na chromosomie 2q33 i region ten został w pierw opisany jako jeden z *loci* warunkujących podatność na rozwój cukrzycy typu 1 (ang. *insulin dependent diabetes mellitus* - IDDM *locus* 12) [171]. Dotychczas opisano 3 polimorfizmy genu CTLA-4: w regionie promotora (C-318T), w eksonie 1 (A49G) oraz w eksonie 3 w regionie nie ulegającym translacji (w pozycji 106 polimorfizm powtórzeń tandemowych (AT)_n) [170, 174]. Polimorfizmy genu CTLA-4 w eksonie 1 oraz w eksonie 3 pozostają względem siebie w dodatnim niezrównoważeniu sprzężeń. Oba te polimorfizmy są prawdopodobnie funkcjonalne, gdyż polimorfizm A49G prowadzi do zamiany aminokwasów w cząsteczce CTLA-4 (treonina na alaninę), zaś polimorfizm w regionie 3' może mieć istotny wpływ na stabilność mRNA i ekspresję białka. Oba te polimorfizmy są związane z rozwojem i przebiegiem wielu chorób autoimmunologicznych [40, 171]. Dodatkowo badania *in vitro* sugerują, że zamiana aminokwasów w cząsteczce CTLA-4 (treonina na alaninę) zaburza proces apoptozy aktywowanych limfocytów [99]. Jednakże ostatnie badania wskazują na istnienie jeszcze dodatkowych funkcjonalnych polimorfizmów w obrębie genu CTLA-4 [171].

W tej pracy częstość występowania allelu CTLA-4 49G (OR=1,7) oraz genotypu G/G (OR=2,0) były znamienne większe u chorych z GD w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami i były podobne do opisywanych w innych populacjach europejskich [4, 40, 172, 175]. Podobne wyniki uzyskano również w zakładzie prof. B. Jarzab, co dodatkowo potwierdziło hipotezę, że CTLA-4 zwiększa podatność na rozwój GD w polskiej populacji [85].

Wpływ czynników środowiskowych i endogennych na rozwój oftalmopatii tarczycowej

Związek czynników środowiskowych i endogennych z oftalmopatią tarczycową jest dobrze udokumentowany i takie czynniki jak: palenie papierosów, podeszły wiek i płeć męska są obecnie uznane za czynniki predysponujące do rozwoju TAO [13, 41, 59, 123, 135]. W pracy tej potwierdzono negatywny wpływ palenia papierosów na rozwój oftalmopatii u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa. Chorzy z TAO charakteryzowali się również starszym wiekiem zachorowania na GD, lecz liczba mężczyzn w grupie TAO nie różniła się znamienne w porównaniu z grupą GD bez klinicznie jawnej oftalmopatii. Podobne wyniki uzyskano w opublikowanej ostatnio pracy Allahabadia i współautorów, co sugeruje że wpływ płci na rozwój TAO wymaga obecnie potwierdzenia w badaniach prospektywnych [4]. Z uwagi na fakt, że terapia radiojodem może nasilać przebieg zmian ocznych, nadczynność tarczycy u chorych z TAO była leczona głównie chirurgicznie lub za pomocą tyreostatyków [12, 112, 160]. Celem zapobieżenia nasileniu procesu zapalnego w oczodole, u chorych z oftalmopatią leczonych radiojodem stosowano prewencyjną terapię prednizonem w dawce 0,5 mg/kg/d [83].

Wpływ wybranych czynników genetycznych na rozwój oftalmopatii u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa

Różnorodność objawów klinicznych choroby Gravesa-Basedowa lokalizujących się w tarczycy, tkankach oczodołu, skórze przedgoleni oraz dystalnych paliczek rąk oraz stóp może sugerować, że różne czynniki genetyczne i środowiskowe modyfikują przebieg choroby [192]. Choć podatność genetyczna na rozwój GD jest dobrze udokumentowana, wpływ konkretnych czynników genetycznych na fenotyp choroby, w tym na rozwój oftalmopatii, wciąż budzi kontrowersje [22, 170, 174]. Dotychczas nie opublikowano wyników badań bliźniąt lub analizy sprzężeń oceniających wpływ czynników genetycznych na rozwój TAO. Analizy asocjacji oparte na badaniach populacyjnych (ang. *population-based association study*) lub badaniach przypadku-kontrola (ang. *case-control study*) są bardzo czułą metodą i dzięki nim można wykryć czynniki genetyczne o małym efekcie działania (które przyczyniają się w mniej niż 5% do podłoża genetycznego choroby) [170]. Nie można jednak zapomnieć o obciążeniu tych badań błędem selekcji i uzyskaniu fałszywych asocjacji. Niestety, istnieje niewiele badań asocjacji, które są zaplanowane prawidłowo aby analizować związek pomiędzy czynnikami genetycznymi a rozwojem oftalmopatii u chorych z GD. Prace te obejmowały często niezbyt liczną i niedokładnie scharakteryzowaną klinicznie (brak danych na temat stopnia zaawansowania zmian ocznych oraz czasu trwania GD) grupę chorych z TAO. Najważniejszym jednak problemem jest brak powszechnie ustalonej definicji „klinicznie jawnej” oftalmopatii. Tak więc, porównywanie wyników dotychczasowych badań oraz wyciąganie wniosków na temat podłoża genetycznego TAO jest bardzo

trudne lub wręcz niemożliwe. Po to by móc ocenić wpływ czynników genetycznych na przebieg choroby, konieczne są dalsze badania obejmujące duże grupy dobrze scharakteryzowanych chorych.

W tej pracy założono, że wytrzeszcz jest specyficznym, obiektywnym i łatwym do pomiaru objawem klinicznym TAO. Łagodne objawy oczne (np. retrakcja powiek) mogą nie być spowodowane autoimmunologicznym zapaleniem tkanek pozagałkowych, lecz nadmierną stymulacją układu współczulnego [33]. Choć objawy ze strony tkanek miękkich mogą być bardzo nasilone u chorych z TAO, brak jest obiektywnych i powtarzalnych metod pomiaru tych objawów [39]. Z tego powodu w ostatnio opublikowanych pracach poświęconych genetyce TAO, wytrzeszcz został uznany za kryterium rozpoznania „klinicznie ewidentnej” oftalmopatii [4, 172, 175]. Grupa chorych z klinicznie jawną oftalmopatią obejmowała ponad 100 chorych i tylko w nielicznych badaniach grupy TAO (NOSPECS klasa III i wyżej) były równie liczne (tab. 10).

Polimorfizm genów układu HLA: TNF oraz HLA-DRB1

Choć badania sprzężenia i/lub asocjacji wskazują, że region HLA wpływa na podatność na rozwój choroby Gravesa-Basedowa w populacjach rasy białej, to wpływ określonych genów na przebieg choroby, w tym na rozwój oftalmopatii, pozostaje nieznan (tab. 9). W ostatnich latach ukazały się badania sugerujące, że allele/haplotypy TNF mogą być odpowiedzialne za szczególne objawy i postacie chorób o podłożu zaburzeń immunologicznych, takich jak: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, reumatoidalne zapalenie stawów, twardzina uogólniona i astma [1, 151, 154, 200]. W tej pracy stwierdzono, że rozkład haplotypów promotora TNF różnił się znamienne u chorych z TAO i u chorych z GD bez oftalmopatii. Wynik ten sugeruje, że geny układu HLA mogą wpływać na fenotyp choroby GD. Najbardziej znamienne różnice dotyczyły haplotypu zawierającego allele TNF -1031C oraz -238A, który nie występował u chorych z TAO. Haplotyp zawierający jedynie allele -1031C był za to „specyficzny” dla nadczynności tarczycy w przebiegu GD bez klinicznie jawnych zmian ocznych. Ponadto, u chorych z TAO nie stwierdzono występowania genotypów TNF -238 A/A oraz G/A. Powyższe wyniki sugerują, że allele -238A lub allele będący w niezrównoważeniu sprzężeń, mogą modyfikować przebieg choroby GD. Genotypy TNF -238A/A i G/A są związane z „łagodniejszym” przebiegiem GD bez oftalmopatii.

