

lek. Małgorzata Pawłowicz

**Specyfika oddziaływania wybranych
polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS*
na funkcję resztkową komórek β trzustki,
aktywność humoralnej odpowiedzi
autoimmunologicznej i progresję choroby
u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1**

rozprawa doktorska

Praca wykonana

w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. n. med., prof. nadzw. Elżbieta Adamkiewicz – Drożyńska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Anna Balcerska

Gdańsk 2013

Praca doktorska finansowana:

- w ramach badania własnego nr rej. AMG W-24 w okresie 22.04.2009 r. – 18.12.2009 r.
- w ramach projektu badawczego promotorskiego nr N N407 184137 Narodowego Centrum Nauki w okresie 7.10.2010 r. – 30.06.2013 r.

Projekt pracy doktorskiej nagrodzony w ramach programu „*Innodoktorant – stypendia dla doktorantów, II edycja*” (Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji, Priorytet VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki), współfinansowanego przez Pomorski Urząd Marszałkowski i Unię Europejską



Każdy z Was, młodzi przyjaciele, znajduje też w życiu jakieś swoje „Westerplatte”.

*Jakiś wymiar zadań, które musi podjąć i wypełnić.
Jakaś słuszną sprawę, o którą nie można nie walczyć.
Jakiś obowiązek, powinność, od której nie można się uchylić. Nie można „zdezertować”.*

Wreszcie — jakiś porządek prawd i wartości, które trzeba „utrzymać” i „obronić”, tak jak to Westerplatte, w sobie i wokół siebie. Tak, obronić — dla siebie i dla innych.

Błogosławiony Jan Paweł II

(Gdańsk, 12 czerwca 1987 r.)

*Pamięci Majora Mieczysława Mikołaja Słabego
– lekarza, obrońcy Westerplatte we wrześniu 1939 r.*

*oraz
mojej najukochańszej Babci,
której zabrakło w ostatnich dniach „mojego Westerplatte”*

Podziękowania

*„Sens walki powinien być mierzony nie jej szansami na zwycięstwo,
lecz wartościami, w obronie których walka została podjęta.”*

prof. Henryk Elzenberg

Pragnę z głębi serca podziękować

Współobrońcom „mojego Westerplatte”

– Najbliższym, Nauczycielom, Przyjaciółom i Współpracownikom:

najukochańszym Mamie, Bratu, † Babci i Dziadkowi

prof. dr hab. med. Januszowi Limonowi

mgr Lucynie Morzuch

dr inż. Annie Stanisławskiej-Sachadyn

dr n. med. Julii Kulczyckiej

dr n. med. Ewie Woś-Wasilewskiej

mec. Małgorzacie Szostawickiej

mgr Elżbiecie Krawczuk

dr Grzegorzowi Krzykowskiemu

dr Rafałowi Filipów

dr Sebastianowi Bentkowskiemu

p. Jackowi Suszyńskiemu

mgr Leszkowi Terleckiemu

† ks. mgr Michałowi Bakule

oraz wszystkim Pacjentom i ich Rodzinom

Spis treści

Spis tabel	15
Spis rycin	17
Wykaz stosowanych skrótów	21
Wstęp	24
Cukrzyca typu 1 jako szczególna postać narządowo swoistej choroby autoimmunologicznej	24
Genetyczne uwarunkowania rozwoju reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM	24
Geny zlokalizowane w regionie HLA jako dominujące czynniki genetyczne w rozwoju reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM	25
Polimorfizm 5'VNTR genu <i>INS</i> jako czynnik genetyczny związany z potencjalnymi zaburzeniami mechanizmów tolerancji centralnej na autoantygeny w patogenezie T1DM	25
Polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> jako czynnik genetyczny związany z potencjalnymi zaburzeniami procesu hamowania aktywacji limfocytów T w patogenezie T1DM	26
Polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> jako czynnik genetyczny związany z potencjalnymi zaburzeniami przekazywania sygnału do wnętrza limfocytów w patogenezie T1DM	27
Epidemiologia T1DM w populacji wieku rozwojowego na terenie województwa pomorskiego a potrzeba badań uwzględniających wieloczynnikowy, a szczególnie poligenowy, charakter choroby	28
Cele pracy	34
Materiały i metody	35
1. Ogólna charakterystyka badania	35
2. Etapy badania	35
2.1. Kwalifikacja pacjentów – moment rozpoznania T1DM	36
2.1.1. Opóźnienie diagnozy T1DM – definicja i kategorie	38
2.1.2. Ocena stanu klinicznego pacjenta w momencie rozpoznania T1DM	38
2.1.2.1. Kryteria rozpoznania cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA)	38
2.1.2.2. Kryteria rozpoznania nieketonowej hiperglikemii hiperosmolalnej (HHS)	39
2.1.2.3. Współwystępowanie cukrzycowej kwasicy ketonowej oraz nieketonowej hiperglikemii hiperosmolalnej (zespół nakładania DKA-HHS)	39
2.1.3. Rodzaje terapii stosowane u pacjentów zakwalifikowanych do badania	39
2.1.4. Ocena dobowego zapotrzebowania na insulinę	40
2.1.5. Pomiary antropometryczne	40
2.1.5.1. Pomiar masy ciała	41
2.1.5.2. Pomiar wysokości ciała	41
2.1.5.3. Wskaźniki oceniające stan odżywienia pacjenta	41
2.1.6. Badanie ankietowe oceniające poziom edukacji pacjenta (chorzy > 14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM	41
2.1.6.1. System oceny badania ankietowego oceniającego poziom edukacji pacjenta (chorzy>14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM	42

2.2.	Roczna obserwacja pacjentów zakwalifikowanych do badania	43
3.	Badania genetyczne – analiza wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i>, <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i>	44
3.1.	Analiza wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> – grupa badana	45
3.1.1.	Izolacja genomowego DNA	45
3.1.2.	Ocena jakościowa i ilościowa preparatów DNA	46
3.1.3.	Analiza bioinformatyczna sekwencji DNA badanych genów	46
3.1.4.	Analiza wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> – reakcja PCR-RFLP	47
3.1.4.1.	Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) z wykorzystaniem specyficznych starterów	47
3.1.4.2.	Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) z wykorzystaniem odpowiednich enzymów restrykcyjnych	47
3.1.4.3.	Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR	48
3.1.5.	Analiza polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>	49
3.1.5.1.	Analiza polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – reakcja PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów	49
3.1.5.2.	Analiza polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – reakcja RFLP z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego BbvI (BseXI)	51
3.1.5.3.	Analiza polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – reakcja sekwencjonowania	52
3.1.6.	Analiza polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i>	53
3.1.6.1.	Analiza polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – reakcja PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów	53
3.1.6.2.	Analiza polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – reakcja RFLP z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego RsaI	54
3.1.6.3.	Analiza polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – reakcja sekwencjonowania	56
3.1.7.	Analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> jako markera polimorfizmu 5'VNTR genu <i>INS</i>	56
3.1.7.1.	Analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> – reakcja PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów	56
3.1.7.2.	Analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> – reakcja RFLP z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego HphI	58
3.1.7.3.	Analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> – reakcja sekwencjonowania	59
3.2.	Analiza wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> – grupa kontrolna	60
3.2.1.	Analiza wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> – reakcja <i>blood-direct</i> PCR-RFLP	61
3.2.1.1.	Bezpośrednia z krwi reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>blood-direct</i> PCR) z wykorzystaniem specyficznych starterów	61
3.2.1.2.	Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) z wykorzystaniem odpowiednich enzymów restrykcyjnych – grupa kontrolna	63
4.	Ocena funkcji resztkowej komórek β trzustki	65
4.1.	Pomiar C-peptydu – zagadnienia przedanalizyczne	65
4.2.	Pomiar C-peptydu – metody analityczne	66
4.3.	Pomiar C-peptydu – kryteria analizy pomiarów resztkowej insulinosekrecji	66

5. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM	66
5.1. Oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA _{1c}) – zagadnienia przedanalizyczne	66
5.2. Oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA _{1c}) – metody analityczne	67
5.3. Oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA _{1c}) – kryteria analizy wyrównania metabolicznego T1DM oraz występowania remisji klinicznej choroby	67
6. Ocena aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej	67
6.1. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) oraz przeciwiinsulinowych (IAA) – zagadnienia przedanalizyczne	68
6.2. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) – metody analityczne	68
6.3. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) – kryteria analizy pomiarów	68
6.4. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciwiinsulinowych (IAA) – metody analityczne	70
6.5. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciwiinsulinowych (IAA) – kryteria analizy pomiarów	70
6.6. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw wyspom trzustkowym (ICA) – metody analityczne	70
6.7. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw wyspom trzustkowym (ICA) – kryteria analizy pomiarów	70
7. Ocena potencjalnego współistnienia innych chorób autoimmunologicznych w pierwszym roku trwania T1DM	71
7.1. Oznaczenia autoprzeciwciał związanych z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy (AIT) oraz celiakią (ChT) – zagadnienia przedanalizyczne	71
7.2. Oznaczenia autoprzeciwciał związanych z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy (AIT) oraz celiakią (ChT) – metody analityczne	71
7.3. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej (TPO) oraz przeciw tyreoglobulinie (TG) – kryteria analizy pomiarów oraz ich interpretacji klinicznej	72
7.4. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw transglutaminazie tkankowej (TGA) – kryteria analizy pomiarów oraz ich interpretacji klinicznej	73
8. Metody statystyczne	74
9. Zagadnienia etyczne	75
Wyniki	76
1. Ogólna charakterystyka badanej grupy	76
1.1. Ocena kompletności 12-miesięcznej obserwacji chorych zakwalifikowanych do badania	76
1.2. Ocena regularności wizyt kontrolnych pacjentów podczas 12-miesięcznej obserwacji	77
1.3. Charakterystyka demograficzna badanej grupy	77
2. Ogólna ocena rodzinnego wywiadu w kierunku wybranych jednostek chorobowych w populacji badanej	79
2.1. Ocena rodzinnego obciążenia cukrzycą, z uwzględnieniem typu 1 oraz typu 2 choroby	79
2.2. Ocena rodzinnego obciążenia chorobami o etiologii autoimmunologicznej, z wyłączeniem T1DM	80

3. Charakterystyka stanu klinicznego pacjenta w momencie rozpoznania T1DM w badanej populacji	81
3.1. Ocena potencjalnie modyfikującego oddziaływania czynników demograficznych na stan kliniczny pacjenta w momencie rozpoznania T1DM	82
3.2. Ocena potencjalnie modulującego oddziaływania czynników środowiskowych na stan kliniczny pacjenta w momencie rozpoznania T1DM	83
3.3. Ocena potencjalnie modulującego oddziaływania wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy na stan kliniczny pacjenta w momencie rozpoznania T1DM	83
3.4. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM	83
3.5. Ocena zależności pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej w momencie rozpoznania T1DM	83
3.6. Ocena potencjalnego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku jej trwania	84
3.7. Ocena częstości występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji w zależności od występowania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej w momencie rozpoznania choroby	84
4. Ogólna ocena rodzaju prowadzonej insulinoterapii w badanej populacji w ciągu rocznej obserwacji	84
5. Ogólna ocena stanu odżywienia pacjentów w pierwszym roku trwania T1DM	85
6. Ogólna ocena badania ankietowego podsumowującego poziom edukacji pacjenta (chorzy powyżej 14 roku życia)/ opiekunów chorego na temat T1DM	85
7. Porównanie częstości występowania wybranych polimorfizmów genów CTLA-4, PTPN22 oraz INS w populacji badanej i kontrolnej	86
8. Ocena częstości występowania wybranych polimorfizmów genów CTLA-4, PTPN22 oraz INS w populacji badanej i kontrolnej w odniesieniu do dystrybucji tych polimorfizmów w obrębie rasy kaukaskiej	89
9. Ocena częstości występowania wybranych polimorfizmów genów CTLA-4, PTPN22 oraz INS w populacji badanej z uwzględnieniem analizy demograficznej	91
9.1. Ocena dystrybucji wybranych polimorfizmów genów CTLA-4, PTPN22 oraz INS w populacji badanej w zależności od płci pacjenta	91
9.2. Ocena dystrybucji wybranych polimorfizmów genów CTLA-4, PTPN22 oraz INS w populacji badanej w zależności od wieku pacjenta	92
9.3. Ocena dystrybucji wybranych polimorfizmów genów CTLA-4, PTPN22 oraz INS w populacji badanej w zależności od miejsca zamieszkania pacjenta	92
10. Ocena dystrybucji wybranych polimorfizmów genów CTLA-4, PTPN22 oraz INS w populacji badanej w zależności od rodzinnego wywiadu w kierunku cukrzycy	92

11. Ocena zależności pomiędzy dystrybucją wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i>, <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> w populacji badanej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM	93
11.1. Płeć pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM	93
11.2. Wiek pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM	97
12. Ocena aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM	99
12.1. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM a płcią pacjenta	99
12.2. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM a wiekiem pacjenta	100
12.3. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM	100
12.4. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z płcią pacjenta	102
12.5. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z wiekiem pacjenta	103
12.6. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM	103
12.6.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM, z uwzględnieniem płci i wieku pacjenta	104
12.6.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby, z uwzględnieniem występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM	104
12.6.3. Aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/	105
12.7. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM	105
12.7.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby, z uwzględnieniem występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM	108
12.7.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM, z uwzględnieniem płci pacjenta	108

12.7.3. Aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ _____	109
12.7.4. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM, z uwzględnieniem wieku pacjenta _____	110
12.7.5. Aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ _____	111
12.8. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu 5'VNTR genu <i>INS</i> z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM _____	113
13. Ocena funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM _____	114
13.1. Ocena potencjalnego związku dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM z pozagenetycznymi czynnikami modyfikującymi _____	115
13.1.1. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy płcią i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM _____	115
13.1.2. Ocena potencjalnego związku pomiędzy wiekiem pacjenta i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM _____	117
13.1.3. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy stadium rozwoju płciowego i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM _____	120
13.1.4. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy wskaźnikiem BMI z-score i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM _____	121
13.1.5. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy występowaniem infekcji w okresie poprzedzającym ujawnienie się T1DM i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby _____	121
13.1.6. Ocena modulującego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na funkcję resztkową komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby _____	121
13.1.7. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania a występowaniem DKA w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z płcią pacjenta _____	124
13.1.8. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania a występowaniem DKA w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z wiekiem pacjenta _____	125
13.2. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a funkcją resztkową komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM _____	126
13.3. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy rodzajem prowadzonej insulinoterapii a dynamiką zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM _____	129
13.4. Ocena potencjalnego wpływu poziomu edukacji pacjenta/opiekunów chorego na temat choroby na funkcję resztkową komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby _____	131
13.5. Ocena potencjalnego związku wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby _____	131

13.5.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby	131
13.5.1.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, z uwzględnieniem płci i wieku pacjenta	132
13.5.1.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, z uwzględnieniem występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM	132
13.5.1.3. Dynamika zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć/	132
13.5.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby	132
13.5.2.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, w powiązaniu z występowaniem DKA w momencie rozpoznania T1DM	134
13.5.2.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, w powiązaniu z płcią pacjenta	135
13.5.2.3. Dynamika zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/	138
13.5.2.4. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, w powiązaniu z wiekiem pacjenta	140
13.5.2.5. Dynamika zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/	140
13.5.3. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu 5'VNTR genu <i>INS</i> z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby	143
14. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM w pierwszym roku trwania choroby	143
14.1. Funkcja resztkowa komórek β trzustki a wyrównanie metaboliczne T1DM w pierwszym roku trwania choroby	144
14.2. Ocena potencjalnego związku pomiędzy płcią pacjenta a wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM	146
14.3. Ocena potencjalnego związku pomiędzy wiekiem pacjenta a wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM	146
14.4. Ocena potencjalnego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku jej trwania	147
14.4.1. Płeć pacjenta jako moderator oddziaływań zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku jej trwania	148

14.4.2. Wiek pacjenta jako moderator oddziaływań zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku jej trwania _____	150
14.5. Poziom edukacji pacjenta na temat własnej choroby a wyrównanie metaboliczne T1DM w pierwszym roku trwania choroby _____	151
14.6. Ocena potencjalnego związku wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> z wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM ____	151
14.6.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> z wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM _____	151
14.6.1.1. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ _____	152
14.6.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM _____	152
14.6.2.1. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> , w zależności od występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM _____	152
14.6.2.2. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> , z uwzględnieniem płci pacjenta _	153
14.6.2.3. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ _____	153
14.6.2.4. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> , z uwzględnieniem wieku pacjenta _____	157
14.6.2.5. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ _____	158
14.6.3. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu 5'VNTR genu <i>INS</i> z wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM _____	161
15. Ocena częstości występowania remisji klinicznej w badanej populacji z uwzględnieniem czynników potencjalnie modyfikujących jej wystąpienie _____	161
15.1. Funkcja resztkowa komórek β trzustki a występowanie remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM _____	163
15.2. Ocena częstości występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji w zależności od płci i wieku pacjenta _____	164
15.3. Ocena częstości występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji w zależności od występowania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej w momencie rozpoznania choroby _____	165
15.3.1. Ocena potencjalnego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, stwierdzanych u pacjenta na początku choroby, na częstość występowania remisji klinicznej T1DM w pierwszym roku jej trwania, z uwzględnieniem płci pacjenta _____	166

15.3.2. Ocena potencjalnego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, stwierdzanych u pacjenta na początku choroby, na częstość występowania remisji klinicznej T1DM w pierwszym roku jej trwania, z uwzględnieniem wieku pacjenta _____	166
15.4. Ocena potencjalnego związku wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> z częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji _____	167
15.4.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> z częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji __	167
15.4.1.1. Częstość występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć/ _____	168
15.4.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> z częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji __	168
15.4.2.1. Częstość występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ _____	168
15.4.2.2. Częstość występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ _____	170
15.4.3. Ocena potencjalnego związku polimorfizm 5'VNTR genu <i>INS</i> z częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji _____	172
16. Ocena częstości współwystępowania z T1DM innych chorób autoimmunologicznych w pierwszym roku trwania choroby w badanej populacji _____	172
16.1. Ocena częstości współwystępowania z T1DM autoimmunologicznego zapalenia tarczycy w badanej populacji w pierwszym roku trwania obserwacji _____	172
16.2. Ocena częstości współwystępowania z T1DM celiakii w populacji badanej w pierwszym roku prowadzonej obserwacji _____	173
Dyskusja _____	174
Ogólna ocena jakości prezentowanego badania _____	174
Populacja badana na tle innych populacji wieku rozwojowego z T1DM, prezentowanych w piśmiennictwie _____	176
Częstość występowania cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA) oraz analiza czynników ryzyka jej rozwoju w badanej populacji w odniesieniu do aktualnych danych z piśmiennictwa. Inne stany ostrej hiperglikemii w okresie ujawniania się T1DM w obserwowanej grupie chorych _	176
Ogólna ocena przeprowadzonych analiz genetycznych _____	178
Częstość występowania wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> w populacji badanej i kontrolnej w odniesieniu do populacji kaukaskiej oraz danych z aktualnego piśmiennictwa _____	179
Modulujące oddziaływanie układów strukturalnych /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ oraz /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ w badanej populacji – próba interpretacji w świetle danych z aktualnego piśmiennictwa _____	182

Rozwój innych chorób autoimmunologicznych w populacji badanej w pierwszym roku trwania choroby – próba oceny w odniesieniu do danych prezentowanych w piśmiennictwie _____	194
Wnioski _____	196
Streszczenie _____	197
Abstract _____	200
Bibliografia _____	203
Aneksy _____	212
Aneks 1. Arkusz badania ankietowego oceniającego poziom edukacji pacjenta (chorzy >14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM _____	212
Aneks 2. Skala Tannera rozwoju płciowego u dziewcząt i chłopców _____	218
Aneks 3. Protokół izolacji genomowego DNA z wykorzystaniem gotowych zestawów Genomic Midi AX (A&A Biotechnology, Polska) _____	219
Aneks 4. Klasyfikacja zmian w obrębie błony śluzowej jelita cienkiego w przebiegu celiakii według Marsha _____	220

Spis tabel

Materiały i metody

Tabela 2.1. Kryteria kwalifikacji pacjentów do badań _____	35
Tabela 2.2. Harmonogram prezentowanego badania _____	36
Tabela 2.3. System kwalifikacji pacjentów do kategorii wiekowych, odpowiadających kolejnym etapom rozwoju psychosomatycznego dziecka _____	37
Tabela 2.4. Różnicowanie DKA i HHS _____	39
Tabela 2.5. Podział badania ankietowego na bloki tematyczne i sposób ich punktacji _____	42
Tabela 2.6. Kryteria oceny badania ankietowego za pomocą wartości procentowej z maksymalnej punktacji za całe badanie/za blok tematyczny ankiety _____	43
Tabela 2.7. Protokół elektroforezy produktów reakcji PCR–RFLP w analizie badanych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> _____	48
Tabela 2.8. Protokół sekwencjonowania produktów reakcji PCR w analizie badanych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> _____	49
Tabela 2.9. Protokół reakcji PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> ____	50
Tabela 2.10. Protokół reakcji RFLP wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> _	51
Tabela 2.11. Protokół reakcji PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> _____	53
Tabela 2.12. Protokół reakcji RFLP wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> _____	55
Tabela 2.13. Protokół reakcji PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu –23 <i>HphIA</i> >T genu <i>INS</i> _	57
Tabela 2.14. Protokół reakcji RFLP wykorzystywanej w analizie polimorfizmu –23 <i>HphIA</i> >T genu <i>INS</i> _	58
Tabela 2.15. Spis alfabetyczny miejscowości województwa pomorskiego, z których uzyskano próbki wysuszonej krwi wraz z liczbą analizowanych próbek _____	60
Tabela 2.16. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz rodzaj aparatury laboratoryjnej używanej podczas reakcji <i>blood-direct</i> PCR w analizie badanych polimorfizmów – grupa kontrolna _____	62
Tabela 2.17. Warunki reakcji <i>blood-direct</i> PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – grupa kontrolna _____	62
Tabela 2.18. Warunki reakcji <i>blood-direct</i> PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – grupa kontrolna _____	62
Tabela 2.19. Warunki reakcji <i>blood-direct</i> PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu –23 <i>HphIA</i> >T genu <i>INS</i> – grupa kontrolna _____	63
Tabela 2.20. Wzory rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP w analizie badanych polimorfizmów genu <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> – grupa kontrolna _____	64
Tabela 2.21. Porównanie warunków reakcji immunoenzymatycznej (ELISA) swoistej dla autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) oraz przeciwiwulsulinowych (IAA) _____	69
Tabela 2.22. Porównanie warunków reakcji immunoenzymatycznej (ELISA) swoistej dla autoprzeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej (TPO), przeciw tyreoglobulinie (TG) oraz przeciw transglutaminazie tkankowej (TGA) _____	72

Wyniki

Tabela 4.1. Ocena rozkładu płci z uwzględnieniem stadium rozwoju płciowego w badanej populacji podczas 12—miesięcznej obserwacji chorych _____	77
Tabela 4.2. Ocena rozkładu wieku w badanej populacji w momencie rozpoznania cukrzycy typu 1, z uwzględnieniem podziału na kategorie wiekowe oraz płeć _____	78
Tabela 4.3. Ocena częstości występowania pozytywnego wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy w populacji badanej _____	80
Tabela 4.4. Ocena częstości występowania chorób o etiologii autoimmunologicznej w rodzinach badanych pacjentów _____	81
Tabela 4.5. Charakterystyka potencjalnie modyfikującego wpływu czynników demograficznych na stan chorego w momencie rozpoznania T1DM _____	82
Tabela 4.6. Ogólna charakterystyka rodzaju prowadzonej insulinoterapii w badanej populacji podczas rocznej obserwacji chorych _____	84
Tabela 4.7. Analiza porównawcza punktacji z poszczególnych bloków tematycznych badania ankietowego w kolejnych miesiącach obserwacji pacjentów _____	86
Tabela 4.8. Porównanie dystrybucji analizowanych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> w populacji badanej i kontrolnej _____	87
Tabela 4.9. Analiza wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> w populacji badanej i kontrolnej – porównanie dystrybucji alleli związanych z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM _____	88
Tabela 4.10. Ocena dystrybucji analizowanych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> w populacji kontrolnej w odniesieniu do rasy kaukaskiej _____	90
Tabela 4.11. Ocena dystrybucji analizowanych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> w populacji badanej w odniesieniu do rasy kaukaskiej _____	91
Tabela 4.12. Zestawienie pomiarów stężenia C-peptydu dokonanych w ciągu rocznej obserwacji w badanej populacji, z uwzględnieniem wytycznych Immunology of Diabetes Society oraz ADA _____	114
Tabela 4.13. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM (według kryteriów ISPAD) w pierwszym roku choroby w badanej populacji przeprowadzona na zasadzie porównań dwóch punktów obserwacji pacjentów _____	144
Tabela 4.14. Ocena częstości występowania remisji klinicznej według kryteriów ISPAD podczas rocznej obserwacji badanych pacjentów _____	162
Tabela 4.15. Ocena częstości występowania wejścia w remisję kliniczną według kryteriów ISPAD w określonym punkcie rocznej obserwacji z uwzględnieniem długości utrzymywania się remisji w populacji badanej _____	162

Spis rycin

Wstęp

Rycina 1.1. Obecnie zmapowane loci sprzężone z predyspozycją do T1DM, leżące poza regionem HLA, oraz loci o prawdopodobnym przyczynowym związku z chorobą, z oceną względnego ryzyka rozwoju T1DM _____	31
Rycina 1.2. Potencjalne patomechanizmy rozwoju reakcji autoimmunologicznej skierowanej przeciw komórkom β trzustki w patogenezie T1DM, z uwzględnieniem roli i miejsc oddziaływania wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i> _____	32
Rycina 1.3. Schematyczne przedstawienie roli fosfatazy tyrozynowej <i>PTPN22</i> w przekazywaniu sygnału z receptora TCR do wnętrza limfocytu T _____	33

Materiały i metody

Rycina 2.1. Algorytm badań genetycznych _____	45
Rycina 2.2. Przykładowy rozkład elektroforetyczny produktów PCR w analizie polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> _____	50
Rycina 2.3. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> _____	52
Rycina 2.4. Elektroforogram reakcji sekwencjonowania produktów PCR w analizie polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – próbki kontrolne _____	52
Rycina 2.5. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów PCR w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> _____	54
Rycina 2.6. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> _____	55
Rycina 2.7. Elektroforogram reakcji sekwencjonowania produktów PCR w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – próbki kontrolne _____	56
Rycina 2.8. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów PCR w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> _____	57
Rycina 2.9. Przykładowy rozkład elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> _____	59
Rycina 2.10. Elektroforogram reakcji sekwencjonowania produktów PCR w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> – próbki kontrolne _____	59
Rycina 2.11. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> – grupa kontrolna _____	64
Rycina 2.12. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – grupa kontrolna _____	64
Rycina 2.13. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> – grupa kontrolna _____	65

Wyniki

Rycina 4.1. Ocena kompletności 12-miesięcznej obserwacji pacjentów zakwalifikowanych do badania _____	76
Rycina 4.2. Histogram wieku pacjentów zakwalifikowanych do badania, z uwzględnieniem podziału na kategorie wiekowe _____	78

Rycina 4.3. Ocena miejsca zamieszkania pacjentów zakwalifikowanych do badania z uwzględnieniem podziału administracyjnego województwa pomorskiego _____	79
Rycina 4.4. Płeć pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM _____	95
Rycina 4.5. Płeć pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM _____	96
Rycina 4.6. Płeć pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> (markera polimorfizmu 5'VNTR genu <i>INS</i>) w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM _____	97
Rycina 4.7. Wiek pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM _____	98
Rycina 4.8. Ocena zależności pomiędzy dynamiką zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej u chorego w momencie rozpoznania choroby _____	101
Rycina 4.9. Ocena oddziaływania polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w pierwszym roku trwania T1DM _____	106
Rycina 4.10. Ocena oddziaływania polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw IAA w pierwszym roku trwania T1DM _____	107
Rycina 4.11. Oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w pierwszym roku trwania T1DM _____	110
Rycina 4.12. Oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w pierwszym roku trwania T1DM _____	112
Rycina 4.13. Ogólna ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM _____	115
Rycina 4.14. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM w zależności od płci pacjenta _____	116
Rycina 4.15. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM w zależności od wieku pacjenta (kategorii wiekowej uwzględniającej etapy rozwoju psychosomatycznego dziecka) _____	118
Rycina 4.16. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM u pacjentów należących do młodszych kategorii wiekowych _____	119
Rycina 4.17. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM u pacjentów należących do starszych kategorii wiekowych _____	120
Rycina 4.18. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania choroby _____	122

Rycina 4.19. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM wśród pacjentów z rozpoznaną DKA na początku choroby, w zależności od stopnia ciężkości DKA (klasyfikacja według kryteriów ISPAD)	123
Rycina 4.20. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od płci chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania choroby	124
Rycina 4.21. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od wieku chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania choroby	126
Rycina 4.22. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD	127
Rycina 4.23. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw IAA	128
Rycina 4.24. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od rodzaju stosowanej insulinoaterapii	129
Rycina 4.25. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> , stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM	133
Rycina 4.26. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> , stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby	135
Rycina 4.27. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> , w powiązaniu z płcią chorego	136
Rycina 4.28. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> , stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z płcią chorego	137
Rycina 4.29. Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej	138
Rycina 4.30. Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej	141
Rycina 4.31. Ocena związku pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki a wyrównaniem metabolicznym T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej	145
Rycina 4.32. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od wieku pacjenta	147
Rycina 4.33. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM	148

- Rycina 4.34.** Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od płci chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM _____ 149
- Rycina 4.35.** Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od wieku chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM _____ 151
- Rycina 4.36.** Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby _____ 153
- Rycina 4.37.** Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na wyrównanie metaboliczne T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej _____ 154
- Rycina 4.38.** Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z wiekiem chorego _____ 157
- Rycina 4.39.** Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na wyrównanie metaboliczne T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej _____ 159
- Rycina 4.40.** Ocena związku pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki a występowaniem remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej _____ 163
- Rycina 4.41.** Ocena częstości występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od wieku pacjenta _____ 164
- Rycina 4.42.** Ocena częstości występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM _____ 165
- Rycina 4.43.** Ocena częstości występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od wieku chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM _____ 167
- Rycina 4.44.** Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na częstość występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej _____ 169
- Rycina 4.45.** Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na częstość występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej _____ 171

Wykaz stosowanych skrótów

→	odsyłacz do określonego fragmentu rozprawy doktorskiej
A	adenina
ADA	American Diabetes Association
AIT	autoimmunologiczne zapalenie tarczycy
BMI	wskaźnik względnej masy ciała (Body Mass Index)
BSA	surowicza albumina wołowa
BUN	azot mocznika w surowicy
C	cytozyna
CD	kompleks różnicowania (skrótom CD z odpowiednią cyfrą oznaczono struktury powierzchniowe komórek, najczęściej leukocytów)
CE	Conformité Européenne (certyfikat zgodności z dyrektywami Unii Europejskiej)
ChT	celiakia (choroba trzewna)
CTLA-4 (CD152)	antygen 4 związany z limfocytom T cytotoksycznym (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)
CTLA-4	gen antygeny 4 związanego z limfocytom T cytotoksycznym (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 gene)
DCCT	Diabetes Control and Complication Trial
ddH₂O	podwójnie destylowana woda
DKA	cukrzycowa kwasica ketonowa
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	trifosforany deoksyrybonukleozydów
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
ELISA	reakcja immunoenzymatyczna
ESPE	European Society for Paediatric Endocrinology
fT₄	wolna tyroksyna
g	gram
G	guanina
GAD	autoprzeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego
glc	stężenie glukozy w osoczu
GWAS	analizy całego genomu ludzkiego (genome-wide association study)
HbA_{1c}	poziom hemoglobiny glikowanej
HCO₃	wodorowęglany w surowicy
HHS	nieketonowa hiperglikemia hiperosmolalna
HPLC	metoda chromatografii cieczowej
IAA	autoprzeciwciała przeciwinsulinowe
ICA	autoprzeciwciała przeciw wyspom trzustkowym
IDF	International Diabetes Federation
IDS	Immunology of Diabetes Society
IFN-γ	interferon γ
Ig	immunoglobulina
IIF	metoda immunofluorescencji pośredniej (indirect immunofluorescence)
IL	interleukina
/INS	gen insuliny
ISPAD	International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes
ITAM	motywy immunoreceptorowe aktywujące oparte na tyrozynie
K	stężenie potasu w surowicy

komórka NK	naturalna komórka cytotoksyczna N
l	litr, dm ³
LA	luka anionowa
LWPES	Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society
Lyp	fosfataza tyrozynowa PTPN22
m	mol, około (6,02214129 ± 0,00000027) ×10 ²³ cząstek
M	stężenie molowe, mol/dm ³
m.c.	masa ciała
MgCl₂	chlerek magnezu
MMTT	test tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego
Na	stężenie sodu w surowicy
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGSP	Narodowy Program Standaryzacji Glikohemoglobiny USA
(NH₄)₂SO₄	siarczan amonu
NKBBN	Niezależna Komisja Bioetyczna ds. Badań Naukowych
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PCR <i>blood-direct</i>	bezpośrednia z krwi reakcja łańcuchowa polimerazy
pkt.	punkt/podpunkt
PTD	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne
PTPN22	gen fosfatazy tyrozynowej niereceptorowej typu 22 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 gene)
PTPN22	fosfataza tyrozynowa niereceptorowa typu 22 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22)
pz	para zasad
RFLP	analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych
ryc.	rycina
SD	odchylenie standardowe
str.	strona
T	tymina
T1DM	cukrzyca typu 1
T2DM	cukrzyca typu 2
tab.	tabela
TBE	bufor do elektroforezy z kwasem bornym
TDID	dobowe zapotrzebowanie na insulinę (total daily insulin dose)
T_{eff}	limfocyt T efektorowy
TG	autoprzeciwciała przeciw tyreoglobulinie
TGA	autoprzeciwciała przeciw transglutaminazie tkankowej
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu β
TMB	3,3',5,5'-tetrametylobenzodyna
TNF	czynnik martwicy nowotworu
TPO	autoprzeciwciała przeciw peroksydazie tarczycowej
T_{reg}	limfocyt T regulatorowy
TRIS	2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol
TSH	hormon tyreotropowy
U	jednostka międzynarodowa (international unit)
WHO	World Health Organization

