

Choroba Gravesa i Basedowa (ChGiB) jest chorobą autoimmunologiczną, postacią nadczynności tarczycy. Podłoże i obraz kliniczny ChGiB są złożone i warunkowane wieloma czynnikami – przede wszystkim genetycznymi, a także środowiskowymi (w tym głównie paleniem tytoniu) i endogennymi (płeć żeńska). Orbitopatia tarczycowa (OT), będąca najczęstszą pozatarczycową manifestacją ChGiB, jest zespołem objawów ocznych wtórnych do procesów autoimmunologicznych w obrębie tkanek miękkich oczodołu w przebiegu ChGiB. Występuje u ok. 30% chorych i ujawnia się w różnym czasie choroby. Jest szczególnie związana z paleniem papierosów, a w jej terapii kluczowe znaczenie mają dożylnie pulsy glikokortykosteroidów (GKS).

W literaturze dostępne są dane o predylekcji genetycznej do zachorowania na ChGiB, gdzie uwagę zwraca się na udział polimorfizmów genetycznych głównego układu zgodności tkankowej (MHC – major histocompatibility complex) - genów układu HLA (human leukocyte antigen), biorących udział w patogenezie tzw. 'autoagresji'. Jednakże wobec modelu choroby wieloczynnikowej, wpływ innych zmian, np. epigenetycznych – będących możliwym 'łącznikiem' dla wpływu czynników środowiskowych, wydaje się wikłać jej występowanie, przebieg i możliwie odpowiedź kliniczną na zastosowane leczenie. Dostępne są wstępne doniesienia dotyczące zmian w metylacji genomowej komórek krwi obwodowej (limfocytów), będących głównym mechanizmem modyfikacji epigenetycznych kwasów nukleinowych, po leczeniu tyreostatykami oraz radiojodem u chorych ze świeżo rozpoznaną ChGiB, gdzie podkreślono występowanie hipometylacji genomu limfocytów u tych chorych oraz wzrost poziomu metylacji po przeprowadzeniu leczenia. Ponadto, zwraca się uwagę na regiony genomu zawierające odmiennie zmetylowane geny cytokin prozapalnych, cząsteczek adhezyjnych i uczestniczących w przekazaniu drugiego sygnału podczas prezentacji antygeny (ważne elementy patofizjologiczne chorób autoimmunizacyjnych), również dla patogeny samej OT.

Wydaje się więc zasadne zbadanie i pogłębienie wiedzy nt. implikacji epigenetycznych ChGiB oraz OT, aby w pełni zrozumieć etiologię, odmienności przebiegu choroby oraz odpowiedzi na leczenie. Celem projektu, badania prospektywnego, jest ocena zaburzeń metylacji całogenomowej komórek krwi obwodowej u pacjentów z ChGiB oraz OT w trakcie leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami.

Badaniem będą objęci pacjenci znajdujący się pod opieką Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Wymieniona Jednostka jest jednocześnie członkiem międzynarodowej grupy roboczej ds. orbitopatii: European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO). Udział pacjentów w projekcie będzie poprzedzony podpisaniem przez nich formularza świadomej zgody. Chorzy zostaną podzieleni na 2 grupy, w zależności od obrazu klinicznego ChGiB oraz OT: osoby z aktywną, umiarkowaną-do-ciężkiej orbitopatią oraz bez-/łagodną nieaktywną orbitopatią. Trzecią grupę będą stanowić zdrowe kontrole. Zostaną pobrane kolejno próbki do badań laboratoryjnych: w momencie rozpoznania choroby u wszystkich chorych z ChGiB (próba 1, P1), następnie po leczeniu przeciwtarczycowym chorych z ChGiB (w czasie  $\leq 12$  miesięcy) po uzyskaniu eutyreozy (P2) oraz wreszcie - po zakończeniu protokołu 12 pulsów GKS, zgodnie z aktualnymi zaleceniami grupy EUGOGO w grupie z aktywną orbitopatią, podczas gdy u pozostałych chorych w trakcie obserwacji nawrotu choroby (P3). Jedna próbka zostanie pobrana od zdrowych kontroli dobieranych zgodnie z wiekiem i płcią, bez chorób autoimmunologicznych oraz schorzeń tarczycy.

Procedury laboratoryjne obejmujące kolejno: pobranie materiału - krwi obwodowej żyłnej od chorych i kontroli, zabezpieczenie materiału (zamrożenie), izolację DNA, stworzenie bibliotek DNA bogatego w zmetylowane fragmenty, oraz sekwencjonowanie nowej generacji - zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe (RRBS) odbędą się w Zakładzie Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Następnie odbędą się analizy wyników: bioinformatyczna oraz biostatystyczna.

W projekcie zostanie porównany obraz metylacji DNA w grupie chorych i kontroli, a także zostaną przeprowadzone analizy porównujące go u chorych z różną prezentacją kliniczną oraz skupiające się na skuteczności leczenia.