W badaniach polimorfizmów genetycznych należy zwrócić uwagę na dwa kryteria wiarygodności i znaczenia biologicznego uzyskanych wyników. Pierwsze z nich oparte jest na powtarzalności wyników asocjacji genetycznych, potwierdzanych w różnych laboratoriach i jeśli to możliwe – w różnych populacjach. Polimorfizm TNF G-238A nie był dotychczas badany w GD, ale został powiązany z rozwojem i/lub przebiegiem innych chorób autoimmunologicznych [29, 31, 42, 74, 200, 204]. Bardzo interesujące są wyniki dwóch niezależnych badań, które wykazały, że chorzy z reumatoidalnym zapaleniem stawów

z genotypami -238 A/A i G/A charakteryzowali się łagodniejszym przebiegiem choroby [31, 42]. Tak więc, polimorfizm TNF G-238A mógłby modyfikować przebieg niektórych chorób autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów i choroba Gravesa-Basedowa. Konieczne jest jednak powtórzenie wyników asocjacji TNF G-238A z przebiegiem GD w innej, dobrze scharakteryzowanej populacji. Drugie kryterium wiarygodności oparte jest na analizie funkcji badanego polimorfizmu. Polimorfizmy funkcjonalne zlokalizowane w eksonach zmieniają sekwencję lub ekspresję kodowanego przez dany gen białka. Niestety, analiza funkcji polimorfizmów zlokalizowanych w regionach regulatorowych genów jest bardzo trudna. Dotychczasowe metody badania funkcji promotorów nie uwzględniają często naturalnej struktury chromatyny oraz występowania haplotypów [96]. Wyniki badań *in vitro* analizujące funkcję allelu TNF-238A są niejednoznaczne, gdyż tylko w niektórych liniach komórkowych stwierdzono jego wpływ na poziom transkrypcji genu [14, 38, 49, 88, 141]. Badania te sugerowały, że allel -238A jest związany ze zmniejszoną produkcją TNF, co mogłoby tłumaczyć ochronny wpływ tego allelu na przebieg zapalenia w oczodole i rozwój klinicznych objawów oftalmopatii. Choć funkcja promotora TNF nie jest w pełni poznana, polimorfizm G-238A może pozostać istotnym markerem genetycznym przebiegu GD i rozwoju oftalmopatii, który jest sprzężony z innymi funkcjonalnymi polimorfizmami w obrębie HLA [178].

Związek pomiędzy allelami HLA-DRB1 a rozwojem TAO jest niejednoznaczny (tab. 9). Częstość występowania cząsteczki HLA-DR3 u chorych z TAO opisana była w literaturze jako zmniejszona, zwiększona lub niezmieniona w stosunku do chorych z GD

bez oftalmopatii [4, 34, 50, 91, 152, 190]. W tej pracy, częstość występowania alleli HLA-DRB1*03 oraz TNF-308A była prawie identyczna u chorych z TAO i chorych z GD bez oftalmopatii, co sugeruje że allele te nie wpływają na rozwój klinicznych zmian ocznych u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa. W tej pracy nie potwierdzono również asocjacji między występowaniem allelu HLA-DRB1*04 a rozwojem TAO [51, 176]. Allel HLA-DR7 jest „allelem ochronnym” w chorobie Gravesa-Basedowa [35, 113]. Zmniejszoną częstość tego allelu opisywano zwłaszcza u chorych z dziecięcą postacią GD i u chorych z TAO [7, 43, 107]. W tej pracy stwierdzono tendencję do zmniejszonej częstości występowania allelu HLA-DRB1*07 u chorych z oftalmopatią tarczycową w stosunku do zdrowych ochotników. Z uwagi na opisywane niezrównoważenie sprzężeń między allelami TNF -238A i HLA-DRB1*07, wykonano analizę w celu stwierdzenia, czy związek TNF G-238A z TAO jest zależny od cząsteczki DR7 [29, 141]. Wyniki tej analizy należy interpretować ostrożnie z uwagi na małą liczbę nosicieli alleli TNF -238A i HLA-DRB1*07 w badanych grupach. Sugerują one, że wpływ TNF G-238A na rozwój klinicznych objawów oftalmopatii nie zależał od allelu DRB1*07.

W naszej poprzedniej pracy stwierdziliśmy, że polimorfizmy TNF T-1031C oraz G-863A były związane z rozwojem oraz stopniem zaawansowania oftalmopatii u chorych z GD w populacji japońskiej [89]. W populacji tej nie stwierdzono związku pomiędzy polimorfizmami TNF G-308A oraz G-238A a podatnością na rozwój GD lub TAO. Należy jednak zwrócić uwagę, że częstość występowania alleli TNF różniła się w obu badanych populacjach – allele -308A i -238A występowały znacznie częściej w populacji polskiej niż japońskiej. Tak więc te na pozór sprzeczne wyniki mogą być wytłumaczone

Tabela 9. Badania asocjacji między allelami genów układu HLA a rozwojem oftalmopatii u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa w populacjach rasy białej.

Table 9. Studies analysing the association of human leukocyte antigen (HLA) alleles with the development of ophthalmopathy in white patients with Graves' disease.

		Allele***	OR	Populacja [Piśmiennictwo] Population [Reference]
HLA klasa I HLA class I	HLA-A		NS	Anglia [91], Dania [16], Holandia [176]
	HLA-B		NS	Anglia [91], Dania [16], Holandia [176]
		B*08 (B8)	OR>1	Węgry [50,163]
HLA klasa II HLA class II	HLA-C		NS	Dania [16], Holandia [176], Węgry [163]
	HLA-DP	DPB1*0201 (DPB2.1)	OR<1	Anglia [191]
	HLA-DQ		NS	Anglia [191], Holandia [176]
	HLA-DR		NS	Anglia [4,91,190], USA [180]
		DRB1*03 (DR3)	OR>1	Niemcy [152], Węgry [50]
	DRB1*03 (DR3)	OR<1	Włochy [34]	
	DRB1*04 (DR4)	OR<1	Kanada [51], Holandia [176]	
	DRB1*07 (DR7)	OR<1	Niemcy [7]	
	DRB3*01 (DR52)	OR>1	Niemcy [30]	
HLA klasa III HLA class III	LTα		NS	Niemcy i Anglia [7]

* W tabeli przedstawiono tylko grupy alleli, które były znamienne związane z rozwojem oftalmopatii tarczycowej.

** W nawiasach przedstawiono nazwy serologiczne cząsteczek HLA [114]. OR – (ang. odds ratio) iloraz szans: OR>1 sugeruje, że badany allel zwiększa ryzyko wystąpienia choroby, zaś OR<1 sugeruje, że badany allel zmniejsza ryzyko wystąpienia choroby („allel ochronny”). NS – (ang. *not significant*) brak znamiennej statystycznie asocjacji. LTα – limfotoksyna α.

* Only groups of alleles which were significantly associated with the development of ophthalmopathy are presented in the table.

** The serological nomenclature of the HLA system are presented in brackets [114]. OR>1 - susceptibility allele; OR < 1 - protective allele. NS – not significant. LTα - lymphotoxin α

tym, że na rozwój i przebieg choroby GD w różnych populacjach wpływają różne czynniki genetyczne [181]. Jednakże obie prace wskazują na związek pomiędzy regionem TNF a rozwojem oftalmopatii, potwierdzając znaczącą rolę tej cytokiny w patogenezie zapalenia w tkankach pozagłokowych. Można więc przypuszczać, że terapia biologiczna anty-TNF może okazać się skuteczna w leczeniu TAO, podobnie jak reumatoidalnego zapalenia stawów.

Polimorfizm genu CTLA-4

Istnieją prace sugerujące, że polimorfizm genu kodującego cząsteczkę CTLA-4 w eksonie 1 (A49G) wpływa na przebieg nadczynności tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa. Opisano bowiem asocjację pomiędzy allelem CTLA-4 49G a stężeniem tyroksyny lub mianem przeciwciał przeciwtarczycowych (przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej i tyreoglobulinie) [66, 199]. Ponadto u chorych z GD w populacjach azjatyckich, częstość występowania remisji immunologicznej (niewykrywalnych przeciwciał przeciwko receptorowi dla TSH) oraz remisji klinicznej po terapii tyreostatykami była znacząco mniejsza u chorych z genotypem 49G/G w porównaniu do chorych z genotypem A/A

[95,186]. Związek polimorfizmu CTLA-4 ze skutecznością leczenia farmakologicznego nadczynności tarczycy oczekuje obecnie na potwierdzenie w badaniach obejmujących populację rasy białej.

Wiele kontrowersji wywołały badania dotyczące związku polimorfizmu genu CTLA-4 A49G z rozwojem oftalmopatii tarczycowej (tab. 10). W pracy Vaidya i współautorów stwierdzono, że genotypy 49G/G i A/G były związane z wystąpieniem klinicznie jawnej oftalmopatii i ze stopniem zaawansowania zmian ocznych u chorych z GD w populacji z Wielkiej Brytanii [172]. Ten sam zespół badaczy potwierdził swoje wyniki w kolejnej pracy, analizując większą grupę chorych z GD [175]. Wyniki tych badań sugerowały użycie testu genetycznego w celu oceny ryzyka rozwoju TAO u chorych z GD. Niestety, wiele prac z różnych ośrodków na świecie, w tym również z Wielkiej Brytanii, nie potwierdziło znamiennej asocjacji pomiędzy polimorfizmem genu CTLA-4 A49G a oftalmopatią [4, 6, 34, 132, 180, 199]. W obecnej pracy, częstość występowania genotypów 49G/G i A/G nie różniła się znamienne u chorych z TAO w porównaniu do chorych z GD bez oftalmopatii. Ponadto allel 49G nie korelował z ciężkością zmian ocznych, sugerując

Tabela 10.