WW wymiennik węglowodanowy (1 WW określa taką ilość produktu spożywczego, która zawiera 10 g węglowodanów)

Przedrostki

T	tera, 10^{12}
G	giga, 10^9
M	mega, 10^6
k	kilo, 10^3
d	decy, 10^{-1}
c	centy, 10^{-2}
m	mili, 10^{-3}
μ	mikro, 10^{-6}
n	nano, 10^{-9}
p	piko, 10^{-12}
f	femto, 10^{-15}

Wstęp

Schorzenia autoimmunizacyjne, w których dochodzi do rozwoju odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw antygenom własnych narządów lub tkanek, stanowią współcześnie jeden z poważniejszych problemów zdrowotnych społeczeństw krajów rozwiniętych (Miller et al., 2012) (Gregersen and Behrens, 2006). Dotychczas opisano ponad 80 jednostek chorobowych o tej etiologii, a liczbę pacjentów z rozpoznaniem objawowej choroby autoimmunologicznej szacuje się na 3 – 7% populacji ogólnej (Jacobson et al., 1997) (Miller et al., 2012). Jednocześnie w przypadku epidemiologii większości z tych schorzeń możemy mówić o zjawisku tzw. wierzchołka góry lodowej, z uwagi na dynamikę rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej. Z reguły od momentu zainicjowania procesu autodestrukcji własnych tkanek do klinicznego ujawnienia się choroby upływa od kilku do kilkunastu miesięcy, niekiedy nawet lat, a właściwa diagnoza u pacjenta, ze względu na subkliniczny i często nietypowy przebieg początkowej fazy choroby, może nastąpić z pewnym opóźnieniem. (Gregersen and Behrens, 2006)

Etiopatogeneza chorób autoimmunologicznych pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Uznaje się je za wieloczynnikowe procesy patologiczne, w których dochodzi do wzajemnej interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi, immunologicznymi oraz hormonalnymi organizmu w połączeniu z oddziaływaniem elementów środowiska zewnętrznego. (Miller et al., 2012)

Cukrzyca typu 1 jako szczególna postać narządowo swoistej choroby autoimmunologicznej

Cukrzyca typu 1 (T1DM) stanowi szczególną postać schorzenia o podłożu autoimmunologicznym z uwagi na fakt, iż pojawiające się po zainicjowaniu procesu chorobowego autoreaktywne limfocyty T CD4⁺ oraz T CD8⁺ naciekają wyspy trzustkowe doprowadzając do selektywnego uszkodzenia tylko komórek β, produkujących insulinę (Chentoufi et al., 2008). Powyższy stopniowy proces autodestrukcji komórek β trzustki w początkowej fazie przebiega zwykle bezobjawowo. Typowe kliniczne objawy T1DM, jak poliuria, polidypsja, utrata masy ciała przy prawidłowym, a początkowo nawet zwiększonym łaknieniu (polifagia), pojawiają się w przypadku uszkodzenia 80% - 90% komórek β trzustki, kiedy dochodzi do wyczerpania się rezerw insuliny umożliwiających pokrycie podstawowego zapotrzebowania metabolicznego organizmu. (Krętowski, 2007)

Większość autorów uznaje, iż w rozwoju autoimmunologicznej reakcji przeciw komórkom β trzustki kluczową rolę odgrywają zaburzenia funkcji regulatorowej układu immunologicznego, która pozostaje pod ścisłą kontrolą określonych loci genowych, a czynniki środowiskowe egzogenne (infekcje, leki) oraz endogenne (hormony, witamina D₃) wpływają modulująco na powyższe interakcje układu genetycznego i odpornościowego. (Baranzini, 2009, Bluestone et al., 2010, Lindley et al., 2005, Marson et al., 2007, Peng and Hagopian, 2006, Vehik and Dabelea, 2011)

Genetyczne uwarunkowania rozwoju reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM

Dziedziczenie i rozwój T1DM uwarunkowane są wielogenowo (Baschal and Eisenbarth, 2008, Ounissi-Benkalha and Polychronakos, 2008). Podczas przeprowadzonych analiz całego ludzkiego genomu (*genome-wide association study* – GWAS) zidentyfikowano 26 loci związanych z predyspozycją do wystąpienia T1DM, przy czym 19 z nich odgrywa szczególnie ważną rolę w kontroli procesów regulujących funkcjonowanie układu immunologicznego (Bluestone et al., 2010). (ryc.1.1 → str.31)

Głównymi loci zaangażowanymi w rozwój reakcji immunologicznej skierowanej przeciw własnym antygenom w patogenezie większości chorób autoimmunologicznych, w tym również i T1DM, są geny regionu kodującego antygeny głównego układu zgodności tkankowej HLA (*human leukocyte antigens*). Jednocześnie, poza regionem HLA, pozostaje zlokalizowanych wiele loci, również związanych ze stosunkowo wysokim ryzykiem rozwoju T1DM i współdziałających z genami układu HLA w patogenezie T1DM, z uwagi na ścisłe powiązanie ich mechanizmów oddziaływania w kolejnych etapach rozwoju reakcji

autoimmunologicznej (ryc.1.1 → str.31) (Todd, 2010, Ounissi-Benkalha and Polychronakos, 2008, Gregersen and Behrens, 2006).

Geny zlokalizowane w regionie HLA jako dominujące czynniki genetyczne w rozwoju reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM

Geny regionu HLA, zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 6 (chromosom 6p21), kodują cząsteczki MHC (*Major Histocompatibility Complex*) klasy I oraz klasy II. Molekuły MHC klasy I są obecne na powierzchni wszystkich komórek jądrowych, natomiast cząsteczki klasy II ulegają ekspresji głównie na powierzchni wyspecjalizowanych komórek, jak limfocyty B, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki nabłonkowe grasicy i odpowiadają za prezentację antygenów limfocytom T CD4⁺. (Ounissi-Benkalha and Polychronakos, 2008)

Geny regionu HLA kodujące cząsteczki MHC klasy II pozostają silnie związane z rozwojem reakcji autoimmunologicznej w patogenezie wielu chorób autoimmunologicznych, w tym również T1DM. Jednocześnie podczas analiz regionu HLA niezwykle trudne pozostaje zlokalizowanie konkretnego locus jednoznacznie związanego z określoną jednostką chorobową, z uwagi na bardzo bliskie położenie poszczególnych genów w tym regionie i występujące zjawisko nieodróżnienia sprzężeń. (Zenewicz et al., 2010, Rioux et al., 2009)

W przypadku T1DM, z wysokim ryzykiem rozwoju choroby pozostają związane geny HLA-DR oraz HLA-DQ, a około 90% wszystkich pacjentów z już zdiagnozowaną chorobą posiada jeden z dwóch układów haplotypów genów HLA: DR4-DQ8 lub DR3-DQ2. Mechanizm oddziaływania genów regionu HLA w patogenezie T1DM pozostaje do końca niewyjaśniony. Prawdopodobnie u osób posiadających predysponujące układy haplotypów HLA-DR oraz DQ w wyniku zaburzeń prezentacji autoantygenów w powiązaniu z cząsteczkami MHC klasy II dochodzi do nieprawidłowej selekcji tymocytów w grasicy i pojawienia się na obwodzie limfocytów T zbyt silnie rozpoznających własne antygeny tkankowe. (Ounissi-Benkalha and Polychronakos, 2008)

Z uwagi na przeprowadzone dotychczas liczne badania potwierdzające związek genów regionu HLA z podwyższonym ryzykiem zachorowania na T1DM (Dorman and Bunker, 2000, Lambert et al., 2004, Kretowski and Kinalska, 1999, Krokowski, 1998), jak również szeroko opisane i ocenione w piśmiennictwie oddziaływanie powyższego regionu na przebieg kliniczny T1DM (Młynarski, 2004, Graham et al., 2002, Nakanishi and Inoko, 2006, Hermann et al., 2005), w niniejszej pracy skoncentrowano się na ocenie wybranych genów spoza układu HLA (*INS*, *CTLA-4*, *PTPN22*), w przypadku których wykazano istotny związek z predyspozycją do wystąpienia choroby (Todd, 2010) (ryc.1.1 → str.31).

Polimorfizm 5'VNTR genu *INS* jako czynnik genetyczny związany z potencjalnymi zaburzeniami mechanizmów tolerancji centralnej na autoantygeny w patogenezie T1DM

Zaburzenia prawidłowej selekcji tymocytów w grasicy stanowią najważniejszy z patomechanizmów, zachodzących na poziomie centralnych narządów limfatycznych, który prowadzi do zniesienia tolerancji na własne antygeny. W przypadku oddziaływania genów regionu HLA powyższe zaburzenie dotyczy przede wszystkim nieprawidłowej ekspresji cząsteczek MHC w obrębie komórek zrębu grasicy, czego następstwem jest zbyt słaba aktywacja receptora TCR dojrzewających tymocytów, a tym samym uniknięcie selekcji negatywnej przez tymocyty posiadające receptory TCR o zbyt dużym powinowactwie do antygeny. (Gregersen and Behrens, 2006, Ounissi-Benkalha and Polychronakos, 2008)

Zupełnie innym patomechanizmem zaburzającym proces selekcji tymocytów w grasicy pozostaje nieprawidłowa ekspresja własnych antygenów w obrębie komórek podścieliska grasicy. Powyższy patomechanizm stanowi główny sposób regulatorowego oddziaływania polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* w przypadku rozwoju reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM. Allel *INS* 5'VNTR klasy I, jako związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby (ryc.1.1 → str.31), wykazuje zmniejszoną

ekspresję w komórkach nabłonka grasicy, przy jednocześnie zwiększonej ekspresji w komórkach β trzustki, tym samym predysponując do pojawienia się na obwodzie autoreaktywnych limfocytów T reagujących silnie z autoantygenem, w wyniku uniknięcia przez nie selekcji negatywnej w grasicy (ryc.1.2 → str.32). (Gregersen and Behrens, 2006, Chentoufi et al., 2008) Natomiast w przypadku allelu *INS* 5'VNTR klasy III, jego protekcyjny charakter oddziaływania wynika z wysokiej ekspresji mRNA kodującego insulinę w komórkach zrębu grasicy (Chentoufi and Polychronakos, 2002).

Polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* jako czynnik genetyczny związany z potencjalnymi zaburzeniami procesu hamowania aktywacji limfocytów T w patogenezie T1DM

Do pełnej aktywacji limfocytów T dochodzi w wyniku wystąpienia tzw. I oraz II sygnału do aktywacji. Pierwszy sygnał związany jest z pobudzeniem receptora TCR przez antygen połączony z cząsteczką MHC komórki prezentującej antygen (APC). Drugi sygnał do aktywacji (tzw. proces kostymulacji) polega na wystąpieniu wzajemnych oddziaływań pomiędzy molekułami B7 (B7.1 czyli CD80, B7.2 czyli CD86) znajdującymi się na powierzchni komórki APC oraz cząsteczkami CD28 obecnymi na powierzchni limfocyta T. Dopiero II sygnał przekazany do wnętrza limfocyta przez cząsteczkę CD28 powoduje zwiększenie wydzielania interleukiny 2 (IL-2) oraz innych cytokin, jak również powoduje proliferację limfocytów T. (ryc.1.2 → str.32) (Sansom and Walker, 2006)

Podczas gdy cząsteczka CD28 jest głównym kostymulatorem podczas aktywacji limfocytów T, cząsteczka CTLA-4 (CD152) pełni funkcję regulatora hamującego nadmierną odpowiedź limfocytów T. CTLA-4 należy do molekuł immunoglobulinopodobnych i w swej budowie zbliżona jest do cząsteczki CD28, wykazując u człowieka około 30% homologie. W zaktywowanym limfocycie T dochodzi do przemieszczania się cząsteczek CTLA-4 z cytoplazmy na powierzchnię błony komórkowej. Cząsteczki CTLA-4, posiadając 40-100 – krotnie wyższe powinowactwo do molekuł B7 w porównaniu z CD28, w sposób preferowany wiążą się z B7.1 oraz B7.2, przekazując do wnętrza limfocyta T sygnał hamujący aktywację. (Gough et al., 2005, Sansom and Walker, 2006, Vaidya and Pearce, 2004)

Obecnie przypuszcza się, że gen *CTLA-4* może również odgrywać modulującą rolę w procesach rozwoju tolerancji centralnej w grasicy. Najnowsze badania zespołu Verhagen et al. przeprowadzone na modelu mysim wykazały ekspresję cząsteczek CTLA-4 w obrębie zrębu grasicy i ich zasadniczą rolę w prawidłowym przebiegu selekcji negatywnej tymocytów. (Verhagen et al., 2009, Verhagen et al., 2013)

Gen *CTLA-4*, kodujący cząsteczkę CTLA-4 (CD152), zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu 2 (chromosom 2q33). W obrębie genu *CTLA-4* stwierdzono występowanie trzech polimorfizmów: CT60G>A (rs3087243), c.49A>G (rs231775) oraz polimorfizmu krótkich tandemowych powtórzeń (AT)_n zlokalizowany w obszarze 3'UTR egzonu 4. (Ligers et al., 2001)

W pierwszych badaniach dotyczących związku polimorfizmów genu *CTLA-4* z predyspozycją do rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej, szczególnie istotną klinicznie rolę przypisywano polimorfizmowi c.49A>G, z uwagi na związaną z nim substytucję aminokwasów alanina (Ala) → treonina (Thr) w pozycji 17 kodowanego białka (Tang et al., 2012, Lohmueller et al., 2003). Za główny patomechanizm oddziaływania powyższego polimorfizmu w patogenezie wielu chorób autoimmunologicznych, w tym również T1DM, uważa się nieprawidłowe funkcjonowanie cząsteczki CTLA-4 o zmienionej sekwencji aminokwasowej. Allel *CTLA-4* c.49G prawdopodobnie związany jest z syntezą cząsteczki CD152 o osłabionym powinowactwie do właściwych ligandów, co z kolei może prowadzić do nasilonej, niekontrolowanej proliferacji limfocytów T i produkcji cytokin, z powodu braku sygnału hamującego aktywację limfocytów. Powyższe zjawisko może zapoczątkowywać rozwój reakcji autoimmunologicznej. Niektórzy autorzy sugerują również modulujące oddziaływanie powyższego polimorfizmu genu *CTLA-4* na funkcję komórek regulatorowych układu immunologicznego. (Kristiansen et al., 2000, Sansom and Walker, 2006)

Od publikacji wyników badań zespołu Ueda et al., wskazujących na istnienie silnego niezrównoważenia sprzężeń pomiędzy regionami zawierającymi poszczególne miejsca polimorficzne genu *CTLA-4*, zwrócono

uwagę na rolę, jaką może odgrywać polimorfizm CT60G>A w patogenezie T1DM. Powyższa odmiana polimorficzna genu *CTLA-4* ma pełnić szczególnie istotną funkcję w procesach kontrolujących efektywność procesu splicingu i syntezy mRNA kodującego białko CTLA-4 (CD152). (Ueda et al., 2003)

Wyniki badań próbujących ocenić, który z powyższych polimorfizmów ma decydujące znaczenie kliniczne pozostają rozbieżne (Howson et al., 2007, Todd, 2010, Kavvoura and Ioannidis, 2005, Tang et al., 2012), a w związku z istniejącym niezrównoważeniem sprzężeń pomiędzy analizowanymi loci jednoznaczne rozstrzygnięcie powyższego problemu badawczego pozostaje niezwykle trudne.

Polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* jako czynnik genetyczny związany z potencjalnymi zaburzeniami przekazywania sygnału do wnętrza limfocytów w patogenezie T1DM

Cząsteczka kodowana przez gen *PTPN22*, zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 1 (chromosom 1p13), jest wewnątrzkomórkowym białkiem wykazującym aktywność fosfatazy tyrozynowej. Jego ekspresja została wykazana w licznych komórkach układu krwiotwórczego, przy czym funkcja fosfatazy tyrozynowej *PTPN22* i jej związek z receptorem TCR zostały najlepiej poznane w przypadku limfocytów T CD4⁺. (Gregersen and Behrens, 2006)

Po pobudzeniu limfocytów T poprzez receptor TCR dochodzi do aktywacji błonowej fosfatazy CD45, która katalizuje reakcję defosforylacji wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej Lck w pozycji Y505, co powoduje autofosforylację Lck w pozycji Y394 i jej ostateczną aktywację. Następnie Lck fosforyluje reszty tyrozynowe specyficznych motywów ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) znajdujących się w obrębie cząsteczek CD3 tworzących kompleks receptora TCR. Dopiero fosforylacja tyrozyn ITAM cząsteczki CD3 umożliwia przekazanie do wnętrza limfocyta T pełnowartościowego sygnału aktywacji. Natomiast fosfataza tyrozynowa *PTPN22* w powiązaniu z kinazą Csk stanowią wewnątrzkomórkowy kompleks enzymatyczny odpowiedzialny za inaktywację kinazy Lck, poprzez defosforylację w pozycji Y394 (*PTPN22*) oraz refosforylację w pozycji Y505 (Csk). (ryc.1.2 → str.32) (Gregersen and Behrens, 2006, Gołąb et al., 2002)

Obecność allelu *PTPN22* c.1858T powoduje substytucję aminokwasową tryptofan → arginina w pozycji 620 białka, w obrębie motywu wiążącego fosfatazy (tzw. motyw Pro-rich – motyw bogaty w prolinę). Powyższa substytucja uniemożliwia wiązanie się enzymu z domeną SH3 kinazy Csk, jak również prowadzi do wzrostu wewnętrznej aktywności enzymatycznej fosfatazy *PTPN22*. W przypadku obecności allelu *PTPN22* c.1858T fosfataza ta oprócz zwiększonej zdolności defosforylacji kinazy Lck, tyrozyn w obrębie motywów ITAM łańcuchów ζ cząsteczki CD3 oraz innych białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału z receptora TCR, zaburza szlaki aktywacji limfocyta T związane z metabolizmem fosfatydyloinozytolu oraz LAT (linker for activated T cells), jak również wykazuje zdolność wiązania się z zupełnie innymi białkami niż fosfataza kodowana przez allel *PTPN22* c.1858C. (ryc.1.3 → str.33) (Vang et al., 2005, Vang et al., 2007)

Wszystkie powyższe zmiany prowadzą do podwyższenia progu aktywacji receptora TCR, a tym samym rozwoju swoistej oporności limfocytów T na sygnał przekazywany za jego pośrednictwem, co paradoksalnie zwiększa ryzyko rozwoju reakcji autoimmunologicznej. W wyniku wzrostu oporności receptora TCR autoreaktywne tymocyty mogą bowiem unikać negatywnej selekcji w grasicy i przedostawać się na obwód, gdzie zapoczątkowują proces autoimmunologicznej destrukcji własnych tkanek. (Gregersen et al., 2006)

Do podwyższenia progu aktywacji receptora TCR dochodzi prawdopodobnie także i w limfocytach T regulatorowych CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (T_{reg}), co może powodować zaburzenia ich funkcji i znacznie ograniczać zdolność do hamowania reakcji autoimmunologicznych. Innym patomechanizmem związanym z obecnością allelu *PTPN22* c.1858T, a mogącym odgrywać szczególnie istotną modulującą rolę w przypadku aktywności limfocytów T_{reg}, wydaje się zmniejszenie syntezy interleukiny 2 (IL-2) w odpowiedzi na stymulację receptora TCR, przy jednocześnie zachowanej prawidłowej liczbie poszczególnych subpopulacji limfocytów. IL-2 pozostaje najważniejszym czynnikiem stymulującym limfocyty T_{reg}, a w przypadku

limfocytów T CD4⁺ odgrywa szczególnie istotną rolę w wygaszaniu reakcji immunologicznej poprzez indukcję ekspresji CTLA-4 oraz FasL (ligand dla cząsteczki Fas – CD95), tym samym doprowadzając do przerwania sygnału kostymulacji (CTLA-4) lub zapoczątkowania apoptozy komórki (FasL). (Gregersen et al., 2006)

W przypadku obecności allelu *PTPN22* c.1858T prawdopodobnie dochodzi również do rozwoju oporności receptora BCR w limfocytach B, co podobnie jak w przypadku limfocytów T, może prowadzić do zaburzeń selekcji limfocytów B w grasicy, tym samym doprowadzając do kumulacji autoreaktywnych limfocytów B na obwodzie. Jednocześnie limfocyty B w przypadku występowania allelu *PTPN22* c.1858T wykazują tendencję do nadmiernej proliferacji, co przypisuje się wzmożonej ekspresji genów *TRAF*, kodujących białka związane z przekazywaniem sygnału aktywującego limfocyty B poprzez cząsteczkę kostymulującą CD40. (Menard et al., 2011)

W związku z powyższymi doniesieniami, polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* uznawany jest obecnie za najważniejsze z loci sprzężone z ryzykiem wystąpienia reakcji autoimmunologicznych, znajdujące się poza układem HLA (Plagnol et al., 2011). Pozostaje ono również szczególnie silnie sprzężone z predyspozycją do rozwoju T1DM (OR 1,82 – 2,15) (Todd et al., 2007), przy ryzyku względnym (RR) przekraczającym 3,5. (ryc.1.1 → str.31) (Todd, 2010)

Epidemiologia T1DM w populacji wieku rozwojowego na terenie województwa pomorskiego a potrzeba badań uwzględniających wieloczynnikowy, a szczególnie poligenowy, charakter choroby

Cele prezentowanego badania stanowią syntezę dotychczasowego stanu wiedzy na temat patomechanizmów rozwoju reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM, jak również wyników własnych badań nad zapadalnością na T1DM w populacji wieku rozwojowego na terenie województwa pomorskiego w latach 1999 – 2005. Na przestrzeni tych lat stwierdzano istotny wzrost zapadalności na T1DM w obserwowanej populacji oraz stosunkowo częste występowanie cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA) jako pierwotnej manifestacji choroby (Pawłowicz et al., 2007, Pawłowicz et al., 2009). Jednocześnie znaczny odsetek rozpoznanej wówczas DKA, pozostawał praktycznie niemożliwy do uzasadnienia klasycznymi czynnikami ryzyka jej rozwoju (Pawłowicz et al., 2009). Powyższe obserwacje skłoniły autora do poszukiwań czynników genetycznych, które potencjalnie mogłyby oddziaływać w badanej populacji i warunkować obserwowane trendy.

Początkowo skoncentrowano się na genie *CTLA-4*, ze względu na wysoki odsetek DKA obserwowany w populacji i doniesienia dotyczące występowania postaci T1DM o piorunującym przebiegu, ściśle związanej z polimorfizmem c.49A>G genu *CTLA-4* (Awata et al., 1998). Jednocześnie z uwagi na wielogenowe uwarunkowanie rozwoju T1DM, uznano za szczególnie uzasadnione przeprowadzenie badań, z uwzględnieniem wpływu przynajmniej kilku loci genowych. Takie postępowanie umożliwia ocenę występowania ewentualnych interakcji międzygenowych, jak również pozwala na kompleksową analizę obserwowanych wzajemnych oddziaływań pomiędzy wieloma czynnikami.

Ostatecznie do badań wybrano trzy polimorfizmy genów *INS*, *CTLA-4* oraz *PTPN22* (5'VNTR genu *INS*, c.49A>G genu *CTLA-4* oraz c.1858T>C genu *PTPN22*), uwzględniając ich ściśle współoddziaływanie w rozwoju reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM, które opisano powyżej. Jednocześnie w momencie tworzenia projektu badania w 2007 roku, przed erą analiz GWAS, wybrane polimorfizmy należały do najsilniej związanych z predyspozycją do rozwoju T1DM spośród loci, zlokalizowanych poza regionem HLA (ryc.1.1 → str.31) (Baschal and Eisenbarth, 2008, Todd, 2010). Przeprowadzenie analiz dotyczących genów spoza układu HLA, o wykazanym ścisłym związku z ryzykiem rozwoju T1DM, pozostawało szczególnie uzasadnione ze względu na nieliczne, często rozbieżne doniesienia dotyczące oddziaływania wybranych loci na przebieg kliniczny T1DM, które z reguły koncentrowały się tylko na pojedynczych polimorfizmach i parametrach klinicznych (Nielsen et al., 2006, Abe et al., 1999).

Jednocześnie istniało zaledwie kilka publikacji oceniających interakcje wybranych loci genowych, spoza układu HLA, oraz ich modulujący wpływ na ryzyko wystąpienia T1DM i późniejszy przebieg choroby (Hermann et al., 2006, Chelala et al., 2007, VanDerAuwera et al., 1997, Młynarski et al., 2003), przy dominującej liczbie badań analizujących oddziaływanie genów regionu HLA. (Graham et al., 2002, Nakanishi and Inoko, 2006, Młynarski, 2004)

Za szczególnie ważne uznano przeprowadzenie oceny oddziaływania wybranych czynników genetycznych nie tylko w początkowej fazie choroby, celem wykazania ich potencjalnego związku z występowaniem DKA w okresie ujawniania się T1DM, ale również analizy ich wpływu na dalszy przebieg choroby.

W przypadku obserwacji przebiegu klinicznego T1DM uznano za istotne wprowadzenie nie tylko standardowych parametrów oceniających wyrównanie metaboliczne T1DM i występowanie fazy remisji klinicznej choroby (oznaczenia hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} oraz ocena dobowego zapotrzebowania na insulinę), ale przede wszystkim uwzględnienie w panelu badań oznaczeń stężenia C-peptydu w połączeniu z oceną swoistych autooprzeciwciał związanych z T1DM. Powyższe postępowanie umożliwiło jednoczesne monitorowanie funkcji resztkowej komórek β trzustki oraz aktywności odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw antygenom tych komórek.

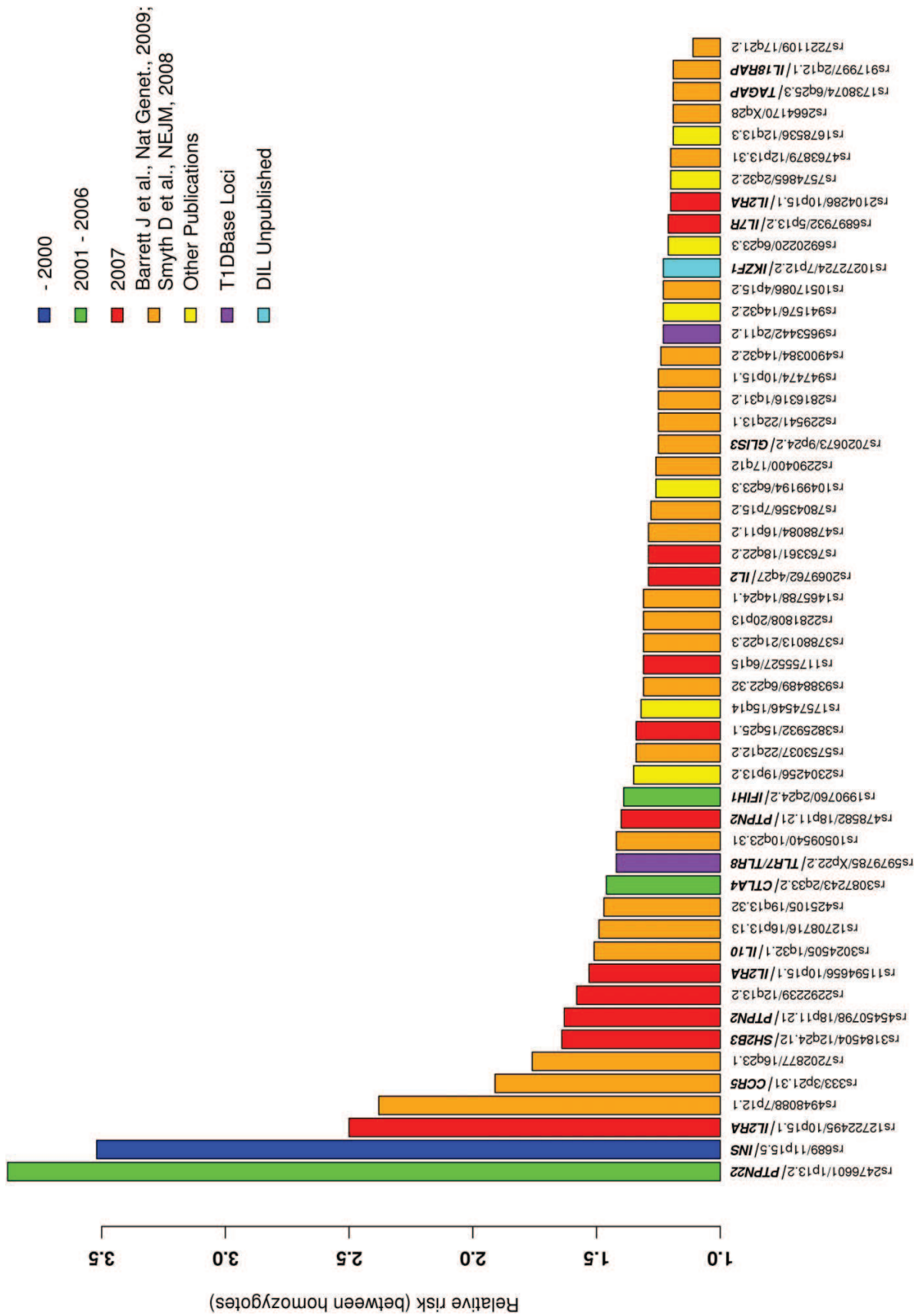
Pomiary stężeń C-peptydu stanowią obecnie podstawową metodę oceny funkcji resztkowej komórek β trzustki u chorych leczonych insuliną. C-peptyd powstaje podczas syntezy insuliny z proinsuliny. Następnie razem z insuliną uwalniany jest do krążenia w ilościach equimolarnych, a jego stężenie koreluje bezpośrednio z insulinemią. (Wallach et al., 2011) Monitorowanie funkcji resztkowej komórek β trzustki pozostaje niezwykle istotne w świetle wyników wielośrodkowego badania DCCT (*Diabetes Control and Complication Trial*), podczas którego jednoznacznie wykazano istotnie wyższe ryzyko rozwoju późnych powikłań cukrzycy u chorych z niewykrywalnym poziomem C-peptydu w odniesieniu do pacjentów z zachowaną resztkową insulinosekrecją – 4,6-krotnie wyższe ryzyko retinopatii oraz 4,4-krotnie wyższe ryzyko nefropatii. Jednocześnie wzrost stężenia C-peptydu o 0,1 nmol/l korelował z poprawą wyrównania metabolicznego choroby i obniżeniem poziomu HbA_{1c} o 0,1% wśród uczestników powyższego badania. (Palmer et al., 2004)

Z kolei ocena resztkowej insulinosekrecji w powiązaniu z aktywnością swoistych autooprzeciwciał skierowanych przeciw antygenom komórek β trzustki wydaje się niezwykle cenna, z uwagi na możliwość stwierdzenia czasowej korelacji w trendzie zmian obu parametrów, jak również w związku z doniesieniami świadczącymi o istotnym powiązaniu pomiędzy poziomem autooprzeciwciał, szczególnie skierowanych przeciw natywnej insulinie, a nasiloną produkcją cytokin prozapalnych, mogących intensyfikować proces autoimmunologicznej destrukcji komórek β trzustki. (Andrade Lima Gabbay et al., 2012)

Wśród celów badawczych prezentowanego badania uwzględniono również stosunkowo słabo poznany i opisany związek pomiędzy wybranymi loci predysponującymi do rozwoju T1DM, zlokalizowanymi poza układem HLA, a występowaniem tzw. „fenomenowi rozprzestrzeniania się epitopów”. Jest to patomechanizm prowadzący do współistnienia u pacjenta kilku chorób autoimmunologicznych. W wyniku niszczenia struktur i komórek podczas reakcji autoimmunologicznej dochodzi do uwalniania kolejnych własnych antygenów, co u osób predysponowanych może prowadzić do aktywacji kolejnych autoreaktywnych limfocytów o określonej swoistości antygenowej i zapoczątkowania procesu immunologicznego w innych tkankach. Większość istniejących doniesień jako główny czynnik genetyczny warunkujący występowanie tego zjawiska wskazuje polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22*, z uwagi na jego regulujące oddziaływanie na rozwój odpowiedzi autoimmunologicznej, odbywające się na wielu etapach tego procesu. (Gregersen and Behrens, 2006, Newman et al., 2006, Plagnol et al., 2011)

Praktycznym aspektem przeprowadzenia tak kompleksowego badania, oceniającego oddziaływanie wybranych polimorfizmów genów *INS*, *CTLA-4*, *PTPN22* na liczne parametry biochemiczne, serologiczne oraz kliniczne, była próba wyłonienia określonych grup pacjentów z rozpoznaną T1DM, u których zachodzi

potrzeba indywidualizacji postępowania terapeutycznego, z uwagi na genetycznie uwarunkowane zmiany w aktywności odpowiedzi autoimmunologicznej, jak również w dynamice zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki i skorelowane z tym procesem zmiany w kontroli metabolicznej choroby oraz w przebiegu fazy remisji T1DM.