Badania asocjacji między polimorfizmem genu CTLA-4 (A49G) a rozwojem oftalmopatii tarczycowej (TAO) u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD).

Table 10.

Studies analysing the association of CTLA-4 (A49G) gene polymorphism with the development of ophthalmopathy in patients with Graves' disease (GD).

Populacja [Piśmiennictwo] Population [Reference]	Grupy badane Studied subjects	Genotypy Genotypes			P=
		AA	AG	GG	
Niemcy [6]	TAO (n=135)	24%	76%*		NS
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=124)	24%	76%*		
Anglia – Newcastle upon Tyne [172]	TAO (n=94)	22%	53%	24%	0.012
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=94)	40%	43%	17%	
Włochy [34]	TAO (n=54)	78%**		22%	NS
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=38)	87%**		13%	
Korea [132]	TAO (n=26)	4%	38%	58%	NS
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=47)	6%	32%	62%	
USA [180]	TAO (n=85)	31%	49%	20%	NS
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=52)	31%	48%	21%	
Anglia – Birmingham [4]	TAO (n=161)	33%	51%	16%	NS
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=323)	26%	56%	19%	
Słowacja [199]	TAO (n=33)	33%	67%*		NS
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=34)	41%	59%*		
Japonia [23]	TAO (n=99)	12%	41%	46%	NS
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=220)	7%	45%	48%	
Anglia - Newcastle upon Tyne [175]	TAO (n=129)	21%	48%	31%	0.006
	GD bez oftalmopatii GD without ophthalmopathy (n=172)	35%	45%	20%	

W pracach analizowano wspólnie genotypy *AG+GG lub **AA+AG. NS – (ang. *not significant*) brak znamiennej statystycznie asocjacji.

Genotypes *AG+GG or **AA+AG were analysed together. NS – not significant.

że polimorfizm genu CTLA-4 nie odgrywa istotnej roli w rozwoju oftalmopatii. Powyższe wyniki oraz niemożność powtórzenia wyników grupy badaczy z Newcastle przez różne ośrodki wskazuje, że jest mało prawdopodobne, aby analiza polimorfizmu CTLA-4 A49G okazała się przydatna w identyfikacji nowych czynników predysponujących do TAO.

Polimorfizm genu IL-6

Istnieje szereg dowodów świadczących, że interleukina 6 (IL-6) może odgrywać istotną rolę w patogenezie TAO: (i) w badaniach *in situ* stwierdzono, że ekspresja mRNA dla IL-6 w tkankach pozagałkowych od chorych z TAO koreluje z aktywnością choroby oraz z objętością tkanek pozagałkowych; (ii) w surowicy chorych z TAO stwierdza się podwyższone stężenie tej cytokiny; (iii) w badaniach *in vitro* IL-6 stymuluje ekspresję potencjalnego autoantygen- receptora dla TSH na fibroblastach oczodołowych [69, 87, 121, 124, 149, 185]. Nadmierna produkcja IL-6 u chorych z oftalmopatią może wynikać z nadmiaru czynników stymulujących i/lub genetycznie uwarunkowanych różnic w kontroli ekspresji genu dla IL-6. Istnieją prace sugerujące, że polimorfizmy promotora genu IL-6, a zwłaszcza polimorfizm w pozycji -174 (G-174C), mogą wpływać na poziom ekspresji genu. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że allel -174C charakteryzuje się zmniejszoną produkcją IL-6 [47, 168]. Ponadto polimorfizm promotora genu dla IL-6 G-174C jest związany ze zwiększoną podatnością na rozwój różnych, przewlekłych chorób zależnych od IL-6, między innymi: osteoporozy, choroby wieńcowej, cukrzycy typu 2 i chorób autoimmunologicznych [45-47, 75, 76, 80, 104, 133, 182, 183]. Na tej podstawie sformułowano założenie obecnej pracy, że polimorfizm IL-6 (G-174C) może odgrywać ważną rolę w patogenezie TAO.

Częstość występowania allelu -174C u zdrowych ochotników w populacji polskiej była zbliżona do częstości uprzednio opisywanych w innych grupach kontrolnych rasy białej (od 40% do 44%) [47, 76, 130, 142]. U chorych z chorobą Gravesa-Basedowa nie stwierdzono zmniejszonej częstości występowania genotypów -174C/C i G/C w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami, jak to uprzednio opisano w innych chorobach autoimmunologicznych. Brak znamiennej asocjacji G-174C z podatnością na rozwój GD wykazano również w populacji z Wielkiej Brytanii [77]. Po podziale chorych w zależności od zmian ocznych stwierdzono, że rozkład genotypów -174C/C i G/C był równomierny u chorych z TAO i chorych z GD bez oftalmopatii. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy częstością występowania allelu -174C a stopniem zaawansowania zmian ocznych [27]. Powyższe wyniki sugerują, że polimorfizm promotora genu IL-6 (G-174C) nie wpływa na rozwój i przebieg choroby Gravesa-Basedowa.

Polimorfizmy genu IL-13

Immunoglobuliny klasy E (IgE) są głównymi mediatorami reakcji alergicznych. W badaniach klinicznych stwierdzono jednak, że podwyższone stężenie IgE występuje również u ok. 30-40% chorych z GD

i jest związane z rozwojem oftalmopatii oraz gorszą odpowiedzią na leczenie farmakologiczne nadczynności tarczycy [97, 120, 150, 198, 203]. Choć przeciwciała przeciwtarczycowe należą głównie do klasy IgG, w autoimmunologicznych chorobach tarczycy stwierdzono przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej i receptorowi dla TSH w klasie IgE [58,117]. Ponadto przeciwciała klasy IgE oraz komórki tuczne stwierdzono *in situ* w tarczycy i tkankach pozagałkowych, co sugeruje, że mogą one odgrywać istotną rolę w zapaleniu autoimmunologicznym w chorobie Gravesa-Basedowa [73, 145, 159, 193].

Główną cytokiną Th2 odpowiedzialną za powstanie przeciwciał IgE jest interleukina 13 (IL-13) [155, 179]. Poza produkcją IgE, interleukina 13 może odgrywać istotną rolę regulacji nadzoru immunologicznego oraz rozwoju chorób autoimmunologicznych, ponieważ stwierdzono zaburzoną produkcję tej cytokiny u osób genetycznie predysponowanych do rozwoju cukrzycy typu 1 [101]. W GD wzmożoną ekspresję mRNA dla IL-13 stwierdzono w tarczycy i tkankach pozagałkowych [2, 185]. Ekspresja cytokin klasy Th2 w tkankach pozagałkowych w TAO jest charakterystyczna dla okresu „wygasania” zapalenia autoimmunologicznego [5, 69, 185].

Gen kodujący IL-13 znajduje się na chromosomie 5q31-33. Interesujący jest fakt, że *locus* 5q31-33 został sprzężony z podatnością na rozwój choroby GD lub autoimmunologicznych chorób tarczycy w populacji japońskiej i chińskiej, ale nie w populacjach rasy białej [3, 84, 169, 184]. Wynik ten sugeruje, że *locus* ten jest specyficzny dla populacji wschodnio-azjatyckich. Region 5q31-33 został również sprzężony w syntezę IgE, podatnością na rozwój astmy i atopowego zapalenia skóry w różnych populacjach [108, 197]. Choć w regionie 5q31-33 znajdują się geny kodujące również inne ważne cytokiny, takie jak: IL-3, IL-4, IL-5 i IL-9, dotychczasowe badania sugerują, że polimorfizmy genu IL-13 wpływają na poziom IgE [54, 62, 72, 143, 177]. Choć początkowo stwierdzono, że polimorfizm genu IL-4 w pozycji -590 (C-590T) jest związany z podatnością na rozwój GD w populacji z Wielkiej Brytanii, kolejne badanie nie potwierdziło jednak tej asocjacji [67, 77].

W obecnej pracy badaliśmy dwa potencjalnie funkcjonalne polimorfizmy genu kodującego IL-13: w regionie promotora w pozycji -1112 (C-1112T), który reguluje transkrypcję genu oraz w eksonie 4 w pozycji 2044 (G2044A), która doprowadza do zamiany aminokwasów (arginina na glutaminę) w cząsteczce IL-13 i może wpływać na interakcje ligand-receptor [54, 62]. Allele -1112T oraz 2044A były względem siebie w nierównoważeniu sprzężeń, co pozostawało w zgodzie z wynikami poprzednich prac [54]. Wyniki tej analizy sugerują, że allele oraz haplotypy genu IL-13 nie wpływają na podatność na rozwój GD w populacji polskiej. Powyższe wyniki potwierdzono badając częstość występowania polimorfizmów genu IL-13: C-1112T oraz G2044A w dodatkowej grupie kontrolnej – osób powyżej 100 lat, które nie chorowały na choroby autoimmunologiczne (wyników nie przedstawiono) [24].

Rozkłady genotypów, alleli i haplotypów polimorfizmów genu IL-13 (C-1112T oraz G2044A) nie różniły się znacząco u chorych z TAO w porównaniu z chorymi z GD bez oftalmopatii. Ponadto, polimorfizmy genu IL-13 nie były związane z stopniem nasilenia tyreotoksycyzy (objętością tarczycy, stężeniem hormonów tarczycy oraz przeciwciał przeciw tarczycy) u chorych z GD (wyników nie przedstawiono) [24]. Powyższe wyniki sugerują, że polimorfizmy genu IL-13 nie wpływają na przebieg choroby GD. Z uwagi na możliwą specyficzność rasową, wskazane są dalsze badania analizujące asocjacje polimorfizmów genu IL-13 z rozwojem i przebiegiem GD w populacji japońskiej i chińskiej. Wstępne wyniki sugerują, że polimorfizmy genu IL-13 C-1112T oraz G2044A są związane z podatnością na rozwój GD, ale nie wpływają na rozwój oftalmopatii tarczycowej w populacji japońskiej (Hiromatsu Y, dane nieopublikowane). Powyższe wyniki mogą ponownie wskazywać na różnice w podłożu genetycznym GD w różnych populacjach [181].

Podsumowanie i wnioski pracy

- (1) Polimorfizm genu CTLA-4 (A49G) oraz allel HLA-DRB1*03 są silnie związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej.
- (2) Polimorfizm TNF G-308A jest związany z predyspozycją do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa, lecz związek ten jest wtórny w stosunku do HLA-DRB1*03.
- (3) Polimorfizm genu TNF w pozycji -238 (G-238A), lub gen będący w niezrównoważeniu sprzężeń, może modyfikować przebieg choroby Gravesa-Basedowa: allel TNF -238A ma wpływ ochronny przed rozwojem oftalmopatii tarczycowej.
- (4) Polimorfizm genu CTLA-4 (A49G) oraz allele HLA-DRB1 nie są związane z rozwojem klinicznie jawnej oftalmopatii u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa.
- (5) Polimorfizmy genów kodujących IL-6 (G-174C) oraz IL-13 (C-1112T, G2044A) nie są związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa i nie wpływają na rozwój ani na przebieg zmian ocznych.
- (6) Rozwój oftalmopatii tarczycowej jest związany z czynnikami środowiskowymi i endogennymi, takimi jak wiek oraz palenie papierosów.

Rozwój i przebieg choroby Gravesa-Basedowa (GD) zależy od wielu czynników genetycznych i środowiskowych. W podłożu genetycznym GD należy wyróżnić czynniki, które warunkują predyspozycję do choroby oraz czynniki modyfikujące jej przebieg. Poznanie polimorfizmów genów wpływających na przebieg GD, w tym na rozwój klinicznie jawnej oftalmopatii tarczycowej (TAO), może przynieść istotny postęp w diagnostyce, profilaktyce i skutecznej terapii tej choroby [110]. W przedstawionej pracy stwierdzono, że allele/haplotypy TNF są związane z wystąpieniem klinicznie jawnej TAO. Powyższe wyniki potwierdzają istotną rolę tej cytokiny w patogenezie oftalmopatii i prawdopodobnie leki

blokujące TNF będą zastosowane w terapii zaawansowanych postaci TAO, podobnie jak reumatoidalnego zapalenia stawów. Ponadto, polimorfizm TNF G-238A może okazać się jednym z markerów genetycznych prognozujących rozwój oftalmopatii u chorych z GD. Konieczne jest jednak powtórzenie wyników asocjacji TNF G-238A z oftalmopatią w innych populacjach oraz poznanie innych polimorfizmów genów modyfikujących przebieg GD. Istnieje bowiem możliwość, że rozwój oftalmopatii jest zależny od interakcji wielu genów, które mogą się różnić w różnych populacjach.

Piśmiennictwo

1. Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, Bunce M, Ling KL, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2003; 62: 527-535
2. Ajjan RA, Watson PF, Weetman AP. Detection of IL-12, IL-13, and IL-15 messenger ribonucleic acid in the thyroid of patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 666-669
3. Akamizu T, Hiratani H, Ikegami S, Rich SS, Bowden DW. Association study of autoimmune thyroid disease at 5q23-q33 in Japanese patients. *J Hum Genet* 2003; 48: 236-242
4. Allahabadi A, Heward JM, Nithiyanthan R, Gibson SM, Reuser TT, Dodson PM, Franklyn JA, Gough SC. MHC class II region, CTLA4 gene, and ophthalmopathy in patients with Graves' disease. *Lancet* 2001; 358: 984-985
5. Aniszewski JP, Valyasevi RW, Bahn RS. Relationship between disease duration and predominant orbital T cell subset in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 776-780
6. Badenhop K, Donner H, Braun J, Siegmund T, Rau H, Usadel KH. Genetic markers in diagnosis and prediction of relapse in Graves' disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 98-100
7. Badenhop K, Schwarz G, Schleusener H, Weetman AP, Recks S, Peters H, Bottazzo GF, Usadel KH. Tumor necrosis factor beta gene polymorphisms in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 287-291
8. Bahn RS, Dutton CM, Heufelder AE, Sarkar G.A genomic point mutation in the extracellular domain of the thyrotropin receptor in patients with Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 256-260
9. Bahn RS. Pathophysiology of Graves' ophthalmopathy: the cycle of disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1939-1946
10. Baj Z, Ferenc T, Lewinski A. Immunopathology of Graves'-Basedow disease. *Postepy Hig Med Dosw* 1997; 51: 531-46.
11. Ban Y, Greenberg DA, Concepcion E, Skrabanek L, Villanueva R, Tomer Y. Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15119-24
12. Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, Bruno-Bossio G, Nardi M, Bartolomei MP, Lepri A, Rossi G, Martino E, Pinchera A. Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 1998; 338: 73-78
13. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C. Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev* 2000; 21: 168-99
14. Bayley JP, de Rooij H, van den Elsen PJ, Huizinga TW, Verweij CL. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine* 2001; 14: 316-323
15. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun [w druku]*
16. Bech K, Lumholtz B, Nerup J, Thomsen M, Platz P, Ryder LP, Svejgaard A, Siersbaek-Nielsen K, Hansen JM, Larsen JH. HLA antigens in Graves' disease. *Acta Endocrinol* 1977; 86: 510-516.
17. Bednarczuk T, Kennerdell JS, Wall JR. Pathophysiology and Etiology of Thyroid Associated Ophthalmopathy. In *Thyroid Disease- Endocrinology, Surgery, Nuclear Medicine and Radiotherapy* (Falk S.A, ed). New York:Raven Press 1997: 341-358