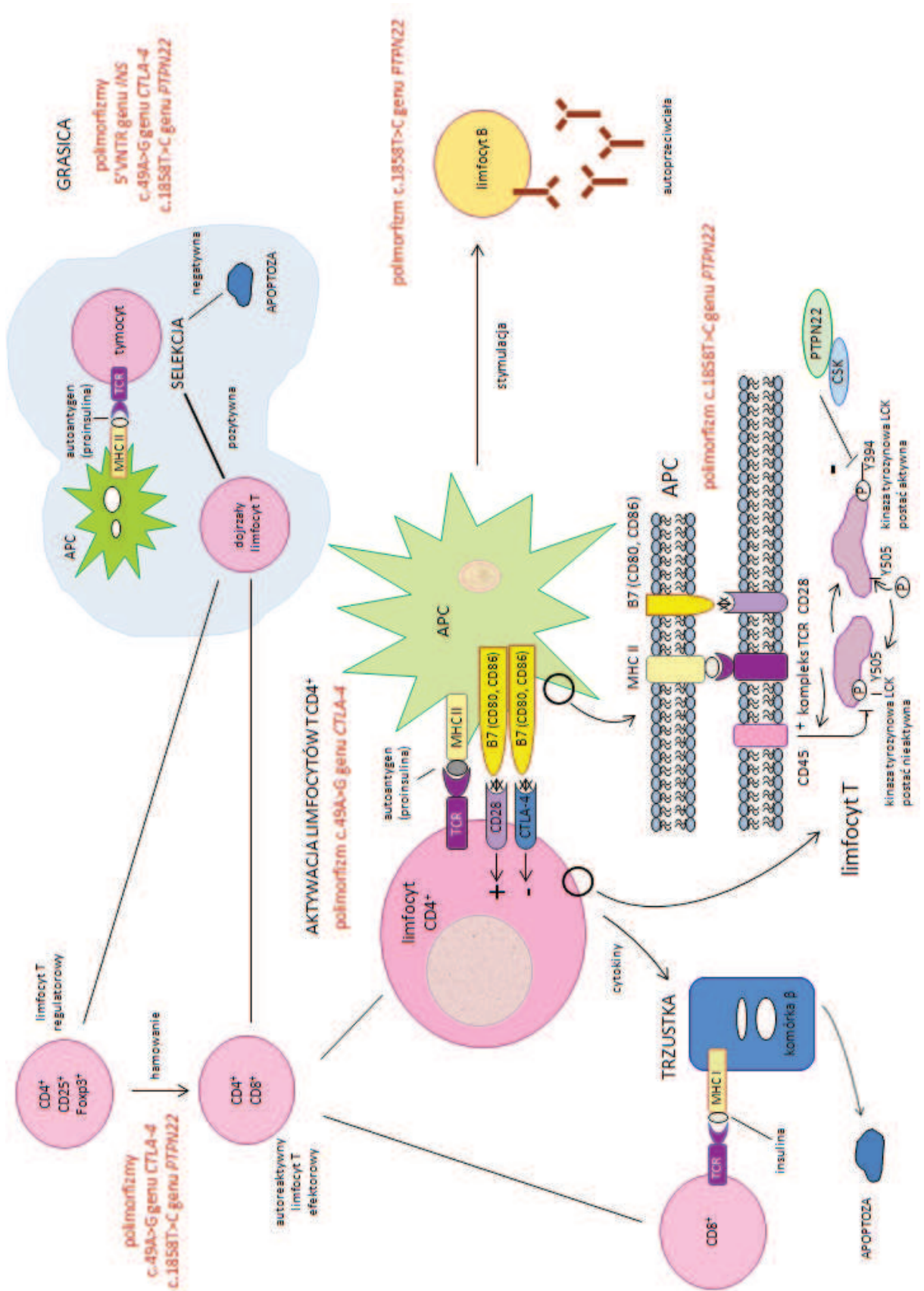


Rycina 1.1. Obecnie zmapowane loci sprzężone z predyspozycją do T1DM, leżące poza regionem HLA, oraz loci o prawdopodobnym przyczynowym związku z chorobą, z oceną względnego ryzyka rozwoju T1DM (Todd, 2010)

Rycina pochodzi z publikacji (Todd, 2010), reprint za zgodą wydawcy (nr licencji 3178330643386)

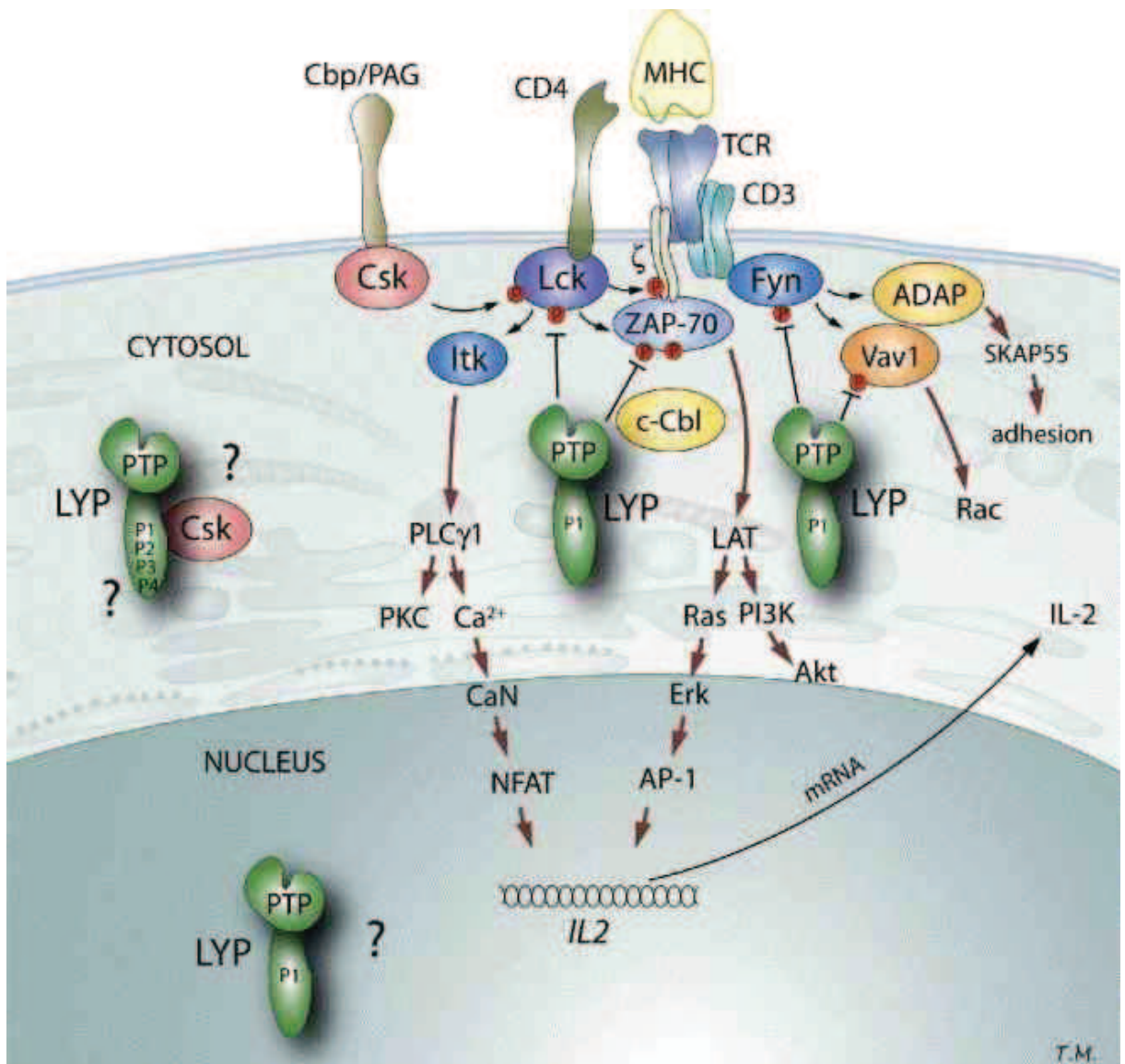
Oś X – podano nazwę genu, jego lokalizację oraz oznaczenia polimorfizmów powiązanych z T1DM

Kolorami oznaczono kolejne analizy całego genomu ludzkiego (GWAS), bazy danych oraz publikacje, na podstawie których uzyskano dane dotyczące poszczególnych loci



Rycina 1.2. Potencjalne patomechanizmy rozwoju reakcji autoimmunologicznej skierowanej przeciw komórkom β trzustki w patogenezie T1DM, z uwzględnieniem roli i miejsc oddziaływania wybranych polimorfizmów genów CTLA-4, PTPN22 oraz INS

Na podstawie (Ounissi-Benkhalha and Polychronakos, 2008), (Gregersen and Behrens, 2006), (Habib et al., 2012), (Verhagen et al., 2009) oraz (Verhagen et al., 2013)



Rycina 1.3. Schematyczne przedstawienie roli fosfatazy tyrozynowej PTPN22 w przekazywaniu sygnału z receptora TCR do wnętrza limfocytu T (Bottini et al., 2006)

Rycina pochodzi z publikacji (Bottini et al., 2006), reprint za zgodą wydawcy (nr licencji 3187000810021)

Strzałkami oznaczono działanie aktywujące, liniami typu T – działanie hamujące

ADAP – plazmatyczna deaminaza adenozykowa

Akt – kinaza białkowa Akt

AP-1 – czynnik transkrypcyjny AP-1

Ca²⁺ – jony wapniowe

CaN – kalcyneuryna

Cbp/PAG – fosfoproteina związana z mikrodomenami wzbogaconymi w glikosfingolipidy

CD3 – cząsteczka wchodząca w skład kompleksu receptora TCR

CD4 – cząsteczka biorąca udział w koaktywacji limfocytów T pomocniczych

Csk – kinaza Csk (rodzina kinaz Src)

Erk – białko z rodziny Erk

Fyn – kinaza Fyn (rodzina kinaz Src-podobnych)

IL-2 – interleukina 2

Itk – kinaza Itk (rodzina kinaz Tec)

LAT – białko adaptorowe, łącznik dla pobudzonych limfocytów T

Lck – kinaza Lck (rodzina kinaz Src-podobnych)

Lyp – fosfataza tyrozynowa PTPN22

MHC – cząsteczka głównego układu zgodności tkankowej

NFAT – czynnik transkrypcyjny z rodziny NFAT

P1, P2, P3, P4 – motywy bogate w prolinę fosfatazy tyrozynowej PTPN22

PI3K – kinaza fosfatidyloinozytolu

PKC – kinaza białkowa C

PLCγ1 – fosfolipaza C-γ1

Rac – białko G z rodziny Rho

Ras – białko Ras

SKAP55 – fosfoproteina związana z rodziną kinaz Src

TCR – receptor antygenowy limfocytów T

Vav1 – czynnik wymiany białek rodziny Rho

ZAP-70 – kinaza ZAP-70 (rodzina kinaz Syk-podobnych)

Cele pracy

1. Ocena samodzielnego i łącznego oddziaływania polimorfizmów genów *CTLA-4* c.49A>G, genu *PTPN22* c.1858T>C oraz 5'VNTR genu *INS* na funkcję resztkową komórek β trzustki oraz aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1.
2. Analiza powyższej korelacji w powiązaniu z oceną stanu klinicznego pacjentów w momencie rozpoznania choroby.
3. Ocena wpływu badanych polimorfizmów na dynamikę zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki oraz aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku choroby, w powiązaniu z rodzajem stosowanej insulinoterapii, stopniem kontroli metabolicznej oraz z oceną poziomu edukacji pacjenta.
4. Ocena wpływu badanych polimorfizmów na rozwój innych chorób autoimmunologicznych (autoimmunologicznego zapalenia tarczycy, celiakii) u pacjentów w pierwszym roku choroby.

Materiały i metody

1. Ogólna charakterystyka badania

Prezentowane badanie obserwacyjne miało charakter longitudinalny, prospektywny i było prowadzone w okresie od października 2008 roku do grudnia 2012 roku w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Kierownicy Kliniki: prof. dr hab. med. Anna Balcerska – do X 2011 r., prof. dr hab. med. Elżbieta Adamkiewicz – Drożyńska).

Uczestników badania kwalifikowano spośród pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 (T1DM), którzy byli hospitalizowani na Oddziale Diabetologii Dziecięcej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Ordynator Oddziału: prof. dr hab. med. Małgorzata Myśliwiec) w okresie od października 2008 roku do kwietnia 2011 roku.

Do badania zgodnie z kryteriami włączenia i wyłączenia (tabela 2.1) zakwalifikowano 147 pacjentów ze świeżo rozpoznaną postacią autoimmunologiczną T1DM. T1DM diagnozowano w oparciu o wytyczne World Health Organization (WHO) (WHO 1999) oraz International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes (ISPAD) (Craig et al., 2009).

Za moment zachorowania na T1DM, zgodnie z wytycznymi ISPAD (Craig et al., 2009), uznawano datę pierwszej iniekcji insuliny.

Tabela 2.1. Kryteria kwalifikacji pacjentów do badań

<i>Kryteria włączenia</i>
<ul style="list-style-type: none"> • świeżo rozpoznana postać autoimmunologiczna T1DM: w momencie zachorowania dodatnie miano co najmniej jednego ze swoistych autoprzeciwciał: <ul style="list-style-type: none"> ○ przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) ○ przeciwinsulinowych (IAA) ○ przeciw wyspom trzustkowym (ICA) • płeć: dziewczęta i chłopcy • wiek zachorowania: od >12 miesiąca życia do <18 roku życia • miejsce zamieszkania: stały pobyt na terenie województwa pomorskiego
<i>Kryteria wyłączenia</i>
<ul style="list-style-type: none"> • świeżo rozpoznana postać idiopatyczna T1DM (ujemne miano swoistych autoprzeciwciał związanych z procesem autoimmunologicznej destrukcji komórek β trzustki) (Craig et al., 2009) • uprzednio rozpoznana T1DM • T2DM i inne specyficzne typy cukrzycy (Craig et al., 2009) • wiek zachorowania: <12 miesiąca życia, ≥ 18 roku życia • miejsce zamieszkania: stały pobyt poza terenem województwa pomorskiego • interwencja terapeutyczna wpływająca na proces autoimmunologicznej destrukcji komórek β trzustki (m.in. terapia humanizowanym przeciwciałem anti-CD3, limfocytami regulatorowymi T CD4⁺CD25⁺CD127⁻) • brak świadomej zgody pacjenta i/lub opiekunów chorego na udział w badaniu

2. Etapy badania

Prezentowane badanie składało się z dwóch etapów:

- kwalifikacji pacjentów
- 12-miesięcznej obserwacji chorych zakwalifikowanych do badania

Harmonogram dla prezentowanego badania przedstawiono w tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Harmonogram prezentowanego badania

	<i>moment rozpoznania choroby</i>	<i>I wizyta kontrolna (3 miesiąc choroby)</i>	<i>II wizyta kontrolna (6 miesiąc choroby)</i>	<i>III wizyta kontrolna (9 miesiąc choroby)</i>	<i>IV wizyta kontrolna (12 miesiąc choroby)</i>
dane demograficzne	X				
dane kliniczne	X	X	X	X	X
pomiary antropometryczne	X	X	X	X	X
badanie ankietowe oceniające poziom edukacji pacjenta/opiekunów chorego na temat T1DM ^{*)}	X		X		X
badania genetyczne – analiza wybranych polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i>	X				
poziom hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c})	X	X	X	X	X
stężenie C-peptydu	X	X	X	X	X
miano swoistych autoprzeciwciał związanych z T1DM (GAD, IAA)	X		X		X
miano swoistych autoprzeciwciał związanych z AIT (TPO, TG)	X				X
miano swoistych autoprzeciwciał związanych z ChT (TGA IgA)	X				X

^{*)} arkusz badania ankietowego oceniającego poziom edukacji pacjenta (chorzy >14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM zamieszczono w *Aneksie 1* (→ *Aneks 1* str.212)

GAD – autoprzeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego

IAA – autoprzeciwciała przeciwiinsulinowe

AIT – autoimmunologiczne zapalenie tarczycy

TPO – autoprzeciwciała przeciw peroksydazie tarczycowej

TG – autoprzeciwciała przeciw tyreoglobulinie

ChT – celiakia (choroba trzewna)

TGA IgA – autoprzeciwciała przeciw transglutaminazie tkankowej w klasie IgA

2.1. Kwalifikacja pacjentów – moment rozpoznania T1DM

Po uzyskaniu świadomej pisemnej zgody pacjenta (osoby >16 roku życia) oraz opiekunów chorego (formularz świadomej zgody pacjenta/opiekunów chorego na udział w badaniu zaaprobowany przez NKBBN Akademii Medycznej w Gdańsku) dokonywano kwalifikacji pacjenta do badania:

- weryfikowano diagnozę T1DM stosując kryteria WHO (WHO 1999) oraz ISPAD (Craig et al., 2009)
- potwierdzano rozpoznanie postaci autoimmunologicznej T1DM na podstawie oznaczeń miana swoistych autoprzeciwciał związanych z T1DM (autoprzeciwciała GAD, IAA, ICA) (→ *Materiały i metody* pkt.6 str.67)
- ustalano moment zachorowania na T1DM – datę podania pierwszej iniekcji insuliny (dożylniej/podskórnej)
- wyliczano wiek kalendarzowy dziecka w momencie zachorowania na podstawie różnicy między datą pierwszej iniekcji insuliny a datą urodzenia oraz kwalifikowano pacjenta do określonej kategorii wiekowej (tabela 2.3)

Tabela 2.3. System kwalifikacji pacjentów do kategorii wiekowych (Needlman, 2000), odpowiadających kolejnym etapom rozwoju psychosomatycznego dziecka

<i>kategoria wiekowa</i>	<i>wiek pacjenta</i>
wiek wczesnodziecięcy	2. – 3. rok życia
wiek przedszkolny	3. – 6. rok życia
wiek szkolny	6. – 12. rok życia
wiek młodzieńczy	12. – 20. roku życia

- na podstawie wywiadu z pacjentem i opiekunami chorego uzyskiwano następujące dane:
 - dane demograficzne: dotyczące miejsca zamieszkania pacjenta (dane te klasyfikowano według Krajowego Rejestru Urzędowego Podziału Terytorialnego Kraju TERYT (GUS, 1995-2013), a następnie dokonywano przyporządkowania danych do określonego powiatu województwa pomorskiego, jak również do określonego rodzaju miejscowości: miasto (z wyszczególnieniem Trójmiasta), teren wiejski)
 - dane kliniczne:
 - dane dotyczące dotychczasowego wywiadu chorobowego u pacjenta: występowanie innych niż cukrzyca chorób autoimmunologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem wywiadu w kierunku AIT oraz ChT
 - dane dotyczące wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy (T1DM, T2DM i innych postaci cukrzycy) oraz chorób autoimmunologicznych (stosowano podział na kategorie chorób autoimmunologicznych w zależności od zajętego procesem chorobowym układu lub narządu, według podręcznika pod red. M. Zembali i A. Górskiego „Zarys immunologii klinicznej” (Zembała and Górski, 2001)), w wywiadzie uwzględniano krewnych I-III°
 - dane dotyczące zachorowania na T1DM: czas trwania wywiadu chorobowego w kierunku objawów T1DM, występowanie choroby infekcyjnej (infekcji wirusowej, bakteryjnej) w ciągu ostatnich 3 miesięcy przed wystąpieniem objawów T1DM, występowanie opóźnienia diagnozy T1DM (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.1 str.38), ilość spożywanych napojów o wysokim ładunku osmolalnym (McDonnell et al., 2005)
- przeprowadzono badanie przedmiotowe pacjenta wraz z oceną stadium rozwoju płciowego według skali Tannera (→ *Aneks 2* str.218) i dokonywano przyporządkowania chorego do określonej kategorii: stadium przedpokwitaniowe (I stadium dojrzewania płciowego według skali Tannera), pokwitanie (II – V stadium dojrzewania płciowego według skali Tannera)
- dokonywano pomiarów antropometrycznych (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.5 str.40)
- na podstawie dokumentacji medycznej pacjenta ustalano:
 - stan kliniczny chorego przy przyjęciu do szpitala (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.2 str.38)
 - rodzaj insulinoterapii i dobowe zapotrzebowanie na insulinę przy wypisie ze szpitala (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.3 str.39 i pkt.2.1.4 str.40)
 - podstawowe stężenie C-peptydu na czczo oraz poziom HbA_{1c} w momencie rozpoznania T1DM (oznaczenia przeprowadzane w ramach rutynowej diagnostyki po rozpoznaniu T1DM, około 4-7 dni od przyjęcia do szpitala, po wyrównaniu zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej i kwasowo – zasadowej)
- pobierano i zabezpieczano krew do wykonania badań genetycznych (→ *Materiały i metody* pkt.3 str.44)
- przeprowadzono pierwszą ankietę dotyczącą stopnia edukacji pacjenta (chorzy > 14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM (→ *Aneks 1* str.212, *Materiały i metody* pkt.2.1.6 str.41)

2.1.1. Opóźnienie diagnozy T1DM – definicja i kategorie (Pawłowicz et al., 2009)

Opóźnienie diagnozy T1DM definiowano jako każdy przypadek braku właściwego rozpoznania u pacjenta w czasie pierwszej wizyty lekarskiej w wyniku:

- nieprawidłowej interpretacji głównych objawów T1DM (np. uznanie poliurii za objaw zakażenia układu moczowego, interpretacja polidypsji jako polidypsji nawykowej, a utraty masy ciała jako następstwa utraty apetytu z innych przyczyn niż T1DM)
- nieprawidłowej interpretacji dodatkowych objawów T1DM (np. pominięcie głównych objawów T1DM i uznanie dodatkowych objawów T1DM, jak grzybicze zapalenie jamy ustnej lub narządów moczowo-płciowych, za odrębną jednostkę chorobową)
- nieprawidłowej interpretacji objawów cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA) (np. uznanie objawów narastającej DKA takich jak bóle brzucha, wymioty za manifestację jednego ze schorzeń gastroenterologicznych, a duszności związanej z DKA – za objaw ciężkiej infekcji dróg oddechowych)
- pominięcia objawów T1DM i leczenia chorób współistniejących (np. infekcji dróg oddechowych, AIT)

2.1.2. Ocena stanu klinicznego pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

Oceny stanu klinicznego pacjenta w momencie rozpoznania T1DM dokonywano na podstawie danych dotyczących obrazu klinicznego przy przyjęciu chorego do szpitala z uwzględnieniem poniższych wyników oznaczeń laboratoryjnych:

- gazometrii krwi tętniczkowej
- stężenia glukozy w osoczu (glc) [mg/dl]
- stężenia ketonów w surowicy/obecności ciał ketonowych w moczu
- stężenia sodu (Na) i potasu (K) w surowicy [mmol/l]
- luki anionowej (LA) [mmol/l] – wyliczanej ze wzoru:
 $LA = Na - (Cl + HCO_3)$ (Wolfsdorf et al., 2009)
- osmolalności surowicy [mOsm/l] – wyliczanej ze wzoru:
 $osmolalność\ surowicy = 2x(Na + K) + glc$ [mmol/l] (Wolfsdorf et al., 2009)
- azotu mocznika (BUN) w surowicy [mmol/kg H₂O]

2.1.2.1. Kryteria rozpoznania cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA)

DKA definiowano jako ostrą, zagrażającą życiu kwasicę metaboliczną rozwijającą się w przypadku nierozpoznanej/niekontrolowanej T1DM na skutek ciężkiego niedoboru insuliny i nadmiernego wydzielania hormonów kontrregulujących: katecholamin, glukagonu, kortyzolu i hormonu wzrostu (Wallach et al., 2011) (Wolfsdorf et al., 2009)

Zgodnie z wytycznymi ISPAD przyjęto następujące kryteria biochemiczne rozpoznania DKA (Wolfsdorf et al., 2009):

- hiperglikemia (stężenie glukozy w osoczu >11 mmol/l [≈ 200 mg/dl])
- pH krwi <7,3 i/lub $HCO_3 < 15$ mmol/l
- ketonemia i ketonuria

Również w oparciu o wytyczne ISPAD (Wolfsdorf et al., 2009), które są zgodne z rekomendacjami innych towarzystw diabetologicznych i endokrynologicznych (m.in. American Diabetes Association ADA (Wolfsdorf et al., 2006), European Society for Paediatric Endocrinology ESPE oraz Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society LWPES (Dunger et al., 2004)), dokonywano klasyfikacji stopnia ciężkości DKA:

- łagodna DKA – $7,2 \leq \text{pH} < 7,3$ i/lub $\text{HCO}_3^- < 15$ mmol/l
- umiarkowana DKA – $7,1 \leq \text{pH} < 7,2$ i/lub $\text{HCO}_3^- < 10$ mmol/l
- ciężka DKA – $\text{pH} < 7,1$ i/lub $\text{HCO}_3^- < 5$ mmol/l

2.1.2.2. Kryteria rozpoznania nieketonowej hiperglikemii hiperosmolalnej (HHS)

HHS rozpoznawano i różnicowano z DKA na podstawie kryteriów przedstawionych w tabeli 2.4

Tabela 2.4. Różnicowanie DKA i HHS (Wallach et al., 2011) (Wolfsdorf et al., 2009)

	<i>DKA</i>	<i>HHS</i>
wyniki oznaczeń laboratoryjnych		
• glukoza w osoczu [mg/dl]	250-600	>600, często >1000
• sód w surowicy [mmol/l]	zazwyczaj ↓	N, ↑ lub ↓
• potas w surowicy [mmol/l]	N, ↑ lub ↓	N lub ↑
• HCO_3^- [mmol/l]	zazwyczaj <15	zazwyczaj >20
• pH krwi	<7,30	>7,30
• ciała ketonowe w surowicy	obecne	nieobecne lub ślad
• ciała ketonowe w moczu	obecne	śląd
• osmolalność surowicy [mOsm/l]	<320	>320, nawet do 380
• BUN w surowicy [mmol/kg H ₂ O]	mniej ↑	bardziej ↑
obraz kliniczny		
• początek	ostry/podostry	podstępny
• objawy prodromalne	<1 dzień	kilka dni
• odwodnienie	mniejszego stopnia	większego stopnia
• woń acetonu w wydychanym powietrzu	tak	nie
• oddech Kussmaula	tak	nie
• bóle brzucha	tak	nie
• ciepłota ciała	N lub ↓	N lub ↑
• zaburzenia świadomości	umiarkowane	ciężkie
• zaburzenia neurologiczne	rzadko	bardzo często

N – prawidłowe, ↑ - podwyższone, ↓ - obniżone

2.1.2.3. Współwystępowanie cukrzycowej kwasicy ketonowej oraz nieketonowej hiperglikemii hiperosmolalnej (zespół nakładania DKA-HHS)

Współwystępowanie DKA i HHS u pacjenta (tzw. zespół nakładania DKA-HHS) rozpoznawano na podstawie następujących kryteriów (McIssaac et al., 2002):

- pH krwi <7,3 i/lub $\text{HCO}_3^- < 15$ mmol/l
- osmolalność surowicy ≥ 330 mOsm/l

Stopień ciężkości DKA w przypadku zespołu nakładania DKA-HHS oceniano zgodnie z klasyfikacją ISPAD przedstawioną w pkt. 2.1.2.1 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.2.1 str.38)

2.1.3. Rodzaje terapii stosowane u pacjentów zakwalifikowanych do badania

Sposób terapii pacjentów włączonych do badania określano stosując następujący podział:

- insulinoterapia intensywna:
 - osobista pompa insulinowa

- intensywna insulinoterapia sposobem *basal – bolus* za pomocą automatycznych wstrzykiwaczy (tzw. penów) – analog szybko działający/insulina krótko działająca przed posiłkami (*bolus*) + analog/insulina długo działająca wieczorem lub rano (*basal*)
- insulinoterapia zintensyfikowana (za pomocą automatycznych wstrzykiwaczy – tzw. penów):
 - tylko analog szybko działający/insulina krótko działająca przed posiłkami
 - tylko analog/insulina długo działająca wieczorem lub rano
 - analog szybko działający/insulina krótko działająca tylko do jednego posiłku + analog/insulina długo działająca wieczorem
- bez insulinoterapii – leczenie dietetyczne, odpowiednio planowany wysiłek fizyczny

Analizę sposobu leczenia według powyższych kategorii przeprowadzano w przypadku każdego pacjenta w momencie wypisu ze szpitala, tuż po rozpoznaniu T1DM, a następnie kontynuowano w ramach 12-miesięcznej obserwacji chorego, dokonując aktualizacji danych dotyczących insulinoterapii podczas każdej wizyty kontrolnej (→ *Materiały i metody* pkt.2.2, podpunkt *Aktualizacja danych klinicznych pacjenta* str.44).

Natomiast w analizach dotyczących występowania potencjalnych zależności pomiędzy określonym rodzajem insulinoterapii a zmianami wybranych parametrów na przestrzeni całego rocznego okresu obserwacji chorego, wykorzystywano kategoryzację sposobu leczenia, uwzględniającą stałość stosowania danego rodzaju insulinoterapii oraz ewentualne zmiany w terapii spowodowane przebiegiem choroby:

- insulinoterapia intensywna za pomocą penów przez cały okres rocznej obserwacji pacjenta
- insulinoterapia intensywna za pomocą osobistej pompy insulinowej przez cały okres rocznej obserwacji chorego
- insulinoterapia intensywna początkowo za pomocą penów, a następnie, w dalszej części obserwacji pacjenta, za pomocą osobistej pompy insulinowej
- insulinoterapia zintensyfikowana w początkowym okresie choroby z możliwym przejściem na leczenie intensywne w dalszej obserwacji pacjenta

2.1.4. Ocena dobowego zapotrzebowania na insulinę

Dobowe zapotrzebowanie na insulinę (TDID) wyliczano na podstawie średniej liczby jednostek insuliny przyjętych przez pacjenta w ciągu trzech ostatnich dni poprzedzających wypis ze szpitala w przeliczeniu na kilogram aktualnej masy ciała.

Dalszą ocenę TDID przeprowadzano z wykorzystaniem kryteriów ISPAD (IDF/ISPAD, 2011), uwzględniających stadium rozwoju płciowego (ocena stadium rozwoju płciowego → *Materiały i metody* pkt.2.1 podpunkt dotyczący badania przedmiotowego pacjenta str.37):

- adekwatne TDID u pacjentów w stadium przedpokwitaniowym (poza okresem częściowej remisji klinicznej): $<0,7$ j./kg m.c./dobę
- zwiększone TDID u pacjentów w stadium przedpokwitaniowym (poza okresem częściowej remisji klinicznej): $\geq 0,7$ j./kg m.c./dobę
- adekwatne TDID u pacjentów w okresie pokwitania: $<0,7$ j./kg m.c./dobę lub $\geq 0,7$ j/kg m.c./dobę (maksymalnie do 2 j./kg m.c./dobę)

2.1.5. Pomiary antropometryczne

Pierwsze pomiary antropometryczne u pacjentów zakwalifikowanych do badania przeprowadzano po wyrównaniu zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej oraz wodno – elektrolitowej, w okresie około 7-10 dni od przyjęcia do szpitala z powodu świeżego rozpoznania T1DM. Powyższa procedura pozwoliła zminimalizować wpływ różnego stopnia odwodnienia organizmu, towarzyszącego zaburzeniom metabolicznym w momencie ujawniania się T1DM, na wartości analizowanych parametrów antropometrycznych.

U każdego z badanych pacjentów dokonywano pomiaru następujących parametrów antropometrycznych:

- masy ciała [kg]
- wysokości ciała [cm]

Na podstawie powyższych pomiarów wyliczano wartość wskaźnika względnej masy ciała – BMI (*Body Mass Index*) celem oceny stanu odżywienia pacjenta.

Wszystkie powyższe pomiary i obliczenia powtarzano u każdego pacjenta zakwalifikowanego do badania podczas kolejnych wizyt kontrolnych w ramach 12-miesięcznej obserwacji (→ *Materiały i metody* pkt.2.2 str.43).

2.1.5.1. Pomiar masy ciała

Pomiaru masy ciała dokonywano na czczo, za pomocą elektronicznej wagi lekarskiej, z dokładnością do 0,1 kg.

2.1.5.2. Pomiar wysokości ciała

Do pomiarów wysokości ciała wykorzystywano stacjonarny stadiometr typu Harpander. W każdym przypadku przeprowadzano pomiar trzykrotnie, z dokładnością do 0,1 cm, przy odpowiedniej postawie pacjenta (kończyny dolne wyprostowane w stawach kolanowych, ramiona opuszczone wzdłuż tułowia, głowa ustawiona w tzw. pozycji frankfurckiej – otwór zewnętrznego przewodu słuchowego tworzy z dolną krawędzią oczodołu linię prostopadłą do osi długiej tułowia, usunięte ozdoby z włosów) (Romer, 2006). Ze wszystkich dokonanych pomiarów obliczano wartość średnią, którą uznawano za ostateczny wynik pomiaru wysokości ciała dziecka.

2.1.5.3. Wskaźniki oceniające stan odżywienia pacjenta

Na podstawie powyżej opisanych pomiarów antropometrycznych wyliczano wskaźnik względnej masy ciała BMI według następującego wzoru matematycznego (Palczewska and Niedźwiecka, 2001):

$$\text{BMI} = \text{masa ciała [kg]} / \text{wysokość ciała}^2 [\text{m}^2]$$

Następnie dokonywano normalizacji uzyskanych wartości wskaźnika względem płci i wieku, otrzymując ostateczną wartość BMI wyrażoną jako Z-score czyli liczbę odchyień standardowych od wartości średniej dla populacji dzieci zdrowych. Ze względu na brak odpowiednich tabel norm dla populacji dziecięcej z regionu województwa pomorskiego podczas normalizacji danych wykorzystywano tabele norm dla populacji dziecięcej z regionu województwa mazowieckiego (Palczewska and Niedźwiecka, 2001), a w przypadku pacjentów $\geq 6,5$ roku życia także tabele norm dla ogólnopolskiej populacji dziecięcej opracowane w ramach programu OLAF (Kułaga et al., 2011).

Ocenę stanu odżywienia badanych pacjentów przeprowadzano na podstawie poniższych kryteriów (Woynarowska, 2008):

- niedobór masy ciała – BMI z-score $\leq -1\text{SD}$ (pozycja centylowa < 5 percentyla)
- nadwaga – $+1\text{SD} \leq \text{BMI z-score} < +2\text{SD}$ (pozycja centylowa ≥ 85 percentyla i < 95 percentyla)
- otyłość – BMI z-score $\geq +2\text{SD}$ (pozycja centylowa ≥ 95 percentyla)

2.1.6. Badanie ankietowe oceniające poziom edukacji pacjenta (chorzy > 14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM

Poziom edukacji pacjenta i/lub opiekunów chorego był oceniany za pomocą badania ankietowego skonstruowanego na potrzeby projektu przez lek. Małgorzatę Pawłowicz i konsultowanego przez prof. dr hab. med. Annę Balcerską. Arkusze badania zostały zatwierdzone przez NKBBN Akademii Medycznej w Gdańsku (nr zgody NKEBN/27-399/2008).

Ankieta miała charakter testu wielokrotnego wyboru, składającego się z 24 pytań (→ *Aneks 1* str.212) i była skierowana do pacjentów powyżej 14 roku życia oraz ich opiekunów, a w przypadku dzieci młodszych, wyłącznie do opiekunów chorego. Zakres wiedzy oceniany za pomocą badania ankietowego obejmował tematykę cyklu szkoleń prowadzonych przez wykwalifikowanych edukatorów podczas hospitalizacji pacjenta z powodu rozpoznania T1DM. Publikacja Hanas R. „*Cukrzyca typu 1 u dzieci, młodzieży i dorosłych. Jak stać się znawcą swojej cukrzycy.*” (Hanas, 2003), która była wykorzystywana podczas w/w szkoleń, stanowiła również główny materiał źródłowy do skonstruowania odpowiedzi w badaniu ankietowym.