18. Bednarczuk T, Kiljanski J, Mrowiec T, Slon M, Ing E, Stolarski C, Kennerdell JS, Górski A, Nauman J, Wall JR. T cell interactions with extracellular matrix proteins in patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Autoimmunity* 1998; 27: 221-230
19. Bednarczuk T, Stolarski C, Pawlik E, Slon M, Rowinski M, Kubota S, Hiromatsu Y, Bartoszewicz Z, Wall JR, Nauman J. Autoantibodies reactive with extracellular matrix proteins in patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 1999; 9: 289-295
20. Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Inoue Y, Yamamoto K, Wall JR, Nauman J. T-cell-mediated immunity in thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 2002; 12: 209-215
21. Bednarczuk T, Nauman J. Patogeneza orbitopatii tarczycowej. *Endokrynol Pol* 2002; 53: 65-78
22. Bednarczuk T, Nauman J. Wpływ czynników genetycznych na rozwój i przebieg choroby Gravesa-Basedowa. *Endokrynol Pol* 2002; 53 (suppl 2): 81-96
23. Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Fukutani T, Jazdzewski K, Miskiewicz P, Osikowska M, Nauman J. Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and non-genetic factors with Graves' ophthalmopathy in European and Japanese populations. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 13-18
24. Bednarczuk T, Placha G, Jazdzewski K, Kuryłowicz A, Kloza M, Makowska U, Hiromatsu Y, Nauman J. Interleukin-13 gene polymorphisms in patients with Graves' disease. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 519-25
25. Bednarczuk T, Makowska U, Nauman J. Development of Graves' disease in a patient under immunosuppressive therapy after liver transplantation. *J Endocrinol Invest*. 2003; 26: 257-260
26. Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Seki N, Ploski R, Fukutani T, Kuryłowicz A, Jazdzewski K, Chojnowski K, Itoh K, Nauman J. Association of tumor necrosis factor (TNF) and HLA-DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Human Immunology* 2004; 65:632-639.
27. Bednarczuk T, Kuryłowicz A, Hiromatsu Y, Kiljanski J, Telichowska A, Nauman J. Association of G-174C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter with Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity* 2004; 37: 223-226.
28. Bednarek J, Sowiński P. Schemat postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w orbitopatii tarczycowej. *Endokrynol Pol* 2002; 53 (suppl 1): 59-65
29. Bertolaccini ML, Atsumi T, Lanchbury JS, Caliz AR, Katsumata K, Vaughan RW, Kondatis E, Khamashta MA, Koike T, Hughes GR. Plasma tumor necrosis factor alpha levels and the -238*A promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2001; 85:198-203
30. Boehm BO, Kuhn P, Manfras BJ, Chen M, Lee JC, Holzberger G, Seidl S, Schifferdecker E, Schumm-Draeger PM, Usadel KH. HLA-DRB3 gene alleles in Caucasian patients with Graves' disease. *Clin Invest* 1992; 70: 956-960
31. Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, Breedveld FC, Verweij CL. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol* 1997; 36: 516-521
32. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedus L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish Twin Cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 930-934
33. Burch HB, Wartofsky L. Graves' ophthalmopathy: current concepts regarding pathogenesis and management. *Endocrine Reviews* 1993; 14: 747-793
34. Buzzetti R, Nistico L, Signore A, Cascino I. CTLA-4 and HLA gene susceptibility to thyroid-associated orbitopathy. *Lancet* 1999; 354: 1824
35. Chen QY, Huang W, She JX, Baxter F, Volpe R, Maclaren NK. HLA-DRB1*08, DRB1*03/DRB3*0101, and DRB3*0202 are susceptibility genes for Graves' disease in North American Caucasians, whereas DRB1*07 is protective. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3182-3186
36. Cuddihy RM, Bahn RS. Lack of an association between alleles of interleukin-1 alpha and interleukin-1 receptor antagonist genes and Graves' disease in a North American Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4476-4478.
37. Cuddihy RM, Schaid DS, Bahn RS. Multivariate analysis of HLA loci in conjunction with a thyrotropin receptor codon 52 polymorphism in conferring risk of Graves' disease. *Thyroid* 1996; 6: 261-265
38. de Jong BA, Westendorp RG, Bakker AM, Huizinga TW. Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production. *Genes Immun* 2002; 3: 25-29
39. Dickinson AJ, Perros P. Controversies in the clinical evaluation of active thyroid-associated orbitopathy: use of a detailed protocol with comparative photographs for objective assessment. *Clin Endocrinol* 2001; 55: 283-303
40. Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, Herwig J, Usadel KH, Badenhoop K. CTLA4 Alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 143-146
41. Eckstein A, Quadbeck B, Mueller G, Rettenmeier AW, Hoermann R, Mann K, Steuhl P, Esser J. Impact of smoking on the response to treatment of thyroid associated ophthalmopathy. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 773-776
42. Fabris M, Di PE, D'Elia A, Damante G, Sinigaglia L, Ferraccioli G. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 29-33
43. Farid NR, Balazs C. The genetics of thyroid associated ophthalmopathy. *Thyroid*. 1998; 8: 407-409.
44. Fatourechi V, Ahmed DD, Schwartz KM. Thyroid acropachy: report of 40 patients treated at a single institution in a 26-year period. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5435-5441
45. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:1334-1339
46. Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnero P, Humphries SE, Greenspan SL. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 255-259
47. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-1376
48. Flynn JC, Rao PV, Gora M, Alsharabi G, Wei W, Giraldo AA, David CS, Banga JP, Kong YM. Graves' hyperthyroidism and thyroiditis in HLA-DRB1*0301 (DR3) transgenic mice after immunization with thyrotropin receptor DNA. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 35-40
49. Fong CW, Siddiqui AH, Mark DF. Characterization of protein complexes formed on the repressor elements of the human tumor necrosis factor alpha gene. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15: 887-895
50. Frecker M, Stenszky V, Balazs C, Kozma L, Kraszits E, Farid NR. Genetic factors in Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 1986; 25: 479-485
51. Frecker M, Mercer G, Skanes VM, Farid NR. Major histocompatibility complex (MHC) factors predisposing to and protecting against Graves' eye disease. *Autoimmunity* 1988;1: 307-315
52. Gerding MN, Terwee CB, Dekker FW, Koornneef L, Prummel MF, Wiersinga WM. Quality of life in patients with Graves' ophthalmopathy is markedly decreased: measurement by the medical outcomes study instrument. *Thyroid* 1997; 7: 885-889
53. Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Nino P, Cadahia V, Saro C, Dieguez MA, Lopez-Larrea C. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1101-1106
54. Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritsch C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E, Martinez FD. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 506-513
55. Gromniak E, Miklaszewicz A, Syrenicz A, Kulig G, Czekalski S, Pilarska K. HLA antigens and organ specific antimicrobial antibodies in patients with autoimmune polyglandular syndromes (APS). *Endokrynol Pol* 2003; 54: 269-276
56. Grzywa M, Maciejko-Meresta B. Określenie podatności na leczenie farmakologiczne w chorobie Gravesa-Basedowa. *Pol Tyg Lek* 1991; 46: 822-823
57. Gunji K, Kubota S, Swanson J, Kiljański J, Bednarczuk T, Wengrowicz S, Salvi M, Wall JR. Role of the eye muscles in

- thyroid eye disease: identification of the principal autoantigens. *Thyroid* 1998; 8: 553-556
58. Guo J, Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid peroxidase autoantibodies of IgE class in thyroid autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82: 157-162
 59. Hagg E, Asplund K. Is endocrine ophthalmopathy related to smoking? *Br Med J* 1987; 295: 634-635
 60. Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 1956; 20: 309-311
 61. Heesen M, Kunz D, Bachmann-Mennenga B, Merk HF, Bloemeke B. Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)-alpha-308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: Association with TNF-alpha response of granulocytes to endotoxin stimulation. *Crit Care Med* 2003; 31: 211-214
 62. Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto R *et al.* Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 549-559
 63. Heufelder AE, Bahn RS. Graves' immunoglobulins and cytokines stimulate the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cultured Graves' orbital fibroblasts. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 529-537
 64. Heufelder AE, Scriba PC. Characterization of adhesion receptors on cultured microvascular endothelial cells derived from the retroorbital connective tissue of patients with Grave's ophthalmopathy. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 51-60
 65. Heward JM, Allahabadi A, Daykin J, Carr-Smith J, Daly A, Franklyn JA, Gough SCL. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and family based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3394-3397
 66. Heward JM, Allahabadi A, Armitage M, Hattersley A, Dodson PM, Macleod K, Carr-Smith J, Daykin J, Daly A, Sheppard MC, Holder RL, Barnett AH, Franklyn JA, Gough SC. The development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2398-2401
 67. Heward JM, Nithiyananthan R, Allahabadi A, Gibson S, Franklyn JA, Gough SC. No association of an interleukin 4 gene promoter polymorphism with Graves' disease in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3861-3863
 68. Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, Itoh K. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998; 51: 605-612
 69. Hiromatsu Y, Yang D, Bednarczuk T, Miyake I, Nonaka K, Inoue Y. Cytokine profiles in eye muscle tissue and orbital fat tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1194-1199
 70. Hiromatsu Y, Bednarczuk T. The role of cytokines in the development of Graves' ophthalmopathy. In: *Thyroid Eye Disease* (Bahn RS, ed). Kluwer Academic Publishers. Boston. 2001: 45-65
 71. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, Riley J, Purvis J, Xu CF. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet [w druk]*
 72. Howard TD, Whittaker PA, Zaiman AL, Koppelman GH, Xu J, Hanley MT, Meyers DA, Postma DS, Bleecker ER. Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 377-384
 73. Hufnagel TJ, Hickey WF, Cobbs WH, Jakobiec FA, Iwamoto T, Eagle RC. Immunohistochemical and ultrastructural studies on the exenterated orbital tissues of a patient with Graves' disease. *Ophthalmology* 1984; 91: 1411-1419
 74. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS. TNF alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997; 72: 149-153
 75. Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology* 2001; 40: 656-61
 76. Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001; 22: 2243-2252
 77. Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bell JI, Wass JA, Welsh KI. Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 1984-1988
 78. Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bunce M, Bell JI, Wass JA, Welsh KI. Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* 2001; 55: 491-499
 79. Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1233-1237
 80. Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG. A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 885-888.
 81. Janik J, Wasowska M, Zgliczyński S, Górowski T, Jastrzębska H. Nadciśnienie oczne u chorych z wytrzeszczem naciekowo-obrzękowym w chorobie Gravesa-Basedowa. *Klin Oczna* 1990; 92: 46-47
 82. Jastrzębska H, Giętka-Czernel M, Janik J, Czech W, Zgliczyński S, Kamińska M. Zastosowanie nikotynamidu w zapobieganiu fazie naciekowo-obrzękowej zmian ocznych w chorobie Gravesa. *Endokrynol Pol* 2000; 51: 257-264
 83. Jastrzębska H, Giętka-Czernel M, Zgliczyński S. Standardy leczenia radiojodem łagodnych chorób tarczycy. *Endokrynol Pol* 2003; 54: 187-194
 84. Jin Y, Teng W, Ben S, Xiong X, Zhang J, Xu S, Shugart YY, Jin L, Chen J, Huang W. Genome-wide scan of Graves' disease: evidence for linkage on chromosome 5q31 in Chinese Han pedigrees. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1798-1803
 85. Jurecka-Lubieniecka B, Hasse-Lazar K, Kula D, Stęchły T, Krawczyk A, Szpak S, Jarzab M, Pawlaczek A, Gubala E. Predyspozycja genetyczna do choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej: związek z polimorfizmem genów TNF i CTLA-4. *Endokrynol Pol* 2002; 53 (supl 1): 214-215
 86. Juszczyński P, Kalinka E, Bienvenu J, Woszczek G, Borowiec M, Robak T, Kowalski M, Lech-Maranda E, Baseggio L, Coiffier B, Salles G, Warzocha K. Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. *Blood* 2002; 100: 3037-3040
 87. Jyonouchi SC, Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, Bahn RS. Interleukin-6 stimulates thyrotropin receptor expression in human orbital preadipocyte fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*. 2001; 11: 929-934
 88. Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, Ziegler-Heitbrock HW, Nedospasov SA, Breedveld FC, Verweij CL. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1998; 4: 724-733
 89. Kamizono S, Hiromatsu Y, Seki N, Bednarczuk T, Matsumoto H, Kimura A, Itoh K. A polymorphism of the 5'-flanking region of tumour necrosis factor alpha gene is associated with thyroid-associated ophthalmopathy in Japanese. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 759-764
 90. Kędzińska A, Turowski G. Układ zgodności tkankowej człowieka - HLA. Rozważania w świetle aktualnych poglądów. Współzależność między antygenami HLA a występowaniem określonych chorób. *Przegl Lek* 2001; 58: 7-8
 91. Kendall-Taylor P, Stephenson A, Stratton A, Papiha SS, Perros P, Roberts DF. Differentiation of autoimmune ophthalmopathy from Graves' hyperthyroidism by analysis of genetic markers. *Clin Endocrinol* 1988; 28: 601-610
 92. Kiljański J, Peele K, Stachura I, Pickeral J, Stolarski C, Kennerdell JS, Wall JR. Antibodies against striated muscle, connective tissue and nuclear antigens in patients with thyroid-associated ophthalmopathy: Should Graves' disease be considered a collagen disorder? *J Endocrinol Invest* 1997; 20: 585-591
 93. Kiljański J, Nauman J. Diagnostyka i leczenie orbitopatii tarczycowej. *Endokrynol Pol* 2002; 53 (supl 2): 97-117
 94. Kim JM, LaBree L, Levin L, Feldon SE. The relation of Graves' ophthalmopathy to circulating thyroid hormone status. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 72-74
 95. Kinjo Y, Takasu N, Komiya I, Tomoyose T, Takara M, Kouki T, Shimajiri Y, Yabiku K, Yoshimura H. Remission of Graves'

hyperthyroidism and A/G polymorphism at position 49 in exon1 of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2593-2596

96. Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nat Genet* 2003; 33: 469-475
97. Komiya I, Yamada T, Sato A, Kouki T, Nishimori T, Takasu N. Remission and recurrence of hyperthyroid Graves' disease during and after methimazole treatment when assessed by IgE and interleukin 13. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3540-3544
98. Komorowski J, Jankiewicz-Wika J, Suprunowicz I, Góraj B, Scibór J, Stępień H. Effect of methylprednisolone treatment on peripheral blood levels of matrix metalloproteinases (MMP-1, -2, -3, -8, -9), tissue inhibitors of MMP's (TIMP-1, -2), angiogenic cytokines (VEGF, bFGF) and adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) in patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO). *Endokrynol Pol* 2003; 54: 13-21
99. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 2000; 165: 6606-6611
100. Krassas GE, Pontikides N, Doukidis D, Heufelder G, Heufelder AE. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1, and soluble interleukin-1 receptor antagonist in patients with thyroid eye disease undergoing treatment with somatostatin analogues. *Thyroid* 2001; 11: 1115-1122
101. Krętowski A, Myśliwiec J, Kinalska I. In vitro interleukin-13 production by peripheral blood in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus and their first degree relatives. *Scand J Immunol* 2000; 51: 321-325
102. Krętowski A, Wawrusiewicz N, Mironczuk K, Myśliwiec J, Kretowska M, Kinalska I. Intercellular adhesion molecule 1 gene polymorphisms in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4945-4949
103. Krzystolik Z, Rutecka-Dębniak A, Pilarska K, Jarema A, Krzyżanowska-Świniarska B, Syrenicz A. Porównanie trzech metod leczenia postępującej obrzękowo-naciekowej oftalmopatii Gravesa. *Nowa Klin* 1998; 5: 848-852
104. Kubaszek A, Pihlajamaki J, Komarovski V, Lindi V, Lindstrom J, Eriksson J *et al.* Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2003; 52: 1872-1876
105. Kula D, Jurecka-Tuleja B, Gubala E, Krawczyk A, Szpak S, Jarzab M. Association of polymorphism of LTalpha and TNF genes with Graves' disease. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39 (suppl 2): 77-78
106. Kumar S, Bahn RS. Relative overexpression of macrophage-derived cytokines in orbital adipose tissue from patients with Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4246-4250
107. Lavard L, Madsen HO, Perrild H, Jacobsen BB, Svejgaard A. HLA class II associations in juvenile Graves' disease: indication for a strong protective role of the DRB1*0701, DQA1*0201 haplotype. *Tissue Antigens* 1997; 1997; 50: 639-641
108. Lonjou C, Barnes K, Chen H, Cookson WO, Deichmann KA, Hall IP, Holloway JW, Laitinen T, Palmer LJ, Wjst M, Morton NE. A first trial of retrospective collaboration for positional cloning in complex inheritance: assay of the cytokine region on chromosome 5 by the consortium on asthma genetics (COAG). *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10942-10947
109. Łącka K, Kordel M, Gembicki M. Human leukocyte antigen (HLA) complex and anti-thyroidal antibodies in Graves' disease. *Pol Tyg Lek* 1989; 44: 179-181
110. Łącka K. Genetyczne uwarunkowania wybranych chorób gruczolów dokrewnych. *Endokrynol Pol* 2003; 54: 594-599
111. Mackiewicz E. Porównanie metod leczenia oftalmopatii towarzyszącej chorobie Graves-Basedowa. *Okulistyka* 2002; 1: 35-39
112. Marocchi C, Bruno-Bossio G, Manetti L, Tanda ML, Miccoli P, Iacconi P, Bartolomei MP, Nardi M, Pinchera A, Bartalena L. The course of Graves' ophthalmopathy is not influenced by near total thyroidectomy: a case-control study. *Clin Endocrinol* 1999; 51: 503-508
113. Marga M, Denisova A, Sochnev A, Pirags V, Farid NR. Two HLA DRB 1 alleles confer independent genetic susceptibility to Graves disease: relevance of cross-population studies. *Am J Med Genet* 2001; 102: 188-191
114. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens* 2002; 60: 407-464
115. Maury CP, Liljeström M, Laiho K, Tiitinen S, Kaarela K, Hurme M. Tumor necrosis factor alpha, its soluble receptor I, and -308 gene promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis with or without amyloidosis: implications for the pathogenesis of nephropathy and anemia of chronic disease in reactive amyloidosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3068-3076
116. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNFalpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 2001; 371: 508-510
117. Metcalfe R, Jordan N, Watson P, Gullu S, Wiltshire M, Crisp M, Evans C, Weetman A, Ludgate M. Demonstration of immunoglobulin G, A, and E autoantibodies to the human thyrotropin receptor using flow cytometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1754-1761
118. Mirkiewicz-Sieradzka B, Pacura M. Oftalmopatia Graves-Basedowa w świetle współczesnych poglądów. *Prz Lek* 2000; 57: 307-312
119. Mittal KK. The HLA polymorphism and susceptibility to disease. *Vox Sanguinis* 1976; 31: 161-173
120. Molnar I, Horvath S, Balazs C. Detectable serum IgE levels in Graves' ophthalmopathy. *Eur J Med Res* 1996; 1: 543-546
121. Molnar I, Balazs C. High circulating IL-6 level in Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity* 1997; 25: 91-96
122. Muhlberg T, Kirchberger M, Spitzweg C, Herrmann F, Heberling HJ, Heufelder AE. Lack of association of Graves' disease with the A2 allele of the interleukin-1 receptor antagonist gene in a white European population. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 686-690
123. Myśliwiec J, Kinalska I. Palenie papierosów - zdefiniowany czynnik ryzyka oftalmopatii w chorobie Gravesa-Basedowa. *Pol. Arch. Med. Wew* 2001; 106: 967-971
124. Myśliwiec J, Krętowski A, Topolska J, Stępień A, Kinalska I. The influence of corticosteroids on IL-6/IL-6R system in patients with Graves' ophthalmopathy. *Pol Arch Med Wewn* 2002; 108: 739-744
125. Nauman J, Adler G, Faryna M, Targonska M. Eye muscle membranes antibodies. *Acta Endocrinol* 1989; 12: 90-98
126. Nauman J. Biological activity of antibodies circulating in endocrine ophthalmopathy. In *Dev Ophthalmol: Endocrine Ophthalmopathy. Molecular, Immunological and Clinical Aspects* (Kahaly G, ed). Basel, Karger, 1993; 25: 29-37
127. Nauman A, Nauman A. Choroby tarczycy. In *Choroby Wewnętrzne* (Wojtczak A, ed). PZWL 1995; tom III: 39-48
128. Newton J, Brown MA, Milicic A, Ackerman H, Darke C, Wilson JN, Wordsworth BP, Kwiatkowski D. The effect of HLA-DR on susceptibility to rheumatoid arthritis is influenced by the associated lymphotoxin alpha-tumor necrosis factor haplotype. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 90-96
129. Nowak M, Kos-Kudła B. Oftalmopatia tarczycowa Gravesa i Basedowa - patogeneza, objawy i wybrane aspekty leczenia. *Klin Oczna* 2000; 102: 455-460
130. Olomolaiye O, Wood NAP, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenetics* 1998; 25: 267
131. Pappa A, Lawson JM, Calder V, Fells P, Lightman S. T cells and fibroblasts in affected extraocular muscles in early and late thyroid associated ophthalmopathy. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 517-522
132. Park YJ, Chung HK, Park DJ, Kim WB, Kim SW, Koh JJ, Cho BY. Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. *Thyroid* 2000; 10: 453-459
133. Pascual M, Nieto A, Mataran L, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Martin J. IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2000; 1: 338-40
134. Pecold K. Patologia oka i oczodołu w chorobie Gravesa-Basedowa - diagnostyka i leczenie. *Endokrynol Pol* 2002; 53 (suppl 1): 47-50
135. Perros P, Crombie AL, Matthews JNS, Kendall-Taylor P. Age and gender influence the severity of thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 1993; 38: 367-372