Ankieta było przeprowadzana w przypadku każdego pacjenta podczas procedury kwalifikacji do badania, po zakończeniu cyklu w/w szkoleń, a następnie powtarzana w odstępach 6-miesięcznych w czasie rocznej obserwacji chorego (→ *Materiały i metody* pkt.2.2 str.43).

2.1.6.1. System oceny badania ankietowego oceniającego poziom edukacji pacjenta (chorzy > 14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM

Za każdą poprawnie zaznaczoną w arkuszu badania ankietowego odpowiedź pacjent/opiekun chorego otrzymywał 1 punkt. (→ *Aneks 1* str.212) Błędne odpowiedzi były punktowane za pomocą punktów ujemnych (każda nieprawidłowa odpowiedź: -1 punkt). Następnie sumowano wszystkie punkty z arkusza ankiety i dokonywano oceny poziomu wiedzy pacjenta/opiekunów chorego na temat T1DM całościowo oraz z uwzględnieniem podziału na grupy pytań związane z określonymi zagadnieniami. Podział pytań ankietowych na bloki tematyczne oraz sposób ich punktacji przedstawiono w tabeli 2.5.

Tabela 2.5. Podział badania ankietowego na bloki tematyczne i sposób ich punktacji

<i>blok tematyczny</i>	<i>liczba porządkowa pytania *)</i>	<i>maksymalna punktacja za pytanie</i>	<i>maksymalna punktacja za blok tematyczny</i>
naturalny przebieg choroby	1.	3	20
	2.	5	
	3.	3	
	4.	5	
	5.	4	
samokontrola	6.	3	15
	16.	3	
	23.	3	
	24.	6	
wysiłek fizyczny	7.	3	5
	8.	2	
insulinoterapia	9.	3	7
	10.	2	
	11.	2	
cukrzycowa kwasica ketonowa	12.	2	11
	13.	3	
	14.	3	
	15.	3	
hipoglikemia	17.	5	29
	18.	9	
	19.	2	
	20.	4	
	21.	4	
	22.	5	
<i>maksymalna punktacja za całe badanie ankietowe</i>			87

*) według arkusza badania ankietowego oceniającego poziom edukacji pacjenta (chorzy >14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM zamieszczonego w *Aneksie 1* (→ *Aneks 1* str.212).

Ilość punktów uzyskanych przez pacjenta/opiekunów pacjenta w badaniu ankietowym, z uwzględnieniem podziału na poszczególne bloki tematyczne, wyrażano jako wartość procentową z maksymalnej punktacji możliwej do osiągnięcia za całe badanie ankietowe i za określony blok tematyczny, a następnie oceniano zgodnie z kryteriami przedstawionymi w tabeli 2.6.

Tabela 2.6. Kryteria oceny badania ankietowego za pomocą wartości procentowej z maksymalnej punktacji za całe badanie/za blok tematyczny ankiety

<i>wartość procentowa z maksymalnej punktacji za badanie ankietowe/ blok tematyczny badania ankietowego</i>	<i>opisowa ocena poziomu wiedzy na temat choroby ogólnie/na temat zagadnienia z danego bloku tematycznego ankiety</i>
81-100%	poziom wiedzy bardzo dobry
61-80%	poziom wiedzy dobry
51-60%	poziom wiedzy zadowalający
≤50%	poziom wiedzy niezadowalający

Wyniki badania ankietowego omawiano z pacjentem/opiekunami chorego podczas kolejnej wizyty kontrolnej w ramach 12-miesięcznej obserwacji klinicznej. Podczas omówienia przedstawiano pacjentowi/opiekunowi chorego ocenę ankiety zgodnie z kryteriami podanymi w tabeli 2.6 oraz sugerowano powtórzenie zagadnień, za które została przyznana najmniejsza ilość punktów. Pacjentowi/opiekunom chorego udzielano odpowiedzi na ewentualne dodatkowe pytania dotyczące badania ankietowego. Natomiast nie wskazywano prawidłowych odpowiedzi na poszczególne pytania ankietowe, ze względu na zaplanowaną powtórzną ocenę poziomu wiedzy na temat T1DM w 6 i 12 miesiącu obserwacji klinicznej z wykorzystaniem identycznego arkusza ankiety.

2.2. Roczna obserwacja pacjentów zakwalifikowanych do badania

Pacjenci zakwalifikowani do badania podlegali 12 – miesięcznej obserwacji. Łącznie u każdego chorego zaplanowano 4 wizyty kontrolne w rocznym okresie obserwacyjnym, z częstotliwością co 3 miesiące (co 120 dni), licząc od daty pierwszej iniekcji insuliny (→ *Materiały i metody* pkt.1 str.35)

Wizyty kontrolne przeprowadzano według poniższego schematu:

- pomiar glikemii na czczo, przed podaniem pierwszej dawki analogu szybko działającego/insuliny krótko działającej (pomiar dokonywany przez pacjenta/opiekunów pacjenta za pomocą osobistego glukometru chorego, glukometr kalibrowany do osocza)
- pobranie krwi żyłnej do badań laboratoryjnych po odpowiednim przygotowaniu pacjenta, zgodnie z wytycznymi Immunology of Diabetes Society (Greenbaum and Harrison, 2003):
 - chory na czczo
 - w przypadku insulinoaterapii z wykorzystaniem automatycznych wstrzykiwaczy (tzw. penów):
podanie wieczornej dawki analogu/insuliny długo działającej w dniu poprzedzającym badania, w dniu badania – pobranie krwi przed podaniem pierwszej dawki analogu szybko działającego/ insuliny krótko działającej
 - w przypadku insulinoaterapii z wykorzystaniem osobistej pompy insulinowej:
w nocy przed badaniem kontynuacja ciągłego wlewu podstawowego insuliny, w dniu badania – pobranie krwi po 15-30 minutach od zatrzymania wlewu podstawowego insuliny, przed podaniem pierwszego bolusa posiłkowego insuliny
 - w przypadku hiperglikemii nocnej i konieczności podania dodatkowej dawki/bolusa analogu szybko działającego/ insuliny krótko działającej w nocy poprzedzającej badania:

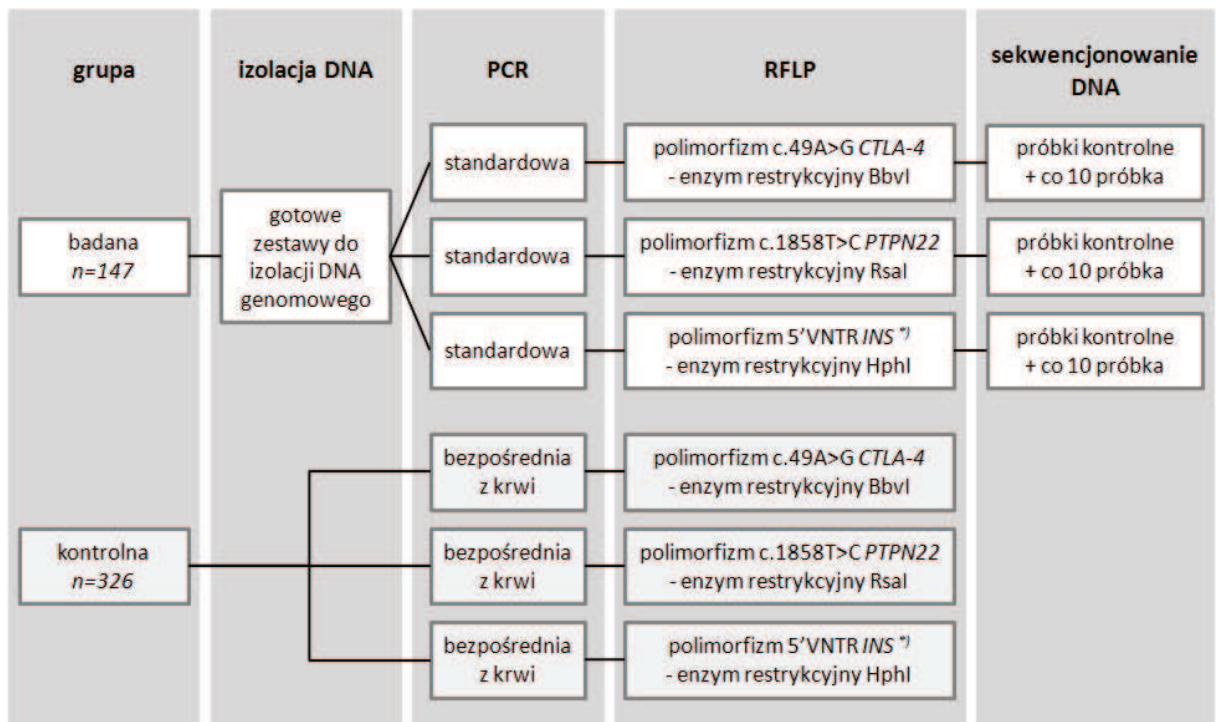
- pobranie krwi po 4-6 godzinach od dodatkowej dawki/bolusa analogu szybko działającego/insuliny krótko działającej, przed pierwszą posiłkową dawką/bolusem analogu szybko działającego/insuliny krótko działającej
- w przypadku hipoglikemii nocnej lub porannej oraz konieczności przyjęcia 1 wymiennika węglowodanowego (WW) płynnej glukozy lub soku:
zmiana terminu wizyty kontrolnej lub jeśli to możliwe pobranie krwi po 4-6 godzinach od przyjęcia 1 WW, przed pierwszą posiłkową dawką/bolusem analogu szybko działającego/insuliny krótko działającej
 - aktualizacja danych klinicznych pacjenta:
 - rodzaj stosowanej insulinoterapii, a w przypadku zmiany rodzaju leczenia – odnotowanie dokładnej daty rozpoczęcia nowego sposobu terapii (sposób kategoryzacji i analizy rodzaju insulinoterapii przedstawiono w punkcie 2.1.3 rozdziału *Materiały i metody* → *Materiały i metody* pkt.2.1.3 str.39)
 - dobowe zapotrzebowanie na insulinę (TDID) – ocena na podstawie średniej liczby jednostek insuliny przyjętych przez pacjenta w ciągu trzech ostatnich dni poprzedzających wizytę kontrolną w przeliczeniu na kilogram aktualnej masy ciała (sposób analizy TDID z uwzględnieniem kryteriów ISPAD opisano w punkcie 2.1.4 rozdziału *Materiały i metody* → *Materiały i metody* pkt.2.1.4 str.40)
 - badanie przedmiotowe pacjenta wraz z oceną stadium rozwoju płciowego według skali Tannera (→ *Aneks 2* str.218) i przyporządkowanie chorego do określonej kategorii: stadium przedpokwitaniowe (I stadium dojrzewania płciowego według skali Tannera), pokwitanie (II – V stadium dojrzewania płciowego według skali Tannera)
 - pomiary antropometryczne pacjenta (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.5 str.40) celem oceny dynamiki rozwoju somatycznego oraz aktualnego stanu odżywienia pacjenta
 - w przypadku wizyty po 6 i 12 miesiącach od momentu zachorowania na T1DM: powtórne badanie ankietowe oceniające poziom edukacji pacjenta (chorzy > 14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM przeprowadzane:
 - celem analizy dynamiki zmian zakresu wiedzy pacjenta i jego opiekunów na temat choroby w czasie obserwacji klinicznej oraz wpływu tych zmian na parametry wyrównania metabolicznego i funkcji resztkowej komórek β trzustki
 - zgodnie z zasadami ustalonymi dla pierwszego badania ankietowego (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.6 str.41): z wykorzystaniem identycznego arkusza ankiety (→ *Aneks 1* str.212) oraz z zachowaniem tych samych kryteriów oceny i sposobu omawiania wyników ankiety z pacjentem/opiekunami chorego (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.6.1 str.42)

Harmonogram oznaczeń laboratoryjnych realizowanych w czasie poszczególnych wizyt kontrolnych przedstawiono w harmonogramie prezentowanego badania (tab.2.2)

3. Badania genetyczne – analiza wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS*

Wszystkie oznaczenia genetyczne zostały wykonane przez lek. Małgorzatę Pawłowicz w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania przeprowadzono za zgodą Kierownika Katedry i Zakładu prof. dr hab. med. Janusza Limona, pod opieką mgr Lucyny Morzuch.

Algorytm realizacji badań genetycznych przedstawiono na rycinie 2.1.



PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, RFLP – analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych
 *) polimorfizm 5'VNTR *INS* – ocena pośrednia poprzez oznaczenia polimorfizmu –23*HphA*>T

Rycina 2.1. Algorytm badań genetycznych

3.1. Analiza wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* – grupa badana

U wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badania przeprowadzono pełną analizę następujących polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS*:

- c.49A>G genu *CTLA-4* (rs231775)
- c.1858T>C genu *PTPN22* (rs2476601)
- 5'VNTR genu *INS* – analiza pośrednia poprzez genotypowanie polimorfizmu –23*HphA*>T genu *INS* (rs689)

Materiał biologiczny do badań genetycznych – pełną krew obwodową w objętości 2 ml, pobierano od pacjenta do probówki zawierającej kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) – antykoagulant nieposiadający właściwości hamujących aktywność enzymów restrykcyjnych. Do pobrania krwi wykorzystywano zamknięty, próżniowy system VACUETTE (Greiner Bio-One Ltd., Wielka Brytania). Do momentu izolacji genomowego DNA pobrany materiał biologiczny przechowywano w temperaturze -20°C (maksymalny czas przechowywania krwi: 6 miesięcy).

Próbki genomowego DNA po izolacji zakodowano celem zminimalizowania wpływu badacza na wyniki dalszych oznaczeń. Następnie wyizolowane genomowe DNA wykorzystywano do analiz wybranych polimorfizmów genetycznych za pomocą metody PCR-RFLP (PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, RFLP – analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) (ryc.2.1). Powstałe produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie na żelu agarozowym, uzyskując wyniki genotypowania poszczególnych polimorfizmów. Celem weryfikacji wyników metody PCR-RFLP przeprowadzono sekwencjonowanie DNA (próbki kontrolne + co 10 analizowana próbka) (ryc.2.1).

3.1.1. Izolacja genomowego DNA

Genomowe DNA izolowano z pełnej krwi obwodowej z wykorzystaniem gotowych zestawów do izolacji Genomic Midi AX (A&A Biotechnology, Polska). Powyższa procedura polegała na zastosowaniu specjalnych

membran jonowo-wymiennych wiążących DNA z wydajnością 99,9% i obejmowała sześć zasadniczych etapów:

1. lizę komórek pod wpływem buforu lizującego
2. denaturację białek katalizowaną przez proteazę
3. usuwanie białek i innych zanieczyszczeń z wykorzystaniem buforu płuczającego oraz minikolumn zawierających membrany jonowo-wymienne
4. wymywanie DNA z membran roztworem soli o wysokiej sile jonowej (bufor elucyjny)
5. odsalanie i zagęszczanie DNA poprzez precypitację alkoholową (izopropanol, 70% etanol)
6. rozpuszczanie osadu DNA poprzez dodanie podwójnie destylowanej wody (ddH₂O)

Szczegółowy protokół izolacji genomowego DNA z wykorzystaniem zestawów Genomic Midi AX (A&A Biotechnology, Polska) zamieszczono w *Aneksie 3* (→ *Aneksie 3* str.219).

3.1.2. Ocena jakościowa i ilościowa preparatów DNA

Ocenę jakościową i ilościową wyizolowanych preparatów DNA przeprowadzano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr Nano Drop ND – 1000, NanoDrop Technologies Inc., USA). Do kalibracji spektrofotometru używano tego samego roztworu, który wykorzystywano uprzednio do rozpuszczania osadu DNA (ddH₂O). Po kalibracji sprzętu pomiarowego odczytywano wartości absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm oraz stężenie DNA w preparacie [ng/μl]. Do dalszych analiz wykorzystywano próbki DNA, dla których wartość współczynnika A_{260}/A_{280} mieściła się w granicach 1,8–2,0 (zakres wartości współczynnika A_{260}/A_{280} wskazujący na wystarczające oczyszczenie preparatu DNA z białek).

Dalsze badania przeprowadzano z wykorzystaniem rozcieńczeń wyizolowanego DNA do wartości 100 ng/μl. Próbkę DNA po rozcieńczeniu przechowywano w temperaturze +4°C, a stężone preparaty DNA w temperaturze -20°C.

3.1.3. Analiza bioinformatyczna sekwencji DNA badanych genów

Na podstawie oceny bioinformatycznej sekwencji DNA badanych genów przygotowano kolejne etapy analizy wybranych polimorfizmów: zaprojektowano specyficzne startery wykorzystywane w dalszej analizie do reakcji PCR oraz dokonano wyboru odpowiedniego enzymu restrykcyjnego rozpoznającego miejsce polimorficzne w reakcji RFLP.

Analiza bioinformatyczna obejmowała następujące etapy:

- wyszukanie sekwencji DNA badanych genów w bazie danych Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>)
 - gen *CTLA-4* – do analizy wybrany transkrypt o numerze identyfikacyjnym ENST00000302823
 - gen *PTPN22* – do analizy wybrany transkrypt o numerze identyfikacyjnym ENST00000359785
 - gen *INS* – do analizy wybrany transkrypt o numerze identyfikacyjnym ENST00000381330
- wyszukanie analizowanego miejsca polimorficznego w wybranej sekwencji genu
- zaprojektowanie specyficznych starterów komplementarnych do sekwencji DNA zawierającej analizowane miejsce polimorficzne, umożliwiających powielenie wybranego odcinka DNA w czasie reakcji PCR (stosowane oprogramowanie: Primer3 version 0.4.0 – <http://frodo.wi.mit.edu>)
- analiza ewentualnego istnienia innych potencjalnych miejsc przyłączenia starterów, ze względu na możliwość występowania w genomie ludzkim regionów DNA o podobnej sekwencji (stosowane oprogramowanie: Basic Local Alignment Search Tool BLAST – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

- dokonanie wyboru odpowiedniego enzymu restrykcyjnego do reakcji RFLP, rozpoznającego miejsce polimorficzne w sekwencji DNA amplifikowanej podczas reakcji PCR (stosowane oprogramowanie: NEBcutter V2.0 – <http://tools.neb.com/NEBcutter2>)

3.1.4. Analiza wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* – reakcja PCR-RFLP

Polimorfizmy c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22*, –23*HphIA*>T genu *INS* (marker polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*) analizowano z wykorzystaniem metody PCR-RFLP. Ogólny opis procedur stosowanych w ocenie wszystkich badanych polimorfizmów podano w podpunktach poniżej (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.1 – 3.1.4.3 str.47-48). Różnice w metodyce analiz poszczególnych polimorfizmów przedstawiono w odrębnych punktach (polimorfizm genu *CTLA-4* → *Materiały i metody* pkt. 3.1.5 str.49; polimorfizm genu *PTPN22* → *Materiały i metody* pkt.3.1.6 str.53; polimorfizm genu *INS* → *Materiały i metody* pkt.3.1.7 str.56).

3.1.4.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) z wykorzystaniem specyficznych starterów

Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej wykorzystywano próbki wyizolowanego od pacjentów DNA rozcieńczone do stężenia 100 ng/μl (matryca DNA) oraz specyficzne dla amplifikowanego regionu DNA startery. Startery projektowano z wykorzystaniem oprogramowania opisanego w punkcie dotyczącym analizy bioinformatycznej sekwencji DNA badanych genów (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.3 str.46). Syntezę chemiczną zaprojektowanych oligonukleotydów zlecano Pracowni Sekwencjonowania DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Oceny jakości i efektywność reakcji PCR dokonywano za pomocą rozdziału elektroforetycznego na 2% żelach agarozowych. Do elektroforezy używano mieszaniny 5 μl produktu PCR i 5 μl buforu obciążającego (skład roztworu 6x: 0,25% ksylan cyjanolu – Sigma-Aldrich Co. LLC, USA; 0,25% błękit bromofenolowy – Sigma-Aldrich Co. LLC, USA; 40% roztwór wodny sacharozy). Zastosowanie bromku etydyny (Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) jako składnika żelu agarozowego (4 μl bromku etydyny na każde 100 ml 2% żelu agarozowego) pozwalało, po zakończeniu elektroforezy, uwidocznić fragmenty DNA na żelu w świetle UV o długości 312 nm.

Parametry rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz –23*HphIA*>T genu *INS* przedstawiono w tabeli 2.7.

3.1.4.2. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) z wykorzystaniem odpowiednich enzymów restrykcyjnych

W dalszej analizie wybranych polimorfizmów genu *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* produkty reakcji PCR poddawano trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi, rozpoznającymi badane miejsce polimorficzne w amplifikowanej sekwencji DNA:

- polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – enzym restrykcyjny BbvI (BseXI)
- polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – enzym restrykcyjny RsaI
- polimorfizm –23*HphIA*>T genu *INS* jako marker polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* – enzym restrykcyjny HphI

Procedurę wyboru odpowiednich enzymów restrykcyjnych, z wykorzystaniem określonych narzędzi bioinformatycznych, opisano w punkcie 3.1.3 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.3 str.46).

Szczegółowe dane dotyczące sposobu i warunków przeprowadzania reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz –23*HphIA*>T genu *INS* przedstawiono w odrębnych podpunktach rozdziału *Materiały i metody*. (→ *Materiały i metody* polimorfizm genu *CTLA-4* – pkt.3.1.5.2 str.51; polimorfizm genu *PTPN22* – pkt.3.1.6.2 str.54; polimorfizm genu *INS* – pkt.3.1.7.2 str.58).

Produkty reakcji RFLP rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelach agarozowych. Do 20 µl reakcyjnej mieszaniny hydrolizującej dodawano 5 µl buforu obciążającego i наносono na podłoże agarozowe. Fragmenty restrykcyjne na żelu uwidaczniano dzięki zastosowaniu bromku etydydy jako składnika żelu agarozowego, co umożliwiała ocenę żelu w świetle UV o długości 312 nm po zakończeniu elektroforezy.

W przypadku rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz -23*HphI*A>T genu *INS* stosowano identyczne warunki, jak podczas elektroforezy produktów reakcji PCR (tab.2.7).

Tabela 2.7. Protokół elektroforezy produktów reakcji PCR–RFLP w analizie badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS*

rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR-RFLP	
warunki rozdziału elektroforetycznego	
stężenie agarozy	2% (Prona Agarose, Hiszpania)
rodzaj buforu	1xTBE (rozcieńczenie roztworu 10xTBE) skład roztworu 10xTBE: <ul style="list-style-type: none"> • 108 g TRIS (MP Biochemicals, USA) • 55 g kwasu bornego (MP Biochemicals, USA) • 40 ml 0,5M EDTA pH 8,0 (SERVA Electrophoresis GmbH, Niemcy) • do 1000 ml ddH₂O
marker wielkości	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
napięcie prądu	120 V
temperatura	22-24°C
czas trwania	50 minut – polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i> 60 minut { polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i> polimorfizm -23 <i>HphI</i> A>T genu <i>INS</i>
stosowany sprzęt laboratoryjny	
aparat do elektroforezy agarozowej Sub-Cell GT i Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)	
zasilacz PowerPac 3000 (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)	
system do archiwizacji żeli Gel Doc 2000 z oprogramowaniem Quanti One (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)	

3.1.4.3. Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzano celem weryfikacji wyników metody PCR-RFLP stosowanej w analizie wszystkich badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS*.

W początkowym etapie analizy wykonywano sekwencjonowanie produktów PCR dla trzech próbek, w przypadku których otrzymane wyniki reakcji PCR-RFLP pozwalały na stworzenie kompletu wszystkich trzech genotypów badanego polimorfizmu (dwie homozygoty, heterozygota). Powyższe próbki po potwierdzeniu zgodności wyników reakcji sekwencjonowania z rezultatami metody PCR-RFLP wykorzystywano w dalszej analizie badanego polimorfizmu jako próbki kontrolne do reakcji PCR-RFLP.

Po zakończeniu genotypowania wszystkich badanych próbek, w kolejnym etapie przeprowadzano sekwencjonowanie DNA z próbek o wątpliwym wyniku genotypowania oraz próbek wybranych losowo. Łącznie dokonano sekwencjonowania produktów PCR dla co 10 badanej próbki w przypadku wszystkich analizowanych polimorfizmów.

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzano z wykorzystaniem gotowych zestawów do sekwencjonowania BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies Corporation, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki prowadzenia reakcji sekwencjonowania podczas analizy badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* przedstawiono w tabeli 2.8. Produkty PCR

wykorzystywane do reakcji sekwencjonowania oczyszczano za pomocą gotowych zestawów do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych Clean-up (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z protokołem producenta.

Tabela 2.8. Protokół sekwencjonowania produktów reakcji PCR w analizie badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS*

<i>sekwencjonowanie produktów reakcji PCR</i>			
skład mieszaniny reakcyjnej			
odczynnik	objętość odczynnika		
BigDye® Terminator (Life Technologies Corporation, USA)	1,0 µl		
starter <i>Forward/Reverse</i> (10 µM) (IBB PAN, Polska)	2,0 µl		
bufor do sekwencjonowania 5x (Life Technologies Corporation, USA)	4,0 µl		
oczyszczony produkt PCR	2,0 µl		
ddH ₂ O	11,0 µl		
łącznie objętość mieszaniny	20,0 µl		
model stosowanego termocyklera			
GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Life Technologies Corporation, USA)			
etapy sekwencjonowania produktów reakcji PCR			
etapy reakcji	temperatura	czas trwania	liczba cykli
I	95°C	2 minuty	} 25
II	95°C	10 sekund	
III	50°C	5 sekund	
IV	60°C	4 minuty	

Produkty reakcji sekwencjonowania oczyszczano z nadmiaru dideoksyrybonukleotydów za pomocą gotowych zestawów do usuwania terminatorów po reakcji sekwencyjnej ExTerminator (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z protokołem producenta. Oczyszczone produkty reakcji sekwencjonowania po elucji ddH₂O poddawano denaturacji termicznej (temp. 95°C przez 5 minut). Odczytu sekwencji DNA dokonywano za pomocą sekwenatora ABI Prism 310 (Applied Biosystem, Life Technologies Corporation, USA), a następnie przeprowadzano ich analizę przy użyciu oprogramowania ABI Data Collection Software v1.0.2. (Applied Biosystem, Life Technologies Corporation, USA). Analizowane sekwencje porównywano z sekwencjami referencyjnymi zawartymi w bazie danych Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>).

3.1.5. Analiza polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*

Polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* analizowano za pomocą metody PCR-RFLP, a następnie wyniki weryfikowano reakcją sekwencjonowania, zgodnie z ogólnym opisem procedur przedstawionym w punkcie 3.1.4 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4 str.47). Poniżej podano szczegółowe dane dotyczące sposobu i warunków przeprowadzania reakcji PCR-RFLP oraz sekwencjonowania podczas analizy badanego polimorfizmu genu *CTLA-4*.

3.1.5.1. Analiza polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* – reakcja PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów

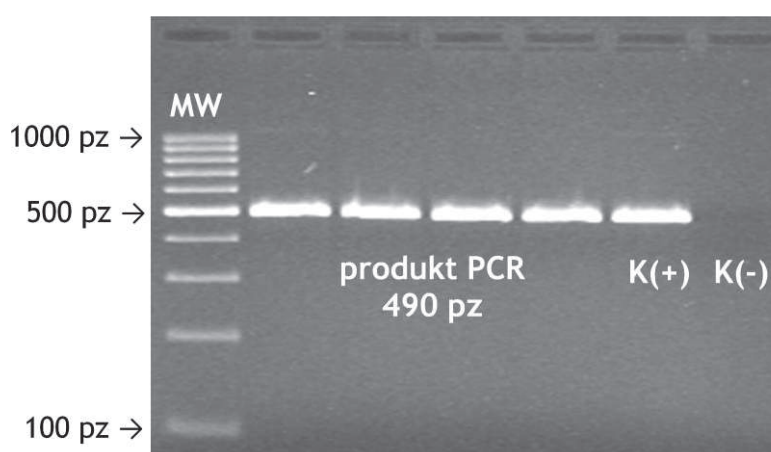
Dokładny opis warunków przeprowadzania reakcji PCR w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* zawiera tabela 2.9.

Tabela 2.9. Protokół reakcji PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*

reakcja PCR – analiza polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>			
sekwencja starterów stosowanych w reakcji PCR			
<i>CTLA-4 Forward</i> 5' TCCTTGATTCTGTGTGGGTTTC 3'			
<i>CTLA-4 Reverse</i> 5' GGGTCTGAAATTGCCTGTGT 3'			
długość amplifikowanego fragmentu DNA			
490 par zasad (pz)			
skład mieszaniny reakcyjnej			
odczynnik		objętość odczynnika	
matryca DNA (100 ng/μl)		1,0 μl	
starter <i>CTLA-4 Forward</i> (10 μM) (IBB PAN, Polska)		1,0 μl	
starter <i>CTLA-4 Reverse</i> (10 μM) (IBB PAN, Polska)		1,0 μl	
dNTP (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		1,0 μl	
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		1,5 μl	
polimeraza <i>Taq</i> (5U/μl) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		0,1 μl	
bufor z (NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)		2,5 μl	
ddH ₂ O		16,9 μl	
łącna objętość mieszaniny		25,0 μl	
model stosowanego termocyklera			
GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Life Technologies Corporation, USA)			
etapy reakcji PCR			
nazwa etapu reakcji	temperatura	czas trwania	liczba cykli
denaturacja wstępna	95°C	5 minut	1
denaturacja	95°C	30 sekund	} 35
hybrydyzacja	53°C	1 minuta	
elongacja	72°C	1 minuta	
elongacja końcowa	72°C	10 minut	1

Rozdział elektroforetyczny produktów powyższej reakcji PCR przeprowadzono na żelach agarozowych zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 2.7 (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.1 → tab.2.7 str.48).

Przykładowy żel z uwidocznionymi w świetle UV produktami PCR przedstawiono na rycinie 2.2.



MW – marker wielkości, K(+) – kontrola pozytywna, K(-) – kontrola negatywna, pz – para zasad

Rycina 2.2. Przykładowy rozkład elektroforetyczny produktów PCR w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*

3.1.5.2. Analiza polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* – reakcja RFLP z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego BbvI (BseXI)

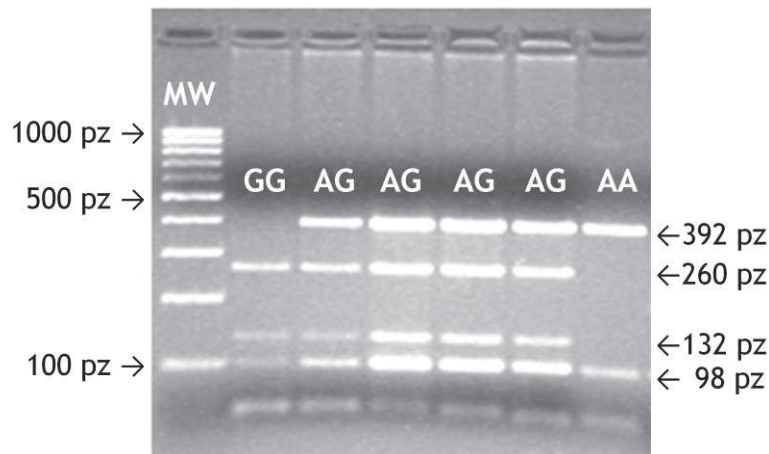
W dalszej analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* produkty reakcji PCR poddawano trawieniu enzymem restrykcyjnym BbvI (BseXI). Specyficzne startery wykorzystywane w reakcji PCR zaprojektowano tak, aby sekwencja amplifikowanego DNA, oprócz miejsca polimorficznego identyfikowanego przez enzym restrykcyjny, zawierała również drugą sekwencję stale rozpoznawaną i trawioną przez enzym. Sekwencja ta określana dodatkowym miejscem cięcia enzymu pozwalała w przypadku każdej analizowanej próbki potwierdzić prawidłowe działanie enzymu. Umożliwiło to minimalizację ryzyka nieprawidłowego odczytania wyników genotypowania. W tabeli 2.10 podsumowano dane dotyczące sposobu i warunków przeprowadzania reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*.

Tabela 2.10. Protokół reakcji RFLP wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*

reakcja RFLP – analiza polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>	
nazwa enzymu restrykcyjnego stosowanego w reakcji	
BbvI (BseXI)	
sekwencja DNA rozpoznawana i trawiona przez enzym restrykcyjny	
5' – GCAGC (N) ₈ [^] – 3' ^{*)}	
3' – CGTCG (N) ₁₂ [^] – 5' ^{*)}	
^{*)} ^ – miejsce cięcia enzymu restrykcyjnego w rozpoznawanej przez enzym sekwencji DNA (N) _n – liczba nukleotydów od sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny do miejsca cięcia enzymu	
skład mieszaniny reakcyjnej	
odczynnik	objętość odczynnika
enzym restrykcyjny BseXI (BbvI) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	0,20 µl
bufor BseXI (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	2,00 µl
BSA (20 mg/ml) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	0,15 µl
ddH ₂ O	2,65 µl
łącznie objętość mieszaniny	
5,00 µl	
stosowany sprzęt laboratoryjny do inkubacji próbek	
Thermomixer comfort 5355 (Eppendorf AG, Niemcy)	
warunki reakcji RFLP	
inkubacja mieszaniny w temp. 65°C przez 60 minut	
ciągłe mieszanie próbek z prędkością 300 rpm podczas inkubacji	
wzór rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP	
homozygota AA – 98 pz ^{**)} , 392 pz	
homozygota GG – 98 pz ^{**)} , 132 pz, 260 pz	
heterozygota AG – 98 pz ^{**)} , 132 pz, 260 pz, 392 pz	
^{**)} produkt reakcji RFLP powstający w wyniku istnienia tzw. dodatkowego miejsca cięcia enzymu w produkcie PCR, poddawanemu trawieniu enzymem restrykcyjnym BbvI (BseXI)	

Rozdział elektroforetyczny produktów powyższej reakcji RFLP przeprowadzano na żelach agarozowych zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 2.7 (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.2 → tab.2.7 str.48).

Przykładowy żel z uwidocznionymi w świetle UV produktami reakcji RFLP przedstawiono na rycinie 2.3.

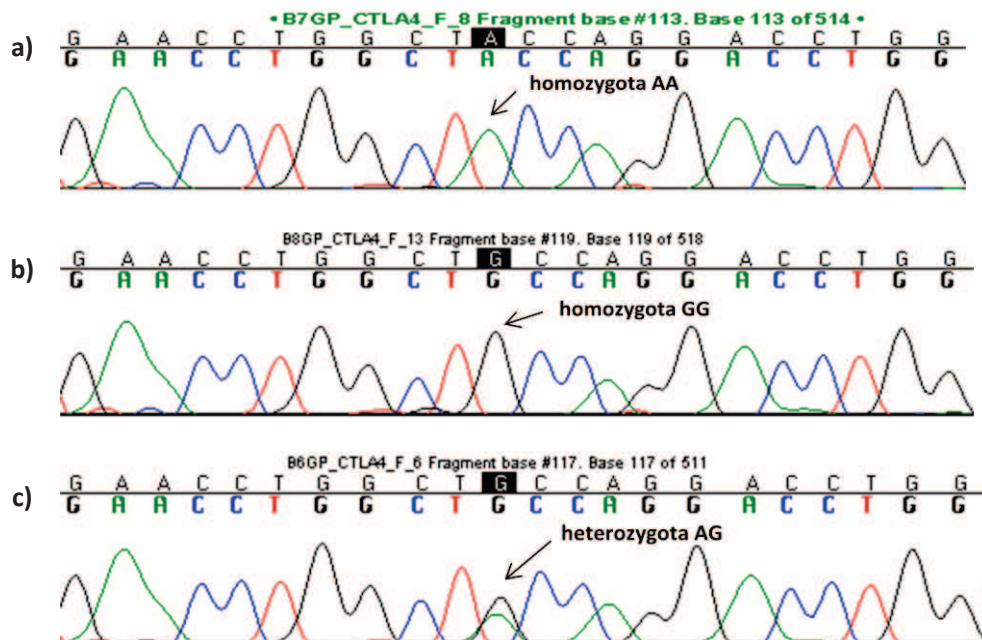


MW – marker wielkości, AA – homozygota AA, GG – homozygota GG, AG – heterozygota AG,
pz – para zasad
prążek 98 pz – tzw. dodatkowe miejsce cięcia enzymu restrykcyjnego BbvI (BseXI)

Rycina 2.3. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*

3.1.5.3. Analiza polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* – reakcja sekwencjonowania

Reakcję sekwencjonowania w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* wykonywano celem weryfikacji wyników procedury PCR-RFLP, zgodnie z opisem podanym w podpunkcie 3.1.4.3 (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.3 str.48). Na rycinie 2.4 przedstawiono elektroforogramy z sekwencjonowania trzech próbek kontrolnych.



Reakcje sekwencjonowania próbek kontrolnych dla polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* przeprowadzone z wykorzystaniem startera *CTLA-4 Forward*. Strzałkami oznaczono analizowane miejsce polimorficzne. Na kolejnych elektroforogramach przedstawiono poszczególne genotypy badanego polimorfizmu: a) homozygota AA; b) homozygota GG; c) heterozygota AG.

Rycina 2.4. Elektroforogram reakcji sekwencjonowania produktów PCR w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* – próbki kontrolne

3.1.6. Analiza polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*

Polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* analizowano za pomocą metody PCR-RFLP zgodnie z ogólnym opisem procedur podanym w punktach 3.1.4.1 – 3.1.4.2 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.1 – 3.1.4.2 str.47). Wyniki procedury PCR-RFLP weryfikowano przeprowadzając reakcję sekwencjonowania zgodnie z protokołem zawartym w punkcie 3.1.4.3 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.3 str.48).

Poniżej przedstawiono szczegółowe dane dotyczące sposobu i warunków przeprowadzania reakcji PCR-RFLP oraz sekwencjonowania podczas analizy badanego polimorfizmu genu *PTPN22*.

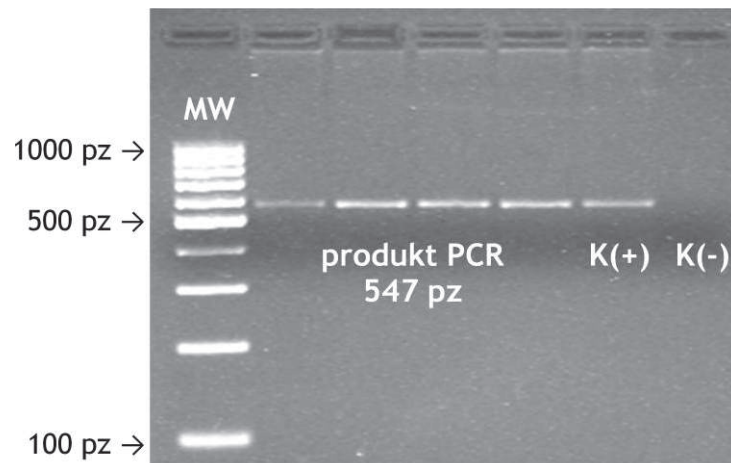
3.1.6.1. Analiza polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – reakcja PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów

Szczegółowy opis sposobu i warunków prowadzenia reakcji PCR w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* zawarto w tabeli 2.11.

Tabela 2.11. Protokół reakcji PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*

<i>reakcja PCR – analiza polimorfizmu c.1858T>C genu PTPN22</i>			
sekwencja starterów stosowanych w reakcji PCR			
<i>PTPN22 Forward</i> 5' CACGTTAGCCAGGATGGTTT 3'			
<i>PTPN22 Reverse</i> 5' GGCCTCAATGAACTCCTCAA 3'			
długość amplifikowanego fragmentu DNA			
547 par zasad (pz)			
skład mieszaniny reakcyjnej			
odczynnik		objętość odczynnika	
matryca DNA (100 ng/μl)		1,0 μl	
starter <i>PTPN22 Forward</i> (10 μM) (IBB PAN, Polska)		1,0 μl	
starter <i>PTPN22 Reverse</i> (10 μM) (IBB PAN, Polska)		1,0 μl	
dNTP (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		1,0 μl	
polimeraza <i>DreamTaq</i> (5U/μl) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		0,1 μl	
bufor 10xDreamTaq (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)		2,5 μl	
ddH ₂ O		18,4 μl	
łączna objętość mieszaniny		25,0 μl	
model stosowanego termocyklera			
GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Life Technologies Corporation, USA)			
etapy reakcji PCR			
nazwa etapu reakcji	temperatura	czas trwania	liczba cykli
denaturacja wstępna	95°C	5 minut	} 35
denaturacja	95°C	30 sekund	
hybrydyzacja	68,7°C	30 sekund	
elongacja	72°C	30 sekund	
elongacja końcowa	72°C	7 minut	

Rozdział elektroforetyczny produktów powyższej reakcji PCR przeprowadzano na żelach agarozowych zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 2.7 (→ *Materiały i metody* pkt. 3.1.4.1 → tab.2.7 str.48). Rycina 2.5 przedstawia przykładowy żel z uwidocznionymi w świetle UV produktami PCR.



MW – marker wielkości, K(+) – kontrola pozytywna, K(-) – kontrola negatywna, pz – para zasad

Rycina 2.5. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów PCR w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*

3.1.6.2. Analiza polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – reakcja RFLP z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego *RsaI*

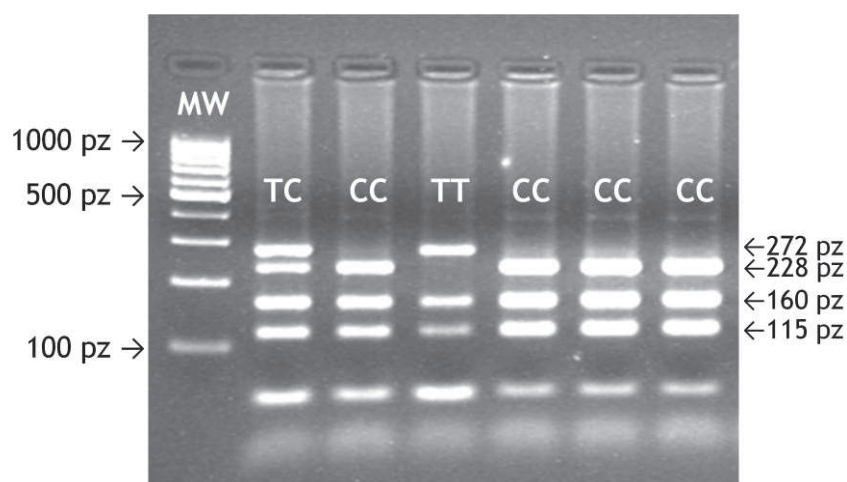
Kolejny etap analizy polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* polegał na trawieniu produktów reakcji PCR enzymem restrykcyjnym *RsaI*. Aby zminimalizować ryzyko nieprawidłowego odczytania wyników genotypowania, specyficzne startery do reakcji PCR zostały zaprojektowane tak, aby sekwencja amplifikowanego DNA, oprócz badanego miejsca polimorficznego, identyfikowanego przez enzym restrykcyjny, zawierała również dodatkowe miejsca cięcia enzymem (sekwencje stale rozpoznawane i trawione przez enzym). Występowanie w amplifikowanej sekwencji DNA dwóch dodatkowych miejsc cięcia powodowało powstanie produktów reakcji RFLP o długości 115 pz i 160 pz. Obecność w rozdziale elektroforetycznym w/w prążków potwierdzała prawidłowe działanie enzymu w przypadku każdej analizowanej próbki.

Szczegółowe dane dotyczące sposobu i warunków przeprowadzania reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* przedstawiono w tabeli 2.12.

Rozdział elektroforetyczny produktów powyższej reakcji RFLP przeprowadzano na żelach agarozowych zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 2.7 (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.2 → tab.2.7 str.48). Przykładowy żel z uwidocznionymi w świetle UV produktami reakcji RFLP przedstawiono na rycinie 2.6.

Tabela 2.12. Protokół reakcji RFLP wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*

reakcja RFLP – analiza polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i>	
nazwa enzymu restrykcyjnego stosowanego w reakcji	
Rsal	
sekwencja DNA rozpoznawana i trawiona przez enzym restrykcyjny	
5' – GT [^] AC – 3' ^{*)}	
3' – CA [^] TG – 5' ^{*)}	
^{*)} ^ – miejsce cięcia enzymu restrykcyjnego w rozpoznawanej przez enzym sekwencji DNA	
skład mieszaniny reakcyjnej	
odczynnik	objętość odczynnika
enzym restrykcyjny RsaI (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	0,20 µl
bufor Tango (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	2,00 µl
BSA (20 mg/ml) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	0,15 µl
ddH ₂ O	2,65 µl
łączna objętość mieszaniny	
5,00 µl	
stosowany sprzęt laboratoryjny do inkubacji próbek	
cieplarka Heraeus Function Line B6 (Thermo Electron Corporation, USA)	
warunki reakcji RFLP	
inkubacja mieszaniny w temp. 37°C przez 24 godziny	
wzór rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP	
homozygota TT – 115 pz ^{**)} , 160 pz ^{**)} , 272 pz	
homozygota CC – 44 pz, 115 pz ^{**)} , 160 pz ^{**)} , 228 pz	
heterozygota TC – 44 pz, 115 pz ^{**)} , 160 pz ^{**)} , 228 pz, 272 pz	
^{**)} produkt reakcji RFLP powstający w wyniku istnienia tzw. dodatkowego miejsca cięcia enzymu w produkcie PCR, poddawanemu trawieniu enzymem restrykcyjnym RsaI	

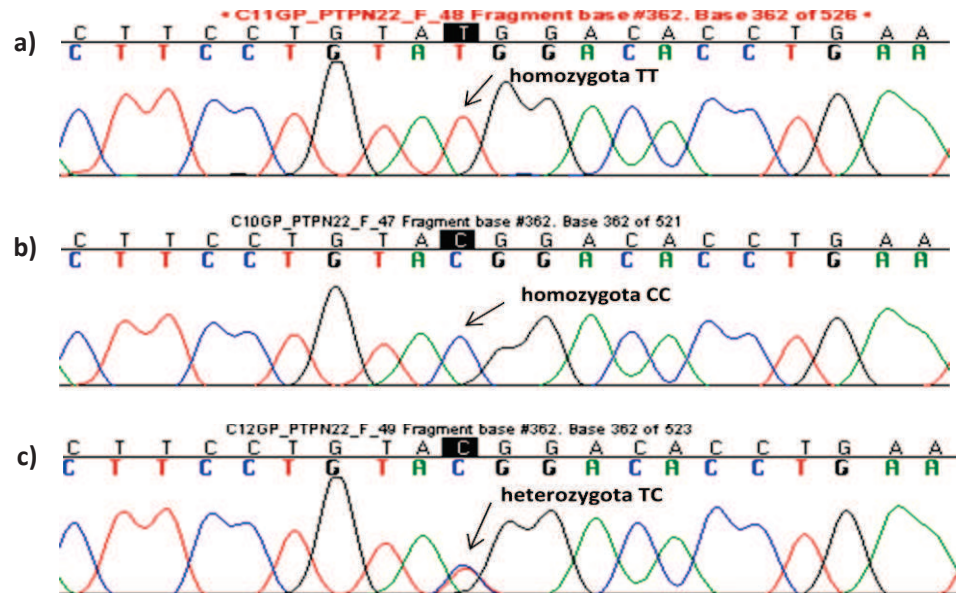


MW – marker wielkości, TT – homozygota TT, CC – homozygota CC, TC – heterozygota TC, pz – para zasad
 prążki 115 pz i 160 pz – tzw. dodatkowe miejsca cięcia enzymu restrykcyjnego RsaI

Rycina 2.6. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*

3.1.6.3. Analiza polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – reakcja sekwencjonowania

Celem weryfikacji wyników uzyskanych podczas procedury PCR-RFLP przeprowadzono reakcję sekwencjonowania. Szczegółowy opis metody podano w punkcie 3.1.4.3 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.3 str.48). Elektroforogramy z sekwencjonowania trzech próbek kontrolnych zaprezentowano na rycinie 2.7.



Reakcje sekwencjonowania próbek kontrolnych dla polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* przeprowadzone z wykorzystaniem startera *PTPN22 Forward*. Strzałkami oznaczono analizowane miejsce polimorficzne. Na kolejnych elektroforogramach przedstawiono poszczególne genotypy badanego polimorfizmu: a) homozygota TT; b) homozygota CC; c) heterozygota TC.

Rycina 2.7. Elektroforogram reakcji sekwencjonowania produktów PCR w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – próbki kontrolne

3.1.7. Analiza polimorfizmu -23*Hph*I>T genu *INS* jako markera polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*

Polimorfizm 5'VNTR genu *INS* analizowano pośrednio poprzez genotypowanie polimorfizmu -23*Hph*I>T genu *INS* (rs689). Polimorfizm -23*Hph*I>T genu *INS* w piśmiennictwie uznawany jest za marker polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*, ze względu na prawie całkowite sprzężenie obu loci w populacjach europejskich (99,77%). (Barratt et al., 2004)

Genotypowanie polimorfizmu markerowego -23*Hph*I>T genu *INS* przeprowadzono za pomocą metody PCR-RFLP, której wyniki weryfikowano reakcją sekwencjonowania. Procedury wykonano zgodnie z ogólnym opisem przedstawionym w punktach 3.1.4.1 – 3.1.4.3 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.1 – 3.1.4.3 str.47-48).

Poniżej podano szczegółowe dane dotyczące sposobu i warunków przeprowadzania reakcji PCR-RFLP oraz sekwencjonowania podczas analizy badanego polimorfizmu genu *INS*.

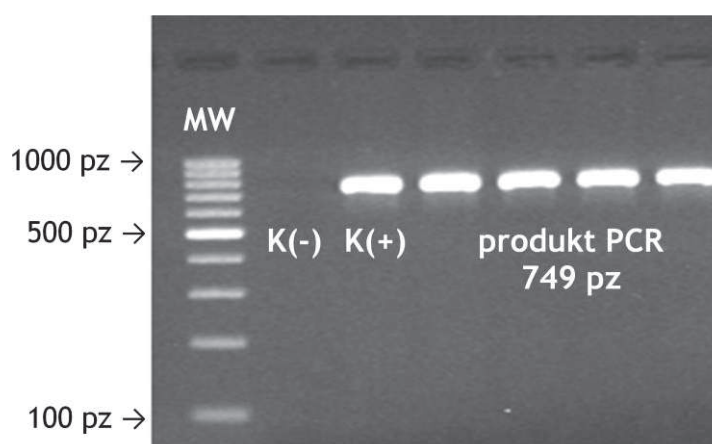
3.1.7.1. Analiza polimorfizmu -23*Hph*I>T genu *INS* – reakcja PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów

Szczegółowy opis sposobu i warunków przeprowadzania reakcji PCR w analizie polimorfizmu -23*Hph*I>T genu *INS* przedstawiono w tabeli 2.13.

Tabela 2.13. Protokół reakcji PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu *INS*

reakcja PCR – analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i>			
sekwencja starterów stosowanych w reakcji PCR			
<i>INS Forward</i> 5' CATCAAGCAGGTCTGTTCCA 3'			
<i>INS Reverse</i> 5' CCAGGTCACCCAGGACTTTA 3'			
długość amplifikowanego fragmentu DNA			
749 par zasad (pz)			
skład mieszaniny reakcyjnej			
odczynnik		objętość odczynnika	
matryca DNA (100 ng/μl)		1,0 μl	
starter <i>INS Forward</i> (10 μM) (IBB PAN, Polska)		1,0 μl	
starter <i>INS Reverse</i> (10 μM) (IBB PAN, Polska)		1,0 μl	
dNTP (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		1,0 μl	
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		1,5 μl	
polimeraza <i>Taq</i> (5U/μl) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		0,1 μl	
bufor z (NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)		2,5 μl	
ddH ₂ O		16,9 μl	
łącna objętość mieszaniny		25,0 μl	
model stosowanego termocyklera			
GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Life Technologies Corporation, USA)			
etapy reakcji PCR			
nazwa etapu reakcji	temperatura	czas trwania	liczba cykli
denaturacja wstępna	95°C	5 minut	1
denaturacja	95°C	30 sekund	} 35
hybrydyzacja	58°C	1 minuta	
elongacja	72°C	1 minuta	
elongacja końcowa	72°C	10 minut	1

Rozdział elektroforetyczny produktów powyższej reakcji PCR przeprowadzono na żelach agarozowych zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 2.7 (→ *Materiały i metody* pkt. 3.1.4.1 str.48). Na rycinie 2.8 przedstawiono przykładowy żel z uwidocznionymi w świetle UV produktami PCR.



MW – marker wielkości, K(+) – kontrola pozytywna, K(-) – kontrola negatywna, pz – para zasad

Rycina 2.8. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów PCR w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu *INS*

3.1.7.2. Analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu *INS* – reakcja RFLP z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego HphI

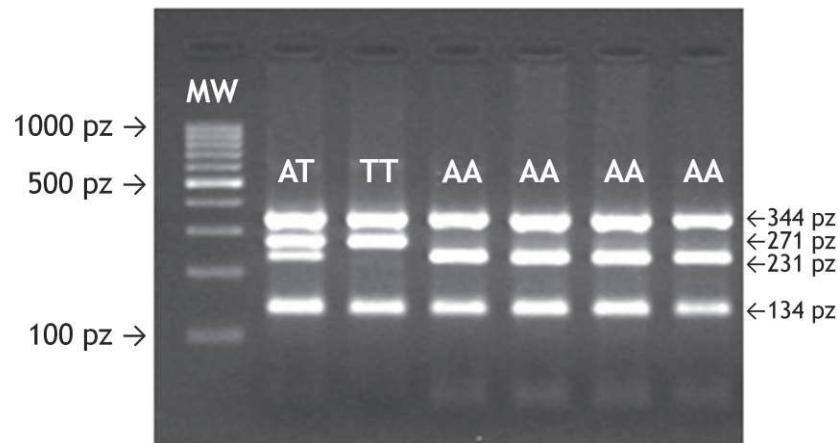
W kolejnym etapie analizy polimorfizmu –23HphIA>T genu *INS* produkty reakcji PCR poddawano trawieniu enzymem restrykcyjnym HphI. Podobnie, jak w analizach pozostałych badanych polimorfizmów, specyficzne startery do reakcji PCR zaprojektowano tak, aby sekwencja amplifikowanego DNA, oprócz miejsca polimorficznego identyfikowanego przez enzym restrykcyjny, zawierała dodatkowe miejsca cięcia enzymem (sekwencje stale rozpoznawane i trawione przez enzym). Obecność prążków o długości 134 pz oraz 344 pz w rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji RFLP potwierdziła prawidłowe działanie enzymu w przypadku każdej analizowanej próbki. Powyższy schemat prowadzenia procedury PCR-RFLP pozwolił zminimalizować ryzyko nieprawidłowego odczytania wyników genotypowania.

W tabeli 2.14 przedstawiono szczegółowe dane dotyczące sposobu i warunków przeprowadzania reakcji RFLP w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu *INS*.

Tabela 2.14. Protokół reakcji RFLP wykorzystywanej w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu *INS*

reakcja RFLP – analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i>	
nazwa enzymu restrykcyjnego stosowanego w reakcji	
HphI	
sekwencja DNA rozpoznawana i trawiona przez enzym restrykcyjny	
5' – GGTGA (N) ₈ – 3' ^{*)}	
3' – CCACT (N) ₇ – 5' ^{*)}	
^{*)} ^ – miejsce cięcia enzymu restrykcyjnego w rozpoznawanej przez enzym sekwencji DNA (N) _n – liczba nukleotydów od sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny do miejsca cięcia enzymu	
skład mieszaniny reakcyjnej	
odczynnik	objętość odczynnika
enzym restrykcyjny HphI (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	0,20 µl
bufor B (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	2,00 µl
BSA (20 mg/ml) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	0,15 µl
ddH ₂ O	2,65 µl
łącznie objętość mieszaniny	5,00 µl
stosowany sprzęt laboratoryjny do inkubacji próbek	
cieplarka Heraeus Function Line B6 (Thermo Electron Corporation, USA)	
warunki reakcji RFLP	
inkubacja mieszaniny w temp. 37°C przez 24 godziny	
wzór rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP	
homozygota TT – 134 pz ^{**)} , 271 pz, 344 pz ^{**)}	
homozygota AA – 40 pz, 134 pz ^{**)} , 231 pz, 344 pz ^{**)}	
heterozygota AT – 40 pz, 134 pz ^{**)} , 231 pz, 271 pz, 344 pz ^{**)}	
^{**)} produkt reakcji RFLP powstający w wyniku istnienia tzw. dodatkowego miejsca cięcia enzymu w produkcie PCR, poddawanemu trawieniu enzymem restrykcyjnym HphI	

Rozdział elektroforetyczny produktów powyższej reakcji RFLP przeprowadzano na żelach agarozowych zgodnie z parametrami zawartymi w tabeli 2.7 (→ *Materiały i metody* pkt. 3.1.4.2 → tab.2.7 str.48). Na rycinie 2.9 przedstawiono przykładowy żel z uwidocznionymi w świetle UV produktami reakcji RFLP.

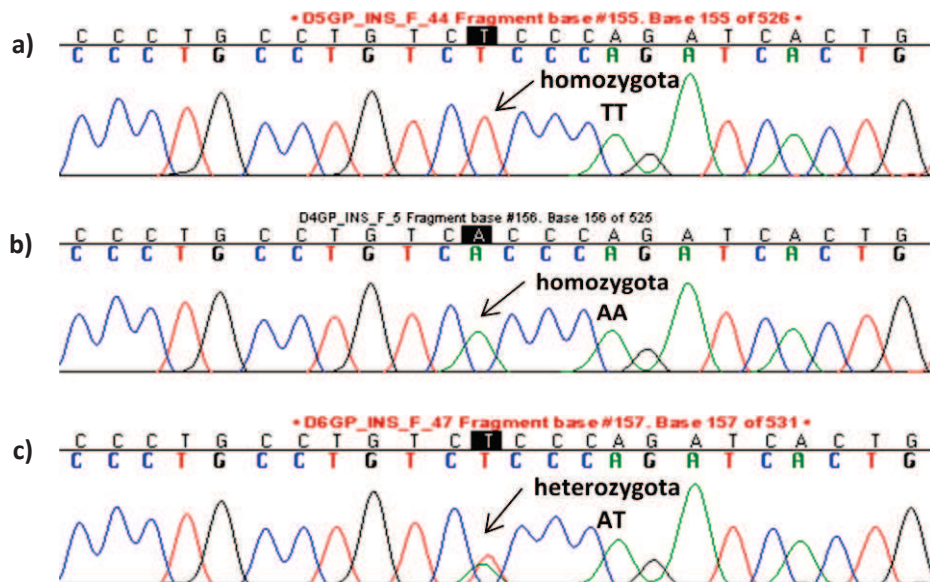


MW – marker wielkości, AA – homozygota AA, TT – homozygota TT, AT – heterozygota AT, pz – para zasad
prążki 134 pz i 344 pz – tzw. dodatkowe miejsca cięcia enzymu restrykcyjnego HphI

Rycina 2.9. Przykładowy rozkład elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu INS

3.1.7.3. Analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu INS – reakcja sekwencjonowania

Wyniki genotypowania uzyskane podczas procedury PCR-RFLP weryfikowano przeprowadzając reakcję sekwencjonowania. Szczegółowy opis metody podano w punkcie 3.1.4.3 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.3 str.48). Na rycinie 2.10 przedstawiono elektroforogramy z sekwencjonowania trzech próbek kontrolnych.



Reakcje sekwencjonowania próbek kontrolnych dla polimorfizmu –23HphIA>T genu INS przeprowadzone z wykorzystaniem startera *INS Forward*. Strzałkami oznaczono analizowane miejsce polimorficzne.

Na kolejnych elektroforogramach przedstawiono poszczególne genotypy badanego polimorfizmu: a) homozygota TT; b) homozygota AA; c) heterozygota AT.

Rycina 2.10. Elektroforogram reakcji sekwencjonowania produktów PCR w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu INS – próbki kontrolne

3.2. Analiza wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* – grupa kontrolna

Ze względu na ograniczenia prawne i etyczne zrezygnowano ze stworzenia grupy kontrolnej składającej się z dzieci zdrowych. Do analizy porównawczej częstości występowania wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w grupie badanej, w odniesieniu do populacji wieku rozwojowego w województwie pomorskim, wykorzystano anonimowe próbki (wysuszone plamy krwi), które pozostały po przeprowadzeniu rutynowych badań przesiewowych w kierunku chorób metabolicznych u noworodków z terenu województwa pomorskiego. Materiał do badań pochodził z Zakładu Badań Przesiewowych Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie (Kierownik Pracowni: dr Mariusz Ołtarzewski) i został użyty dzięki pomocy oraz uprzejmości Kierownika Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego prof. dr hab. med. Janusza Limona.

Do analizy porównawczej wybrano losowo 326 anonimowych próbek, pochodzących z 19 miejscowości województwa pomorskiego, z których przesyłano materiał do badań przesiewowych noworodków. Dokładne dane dotyczące liczby analizowanych próbek z poszczególnych miejscowości województwa pomorskiego zawarto w tabeli 2.15.

Tabela 2.15. Spis alfabetyczny miejscowości województwa pomorskiego, z których uzyskano próbki wysuszonych plam krwi wraz z liczbą analizowanych próbek

<i>nazwa miejscowości</i>	<i>liczba analizowanych próbek (n=326)</i>
Bytów	20
Chojnice	16
Człuchów	18
Gdańsk	18
Gdańsk/Sopot	16
Gdynia	14
Kartuzy	18
Kościerzyna	16
Kwidzyn	18
Lębork	17
Malbork	17
Miastko	18
Puck	20
Słupsk	16
Starogard Gdański	16
Sztum	16
Tczew	18
Ustka	16
Wejherowo	18

W przypadku każdej z powyższych próbek przeprowadzono pełną analizę wszystkich trzech badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* za pomocą metody *blood-direct* PCR-RFLP (*blood-direct* PCR – bezpośrednia z krwi reakcja łańcuchowa polimerazy, RFLP – analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) (→ *Materiały i metody* pkt.3.2.1 str.61 oraz ryc.2.1 str.45).

Z uwagi na rodzaj materiału (wysuszone plamy krwi na specjalnych bibułach) oraz znaczny stopień degradacji materiału genetycznego w powyższym materiale nie dokonano weryfikacji wyników metody *blood-direct* PCR-RFLP za pomocą sekwencjonowania.

Wyniki oznaczeń genetycznych uzyskane w badanej populacji porównano z wynikami uzyskanymi podczas analizy próbek z grupy kontrolnej, a następnie odniesiono do danych dotyczących częstości występowania analizowanych odmian polimorficznych w obrębie rasy kaukaskiej, dostępnych w bazie National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

3.2.1. Analiza wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* – reakcja *blood-direct* PCR-RFLP

Ze względu na specyfikę materiału stosowanego do badań oznaczenia polimorfizmów c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22*, –23*HphIA*>T genu *INS* (jako markera polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*) w grupie kontrolnej przeprowadzono z wykorzystaniem metody *blood-direct* PCR-RFLP (*blood-direct* PCR – reakcja PCR wykonywana bezpośrednio z materiału poddawanego badaniu, bez uprzedniej izolacji DNA, z wykorzystaniem specjalnej mieszaniny reakcyjnej).

Z uwagi na znaczny stopień degradacji materiału genetycznego w analizowanych próbkach konieczne było skrócenie amplifikowanych podczas reakcji PCR fragmentów DNA, w odniesieniu do reakcji PCR stosowanych podczas analiz w grupie badanej. Uniemożliwiło to zachowanie tzw. dodatkowego miejsca cięcia enzymem restrykcyjnym w reakcji RFLP podczas analizy polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, przy wykorzystaniu tego samego enzymu restrykcyjnego (BbvI), który stosowano w metodzie RFLP w grupie badanej.

Ogólny opis procedur stosowanych podczas reakcji *blood-direct* PCR-RFLP przy ocenie wszystkich badanych polimorfizmów podano w poniższych podpunktach 3.2.1.1 – 3.2.1.2.

3.2.1.1. Bezpośrednia z krwi reakcja łańcuchowa polimerazy (*blood-direct* PCR) z wykorzystaniem specyficznych starterów

Reakcje *blood-direct* PCR, w której materiał stanowiły wysuszone plamy krwi, przeprowadzano z wykorzystaniem gotowej mieszaniny reakcyjnej KAPA Blood PCR Mix B (Kapa Biosystems, USA) oraz specyficznych dla amplifikowanego regionu starterów. Startery zaprojektowano z wykorzystaniem oprogramowania opisanego w punkcie dotyczącym analizy bioinformatycznej sekwencji DNA badanych genów (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.3 str.46). Syntezę chemiczną zaprojektowanych oligonukleotydów zlecano Pracowni Sekwencjonowania DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz rodzaj aparatury laboratoryjnej używanej do przeprowadzenia reakcji *blood-direct* PCR podczas analizy badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* zawarto w tabeli 2.16.

Odrębności dotyczące sposobu i warunków prowadzenia reakcji *blood-direct* PCR w analizie poszczególnych polimorfizmów w grupie kontrolnej przedstawiono w następujących tabelach: polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – tabela 2.17, polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – tabela 2.18 oraz polimorfizm –23*HphIA*>T genu *INS* – tabela 2.19).

Oceny jakości i efektywności metody *blood-direct* PCR dokonywano na podstawie rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji na 2% żelach agarozowych. Stosowano te same parametry rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR, jak podczas analizy polimorfizmów genu *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w grupie badanej (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.1 str.47).

Tabela 2.16. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz rodzaj aparatury laboratoryjnej używanej podczas reakcji *blood-direct* PCR w analizie badanych polimorfizmów – grupa kontrolna

reakcja <i>blood-direct</i> PCR – analiza polimorfizmów genów <i>CTLA-4</i>, <i>PTPN22</i> oraz <i>INS</i>	
skład mieszaniny reakcyjnej	
odczynnik	objętość odczynnika
matryca DNA (wysuszona plama krwi – krążek bibuły o średnicy 3-4 mm)	
starter <i>Forward</i> (10 μM) (IBB PAN, Polska)	1,0 μl
starter <i>Reverse</i> (10 μM) (IBB PAN, Polska)	1,0 μl
KAPA Blood PCR Mix B (Kapa Biosystems, USA)	10,0 μl
ddH ₂ O	10,0 μl
łącznie objętość mieszaniny	22,0 μl
model stosowanego termocyklera	
GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Life Technologies Corporation, USA)	
ARKTIK Thermal Cycler (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	

Tabela 2.17. Warunki reakcji *blood-direct* PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* – grupa kontrolna

reakcja <i>blood-direct</i> PCR – analiza polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>			
sekwencja starterów stosowanych w reakcji PCR			
<i>kCTLA-4 Forward</i> 5' GGATCCTGAAAGGTTTTGCTC 3'			
<i>kCTLA-4 Reverse</i> 5' CACTGCCTTTGACTGCTGAA 3'			
długość amplifikowanego fragmentu DNA			
250 par zasad (pz)			
etapy reakcji PCR			
nazwa etapu reakcji	temperatura	czas trwania	liczba cykli
denaturacja wstępna	95°C	5 minut	} 35
denaturacja	95°C	30 sekund	
hybrydyzacja	63,2°C	45 sekund	
elongacja	72°C	45 sekund	
elongacja końcowa	72°C	7 minut	

Tabela 2.18. Warunki reakcji *blood-direct* PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – grupa kontrolna

reakcja <i>blood-direct</i> PCR – analiza polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i>			
sekwencja starterów stosowanych w reakcji PCR			
<i>kPTPN22 Forward</i> 5' AATGTTGCTTCAACGGAATTT 3'			
<i>kPTPN22 Reverse</i> 5' TTGAGGAGTTCATTGAGGCC 3'			
długość amplifikowanego fragmentu DNA			
329 par zasad (pz)			
etapy reakcji PCR			
nazwa etapu reakcji	temperatura	czas trwania	liczba cykli
denaturacja wstępna	95°C	5 minut	} 35
denaturacja	95°C	30 sekund	
hybrydyzacja	58°C	45 sekund	
elongacja	72°C	45 sekund	
elongacja końcowa	72°C	7 minut	

Tabela 2.19. Warunki reakcji *blood-direct* PCR wykorzystywanej w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu *INS* – grupa kontrolna

<i>reakcja blood-direct PCR – analiza polimorfizmu –23HphIA>T genu INS</i>			
sekwencja starterów stosowanych w reakcji PCR			
<i>INS Forward</i> 5' CATCAAGCAGGTCTGTTCCA 3' *)			
<i>kINS Reverse</i> 5' CCCCACACTAGGTAGAGA 3'			
*) starter stosowany w reakcji PCR podczas analizy polimorfizmu –23HphIA>T genu <i>INS</i> w grupie badanej			
długość amplifikowanego fragmentu DNA			
365 par zasad (pz)			
etapy reakcji PCR			
nazwa etapu reakcji	temperatura	czas trwania	liczba cykli
denaturacja wstępna	95°C	5 minut	} 1 35 1
denaturacja	95°C	30 sekund	
hybrydyzacja	63,2°C	1 minuta	
elongacja	72°C	45 sekund	
elongacja końcowa	72°C	7 minut	

3.2.1.2. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) z wykorzystaniem odpowiednich enzymów restrykcyjnych – grupa kontrolna

W grupie kontrolnej dalszą analizę wybranych polimorfizmów genu *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* prowadzono podobnie jak w grupie badanej – za pomocą metody RFLP, poddając produkty reakcji PCR trawieniu tymi samymi enzymami restrykcyjnymi, które stosowano podczas analiz w grupie badanej (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.2 str.47).