136. Philippou G, Krimitzas A, Kaltsas G, Anastasiou E, Souvatzoglou A, Alevizaki M. HLA DQA1*0501 and DRB1*0301 antigens do not independently convey susceptibility to Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: 88-91
137. Pilarska K, Czekalski S, Syrenicz A, Andrzejewska W, Ciecchanowicz A, Krzystolik Z. Indywidualny wybór metody leczenia postępującej oftalmopatii obrzękowo-naciekowej w chorobie Gravesa-Basedowa. *Pol Tyg Lek* 1993; 48: 609-611
138. Ploski R, Ronningen KS, Thorsby E. HLA class II profile of a Polish population: frequencies of DRB1, DQA1, DQB1 and DPB1 alleles and DRB1-DQA1-DQB1 haplotypes. *Transplant Proc* 1996; 28: 3431-3432
139. Ploski R, Forre O. Genetic marker analysis. In: *Oxford Textbook of Rheumatology*. Oxford University Press 1998: 686-701
140. Ploski R, Bednarczuk T, Hiromatsu Y. Distribution of tumor necrosis factor (TNF)-alpha haplotypes in healthy Caucasians. *Arthritis Rheum [w druku]*
141. Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42: 501-504
142. Pola R, Flex A, Gaetani E, Flore R, Serricchio M, Pola P. Synergistic effect of -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 881-885
143. Postma DS, Bleeker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, Meyers DA, Levitt RC. Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 1995; 333: 894-900
144. Prummel MF, Wiersinga WM. Smoking and risk of Graves' disease. *JAMA* 1993; 269: 479-482
145. Raikow RB, Dalbow MH, Kennerdell JS, Compher K, Machen L, Hiller W, Blendermann D. Immunohistochemical evidence for IgE involvement in Graves' orbitopathy. *Ophthalmology* 1990; 97: 629-635
146. Ringold DA, Nicoloff JT, Kesler M, Davis H, Hamilton A, Mack T. Further evidence for a strong genetic influence on the development of autoimmune thyroid disease: the California twin study. *Thyroid* 2002; 12: 647-653
147. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, Verduyn W, Westendorp RG, de Vries RR, Breedveld FC, Verweij CL, Huizinga TW. TNF308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 129-134
148. Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Tamai H, Kuma K, Akamizu T, Tanimura M, Furugaki K, Yamamoto K, Sasazuki T. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1379-1386
149. Salvi M, Pedrazzoni M, Girasole G, Giuliani N, Minelli R, Wall JR, Roti E. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves' disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 197-202
150. Sato A, Takemura Y, Yamada T, Ohtsuka H, Sakai H, Miyahara Y, Aizawa T, Terao A, Onuma S, Junen K, Kanamori A, Nakamura Y, Tejima E, Ito Y, Kamijo K. A possible role of immunoglobulin E in patients with hyperthyroid Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3602-3605
151. Sato H, Lagan AL, Alexopoulou C, Vassilakis D, Ahmad T, Pantelidis P, Veeraghavan S, Renzoni E, Denton C, Black C, Wells AU, du Bois RM, Welsh KI. The TNF-863A allele strongly associates with antientomere antibody positivity in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 558-564
152. Schleusener H, Schernthaner G, Mayr WR, Kotulla P, Bogner U, Finke R, Meinhold H, Koppenhagen K, Wenzel KW. HLA-DR3 and HLA-DR5 associated thyrotoxicosis-two different types of toxic diffuse goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56: 781-785
153. Segni M, Pani MA, Pasquino AM, Badenhoop K. Familial clustering of juvenile thyroid autoimmunity: higher risk is conferred by human leukocyte antigen DR3-DQ2 and thyroid peroxidase antibody status in fathers. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3779-3782.
154. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang HJ, Kim YJ, Park HS, Hong SJ, Choi BW, Kim DJ, Park CS. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 397-401
155. Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunology Today* 2000; 21: 60-64.
156. Siegmund T, Usadel KH, Donner H, Braun J, Walfish PG, Badenhoop K. Interferon-gamma gene microsatellite polymorphisms in patients with Graves' disease. *Thyroid* 1998; 8: 1013-1017
157. Sieradzki J, Katra B, Mirkiewicz-Sieradzka B. Czynniki ryzyka wystąpienia oftalmopatii w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa. *Przegl Lek* 2000; 57: 321-323
158. Smerdel A, Lie BA, Ploski R, Koeleman BP, Forre O, Thorsby E, Undlien DE. A gene in the telomeric HLA complex distinct from HLA-A is involved in predisposition to juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1614-1619
159. Smith TJ, Parikh SJ. HMC-1 mast cells activate human orbital fibroblasts in coculture: evidence for upregulation of prostaglandin E2 and hyaluronan synthesis. *Endocrinology* 1999; 140: 3518-3525
160. Sowiński J, Stajgis P, Ziemiński A, Drews M, Sosnowski P, Kadłubowska-Trzcinska M. Total thyroidectomy in the treatment of Basedow's ophthalmopathy. *Exp Clin Endocrinol* 1991; 97: 348-53
161. Standardy Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego. Ophthalmopatia naciekowo-obrzękowa. *Endokrynol Pol* 2003; 54: 385-387
162. Stankiewicz A. Orbitopatia i oftalmopatia Gravesa. *Klin Oczna* 1997; 99: 59-63
163. Stenszky V, Balazs C, Kozma L, Rochlitz S, Bear JC, Farid NR. Identification of subsets of patients with Graves' disease by cluster analysis. *Clin Endocrinol* 1983; 18: 335-345
164. Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1162-1164
165. Stephens M, Smith N, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978-981
166. Tang X, Fenton MJ, Amar S. Identification and functional characterization of a novel binding site on TNF-alpha promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4096-4101
167. Tellez M, Cooper J, Edmonds C. Graves' ophthalmopathy in relation to cigarette smoking and ethnic origin. *Clinical Endocrinology* 1992; 36: 291-294
168. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275: 18138-18144
169. Tomer Y, Ban Y, Concepcion E, Barbesino G, Villanueva R, Greenberg DA, Davies TF. 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: 736-747
170. Tomer Y, Davies TF. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr Rev* 2003; 24: 694-717
171. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506-511
172. Vaidya B, Imrie H, Perros P, Dickinson J, McCarthy MI, Kendall-Taylor P & Pearce SHS. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism confers susceptibility to thyroid-associated orbitopathy. *Lancet* 1999; 354: 743-744
173. Vaidya B, Imrie H, Perros P, Young ET, Kelly WF, Carr D, Large DM, Toft AD, McCarthy MI, Kendall-Taylor P, Pearce SHC. The cytotoxic T lymphocyte antigen-4 is a major Graves' disease locus. *Human Mol Gen* 1999; 8: 1195-1199
174. Vaidya B, Kendall-Taylor P, Pearce SH. The genetics of autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5385-97
175. Vaidya B, Oakes EJ, Imrie H, Dickinson AJ, Perros P, Kendall-Taylor P, Pearce SH. CTLA4 gene and Graves' disease: association of Graves' disease with the CTLA4 exon 1 and intron 1 polymorphisms, but not with the promoter polymorphism. *Clin Endocrinol* 2003; 58: 732-735
176. van der Gaag R, Wiersinga WM, Koornneef L, Mourits MP, Prummel MF, Berghout A, de Vries RR, Schreuder GM, D'Amato J. HLA-DR4 associated response to corticosteroids in Graves' ophthalmopathy patients. *J Endocrinol Invest* 1990; 13: 489-492