Warunki przeprowadzania reakcji RFLP w analizie poszczególnych polimorfizmów w grupie kontrolnej odpowiadały warunkom tożsamyh reakcji w grupie badanej (odpowiednio: polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* → *Materiały i metody* pkt.3.1.5.2 str.51, polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* → *Materiały i metody* pkt.3.1.6.2 str.54 oraz polimorfizm –23HphIA>T genu *INS* → *Materiały i metody* pkt.3.1.7.2 str.58).

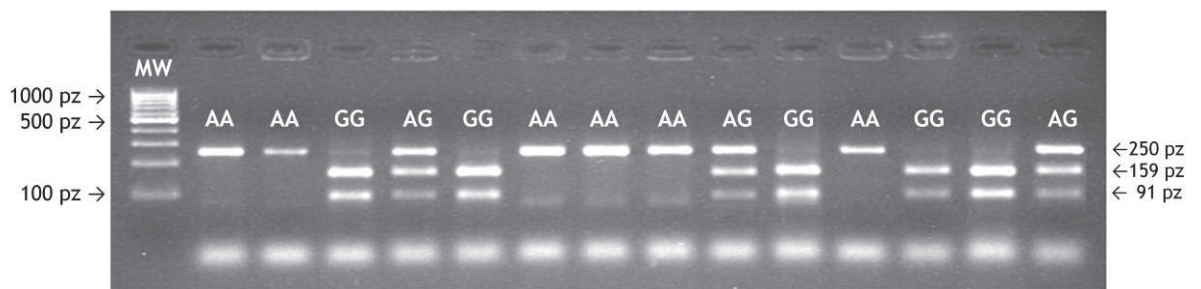
Odrębności we wzorze rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej, wynikające z odmiennej długości produktów reakcji PCR wykorzystywanych do analiz, zawarto w tabeli 2.20.

Produkty reakcji RFLP rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelach agarozowych. Stosowano te same parametry rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP, jak podczas analizy polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w grupie badanej (→ *Materiały i metody* pkt.3.1.4.2 oraz tab. 2.7 str.48).

Przykładowe żele z uwidocznionymi w świetle UV produktami reakcji RFLP w analizach poszczególnych polimorfizmów w grupie kontrolnej przedstawiono na następujących rycinach: polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – rycina 2.11, polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – rycina 2.12 oraz polimorfizm –23HphIA>T genu *INS* – rycina 2.13).

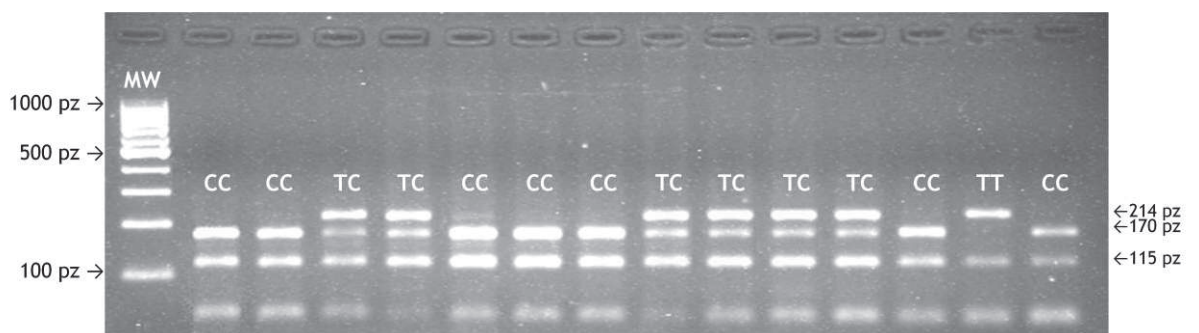
Tabela 2.20. Wzory rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP w analizie badanych polimorfizmów genu *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* – grupa kontrolna

<i>Wzór rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP</i>
analiza polimorfizmu c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>
homozygota AA – 250 pz
homozygota GG – 91 pz, 159 pz
heterozygota AG – 91 pz, 159 pz, 250 pz
analiza polimorfizmu c.1858T>C genu <i>PTPN22</i>
homozygota TT – 115 pz ^{*)} , 214 pz
homozygota CC – 44 pz, 115 pz ^{*)} , 170 pz
heterozygota TC – 44 pz, 115 pz ^{*)} , 170 pz, 214 pz
^{*)} produkt reakcji RFLP powstający w wyniku istnienia tzw. dodatkowego miejsca cięcia enzymu w produkcie PCR, poddawanemu trawieniu enzymem restrykcyjnym <i>RsaI</i>
analiza polimorfizmu –23 <i>HphI</i> A>T genu <i>INS</i>
homozygota TT – 134 pz ^{**)} , 231 pz
homozygota AA – 40 pz, 134 pz ^{**)} , 191 pz
heterozygota AT – 40 pz, 134 pz ^{**)} , 191 pz, 231 pz
^{**)} produkt reakcji RFLP powstający w wyniku istnienia tzw. dodatkowego miejsca cięcia enzymu w produkcie PCR, poddawanemu trawieniu enzymem restrykcyjnym <i>HphI</i>



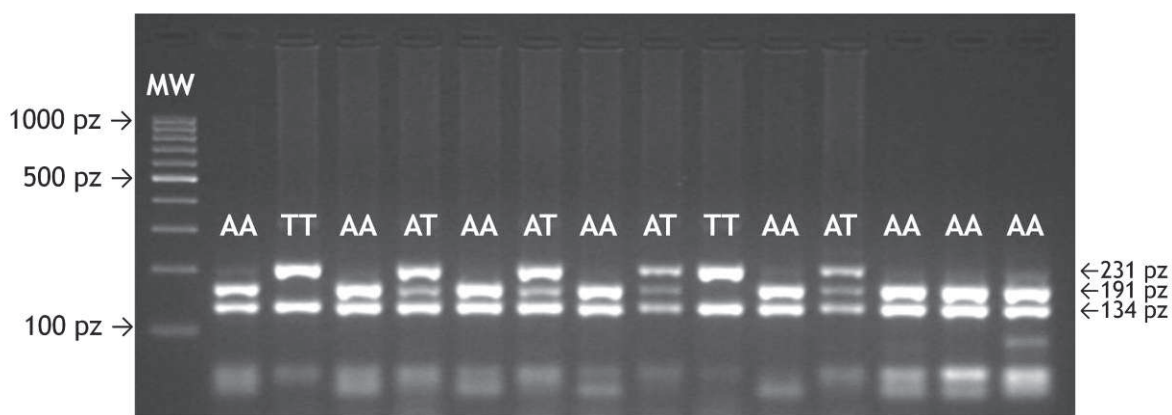
MW – marker wielkości, AA – homozygota AA, GG – homozygota GG, AG – heterozygota AG, pz – para zasad

Rycina 2.11. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* – grupa kontrolna



MW – marker wielkości, TT – homozygota TT, CC – homozygota CC, TC – heterozygota TC, pz – para zasad prążek 115 pz – tzw. dodatkowe miejsce cięcia enzymu restrykcyjnego *RsaI*

Rycina 2.12. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – grupa kontrolna



MW – marker wielkości, AA – homozygota AA, TT – homozygota TT, AT – heterozygota AT, pz – para zasad prążek 134 pz – tzw. dodatkowe miejsce cięcia enzymu restrykcyjnego HphI

Rycina 2.13. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP w analizie polimorfizmu –23HphIA>T genu *INS* – grupa kontrolna

4. Ocena funkcji resztkowej komórek β trzustki

Ocenę funkcji resztkowej komórek β trzustki u pacjentów ze świeżo rozpoznaną T1DM zakwalifikowanych do rocznej obserwacji przeprowadzano za pomocą pomiarów stężeń C-peptydu – peptydu powstającego podczas syntezy insuliny w komórkach β trzustki i uwalnianego do krążenia razem z insuliną w równomolowych ilościach. Oceny stężeń C-peptydu dokonywano u każdego z pacjentów w momencie rozpoznania choroby (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.2.1 str.37) oraz co 3 miesiące podczas rocznej obserwacji, zgodnie z harmonogramem oznaczeń laboratoryjnych przedstawionym w tabeli 2.2 (\rightarrow *Materiały i metody* tab.2.2 str.36 oraz pkt.2.2 str.43). Pomiary stężeń C-peptydu przeprowadzono dzięki pomocy i uprzejmości mgr Michała Makowieckiego (Centralne Laboratorium Kliniczne Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, Kierownik: dr n. przyr. Zenon Jakubowski – do X 2012 r., dr n. med. Krzysztof Lewandowski).

4.1. Pomiar C-peptydu – zagadnienia przedanalizacyjne

Krew żylną do oznaczeń stężenia C-peptydu pobierano po odpowiednim przygotowaniu pacjenta do badań (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.2.2 str.43), na czczo, przed podaniem pierwszej dawki posiłkowej insuliny. Do pobrania krwi wykorzystywano zamknięty, próżniowy system VACUETTE z probówkami do surowicy zawierającymi aktywator krzepnięcia i separator żelowy (Greiner Bio-One Ltd., Wielka Brytania). Zastosowanie probówek z separatorem żelowym umożliwiło całkowitą eliminację próbek z hemolizą. Jednocześnie, według specyfikacji producenta (Greiner Bio-One Ltd., Wielka Brytania), stosowany w probówkach żel separujący nie wykazuje zdolności wiążących C-peptyd, a tym samym nie wpływa na jego stężenie w analizowanych próbkach. Surowicę do analiz uzyskiwano przez wirowanie krwi żyłnej w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ przez 10 minut przy prędkości 3 000 RPM (około 1 500 x g) (wirówka Eppendorf Centrifuge 5810R; Eppendorf AG, Niemcy). Surowicę oddzielano od osadu w ciągu 4-6 godzin od pobrania krwi (do momentu wirowania krew przechowywano w lodówce w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$). Próbkę surowicy po odwirowaniu kodowano celem zminimalizowania wpływu osoby prowadzącej analizy na wyniki seryjnych oznaczeń C-peptydu u poszczególnych pacjentów, a następnie przechowywano w temperaturze -20°C do momentu wykonania analiz (maksymalny czas przechowywania surowicy: 3 miesiące).

4.2. Pomiar C-peptydu – metody analityczne

Do ilościowych oznaczeń C-peptydu w surowicy badanych pacjentów stosowano metodę immunochemiluminescencji (kanapkowy test immunochemiluminescencyjny LIAISON C-Peptid, DiaSorin S.p.A., Włochy). Testy przeprowadzono w analizatorze serii LIAISON Analyzer (DiaSorin S.p.A., Włochy).

Powyższa metoda analityczna obejmowała następujące etapy:

- dodanie do odpowiednich naczynek reakcyjnych po 200 µl załączonych do zestawu kalibratorów/kontroli oraz badanych surowic
- dodanie do naczynek reakcyjnych cząsteczek ferromagnetycznych opłaszczonych swoistym monoklonalnym przeciwciałem mysim (tzw. faza stała testu) oraz koniugatu izoluminol – inne przeciwciała monoklonalne
- inkubacja mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 37°C z okresowym wytrząsaniem (podczas inkubacji C-peptyd obecny w kalibratorach, próbkach kontrolnych oraz próbkach badanych ulegał związaniu przez przeciwciała monoklonalne fazy stałej testu, a następnie koniugat izoluminol – przeciwciała reagował z C-peptydem już związanym z fazą stałą testu)
- usunięcie niezwiązanego podczas inkubacji materiału poprzez cykl przemywania odczynnikami Wash/System Liquid
- dodanie odczynnika Starter celem zapoczątkowania reakcji chemiluminescencyjnej
- pomiar emitowanego podczas reakcji sygnału świetlny przy użyciu fotopowielacza i odczytanie wyników pomiaru stężenia C-peptydu w kalibratorach, próbkach kontrolnych i próbkach badanych

Próg detekcji C-peptydu wynosił 0,01 ng/ml (współczynnik przeliczeniowy: ng/ml x 0,33 = 0,33 nmol/l), przy zakresie norm dla C-peptydu w surowicy u osób zdrowych, pozostających 12 godzin na czczo 0,8-4,2 ng/ml (0,26-1,39 nmol/l).

4.3. Pomiar C-peptydu – kryteria analizy pomiarów resztkowej insulinosekrecji

Zgodnie z wytycznymi Immunology of Diabetes Society (Greenbaum and Harrison, 2003) oraz ADA (Palmer et al., 2004) w analizach dotyczących funkcji resztkowej komórek β trzustki uwzględniono wyłącznie oznaczenia C-peptydu przeprowadzone z próbek surowicy pobranych przy stężeniu glukozy we krwi włośniczkowej w granicach 70-200 mg/dl (pomiar na czczo, przed podaniem pierwszej posiłkowej dawki insuliny, wykonany za pomocą osobistego glukometru pacjenta). Pomiar C-peptydu na czczo, wykonane przy zachowaniu warunków opisanych powyżej, korelują ze stężeniami C-peptydu uzyskiwanymi podczas testu tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego (MMTT mixed-meal tolerance test) (Palmer et al., 2004).

5. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM

Oznaczenia poziomu hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) powtarzane co 3 miesiące, zgodnie z harmonogramem badań laboratoryjnych przedstawionym w tabeli 2.2 (→ *Materiały i metody* tab.2.2 str.36 oraz pkt.2.2 str.43), stanowiły podstawę do długoterminowej oceny metabolicznego wyrównania T1DM u obserwowanych chorych. Pomiar poziomu HbA_{1c} przeprowadzono dzięki pomocy i uprzejmości mgr Michała Makowieckiego (Centralne Laboratorium Kliniczne Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, Kierownik: dr n. przyr. Zenon Jakubowski – do X 2012 r., dr n. med. Krzysztof Lewandowski).

5.1. Oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) – zagadnienia przedanalizacyjne

Materiał do oznaczeń HbA_{1c} stanowiła pełna krew żylna pobrana za pomocą zamkniętego, próżniowego systemu VACUETTE do probówek zawierających EDTA (Greiner Bio-One Ltd., Wielka Brytania). Próbkę przed przekazaniem ich do dalszych badań kodowano celem zminimalizowania wpływu osoby prowadzącej analizy na wyniki seryjnych oznaczeń HbA_{1c} u poszczególnych pacjentów. Oznaczenia

przeprowadzano w dniu pobrania próbki lub w godzinach porannych dnia następnego. Do momentu wykonania oznaczeń próbki przechowywano w lodówce w temperaturze +4°C.

5.2. Oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) – metody analityczne

Oznaczenia poziomu HbA_{1c} przeprowadzono zgodnie z wytycznymi IDF/ISPAD (IDF/ISPAD, 2011) oraz światowym konsensusem dotyczącym standaryzacji pomiaru HbA_{1c} (Hanas and John, 2010):

- zastosowano metodę chromatografii wysokociśnieniowej (HPLC) z wykorzystaniem chromatografu TOSOH G8 Variant HLC - 723G8, kolumna lot #B (TOSOH Corporation, Japonia)
- stosowana metoda uzyskała certyfikat w Narodowym Programie Standaryzacji Glikohemoglobiny (National Glycohemoglobin Standardization Program NGSP, USA; <http://www.ngsp.org>)
- używana do oznaczeń metoda podlegała wewnątrzlaboratoryjnej i zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości analitycznej – współczynnik zmienności nieprecyzji utrzymywał się na poziomie <5%
- wyniki oznaczeń HbA_{1c} podawano w procentach (jednostki NGSP/DCCT), które mogły zostać przeliczone na jednostki IFCC [mmol/mol] za pomocą równania

$$\text{HbA}_{1c} [\text{mmol/mol}] = (\text{HbA}_{1c} [\%] - 2,15) / 0,0915$$

5.3. Oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) – kryteria analizy wyrównania metabolicznego T1DM oraz występowania remisji klinicznej choroby

Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń poziomu HbA_{1c} dokonywano oceny wyrównania metabolicznego T1DM u poszczególnych pacjentów biorących udział w badaniu, w kolejnych miesiącach obserwacji, zgodnie z następującymi kryteriami:

- wytyczne ISPAD 2011 (IDF/ISPAD, 2011):
 - cukrzyca wyrównana metabolicznie – HbA_{1c} < 7,5%
 - cukrzyca niewyrównana metabolicznie – HbA_{1c} ≥ 7,5%
- wytyczne PTD 2012 (PTD, 2012):
 - cukrzyca wyrównana metabolicznie – HbA_{1c} ≤ 6,5%
 - cukrzyca niewyrównana metabolicznie – HbA_{1c} > 6,5%

U poszczególnych chorych na podstawie prowadzonych oznaczeń poziomu HbA_{1c} oceniano również ewentualne występowanie i długość trwania częściowej remisji klinicznej T1DM. Okres częściowej remisji klinicznej u pacjenta definiowano, zgodnie z wytycznymi ISPAD (IDF/ISPAD, 2011), jako okres przejściowego zmniejszenia się zapotrzebowania na insulinę do wartości TDID < 0,5 j./kg m.c./dobę (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.4 str.40 oraz pkt.2.2 podpunkt *Aktualizacja danych klinicznych pacjenta* str.44), szczególnie na początku trwania choroby, przy jednoczesnym prawidłowym wyrównaniu metabolicznym T1DM (HbA_{1c} < 7%).

6. Ocena aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej

Aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciwko antygenom komórek β trzustki oceniano na podstawie pomiarów miana autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) oraz autoprzeciwciał przeciwinulinowych (IAA). U każdego z pacjentów w momencie rozpoznania choroby oznaczano miano autoprzeciwciał GAD i IAA, dokonując dwóch niezależnych pomiarów dla każdego z powyższych autoprzeciwciał. Kwalifikacja chorego do badania następowała na podstawie dodatniego miana przynajmniej jednego z autoprzeciwciał GAD/IAA, w co najmniej jednym z przeprowadzonych pomiarów. U pacjentów z ujemnym mianem obu autoprzeciwciał podczas dwóch niezależnych pomiarów sprawdzano miano autoprzeciwciał przeciw wyspom trzustkowym

(ICA). W przypadku dodatniego miana ICA włączano pacjenta do grupy badanej, natomiast wynik ujemny oznaczał miano ICA powodował wykluczenie chorego (→ *Materiały i metody* tab.2.1 str.35 oraz pkt.2.1 str.36).

Pomiary miana autoprzeciwciał GAD oraz IAA powtarzano podczas rocznej obserwacji pacjentów co 6 miesięcy, zgodnie z harmonogramem oznaczeń laboratoryjnych przedstawionym w tabeli 2.2 (→ *Materiały i metody* tab.2.2 str.36). Ocenę miana autoprzeciwciał GAD i IAA przeprowadzono dzięki pomocy i uprzejmości dr n. med. Julii Kulczyckiej (Laboratorium Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Hematologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, Kierownik: dr hab. n. med. Grażyna Moszkowska)

6.1. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) oraz przeciwinsulinowych (IAA) – zagadnienia przedanalizyczne

Do oznaczeń miana autoprzeciwciał GAD oraz IAA wykorzystywano próbki surowicy przygotowane i przechowywane w tych samych warunkach, jak próbki surowicy do analizy stężeń C-peptydu (→ *Materiały i metody* pkt.4.1 str.65). Separator żelowy stosowany w próbkach systemu VACUETTE (Greiner Bio-One Ltd., Wielka Brytania), według specyfikacji producenta, nie posiada zdolności wiążących autoprzeciwciała GAD i IAA oraz nie zaburza oceny ich miana w analizowanych próbkach.

Podobnie jak w przypadku innych pomiarów laboratoryjnych, próbki surowicy po odwirowaniu kodowano celem zminimalizowania wpływu osoby przeprowadzającej analizy na wyniki seryjnych oznaczeń miana autoprzeciwciał u poszczególnych pacjentów.

6.2. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) – metody analityczne

Do oceny miana autoprzeciwciał GAD stosowano gotowe, standaryzowane testy immunoenzymatyczne (ELISA) swoiste dla przeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) Autoantibody ELISA kit, RSR Ltd., Wielka Brytania).

W stosowanych zestawach testowych wykorzystywano trójstopniową technikę ELISA, w której przeciwciała pierwotne – autoprzeciwciała GAD, wykrywano za pomocą dwóch rodzajów kompleksów detekcyjnych: pierwszego (I) – przeciwciała detekcyjnego sprzężonego z biotyną i drugiego (II) – kompleksu enzymatycznego peroksydaza – streptawidyna. Dokładny opis warunków reakcji ELISA wykrywającej autoprzeciwciała GAD zawarto w tabeli 2.21.

6.3. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) – kryteria analizy pomiarów

Wyniki miana autoprzeciwciał wyrażano w jednostkach międzynarodowych (U – *international unit*). Jakościowej interpretacji wyników dokonywano zgodnie z wytycznymi producenta testu ELISA do oznaczeń autoprzeciwciał GAD (Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) Autoantibody ELISA kit, RSR Ltd., Wielka Brytania):

- miano ujemne – pomiar < 5 U/ml
- miano dodatnie – pomiar ≥ 5 U/ml

Zakres pomiaru dla stosowanego testu ELISA wynosił 0-2000 U/ml. Ocenę ilościową próbek o wartości pomiaru miana przekraczającej powyższy zakres przeprowadzano po dokonaniu kolejnych rozcieńczeń badanych surowic. Następnie odczytywano wartości średnich absorbancji powyższych próbek, sprowadzając wyniki pomiaru do zakresu określonego przez krzywą kalibracyjną wyznaczoną do zastosowanych rozcieńczeń.

Tabela 2.21. Porównanie warunków reakcji immunoenzymatycznej (ELISA) swoistej dla auto przeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) oraz przeciwiinsulinowych (IAA)

<i>etapy reakcji ELISA</i>		<i>auto przeciwciała GAD</i>	<i>auto przeciwciała IAA</i>
etap I – inkubacja kalibratorów, kontroli oraz badanych surowic ze swoistym antygenem	<i>rodzaj antygeny opłaszczonych na studzienkach reakcyjnych</i>	antygen dekarboksylazy kwasu glutaminowego (izoforma GAD ₆₅ kDa)	ludzka rekombinowana insulina
	<i>klasa wykrywanych auto przeciwciał</i>	IgG	IgG
	<i>pipetowanie</i>	kalibratory } kontrole } surowice badane } 25 µl	kalibratory } kontrole } surowice badane } 100 µl
	<i>inkubacja</i>	60 minut w temperaturze pokojowej (+18°C – +25°C)	60 minut w temperaturze +37°C
	<i>płukanie</i>	3-krotnie – 300 µl buforu płuczającego	
etap II – tworzenie kompleksów auto przeciwciała- przeciwciała detekcyjne	<i>pipetowanie</i>	koniugat przeciwciała detekcyjne GAD ₆₅ – biotyna – 100 µl	X
	<i>inkubacja</i>	60 minut w temperaturze pokojowej (+18°C – +25°C)	
	<i>płukanie</i>	3-krotnie – 300 µl buforu płuczającego	
etap III – wiązanie z koniugatem enzymatycznym	<i>pipetowanie</i>	koniugat peroksydaza – streptawidyna – 100 µl	koniugat przeciwciała detekcyjne (anty-ludzka IgG) – peroksydaza chrzanowa – 100 µl
	<i>inkubacja</i>	20 minut w temperaturze pokojowej (+18°C – +25°C)	15 minut w temperaturze +37°C
	<i>płukanie</i>	3-krotnie – 300 µl buforu płuczającego	
etap IV – enzymatyczna reakcja barwna	<i>pipetowanie</i>	TMB ^{*)} – 100 µl (niebieskie zabarwienie mieszaniny reakcyjnej)	
	<i>inkubacja</i>	20 minut w temperaturze pokojowej (+18°C – +25°C)	15 minut w temperaturze +37°C
	<i>terminacja</i>	roztwór przerywający reakcję – 100 µl (ponownie żółte zabarwienie mieszaniny reakcyjnej)	
sposób oceny		odczyt absorbancji przy 450 nm lub 405 nm ^{**)} ; uniwersalny czytnik mikro płytkowy ELx800 (BioTek Instruments Inc., USA)	odczyt absorbancji przy 450 nm; uniwersalny czytnik mikro płytkowy ELx800 (BioTek Instruments Inc., USA)

^{*)} TMB – 3,3',5,5'-tetrametylobenzidyna

^{**)} zgodnie z wytycznymi producenta testu ELISA (Glutaminic Acid Decarboxylase (GAD) Autoantibody ELISA kit, RSR Ltd., Wielka Brytania) w przypadku wysokich wartości absorbancji kalibratorów przy 450 nm, wyniki absorbancji dla całego testu odczytywano przy 405 nm i uzyskaną wartość mnożono przez współczynnik 3,4.

6.4. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciwiinsulinowych (IAA) – metody analityczne

Ocenę miana autoprzeciwciał IAA przeprowadzano stosując gotowe, standaryzowane testy immunoenzymatyczne (ELISA) swoiste dla przeciwciał przeciw ludzkiej insulinie (Anti-INSULIN Qualitative ELISA Test, DiaMetra, Włochy).

Metodę stosowaną w powyższych oznaczeniach stanowiła dwustopniowa technika ELISA, w której przeciwciała pierwotne – autoprzeciwciała IAA wykrywano za pomocą pojedynczego kompleksu detekcyjnego: koniugatu enzymatycznego ludzka anty-Ig – peroksydaza chrzanowa.

W tabeli 2.21 dokonano porównania warunków reakcji ELISA wykrywającej autoprzeciwciała GAD oraz IAA.

6.5. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciwiinsulinowych (IAA) – kryteria analizy pomiarów

Wyniki miana autoprzeciwciał wyrażano w jednostkach międzynarodowych (U – *international unit*). Jakościową interpretację wyników pomiaru przeprowadzano według informacji producenta testu ELISA do oznaczeń autoprzeciwciał IAA (Anti-INSULIN Qualitative ELISA Test, DiaMetra, Włochy):

- miano ujemne – pomiar < 2,4 U/ml
- miano dodatnie – pomiar ≥ 2,4 U/ml

Podczas oceny ilościowej próbek o wartości pomiaru średniej absorbancji przekraczającej wartości pomiaru dla kalibratora o najwyższej absorbancji stosowano kolejne rozcieńczenia badanych surowic. Następnie odczytywano wartości średnich absorbancji powyższych próbek, sprowadzając wyniki pomiaru do zakresu określonego przez krzywą kalibracyjną wyznaczoną do zastosowanych rozcieńczeń.

6.6. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw wyspom trzustkowym (ICA) – metody analityczne

Oznaczenia miana autoprzeciwciał przeciw wyspom trzustkowym (ICA) przeprowadzano z wykorzystaniem gotowych, standaryzowanych zestawów testowych do immunofluorescencji pośredniej (IIF) (Test Immunofluorescencji Pośredniej – Trzustka (Małpa), EUROIMMUN, Niemcy).

Test IIF wykrywający autoprzeciwciała ICA obejmował dwa zasadnicze etapy:

- etap I – inkubacja rozcieńczonych surowic pacjentów z antygenem
Antygen w powyższej reakcji stanowiły mrożone skrawki trzustki małpy. W stosowanych testach, dzięki specjalnej metodzie konstrukcji płytki reakcyjnej (tzw. BIOCHIP), wystandaryzowano ilość antygeny w obrębie pola reakcyjnego, ilość i sposób nanoszenia reagentów oraz czas trwania reakcji. Podczas inkubacji autoprzeciwciała ICA w pozytywnych przypadkach ulegały związaniu z antygenem zawartym w obrębie BIOCHIP-ów.
- etap II – wykrywanie autoprzeciwciał związanych z antygenem za pomocą przeciwciał antyludzkich znakowanych fluoresceiną
Podczas drugiego etapu na każde pole reakcyjne nanoszono kompleks detekcyjny przeciwciała ludzkie IgG skoniugowane z fluoresceiną, co w przypadkach pozytywnych umożliwiała wykrycie związanych z antygenem autoprzeciwciał ICA. Oceny jakościowej i ilościowej reakcji dokonywano pod mikroskopem fluorescencyjnym.

6.7. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw wyspom trzustkowym (ICA) – kryteria analizy pomiarów

Jakościowej interpretacji wyników dokonywano zgodnie z wytycznymi producenta testu IIF do oznaczeń autoprzeciwciał ICA (Test Immunofluorescencji Pośredniej – Trzustka (Małpa), EUROIMMUN, Niemcy):

- miano ujemne – brak fluorescencji (jednolitej lub ziarnistej) cytoplazmy komórek wysp przy rozcieńczeniu badanej surowicy 1:10

- miano dodatnie – obecna fluorescencja (jednolita lub ziarnista) cytoplazmy komórek wysp przy rozcieńczeniu badanej surowicy 1:10

Ilościowo miano autooprzeciwciał ICA określano za pomocą takiego rozcieńczenia badanej surowicy, przy którym występował jeszcze charakterystyczny dla stosowanego testu typ fluorescencji. Za normę zgodnie z protokołem producenta testu przyjęto miano autooprzeciwciał ICA < 1:10.

7. Ocena potencjalnego współistnienia innych chorób autoimmunologicznych w pierwszym roku trwania T1DM

Badania przesiewowe w kierunku współistniejących chorób autoimmunologicznych obejmowały ocenę miana autooprzeciwciał związanych z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy (AIT) – autooprzeciwciała przeciw peroksydazie tarczycowej (TPO) oraz przeciw tyreoglobulinie (TG), jak również analizę miana autooprzeciwciał swoistych dla celiakii (ChT) – autooprzeciwciała przeciw transglutaminazie tkankowej (endomysium) w klasie IgA (TGA IgA).

U każdego pacjenta powyższe badania w kierunku AIT i ChT wykonywano w momencie rozpoznania T1DM, a następnie powtarzano po 12 miesiącach choroby, zgodnie z harmonogramem oznaczeń laboratoryjnych przedstawionym w tabeli 2.2 (→ *Materiały i metody* tab.2.2 str.36).

Ocenę miana autooprzeciwciał TPO, TG oraz TGA IgA przeprowadzono dzięki pomocy i uprzejmości dr n. med. Julii Kulczyckiej (Laboratorium Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Hematologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, Kierownik: dr hab. n. med. Grażyna Moszkowska)

7.1. Oznaczenia autooprzeciwciał związanych z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy (AIT) oraz celiakią (ChT) – zagadnienia przedanalizyczne

Próbki surowicy do oznaczeń miana autooprzeciwciał TPO, TG oraz TGA IgA przygotowywano i przechowywano w tych samych warunkach, jak próbki surowicy do analizy stężeń C-peptydu (→ *Materiały i metody* pkt.4.1 str.65). Separator żelowy stosowany w próbkach systemu VACUETTE (Greiner Bio-One Ltd., Wielka Brytania), według specyfikacji producenta, nie posiada zdolności wiążących autooprzeciwciała TPO, TG i TGA IgA oraz nie zaburza oceny ich miana w analizowanych próbkach.

Podobnie jak w przypadku innych pomiarów laboratoryjnych, próbki surowicy po odwirowaniu kodowano celem zminimalizowania wpływu osoby przeprowadzającej analizy na wyniki seryjnych oznaczeń miana autooprzeciwciał u poszczególnych pacjentów.

7.2. Oznaczenia autooprzeciwciał związanych z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy (AIT) oraz celiakią (ChT) – metody analityczne

Oznaczenia miana autooprzeciwciał związanych z AIT oraz ChT przeprowadzano z wykorzystaniem gotowych, standaryzowanych testów immunoenzymatycznych (ELISA):

- QUANTA Lite™ TPO (Inova Diagnostic Inc., USA) – do półilościowego wykrywania autooprzeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej
- QUANTA Lite™ Thyroid T (Inova Diagnostic Inc., USA) – do półilościowego wykrywania autooprzeciwciał przeciw tyreoglobulinie
- QUANTA Lite™ h-tTG IgA (Inova Diagnostic Inc., USA) – do półilościowego wykrywania autooprzeciwciał przeciw transglutaminazie tkankowej w klasie IgA

Stosowaną w powyższych zestawach testowych metodą ELISA była technika dwustopniowa. Podobnie, jak w przypadku oznaczeń autooprzeciwciał IAA, tak i w powyższych badaniach swoiste autooprzeciwciała wykrywano za pomocą pojedynczego kompleksu detekcyjnego: koniugatu enzymatycznego ludzka anty-Ig – peroksydaza chrzanowa.

Szczegółowy opis etapów oraz warunków reakcji ELISA wykrywającej autooprzeciwciała TPO, TG oraz TGA IgA zawarto w tabeli 2.22.

Tabela 2.22. Porównanie warunków reakcji immunoenzymatycznej (ELISA) swoistej dla autoprzeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej (TPO), przeciw tyreoglobulinie (TG) oraz przeciw transglutaminazie tkankowej (TGA)

<i>etapy reakcji ELISA</i>		<i>autoprzeciwiła TPO</i>	<i>autoprzeciwiła TG</i>	<i>autoprzeciwiła TGA</i>
etap I – inkubacja kalibratorów, kontroli oraz badanych surowic ze swoistym antygenem	<i>rodzaj antygeny opłaszczony na studzienkach reakcyjnych</i>	ludzka peroksydaza tarczycowa	ludzka tyreoglobulina	ludzka transglutaminaza tkankowa
	<i>klasa wykrywanych autoprzeciwciał</i>	IgG	IgG	IgA
	<i>pipetowanie</i>	kalibratory kontrole rozcieńczone surowice badane } 100 µl		
	<i>inkubacja</i>	30 minut w temperaturze pokojowej (+18°C – +25°C)		
	<i>płukanie</i>	3-krotnie – 300 µl buforu płuczającego		
etap II – wiązanie z koniugatem enzymatycznym	<i>pipetowanie</i>	koniugat przeciwiła detekcyjne (anty-ludzka IgG) – peroksydaza chrzanowa – 100 µl	koniugat przeciwiła detekcyjne (anty-ludzka IgA) – peroksydaza chrzanowa – 100 µl	
	<i>inkubacja</i>	30 minut w temperaturze pokojowej (+18°C – +25°C)		
	<i>płukanie</i>	3-krotnie – 300 µl buforu płuczającego		
etap III – enzymatyczna reakcja barwna	<i>pipetowanie</i>	TMB ^{*)} – 100 µl (niebieskie zabarwienie mieszaniny reakcyjnej)		
	<i>inkubacja</i>	30 minut w temperaturze pokojowej (+18°C – +25°C)		
	<i>terminacja</i>	roztwór przerywający reakcję – 100 µl (ponownie żółte zabarwienie mieszaniny reakcyjnej)		
sposób oceny		odczyt absorbancji przy 450 nm lub 620 nm ^{**) ; uniwersalny czytnik mikroplótkowy ELx800 (BioTek Instruments Inc., USA)}		

^{*)} TMB – 3,3',5,5'-tetrametylobenzodyna

^{**)} zgodnie z wytycznymi producenta testów ELISA (Inova Diagnostic Inc., USA) w przypadku wysokich wartości absorbancji kalibratorów przy 450 nm, wyniki absorbancji dla całego testu odczytywano przy 620 nm.

7.3. Oznaczenia autoprzeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej (TPO) oraz przeciw tyreoglobulinie (TG) – kryteria analizy pomiarów oraz ich interpretacji klinicznej

Wyniki miana autoprzeciwciał TPO i TG wyrażano w jednostkach międzynarodowych (U – *international unit*). Zgodnie z informacją producenta testów ELISA (Inova Diagnostic Inc., USA) dokonywano następującej jakościowej interpretacji uzyskanych wyników oznaczeń autoprzeciwciał TPO oraz TG:

- autoprzeciwiła TPO:
 - miano ujemne – pomiar < 100 U/ml
 - miano dodatnie – pomiar ≥ 100 U/ml

- autoprzeciwiła TG:
 - miano ujemne – pomiar < 100 U/ml
 - miano słabo dodatnie – pomiar 100-150 U/ml
 - miano dodatnie – pomiar > 150 U/ml

Ocenę ilościową próbek o wartości pomiaru średniej absorbancji przekraczającej wartości pomiaru dla kalibratora o najwyższej absorbancji przeprowadzano stosując kolejne rozcieńczenia badanych surowic. Wartości średnich absorbancji powyższych próbek odczytywano, sprowadzając wyniki pomiaru do zakresu określonego przez krzywą kalibracyjną wyznaczoną do zastosowanych rozcieńczeń.

U pacjentów włączonych do badania stosowano następującą interpretację kliniczną dodatnich wyników oznaczeń autoprzeciwiła TPO i TG:

- faza subkliniczna AIT – dodatnie miano autoprzeciwiła TPO i/lub TG, przy prawidłowej funkcji hormonalnej gruczołu tarczowego ocenionej za pomocą oznaczeń hormonu tyreotropowego (TSH) i wolnej tyroksyny (fT₄)
- AIT – dodatnie miano autoprzeciwiła TPO i/lub TG oraz zaburzenia funkcji hormonalnej gruczołu tarczowego (nieprawidłowe wyniki oznaczeń TSH i fT₄)

7.4. Oznaczenia autoprzeciwiła przeciw transglutaminazie tkankowej (TGA) – kryteria analizy pomiarów oraz ich interpretacji klinicznej

Wyniki oznaczeń miana autoprzeciwiła TGA wyrażano jednostkach międzynarodowych (U – *international unit*). Jakościową interpretację uzyskanych wyników przeprowadzano zgodnie z wytycznymi producenta testów ELISA do oznaczeń autoprzeciwiła TGA (Inova Diagnostic Inc., USA), przyjmując poniższe wartości odcięcia:

- miano ujemne – pomiar < 20 U/ml
- miano słabo dodatnie – pomiar 20-30 U/ml
- miano dodatnie – pomiar > 30 U/ml

Do oceny ilościowej próbek o wartości pomiaru średniej absorbancji przekraczającej wartości pomiaru dla kalibratora o najwyższej absorbancji stosowano kolejne rozcieńczenia badanych surowic. Następnie dokonywano odczytu wartości średnich absorbancji powyższych próbek poprzez sprowadzenie wyników pomiaru do zakresu określonego przez właściwą krzywą kalibracyjną, wyznaczoną odpowiednio do zastosowanych rozcieńczeń.

W przypadku wystąpienia dodatnich wyników oznaczeń autoprzeciwiła TGA u pacjentów włączonych do badania stosowano poniższą ich interpretację (WGO, 2012):

- postać asymptomatyczna ChT – dodatnie miano autoprzeciwiła TGA oraz zmiany histopatologiczne 3/4 stopień według klasyfikacji Marsha w biopsji jelita cienkiego (klasyfikacja Marsha → *Aneks 4* str.220), bez objawów klinicznych
- postać nieklasyczna ChT – dodatnie miano autoprzeciwiła TGA oraz zmiany histopatologiczne 3/4 stopień według klasyfikacji Marsha w biopsji jelita cienkiego (klasyfikacja Marsha → *Aneks 4* str.220) ± pozajelitowa manifestacja ChT, nietypowe objawy ChT
- postać klasyczna ChT – dodatnie miano autoprzeciwiła TGA oraz zmiany histopatologiczne 3/4 stopień według klasyfikacji Marsha w biopsji jelita cienkiego (klasyfikacja Marsha → *Aneks 4* str.220) + objawy kliniczne zaburzeń wchłaniania jelitowego

Dodatkowo wyróżniono dwie podgrupy pacjentów, u których istniało zwiększone ryzyko rozwoju ChT z uwagi na nieprawidłowe wyniki oznaczeń autoprzeciwiła TGA:

- pacjenci z dodatnim mianem autoprzeciwciał TGA oraz prawidłowym obrazem histopatologicznym w biopsji jelita cienkiego
- pacjenci z dodatnim mianem autoprzeciwciał TGA oraz zmianami histopatologicznymi 1/2 stopień według klasyfikacji Marsha w biopsji jelita cienkiego (klasyfikacja Marsha → *Aneks 4 str.220*)

10. Metody statystyczne (R Foundation, 2013), (Altman, 2001)

Surowy materiał obejmował wyniki badań i obserwacji pochodzące od 147 pacjentów ze świeżo rozpoznaną autoimmunologiczną postacią cukrzycy typu 1 (T1DM) i został zgromadzony zgodnie z procedurami opisanymi w punktach 1-2 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.1-2, str.35-44).

W pierwszym etapie opracowania powyższego materiału przeprowadzono kategoryzację i standaryzację według obowiązujących standardów merytorycznych i procedur opisanych w punktach 1-2 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.1-2, str.35-44). Empiryczne wielkości pomiarów cech zostały poddane analizie statystycznej w podgrupach uzyskanych w wyniku tej klasyfikacji.

Analiza statystyczna obejmowała analizę opisową i decyzyjną. W skład analizy opisowej weszły prezentacje graficzne i liczbowe otrzymanych wyników. W zakresie statystycznej analizy decyzyjnej stosowano testy statystyczne.

Za miarę położenia przyjęto średnią i pięć nieparametrycznych charakterystyk Tukey'a (minimum, kwartył 25%, mediana, kwartył 75% i maksimum). Statystyki te stosowano na wykresach ilustrujących porównanie występowania analizowanych wielkości badawczych w wyróżnionych podgrupach pacjentów. Za miarę rozrzutu przyjęto odchylenie standardowe i nie zostało ono przedstawione na wykresach. Wyniki analiz jakościowych zestawiono przy pomocy tablic kontyngencji z zaznaczeniem odpowiedniego udziału procentowego i ilościowego. Wyniki wskaźnika względniej masy ciała BMI dla dzieci powyżej 6,5 lat przeliczono na wartości Z-score zgodnie z procedurą opartą na wartościach parametrów L, M i S uzyskanych przez autorów konstrukcji siatek centylowych w projekcie OLAF (Kułaga et al., 2011), a w przypadku dzieci w wieku poniżej 6,5 roku życia, wartości Z-score zostały wyliczone w oparciu o rozkład gaussowski na bazie średnich i odchyłeń standardowych podanych w tabelach norm dla populacji dziecięcej z regionu województwa mazowieckiego (Palczewska and Niedźwiecka, 2001). Estymację występowania genotypów przeprowadzono w oparciu o model Hardy'ego – Weinberga.

Podstawowym problemem na wstępie wszystkich badań pozostaje ustalenie losowego modelu matematycznego opisującego wyniki badań obserwacyjnych. Na ogół przyjmuje się, zgodnie z Centralnym Twierdzeniem Granicznym, że zmienne podlegające analizie mają rozkład Gaussa. Niestety przeprowadzona analiza statystyczna w postaci testowania testem Kołmogorowa – Smirnowa i testem Chi-kwadrat w stosunku do znacznej liczby zmiennych odrzuciła przypuszczenie o normalności rozkładu (na poziomie $p < 0,05$). Wyniki testów Kołmogorowa – Smirnowa i Chi-kwadrat nie zostały zamieszczone w pracy. Powyższa obserwacja spowodowała konieczność ujednoczenia analiz i zastosowania w dalszych analizach metod opartych na teorii testów nieparametrycznych. W związku z tym decyzja o różnicy innych miar położenia była podejmowana w oparciu o test Wilcoxona. W tablicach kontyngencji testowanie przebiegało w oparciu o dokładny test Fishera (Exact Fisher Test).

W przypadku każdej decyzji podano test za pomocą którego weryfikowano postawioną hipotezę, stanowiącą podstawę decyzji, jak również poziom istotności odpowiadający błędowi pierwszego rodzaju dla tej hipotezy. Jako poziom graniczny ustalono wartość $p = 0,05$. Przy poziomie istotności poniżej 0,05, analizowaną różnicę lub częstość uznawano za znamienne statystycznie. Dla poziomu istotności mniejszego od wartości 0,001 stosowano zapis $p < 0,001$.

Obliczenia wykonano z użyciem środowiska obliczeń statystycznych R 2.15.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Austria)

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono dzięki pomocy i uprzejmości dr Grzegorza Krzykowskiego (Zakład Algorytmów Instytutu Informatyki Uniwersytetu Gdańskiego, Dyrektor Instytutu: prof. UG, dr hab. Andrzej Szepietowski) oraz dr Rafała Filipów (Zakład Funkcji Rzeczywistych Instytutu Matematyki Uniwersytetu Gdańskiego, Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Andrzej Szczepański)

11. Zagadnienia etyczne

Prezentowane badanie uzyskało zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych (NKBBN) przy Akademii Medycznej w Gdańsku (nr zgody NKEBN/27/2008, z późniejszym rozszerzeniem NKEBN/27-315/2008 oraz NKEBN/27-399/2008).

Wyniki

1. Ogólna charakterystyka badanej grupy

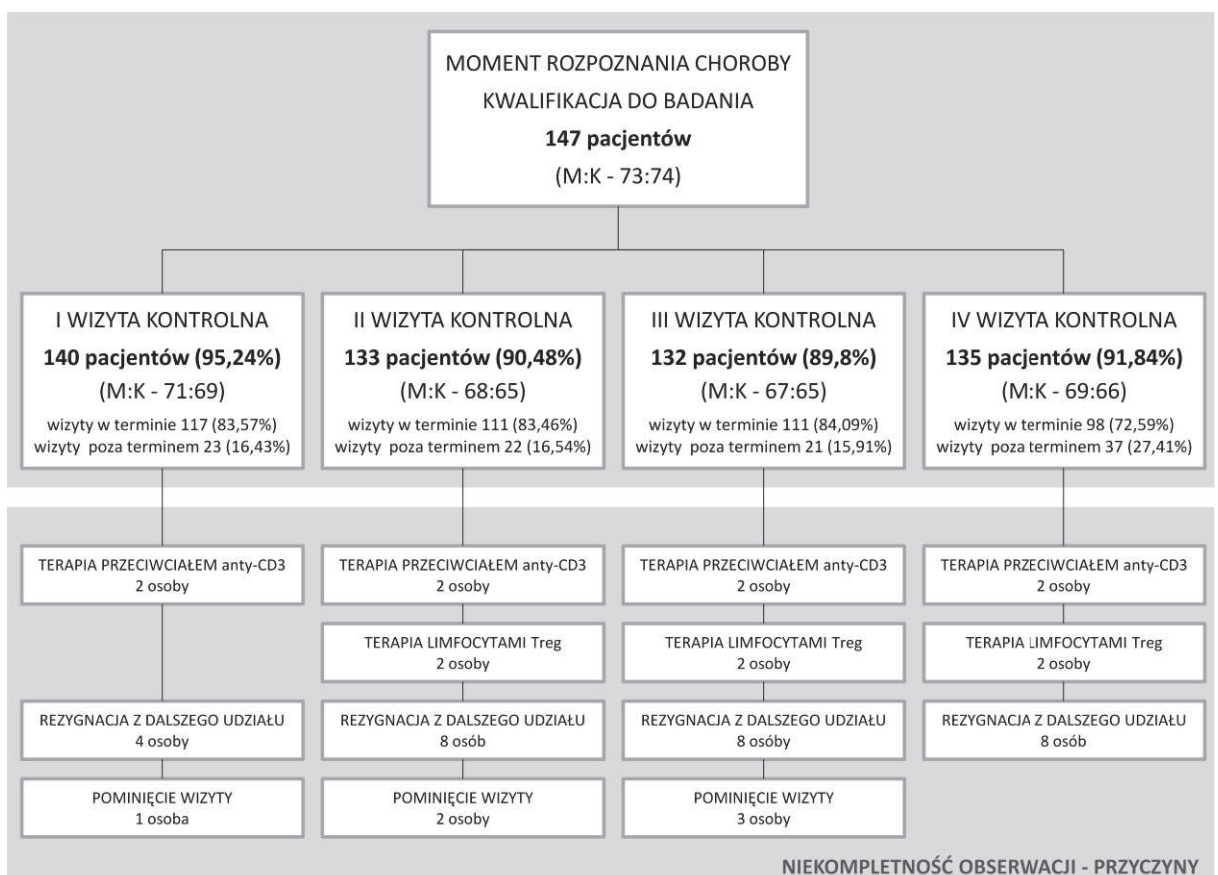
Do badania prospektywnego, zgodnie z kryteriami włączenia i wyłączenia przedstawionymi w tabeli 1.1 w rozdziale *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.1 str.35), zakwalifikowano 147 pacjentów ze świeżo rozpoznaną postacią autoimmunologiczną cukrzycy typu 1 (T1DM) (73 chłopców i 74 dziewczynki, średnia wieku $8,91 \pm 4,516$ lat).

1.1. Ocena kompletności 12-miesięcznej obserwacji chorych zakwalifikowanych do badania

Spośród 147 pacjentów zakwalifikowanych do badania, 130 chorych ukończyło w pełni planowaną 12-miesięczną obserwację (88,43% dzieci pierwotnie zakwalifikowanych do badania). Pięcioro pacjentów ukończyło badanie w sposób niekompletny (nieobecność na jednej wizycie kontrolnej – 4 dzieci, nieobecność na dwóch wizytach – 1 pacjent).

W przypadku 4 pacjentów opiekunowie wyrazili zgodę jedynie na przeprowadzenie badań genetycznych, bez kontynuowania dalszej obserwacji dziecka. Czterech kolejnych chorych zgodnie z kryteriami kwalifikacji do badania, zostało wykluczonych z dalszej obserwacji z powodu interwencji terapeutycznej wpływającej na proces autoimmunologicznej destrukcji komórek β trzustki. Czworo pacjentów z przyczyn niezależnych zrezygnowało z udziału w badaniu po 3 miesiącach trwania obserwacji.

Szczegółowy schemat dotyczący oceny kompletności 12-miesięcznej obserwacji pacjentów zakwalifikowanych do badania przedstawiono na rycinie 4.1.



Rycina 4.1. Ocena kompletności 12-miesięcznej obserwacji pacjentów zakwalifikowanych do badania

M:K – liczba chłopców : liczba dziewcząt

Terapia przeciwciałem anty-CD3 – terapia humanizowanym przeciwciałem anty-CD3

Terapia limfocytami Treg – terapia limfocytami regulatorowymi T CD4⁺CD25⁺CD127⁻

1.2. Ocena regularności wizyt kontrolnych pacjentów podczas 12-miesięcznej obserwacji

Termin wizyty kontrolnej wyznaczano w odstępach 3-miesięcznych (co 120 dni) licząc od daty rozpoznania T1DM, ustalonej zgodnie z wytycznymi ISPAD (→ *Materiały i metody* pkt.1 str.35 oraz pkt.2.2 str.43). Jako wizytę kontrolną w zaplanowanym terminie uznawano każdą wizytę, która odbyła się do 14 dni od wyznaczonej daty. Przesunięcie terminu wizyty o ponad 30 dni od wyznaczonej daty skutkowało jej anulowaniem i pominięciem w obserwacji (obserwacja niekompletna → *Wyniki* pkt.1.1 str.76).

W ciągu rocznej obserwacji pacjentów odsetek wizyt kontrolnych w zaplanowanym terminie wahał się w granicach 72,59 – 84,09% (ryc. 4.1).

1.3. Charakterystyka demograficzna badanej grupy

Analizę rozkładu procentowego płci z uwzględnieniem oceny stadium rozwoju płciowego (→ *Materiały i metody* pkt.2.1 str.37 oraz pkt.2.2 str.44; *Aneks 2* str.218) w poszczególnych miesiącach obserwacji przedstawiono w tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Ocena rozkładu płci z uwzględnieniem stadium rozwoju płciowego w badanej populacji podczas 12—miesięcznej obserwacji chorych

punkt obserwacji	stadium rozwoju płciowego					
	stadium przedpokwitaniowe ^{*)}			pokwitanie ^{**)}		
	liczba pacjentów	liczba chłopców	liczba dziewcząt	liczba pacjentów	liczba chłopców	liczba dziewcząt
moment rozpoznania choroby <i>n=147</i>	87 (59,18%)	44 (29,93%)	43 (29,25%)	60 (40,82%)	29 (19,73%)	31 (21,09%)
I wizyta kontrolna (3 miesiąc choroby) <i>n=140</i>	76 (54,30%)	38 (27,15%)	38 (27,15%)	64 (45,70%)	33 (23,60%)	31 (22,10%)
II wizyta kontrolna (6 miesiąc choroby) <i>n=133</i>	74 (55,64%)	38 (28,57%)	36 (27,07%)	59 (44,36%)	30 (22,56%)	29 (21,80%)
III wizyta kontrolna (9 miesiąc choroby) <i>n=132</i>	73 (55,30%)	36 (27,27%)	37 (28,03%)	59 (44,70%)	31 (23,49%)	28 (21,21%)
IV wizyta kontrolna (12 miesiąc choroby) <i>n=135</i>	75 (55,56%)	38 (28,15%)	37 (27,41%)	60 (44,44%)	31 (22,96%)	29 (21,48%)

^{*)} stadium przedpokwitaniowe – I stadium dojrzewania płciowego według skali Tannera (→ *Aneks 2*)

^{**)} pokwitanie – II – V stadium dojrzewania płciowego według skali Tannera (→ *Aneks 2*)

n – liczba pacjentów uwzględniana w analizie w danym punkcie czasowym obserwacji

Dane w tabeli przedstawiono jako liczbę pacjentów zakwalifikowanych do danej kategorii w określonym czasie rocznej obserwacji, w nawiasach podano ich udział procentowy w populacji uwzględnianej w analizie w danym punkcie czasowym

Średnia wieku w badanej populacji w momencie rozpoznania T1DM wynosiła $8,91 \pm 4,516$ lat (min. – max.: 1,074 – 17,885 lat). Udział procentowy poszczególnych kategorii wiekowych w obserwowanej grupie, z uwzględnieniem rozkładu płci w momencie diagnozy choroby, przedstawiono w tabeli 4.2.

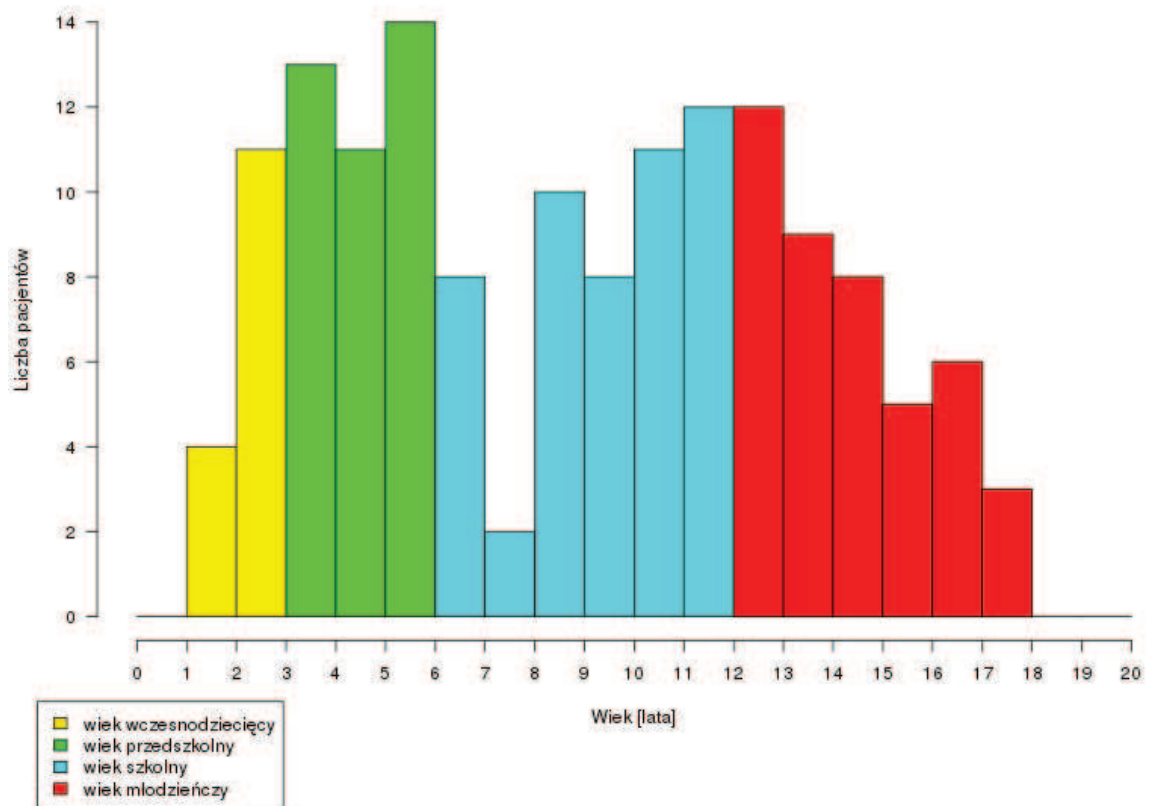
W części dalszych analiz oprócz standardowego podziału na cztery kategorie wiekowe (→ *Materiały i metody* pkt.2.1 str.36) stosowano podział na dwie grupy (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny; wiek szkolny + młodzieńczy), uwzględniając bimodalny rozkład wieku w badanej populacji (ryc. 4.2).

Analiza porównawcza rozkładu płci i wieku, z uwzględnieniem podziału na dwie i cztery kategorie wiekowe, nie wykazała znamiennej zależności pomiędzy tymi cechami w badanej grupie pacjentów (dokładny test Fishera, płeć vs. wiek – dwie kategorie $p=0,166$; płeć vs. wiek - cztery kategorie $p=0,172$).

Tabela 4.2. Ocena rozkładu wieku w badanej populacji w momencie rozpoznania cukrzycy typu 1, z uwzględnieniem podziału na kategorie wiekowe oraz płeć

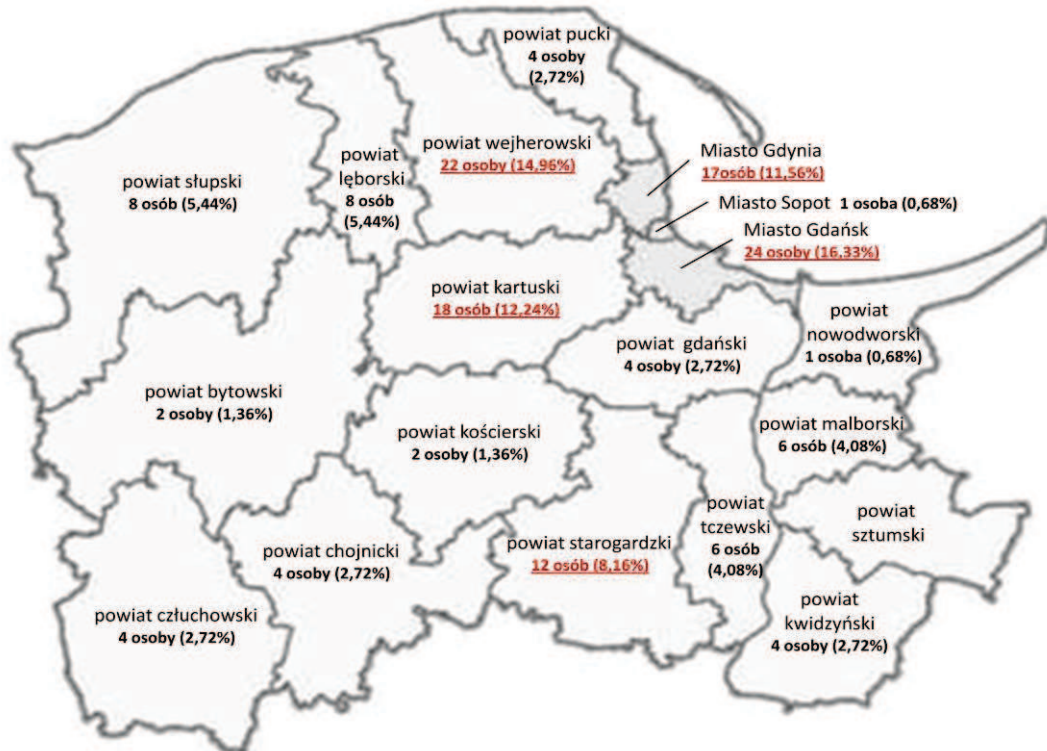
<i>kategoria wiekowa</i>	<i>liczba pacjentów</i> <i>n=147</i>	<i>liczba chłopców</i> <i>n=73</i>	<i>liczba dziewcząt</i> <i>n=74</i>	<i>kategoria wiekowa</i> <i>(analiza bimodalna)</i>	<i>liczba pacjentów</i> <i>n=147</i>	<i>liczba chłopców</i> <i>n=73</i>	<i>liczba dziewcząt</i> <i>n=74</i>
wiek wczesno-dziecięcy	14 (9,52%)	9 (12,33%)	5 (6,76%)	wiek wczesno-dziecięcy + przedszkolny	53 (36,05%)	23 (31,51%)	30 (40,54%)
wiek przedszkolny	39 (26,53%)	14 (19,18%)	25 (33,78%)				
wiek szkolny	51 (34,70%)	30 (41,09%)	21 (28,38%)	wiek szkolny + młodzieńczy	94 (63,95%)	50 (68,49%)	44 (59,46%)
wiek młodzieńczy	43 (29,25%)	20 (27,4%)	23 (31,08%)				

n – liczba pacjentów uwzględnionych w analizie oceniającej wiek chorych



Rycina 4.2. Histogram wieku pacjentów zakwalifikowanych do badania, z uwzględnieniem podziału na kategorie wiekowe

W analizie dotyczącej miejsca zamieszkania pacjentów zakwalifikowanych do badania stwierdzono ponad sześćdziesięcioprocentowy udział dzieci pochodzących z terenów miejskich województwa pomorskiego (92 chorych – 62,58%), przy czym niemal połowa z nich zamieszkiwała teren Trójmiasta (42 dzieci – 28,57%). Ponad 30% chorych pochodziło z terenów wiejskich (55 pacjentów – 37,41%). Powyższy podział na tereny miejskie, wiejskie oraz Trójmiasto został dokonany zgodnie z Krajowym Rejestrem Urzędowego Podziału Terytorialnego Kraju TERYT, prowadzonym przez Główny Urząd Statystyczny (GUS, 1995-2013). Dane dotyczące liczby pacjentów pochodzących z poszczególnych powiatów województwa pomorskiego przedstawiono na rycinie 4.3.



Rycina 4.3. Ocena miejsca zamieszkania pacjentów zakwalifikowanych do badania z uwzględnieniem podziału administracyjnego województwa pomorskiego

N (%) – liczba pacjentów w grupie badanej pochodzących z terenów danego powiatu województwa pomorskiego, w nawiasie podano udział procentowy w całej populacji badanej

N (%) – powiaty o najwyższej odnotowanej w grupie badanej liczbie zachorowań na T1DM, w nawiasie podano udział procentowy w całej populacji badanej

powiat sztumski – w populacji badanej nie odnotowano przypadków zachorowania na T1DM

Przyporządkowania pacjentów ze względu na miejsce zamieszkania do poszczególnych powiatów województwa pomorskiego dokonano zgodnie z Krajowym Rejestrem Urzędowego Podziału Terytorialnego Kraju TERYT prowadzonym przez Główny Urząd Statystyczny (GUS, 1995-2013)

2. Ogólna ocena rodzinnego wywiadu w kierunku wybranych jednostek chorobowych w populacji badanej

2.1. Ocena rodzinnego obciążenia cukrzycą, z uwzględnieniem typu 1 oraz typu 2 choroby

Występowanie cukrzycy w rodzinie odnotowano u 117 pacjentów (79,59%) zakwalifikowanych do badania. Pozytywny wywiad rodzinny w kierunku T1DM wykazano u 24 chorych (16,33%), w kierunku T2DM – u 93 osób (63,26%), przy czym u 8 pacjentów stwierdzono współistnienie przypadków T1DM oraz T2DM w rodzinie. Szczegółowe dane dotyczące rodzinnego wywiadu w kierunku cukrzycy, z

uwzględnieniem stopnia pokrewieństwa w odniesieniu do chorego pozostającego w populacji badanej przedstawiono w tabeli 4.3.

Dane dotyczące obciążonego wywiadu rodzinnego w kierunku T1DM oraz T2DM uwzględniono w dalszych analizach dotyczących ogólnej charakterystyki stanu klinicznego pacjenta w momencie rozpoznania choroby (→ Wyniki pkt.3.3 str.83), jak również przy ocenie dystrybucji wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w badanej populacji (→ Wyniki pkt.10 str.92). Analiz uwzględniających występowanie cukrzycy w rodzinie, a dotyczących aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej, dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki oraz kontroli metabolicznej T1DM w pierwszym roku trwania choroby, nie przedstawiono w niniejszej pracy, jako wykraczających poza jej zakres tematyczny.

Tabela 4.3. Ocena częstości występowania pozytywnego wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy w populacji badanej

<i>stopień pokrewieństwa</i>	<i>pozytywny wywiad rodzinny w kierunku T1DM (n=24)^{*)}</i>	<i>pozytywny wywiad rodzinny w kierunku T2DM (n=93)^{*)}</i>
I	8 (5,44%)	5 (3,40%)
ojciec	2 (1,36%)	4 (2,72%)
matka	3 (2,04%)	1 (0,68%)
ojciec + matka	1 (0,68%)	-
rodzeństwo	2 (1,36%)	-
II	5 (3,40%)	57 (38,77%)
III	17 (11,56%)	53 (36,05%)

n – liczba pacjentów zakwalifikowanych do określonej kategorii oceniającej występowanie przypadków T1DM/T2DM w rodzinie

^{*)} liczba pacjentów z pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku T1DM/T2DM, podana w odpowiednich kolumnach, przekracza liczbę *n* wskazaną w nagłówku kolumny, z uwagi na występowanie nawet kilku przypadków cukrzycy u krewnych różnego stopnia w rodzinach pacjentów uwzględnionych w zestawieniu. W nawiasach podano odsetek pacjentów posiadających w rodzinie krewnego o danym stopniu pokrewieństwa, chorującego na T1DM/T2DM, w odniesieniu do wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badania (*n*=147)

2.2. Ocena rodzinnego obciążenia chorobami o etiologii autoimmunologicznej, z wyłączeniem T1DM

Występowanie schorzeń z kręgu autoimmunologicznych stwierdzono w rodzinach 57 chorych biorących udział w badaniu (38,77%), przy czym w przypadku ośmiu rodzin (14,03% rodzin z pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku chorób autoimmunologicznych) obserwowano przynajmniej dwie różne choroby autoimmunologiczne (2 różne jednostki chorobowe – 7 rodzin; 3 różne jednostki chorobowe – 1 rodzina). W tabeli 4.4 podano dokładne częstości występowania chorób autoimmunologicznych w rodzinach badanych pacjentów, z wyszczególnieniem kategorii schorzenia w zależności od układu/narządu objętego procesem autoimmunizacyjnym (podział na kategorie chorób autoimmunologicznych według podręcznika pod red. M. Zembali i A. Górskiego "Zarys immunologii klinicznej") (Zembała and Górski, 2001).

Tabela 4.4. Ocena częstości występowania chorób o etiologii autoimmunologicznej w rodzinach badanych pacjentów

<i>rodzaj choroby autoimmunologicznej w zależności od zajętego procesem chorobowym układu/narządu</i>	<i>liczba pacjentów posiadających krewnego z pozytywnym wywiadem (n=57)</i>	<i>odsetek pacjentów posiadających krewnego z pozytywnym wywiadem w odniesieniu do wszystkich chorych zakwalifikowanych do badania</i>
choroby gruczołu tarczowego	12	8,16%
choroby stawów	12	8,16%
choroby układu pokarmowego	4	2,72%
choroby skóry	32	21,77%
choroby neurologiczne	5	3,40%
choroby tkanki łącznej	1	0,68%

n – liczba pacjentów zakwalifikowanych do określonej kategorii oceniającej występowanie chorób autoimmunologicznych w rodzinie

^{*)}liczba pacjentów z pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku chorób autoimmunologicznych, podana w kolumnie, przekracza liczbę *n* wskazaną w nagłówku kolumny, z uwagi na występowanie nawet kilku schorzeń autoimmunologicznych z różnych układów/narządów u krewnych pacjentów uwzględnionych w zestawieniu.