177. van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeije LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, Bakker A, Verweij CL, Aarden LA, van der Zee JS. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun* 1999; 1: 61-65
178. Vatay A, Yang Y, Chung EK, Zhou B, Blanchong CA, Kovacs M, Karadi I, Fust G, Romics L L, Varga L, Yu CY, Szalai C. Relationship between complement components C4A and C4B diversities and two TNFA promoter polymorphisms in two healthy Caucasian populations. *Hum Immunol* 2003; 64: 543-552
179. Vercelli D. Genetics of IL-13 and functional relevance of IL-13 variants. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 389-393
180. Villanueva R, Inzerillo AM, Tomer Y, Barbesino G, Meltzer M, Concepcion ES, Greenberg DA, MacLaren N, Sun ZS, Zhang DM, Tucci S, Davies TF. Limited genetic susceptibility to severe Graves' ophthalmopathy: no role for CTLA-4 but evidence for an environmental etiology. *Thyroid* 2000; 10: 791-798
181. Villanueva R, Tomer Y, Greenberg DA, Mao C, Concepcion ES, Tucci S, Estilo G, Davies TF. Autoimmune thyroid disease susceptibility loci in a large Chinese family. *Clin Endocrinol* 2002; 56:45-51
182. Villuendas G, San Millan JL, Sancho J, Escobar-Morreale HF. The -597 G-->A and -174 G-->C polymorphisms in the promoter of the IL-6 gene are associated with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1134-1141
183. Vojarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003; 112: 409-413
184. Wakelkamp IM, Gerding MN, Van Der Meer JW, Prummel MF, Wiersinga WM. Both Th1- and Th2-derived cytokines in serum are elevated in Graves' ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 453-457
185. Wakelkamp IM, Bakker O, Baldeschi L, Wiersinga WM, Prummel MF. TSH-R expression and cytokine profile in orbital tissue of active vs. inactive Graves' ophthalmopathy patients. *Clin Endocrinol* 2003; 58: 280-287
186. Wang PW, Liu RT, Juo SH, Wang ST, Hu YH, Hsieh CJ, Chen MH, Chen IY, Wu CL. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 polymorphism and relapse of Graves' hyperthyroidism after antithyroid withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:169-73
187. Wanic K, Malecki M, Klupa T, Witek P, Kozek E, Sieradzki J. TNF-alpha and PC-1 gene polymorphisms and pre-diabetes quantitative features in the Polish population *Przegl Lek* 2002; 59: 888-891
188. Warmuz-Stangierska I, Czarnywojtek A, Stangierski R, Sowiński J. Jakość życia pacjentów z oftalmopatią tarczycową. *Endokrynol Pol* 2002; 53 (suppl 1): 106
189. Watson PF, French A, Pickering AP, McIntosh RS, Weetman AP. Lack of association between a polymorphism in the coding region of the thyrotropin receptor gene and Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1032-1035
190. Weetman AP, So AK, Warner CA, Foroni L, Fells P, Shine B. Immunogenetics of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 1988; 28: 619-628
191. Weetman AP, Zhang L, Webb S, Shine B. Analysis of HLA-DQB and HLA-DPB alleles in Graves' disease by oligonucleotide probing of enzymatically amplified DNA. *Clin Endocrinol* 1990; 33: 65-71
192. Weetman AP. Graves' disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 1236-1248
193. Werner SC, Wegelius O, Fierer JA, Hsu KC. Immunoglobulins (E,M,G) and complement in the connective tissues of the thyroid in Graves's disease. *N Engl J Med* 1972; 287: 421-425
194. Werner SC. Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease: recommendations of the Ad Hoc Committee of the American Thyroid Association. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44: 203-204
195. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-3199
196. Woolf B. On estimating the relationship between blood group and disease. *Ann Hum Genet.* 1955; 19: 251-253
197. Xu J, Postma DS, Howard TD, Koppelman GH, Zheng SL, Stine OC, Bleeker ER, Meyers DA. Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1163-1173
198. Yamada T, Sato A, Komiya I, Nishimori T, Ito Y, Terao A, Eto S, Tanaka Y. An elevation of serum immunoglobulin E provides a new aspect of hyperthyroid Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2775-2778
199. Zaletel K, Krhin B, Gaberscek S, Pirnat E, Hojker S. The influence of the exon 1 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene on thyroid antibody production in patients with newly diagnosed Graves' disease. *Thyroid* 2002; 12: 373-376
200. Zeggini E, Thomson W, Kwiatkowski D, Richardson A, Ollier W, Donn R: British Paediatric Rheumatology Study Group. Linkage and association studies of single-nucleotide polymorphism-tagged tumor necrosis factor haplotypes in juvenile oligoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3304-3311
201. Zgliczyński S, Jastrzębska H, Górowski T. Treatment of severe Graves' ophthalmopathy. *Exp Clin Endocrinol* 1991; 97: 399
202. Zgliczyński S, Jastrzębska H, Górowski T, Janik J, Kuś J, Hliniak A, Karczmarszyk R, Kukołowicz P. Wyniki 3-etapowego leczenia: (I) korytkoterapia, (II) akcelerator liniowy i (III) dekompresja oczodołów, 206 chorych z wytrzeszczem złośliwym w chorobie Graves-Basedowa. *Endokrynol Pol.* 1992; 43: 274-286
203. Ziemnicka K, Gryczyńska M, Bączek M, Stankowiak-Kulpa H, Czepczyński R, Sowiński J. Poziom immunoglobuliny E oraz skłonność do alergii u chorych z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy. *Endokrynol Pol* 2002; 53 (suppl 1): 397-398 [abstract]
204. Zuniga J, Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun* 2001; 2: 363-366

Podziękowania

Pragnę wyrazić wdzięczność Panu profesorowi J. Naumanowi za zainteresowanie mnie problemami choroby Gravesa-Basedowa i oftalmopatii oraz okazane mi wsparcie w badaniach dotyczących patogenezy tej choroby.

Powyższe badania nie byłyby jednak możliwe do wykonania bez życzliwości wielu osób. Chciałbym serdecznie podziękować (w kolejności alfabetycznej): dr K. Badenhoop (University Hospital, Frankfurt am Main, Niemcy); prof. E. Bar-Andziak, dr U. Ambroziak, dr K. Chojnowskiemu, dr J. Kiljańskiemu, dr P. Miskiewiczowi i dr M. Osikowskiej (Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii, AM w Warszawie); prof. Z. Gacjongowi, dr J. Góra i dr G. Placha (Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii, AM w Warszawie); dr Y. Hiromatsu i dr T. Fukutani (Kurume University School of Medicine, Japonia); prof. B. Jarzab i dr D. Kuli (Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Gliwice); dr K. Jażdżewskiemu (Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Nadciśnienia Tętniczego, AM w Gdańsku); prof. J. Kuźnickiemu i dr M. Mossakowskiej (Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa); prof. T. Romerowi i dr U. Oczkowskiej (Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa); dr R. Płoskiemu, dr P. Kuźniar i dr A. Skórce (Katedra i Zakład Medycyny Sądowej oraz Międzyzakładowa Pracownia Genetyki Molekularnej Człowieka, AM w Warszawie) oraz Kolegom i Koleżankom z Zakładu Endokrynologii IMDiK PAN za nieocenioną pomoc i współpracę w wykonanych badaniach genetycznych. Badania genetyczne były finansowane przez środki IMDiK PAN, które zostały przyznane na realizację projektu statutowego Zakładu Endokrynologii oraz środki Komitetu Badań Naukowych, które zostały przyznane na realizację projektu Nr 4PO5B 131 19.