3. Charakterystyka stanu klinicznego pacjenta w momencie rozpoznania T1DM w badanej populacji

Zgodnie z wytycznymi ISPAD (Wolfsdorf et al., 2009) (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.2.1 str.38), w grupie badanej, cukrzycową kwasicę ketonową (DKA) w momencie rozpoznania T1DM stwierdzono u 52 pacjentów (35,37%). Ciężka DKA występowała u 12 chorych (8,16% populacji badanej; 23,08% populacji z rozpoznaną DKA), umiarkowana DKA – u 17 pacjentów (11,56% populacji badanej; 32,69% populacji z DKA). Natomiast łagodna DKA została rozpoznana u 23 obserwowanych dzieci ze świeżo rozpoznaną T1DM (15,65% populacji badanej; 44,23% populacji z DKA). U większości pacjentów (88 chorych – 59,86% populacji badanej) nie wykazano istotnych zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej przy przyjęciu do szpitala.

Izolowaną nieketonową hiperglikemię hiperosmolalną (HHS) (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.2.2 str.39) stwierdzono tylko u jednej pacjentki (0,63%) – 3,5-letniej dziewczynki z około 12-dniowym wywiadem chorobowym (stężenie glukozy w osoczu przy przyjęciu do szpitala 1036 mg/dl, pH 7,33, HCO₃ 16,7 mmol/l, osmolalność surowicy 333 mOsm/l).

Współwystępowanie DKA różnego stopnia z HHS czyli tzw. zespół nakładania DKA-HHS (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.2.3 str.39) zaobserwowano u 4 chorych (2,72%) – u 3 pacjentów HHS współistniało z łagodną DKA (11-letni chłopiec, 3,5-letnia oraz 4-letnia dziewczynka). U czwartego dziecka rozpoznano HHS z ciężką DKA (4,5-letnia dziewczynka z około 2-dniowym wywiadem chorobowym, stężenie glukozy w osoczu przy przyjęciu do szpitala 1340 mg/dl, pH 7,08, HCO₃ 7,5 mmol/l, osmolalność surowicy 367 mOsm/l).

U dwójki pacjentów z badanej grupy (1,36%) nie uzyskano kompletu danych medycznych pozwalających na dokonanie oceny stanu klinicznego w momencie rozpoznania T1DM.

Dalsze analizy dotyczące stanu klinicznego pacjenta w momencie rozpoznania T1DM w badanej populacji przeprowadzono z uwzględnieniem chorych bez istotnych zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej (bez cech DKA) oraz ze stwierdzoną DKA, pomijając, ze względu na małą liczbę, pacjentów z rozpoznaniem HHS lub zespołu nakładania DKA-HHS.

3.1. Ocena potencjalnie modyfikującego oddziaływania czynników demograficznych na stan kliniczny pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

W badanej grupie DKA znamiennej częściej występowała u chłopców. Średnia wieku w grupie chorych bez zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej wynosiła $9,45 \pm 4,29$ lat, zaś w grupie pacjentów z DKA – $8,1 \pm 4,76$ lat (ocena median wieku w oparciu o test Wilcoxon, $p=0,04$). Po uwzględnieniu stopnia ciężkości DKA, w grupie chorych z ciężką DKA odnotowano znamiennej niższą medianę wieku w odniesieniu do pacjentów z łagodną DKA (test Wilcoxon $p=0,039$), jak i umiarkowaną DKA (test Wilcoxon $p=0,044$; mediana wieku: łagodna DKA 8,15 lat; umiarkowana DKA 9,28 lat; ciężka DKA 3,71 lat). Natomiast w grupach chorych z DKA łagodną oraz DKA umiarkowaną mediana wieku pozostawała porównywalna (test Wilcoxon $p=0,478$). Jednocześnie analiza częstości występowania DKA z uwzględnieniem czterech kategorii wiekowych (zgodnych z rozwojem psychosomatycznym dziecka), jak i bimodalnego rozkładu wieku w badanej populacji nie wykazała istotnych zależności.

W analizowanej populacji nie stwierdzono również znamiennej zależności pomiędzy występowaniem DKA a miejscem zamieszkania pacjenta.

Szczegółowe dane dotyczące oddziaływania czynników demograficznych na stan kliniczny chorego w momencie rozpoznania T1DM przedstawiono w tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Charakterystyka potencjalnie modyfikującego wpływu czynników demograficznych na stan chorego w momencie rozpoznania T1DM

<i>czynnik demograficzny</i>	<i>pacjenci bez zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej*) (n=88)</i>	<i>pacjenci z DKA*) (n=52)</i>	<i>analiza porównawcza wartość p**)</i>
płeć	M 38 (27,14%) K 50 (35,72%)	M 31 (22,14%) K 21 (15,0%)	0,044
wiek (analiza standardowa):			
wczesnodziecięcy	6 (4,29%)	8 (5,71%)	NS
przedszkolny	21 (15,0%)	14 (10,0%)	
szkolny	33 (23,57%)	17 (12,14%)	
młodzieńczy	28 (20,0%)	13 (9,29%)	
wiek (analiza bimodalna):			
wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny	27 (19,29%)	22 (15,71%)	NS
wiek szkolny + młodzieńczy	61 (43,57%)	30 (21,43%)	
miejsce zamieszkania***):			
Trójmiasto	27 (19,30%)	14 (10,0%)	NS
miasto	29 (20,71%)	17 (12,14%)	
teren wiejski (wieś/osada)	32 (22,85%)	21 (15,0%)	

*) dane w poszczególnych kolumnach przedstawiono jako liczbę pacjentów przyporządkowanych do określonej kategorii, w nawiasach podano ich udział procentowy w całej analizowanej populacji (140 pacjentów)

**) analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

***) według Krajowego Rejestru Urzędowego Podziału Terytorialnego Kraju TERYT prowadzonego przez Główny Urząd Statystyczny (GUS, 1995-2013)

n – liczba pacjentów zakwalifikowanych do określonej kategorii oceniającej stan kliniczny chorego

M – liczba chłopców

K – liczba dziewcząt

NS – wartości $p > 0,05$ (nieistotne statystycznie)

3.2. Ocena potencjalnie modulującego oddziaływania czynników środowiskowych na stan kliniczny pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

Dokonano analizy następujących czynników środowiskowych mogących potencjalnie oddziaływać na stan kliniczny pacjenta w momencie rozpoznania T1DM: długość wywiadu chorobowego dotyczącego objawów T1DM (→ *Materiały i metody* pkt.2.1 str.36 → podpunkt *Dane kliniczne* str.37), opóźnienie diagnozy (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.1 str.38), występowanie choroby infekcyjnej poprzedzającej objawy T1DM oraz spożywanie napojów o wysokim ładunku osmolalnym (→ *Materiały i metody* pkt.2.1 str.36 → podpunkt *Dane kliniczne* str.37).

W analizowanej populacji nie wykazano istotnego związku pomiędzy rozwojem DKA a długością wywiadu chorobowego dotyczącego objawów T1DM (dokładny test Fishera $p=0,103$). W grupie chorych z DKA istotnie częściej obserwowano opóźnienie rozpoznania T1DM definiowane jako brak właściwej diagnozy u pacjenta podczas pierwszej wizyty lekarskiej (dokładny test Fishera, $p=0,014$; odsetek DKA w grupie chorych z opóźnieniem diagnozy vs. z rozpoznaniem o czasie: 54,28% vs. 31,43%), przy jednocześnie nieznamiennej zależności pomiędzy wystąpieniem opóźnienia diagnozy a długością wywiadu chorobowego dotyczącego objawów T1DM (dokładny test Fishera $p=0,121$).

W badanej grupie nie potwierdzono istotnej zależności pomiędzy rozwojem DKA w okresie ujawniania się T1DM a występowaniem poprzedzającej choroby infekcyjnej (dokładny test Fishera $p=1,0$) oraz spożyciem napojów o wysokim ładunku osmolalnym (dokładny test Fishera $p=0,852$). Jednocześnie w grupie chorych z DKA, jak również bez stwierdzonych cech DKA, nie obserwowano znamiennego wzrostu osmolalności surowicy wraz ze wzrostem ilości przyjmowanych napojów o wysokim ładunku osmolalnym (test Wilcozona, porównanie skrajnych kategorii spożycia płynów o wysokim ładunku osmolalnym – spożycie do 0,5 l. vs. spożycie 3-10 l.: grupa z DKA $p=0,207$; grupa bez DKA $p=0,086$).

3.3. Ocena potencjalnie modulującego oddziaływania wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy na stan kliniczny pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

Nie wykazano znamiennego związku pomiędzy występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby a pozytywnym/negatywnym wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy (dokładny test Fishera, $p=0,843$). W grupie pacjentów z pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy obecność DKA przy przyjęciu do szpitala stwierdzono u 38 chorych (36,54%), natomiast u 66 dzieci (63,46%) nie obserwowano istotnych zaburzeń w gospodarce kwasowo – zasadowej. Podobny odsetek występowania DKA wykazano w grupie z negatywnym wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy (pacjenci z DKA 38,89%, chorzy bez istotnych zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej – 61,11%).

Również na podstawie szczegółowej analizy dotyczącej rodzinnego wywiadu w kierunku cukrzycy, uwzględniającej typ choroby (T1DM/T2DM), nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy rozwojem DKA w momencie ujawniania się T1DM u badanych pacjentów a wywiadem rodzinnym w kierunku T1DM (dokładny test Fishera, $p=0,818$), T2DM (dokładny test Fishera, $p=0,76$), T1DM oraz T2DM łącznie (dokładny test Fishera, $p=0,932$).

3.4. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

Zagadnienie omówiono w punkcie 12.3 rozdziału *Wyniki* (→ *Wyniki* pkt.12.3 str.100)

3.5. Ocena zależności pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej w momencie rozpoznania T1DM

Zagadnienie omówiono w punkcie 13.1.6. rozdziału *Wyniki* (→ *Wyniki* pkt.13.1.6 str.121).

3.6. Ocena potencjalnego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku jej trwania

Zagadnienie omówiono w punkcie 14.4 rozdziału *Wyniki* (→ *Wyniki* pkt.14.4 str.147)

3.7. Ocena częstości występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji w zależności od występowania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej w momencie rozpoznania choroby

Zagadnienie omówiono w punkcie 15.3 rozdziału *Wyniki* (→ *Wyniki* pkt.15.3 str.165).

4. Ogólna ocena rodzaju prowadzonej insulinoterapii w badanej populacji w ciągu rocznej obserwacji

W tabeli 4.6. przedstawiono ogólną analizę częstości stosowania określonych rodzajów insulinoterapii w grupie badanej podczas rocznej obserwacji chorych. Klasyfikację rodzaju insulinoterapii przeprowadzono zgodnie z podziałem sposobu leczenia opisanym w punkcie 2.1.3 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.3 str.39)

Tabela 4.6. Ogólna charakterystyka rodzaju prowadzonej insulinoterapii w badanej populacji podczas rocznej obserwacji chorych

rodzaj insulinoterapii	punkt obserwacji ^{*)}				
	moment rozpoznania choroby n=147	I wizyta kontrolna (po 3 miesiącach) n=140	II wizyta kontrolna (po 6 miesiącach) n=133	III wizyta kontrolna (po 9 miesiącach) n=132	IV wizyta kontrolna (po 12 miesiącach) n=135
insulinoterapia intensywna za pomocą penów	137 (93,20%)	116 (82,86%)	87 (65,41%)	59 (44,70%)	54 (40,0%)
insulinoterapia intensywna za pomocą osobistej pompy insulinowej	8 (5,44%)	14 (10,0%)	40 (30,07%)	69 (52,28%)	78 (57,78%)
insulinoterapia zintensyfikowana	1 (0,68%)	9 (6,43%)	3 (2,26%)	2 (1,51%)	1 (0,74%)
bez insulinoterapii	1 (0,68%)	1 (0,71%)	3 (2,26%)	2 (1,51%)	2 (1,48%)

^{*)} dane w poszczególnych kolumnach przedstawiono jako liczbę pacjentów przyporządkowanych do określonej kategorii sposobu leczenia, w nawiasach podano ich udział procentowy w analizowanej populacji w danym punkcie rocznej obserwacji
n – liczba pacjentów uwzględnionych w analizie w danym punkcie rocznej obserwacji

W dalszych analizach, dotyczących oceny parametrów w czasie, wykorzystywano kategoryzację sposobu leczenia uwzględniającą stałość stosowania danego rodzaju insulinoterapii przez cały okres rocznej obserwacji pacjenta oraz ewentualne zmiany w terapii spowodowane przebiegiem choroby, przedstawioną w punkcie 2.1.3 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.3 str.39).

Analiza zależności pomiędzy sposobem insulinoterapii, kategoryzowanym ze względu na stałość terapii określoną metodą, a wiekiem chorego, z uwzględnieniem czterech kategorii wiekowych (zgodnych z rozwojem psychosomatycznym dziecka), potwierdziła istotnie częstsze stosowanie intensywnej insulinoterapii za pomocą osobistej pompy insulinowej od momentu rozpoznania T1DM do zakończenia

rocznej obserwacji w najmłodszej grupie wiekowej (dokładny test Fishera, $p=0,035$), co stanowi odzwierciedlenie wytycznych leczenia za pomocą osobistej pompy insulinowej. Natomiast w najstarszej grupie wiekowej znamiennie częściej istniała możliwość zastosowania terapii zintensyfikowanej w początkowym okresie choroby (dokładny test Fishera, $p=0,035$), a u jednej 15-letniej pacjentki ten typ terapii był stosowany przez cały okres rocznej obserwacji. Powyższa zależność może stanowić odzwierciedlenie stopnia zachowania resztkowej insulinosekrecji w najstarszej grupie wiekowej (→ *Wyniki* pkt.13.1.2 str.117).

Nie wykazano zależności pomiędzy przedstawionym powyżej podziałem sposobu insulinoterapii a płcią pacjenta (dokładny test Fishera, $p=0,169$).

5. Ogólna ocena stanu odżywienia pacjentów w pierwszym roku trwania T1DM

Na podstawie obliczeń wskaźnika BMI z-score oraz kryteriów oceny stanu odżywienia pacjentów (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.5.3 str.41), w populacji badanej stwierdzono wzrost odsetka chorych z nadwagą (z 4,84% do 10% obserwowanych pacjentów) oraz otyłością (z 4,84% do 6,15% obserwowanych osób) podczas rocznej obserwacji. Powyższy wzrost odsetka pacjentów z nieprawidłowym wskaźnikiem BMI z-score $\geq +1$ SD pozostawał znamienny pomiędzy kolejnymi punktami czasowymi prowadzonej obserwacji chorych (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera), jak i w skali całego pierwszego roku trwania T1DM (dokładny test Fishera, miesiąc choroby: 0 vs. 12 $p=0,013$; 3 vs. 12 $p<0,001$).

Niedobór masy ciała na podstawie wyliczonego wskaźnika BMI z-score oraz kryteriów oceny stanu odżywienia pacjentów (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.5.3 str.41) rozpoznano u 20,97% chorych w momencie rozpoznania T1DM. W dalszej obserwacji niedobór masy ciała stwierdzono tylko w przypadku jednego pacjenta (0,77%) w 6 miesiącu trwania choroby.

6. Ogólna ocena badania ankietowego podsumowującego poziom edukacji pacjenta (chorzy powyżej 14 roku życia)/ opiekunów chorego na temat T1DM

Badanie ankietowe oceniające poziom edukacji pacjenta/ opiekunów chorego na temat T1DM przeprowadzono zgodnie z harmonogramem badania (→ *Materiały i metody* tab. 2.2 str.36) – w momencie rozpoznania choroby i co 6 miesięcy w dalszej obserwacji chorych. Uzyskano następujący odsetek zwrotów wypełnionych ankiet: moment zachorowania – 93,88%, 6 miesiąc choroby – 93,23%, 12 miesiąc choroby – 74,07% (średni odsetek zwrotu ankiet 87,06%).

Ocenę badania ankietowego przeprowadzono za pomocą systemu punktacji przedstawionego w punkcie 2.1.6.1 rozdziału *Materiały i metody* (→ *Materiały i metody* pkt. 2.1.6.1 str.42).

Średnia suma punktów uzyskanych z ankiet w badanej grupie kształtowała się następująco: moment rozpoznania choroby – 62,93 pkt. (72,33% – poziom wiedzy dobry); 6 miesiąc choroby – 60,02 pkt. (68,99% – poziom wiedzy dobry); 12 miesiąc choroby – 61,11 pkt. (70,24% – poziom wiedzy dobry). Jednocześnie w 6 i 12 miesiącu trwania T1DM obserwowano znamienne różnice w rozkładzie sumy punktów uzyskiwanych z badania ankietowego w badanej populacji w odniesieniu do momentu rozpoznania choroby (test Wilcoxon, miesiąc choroby: 0 vs. 6 $p<0,001$; 0 vs. 12 $p=0,026$). Natomiast porównania badań ankietowych w 6 miesiącu obserwacji z badaniami przeprowadzonymi w 12 miesiącu trwania T1DM nie wykazały znamiennych różnic w rozkładzie sumy punktów (test Wilcoxon, miesiąc choroby 6 vs. 12 $p=0,08$).

Analizę porównawczą punktacji z poszczególnych bloków tematycznych badania ankietowego uzyskanej przez uczestników w kolejnych miesiącach trwania choroby przedstawiono w tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Analiza porównawcza punktacji z poszczególnych bloków tematycznych badania ankietowego w kolejnych miesiącach obserwacji pacjentów

blok tematyczny badania ankietowego	moment rozpoznania choroby*) (n=138)	II wizyta kontrolna (6 miesiąc choroby*) (n=124)	IV wizyta kontrolna (12 miesiąc choroby*) (n=100)	analiza porównawcza		
				wartość p**)		
				miesiąc choroby 0 vs. 6	miesiąc choroby 0 vs. 12	miesiąc choroby 6 vs. 12
naturalny przebieg choroby	15,07 ± 2,72 75,35% (poziom dobry)	14,69 ± 3,02 73,45% (poziom dobry)	14,71 ± 3,28 73,55% (poziom dobry)	NS	NS	NS
samokontrola	11,91 ± 2,53 79,4% (poziom dobry)	11,47 ± 2,72 76,47% (poziom dobry)	11,56 ± 2,67 77,07% (poziom dobry)	0,019	NS	NS
wysiłek fizyczny	3,09 ± 1,15 61,8% (poziom dobry)	2,68 ± 1,29 53,6% (poziom zadowalający)	2,83 ± 1,26 56,6% (poziom zadowalający)	<0,001	0,021	0,044
insulinoterapia	5,44 ± 1,32 77,71% (poziom dobry)	5,09 ± 1,37 72,71% (poziom dobry)	5,22 ± 1,34 74,57% (poziom dobry)	0,006	0,024	NS
cukrzycowa kwasica ketonowa	8,88 ± 1,88 80,73% (poziom dobry)	8,31 ± 1,99 75,54% (poziom dobry)	8,23 ± 2,13 74,82% (poziom dobry)	<0,001	0,002	NS
hipoglikemia	18,51 ± 4,45 63,83% (poziom dobry)	17,78 ± 4,39 61,31% (poziom dobry)	18,56 ± 4,51 64% (poziom dobry)	0,015	NS	0,011

*) dane przedstawiono jako wartość średnią ± odchylenie standardowe liczby punktów uzyskanych za określony blok tematyczny, wartość procentową z maksymalnej liczby punktów za określony blok tematyczny, opisową ocenę poziomu wiedzy na temat zagadnień z danego bloku tematycznego

**) analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon'a

n – liczba uzyskanych ankiet w danym punkcie czasowym obserwacji pacjentów

NS – wartości p>0,05 (nieistotne statystycznie)

7. Porównanie częstości występowania wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej i kontrolnej

Pełną analizę polimorfizmów c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS* przeprowadzono u wszystkich badanych pacjentów (147 chorych), a w grupie kontrolnej – dla 326 losowo wybranych, anonimowych próbek (wysuszonych plam krwi) pochodzących z rutynowego badania przesiewowego w kierunku chorób metabolicznych u noworodków z terenów województwa pomorskiego. Powyższą analizę wykonano zgodnie z protokołem badań opisanym w rozdziale *Materiały i metody* w punktach 3.1 (grupa badana) oraz 3.2 (grupa kontrolna) (→ *Materiały i metody* pkt.3.1 str.45 oraz pkt.3.2 str.60).

Zestawienie częstości występowania wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono w tabeli 4.8. W obu grupach, w każdym z analizowanych loci, częstości występowania poszczególnych alleli i genotypów pozostawały w stanie równowagi Hardy'ego – Weinberga (analizy przeprowadzone w oparciu o dokładny test Haldane'a).

Tabela 4.8. Porównanie dystrybucji analizowanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej i kontrolnej

częstość występowania odmian polimorficznych	grupa badana (n=147)		grupa kontrolna (n=326)		analiza porównawcza
	liczność	udział procentowy w populacji badanej (%)	liczność	udział procentowy w populacji kontrolnej (%)	wartość p ^{*)}
polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>					
częstość alleli					
A	153	52,04	369	56,60	NS
G	141	47,96	283	43,40	
częstość genotypów					
AA	35	23,81	107	32,82	NS
AG	83	56,46	155	47,55	
GG	29	19,73	64	19,63	
częstość genotypów z uwzględnieniem stratyfikacji ryzyka rozwoju T1DM					
ryzyko niskie (AA)	35	23,81	107	32,82	0,03
ryzyko wysokie (GG+ AG)	112	76,19	219	67,18	
polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i>					
częstość alleli					
C	226	76,87	514	78,83	NS
T	68	23,13	138	21,17	
częstość genotypów					
CC	91	61,91	198	60,74	0,037
TC	44	29,93	118	36,20	
TT	12	8,16	10	3,06	
częstość genotypów z uwzględnieniem stratyfikacji ryzyka rozwoju T1DM					
ryzyko niskie (CC)	91	61,91	198	60,74	NS
ryzyko wysokie (TT + TC)	56	38,09	128	39,26	
polimorfizm 5'VNTR genu <i>INS</i> (analiza pośrednia poprzez ocenę polimorfizmu -23HphIA>T)					
częstość alleli					
klasa III (allel T ^{**})	49	16,67	175	26,84	<0,001
klasa I (allel A ^{**})	245	83,33	477	73,16	
częstość genotypów					
klasa III/III (genotyp TT ^{**})	6	4,08	23	7,06	0,002
klasa I/III (genotyp AT ^{**})	37	25,17	129	39,57	
klasa I/I (genotyp AA ^{**})	104	70,75	174	53,37	
częstość genotypów z uwzględnieniem stratyfikacji ryzyka rozwoju T1DM					
ryzyko niskie klasa III/III (genotyp TT ^{**})	6	4,08	23	7,06	NS
ryzyko wysokie klasa I/I + I/III (genotyp AA + AT ^{**})	141	95,92	303	92,94	

^{*)} analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

^{**)} mianownictwo dotyczące analizy pośredniej polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*, poprzez ocenę polimorfizmu -23HphIA>T

NS – wartości p>0,05 (nieistotne statystycznie)

Z powodu stwierdzonych znamienych różnic w rozkładach częstości genotypów w przypadku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS*, a w przypadku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* – różnic w rozkładzie genotypów stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, przeprowadzono kolejną analizę porównawczą grupy badanej i kontrolnej, uwzględniając dawkę allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju choroby. W przypadku polimorfizmów c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS* obserwowano, w populacji badanej, istotnie częstsze występowanie homozygot allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858TT, klasa I/I polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*) w odniesieniu do częstości heterozygot (*PTPN22* c.1858TC, klasa I/III polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*). Szczegółowe wyniki powyższego porównania przedstawiono w tabeli 4.9.

Tabela 4.9. Analiza wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej i kontrolnej – porównanie dystrybucji alleli związanych z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM

częstość występowania odmian polimorficznych	grupa badana		grupa kontrolna		analiza porównawcza
	liczność	udział procentowy w grupie wysokiego ryzyka w populacji badanej (%)	liczność	udział procentowy w grupie wysokiego ryzyka w populacji kontrolnej (%)	wartość p ^{*)}
polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>					
częstość genotypów z uwzględnieniem dawki allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM					
AG	83	74,11	155	70,78	NS
GG	29	25,89	64	29,22	
polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i>					
częstość genotypów z uwzględnieniem dawki allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM					
TC	44	78,57	118	92,19	0,011
TT	12	21,43	10	7,81	
polimorfizm 5'VNTR genu <i>INS</i> (analiza pośrednia poprzez ocenę polimorfizmu –23HphIA>T)					
częstość genotypów z uwzględnieniem dawki allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM					
klasa I/III (genotyp AT ^{**)})	37	26,24	129	42,57	<0,001
klasa I/I (genotyp AA ^{**)})	104	73,76	174	57,43	

^{*)} analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

^{**)} mianownictwo dotyczące analizy pośredniej polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*, poprzez ocenę polimorfizmu –23HphIA>T

NS – wartości p>0,05 (nieistotne statystycznie)

Oceniając częstość wspólnego występowania genotypów polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, w populacji badanej nie odnotowano u żadnego z pacjentów współwystępowania trzech genotypów o niskim ryzyku rozwoju choroby (*CTLA-4* c.49AA i *PTPN22* c.1858CC oraz klasa III/III polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*). W grupie kontrolnej stwierdzono występowanie powyższego układu genowego w 2 przypadkach (0,61%). Współwystępowanie trzech genotypów z podwójną dawką allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM (*CTLA-4* c.49GG i *PTPN22* c.1858TT oraz klasa I/I polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*) obserwowano u 2 chorych (1,36%) w populacji badanej, natomiast w grupie kontrolnej nie odnotowano żadnego przypadku.

Nie wykazano również znamienych różnic pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną w częstości współwystępowania u jednej osoby przynajmniej dwóch genotypów z podwójną dawką allelu związanego

z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM (*CTLA-4* c.49GG, *PTPN22* c.1858TT, klasa I/I polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*) (dokładny test Fishera $p=1,0$).

8. Ocena częstości występowania wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej i kontrolnej w odniesieniu do dystrybucji tych polimorfizmów w obrębie rasy kaukaskiej

Analizę porównawczą dystrybucji badanych polimorfizmów c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS* w grupie badanej i kontrolnej w odniesieniu do populacji kaukaskiej przeprowadzono na podstawie danych dotyczących rasy kaukaskiej dostępnych w bazie National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) (→ *Materiały i metody* pkt.3.2 str.60).

Nie stwierdzono znamienych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmów c.49A>G genu *CTLA-4* oraz 5'VNTR genu *INS* przy porównaniu grupy kontrolnej z populacją kaukaską (dokładny test Fishera, polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4*: częstość genotypów $p=0,446$, częstość alleli $p=0,154$; polimorfizm $-23HphIA>T$ genu *INS*: częstość genotypów $p=0,735$, częstość alleli $p=0,241$).

Natomiast w analizie dotyczącej polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* wykazano istotne różnice w częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli zarówno przy odniesieniu grupy kontrolnej, jak i badanej do rasy kaukaskiej. Jednocześnie w przypadku polimorfizmów c.49A>G genu *CTLA-4* oraz 5'VNTR genu *INS* porównanie danych z populacji badanej z danymi dotyczącymi rasy kaukaskiej potwierdziło znamienne częstsze występowanie alleli związanych z większym ryzykiem rozwoju T1DM w grupie badanej.

Szczegóły analizy porównawczej przedstawiono w tabelach 4.10 oraz 4.11.

Tabela 4.10. Ocena dystrybucji analizowanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji kontrolnej w odniesieniu do rasy kaukaskiej

częstość występowania odmian polimorficznych	grupa kontrolna (n=326)		populacja kaukaska*) (n=100)		analiza porównawcza
	liczność	udział procentowy w populacji kontrolnej (%)	liczność	udział procentowy w populacji kaukaskiej (%)	wartość p**)
polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>					
częstość alleli					
A	369	56,60	122	61,0	NS
G	283	43,40	78	39,0	
częstość genotypów					
AA	107	32,82	36	36,0	NS
AG	155	47,55	50	50,0	
GG	64	19,63	14	14,0	
polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i>					
częstość alleli					
C	514	78,83	176	88,0	0,002
T	138	21,17	24	12,0	
częstość genotypów					
CC	198	60,74	77	77,0	0,01
TC	118	36,20	22	22,0	
TT	10	3,06	1	1,0	
polimorfizm 5'VNTR genu <i>INS</i> (analiza pośrednia poprzez ocenę polimorfizmu –23HphIA>T)					
częstość alleli					
klasa III (allel T ^{***})	175	26,84	48	24,0	NS
klasa I (allel A ^{***})	477	73,16	152	76,0	
częstość genotypów					
klasa III/III (genotyp TT ^{***})	23	7,06	6	6,0	NS
klasa I/III (genotyp AT ^{***})	129	39,57	36	36,0	
klasa I/I (genotyp AA ^{***})	174	53,37	58	58,0	

*) dane dotyczące rasy kaukaskiej z bazy National Center for Biotechnology Information (NCBI)

**) analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

**) mianownictwo dotyczące analizy pośredniej polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*, poprzez ocenę polimorfizmu –23HphIA>T

NS – wartości p>0,05 (nieistotne statystycznie)

Tabela 4.11. Ocena dystrybucji analizowanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej w odniesieniu do rasy kaukaskiej

częstość występowania odmian polimorficznych	grupa badana (n=147)		populacja kaukaska*) (n=100)		analiza porównawcza
	liczność	udział procentowy w populacji badanej (%)	liczność	udział procentowy w populacji kaukaskiej (%)	wartość p**)
polimorfizm c.49A>G genu <i>CTLA-4</i>					
częstość alleli					
A	153	52,04	122	61,0	0,003
G	141	47,96	78	39,0	
częstość genotypów					
AA	35	23,81	36	36,0	NS
AG	83	56,46	50	50,0	
GG	29	19,73	14	14,0	
polimorfizm c.1858T>C genu <i>PTPN22</i>					
częstość alleli					
C	226	76,87	176	88,0	<0,001
T	68	23,13	24	12,0	
częstość genotypów					
CC	91	61,91	77	77,0	0,008
TC	44	29,93	22	22,0	
TT	12	8,16	1	1,0	
polimorfizm 5'VNTR genu <i>INS</i> (analiza pośrednia poprzez ocenę polimorfizmu -23HphIA>T)					
częstość alleli					
klasa III (allel T ^{***})	49	16,67	48	24,0	0,029
klasa I (allel A ^{***})	245	83,33	152	76,0	
częstość genotypów					
klasa III/III (genotyp TT ^{***})	6	4,08	6	6,0	NS
klasa I/III (genotyp AT ^{***})	37	25,17	36	36,0	
klasa I/I (genotyp AA ^{***})	104	70,75	58	58,0	

*) dane dotyczące rasy kaukaskiej z bazy National Center for Biotechnology Information (NCBI)

**) analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

**) mianownictwo dotyczące analizy pośredniej polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*, poprzez ocenę polimorfizmu -23HphIA>T

NS – wartości p>0,05 (nieistotne statystycznie)

9. Ocena częstości występowania wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej z uwzględnieniem analizy demograficznej

9.1. Ocena dystrybucji wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej w zależności od płci pacjenta

Analiza częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS* w połączeniu z oceną płci nie wykazała znamienych różnic w dystrybucji genotypów pomiędzy chłopcami i dziewczętami w badanej grupie chorych (dokładny test Fishera, polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* p=0,77; polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* p=0,709; polimorfizm 5'VNTR genu *INS* p=0,428).

Nie stwierdzono również istotnych różnic w zależności od płci w częstości występowania genotypów stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM (dokładny test Fishera, *CTLA-4* c.49AA vs. *CTLA-4* c.49GG+aG p=0,794; *PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TT+ TC p=0,82; *INS* 5'VNTR klasa III/III vs. klasa I/I + I/III p=1,0), jak również stratyfikowanych względem dawki allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju choroby (dokładny test Fishera, *CTLA-4* c.49AG vs. *CTLA-4* c.49GG p=0,829; *PTPN22* c.1858TC vs. *PTPN22* c.1858TT p=0,756; *INS* 5'VNTR klasa I/III vs. klasa I/I p=0,931).

9.2. Ocena dystrybucji wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej w zależności od wieku pacjenta

Ocenę zależności pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów a wiekiem pacjentów przeprowadzono z uwzględnieniem podziału na cztery standardowe kategorie wiekowe (→ *Materiały i metody* pkt.2.1 str.36) oraz podziału na dwie grupy (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny; wiek szkolny + młodzieńczy), z uwagi na bimodalny rozkład wieku w badanej populacji.

Nie zaobserwowano znamienych różnic w rozkładzie częstości genotypów analizowanych polimorfizmów w standardowych grupach wiekowych (dokładny test Fishera, polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* p=0,813; polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* p=0,533; polimorfizm 5'VNTR genu *INS* p=0,721), jak również w dwóch grupach uwzględniających bimodalny rozkład wieku w grupie badanej (dokładny test Fishera, polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* p=0,892; polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* p=0,338; polimorfizm 5'VNTR genu *INS* p=0,133).

Nie wykazano istotnych różnic w zależności od wieku także w częstości występowania genotypów stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM (dokładny test Fishera, *CTLA-4* c.49AA vs. *CTLA-4* c.49GG+AG p=0,829, bimodalna analiza wieku p=0,777; *PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TT+ TC p=0,434, bimodalna analiza wieku p=0,936; *INS* 5'VNTR klasa III/III vs. klasa I/I + I/III p=0,399, bimodalna analiza wieku p=1,0).

Również w przypadku dystrybucji genotypów, stratyfikowanych względem dawki allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju choroby, nie stwierdzono istotnej zależności z wiekiem pacjentów (dokładny test Fishera, *CTLA-4* c.49AG vs. *CTLA-4* c.49GG p=0,553, bimodalna analiza wieku p=1,0; *PTPN22* c.1858TC vs. *PTPN22* c.1858TT p=0,61, bimodalna analiza wieku p=0,814; *INS* 5'VNTR klasa I/III vs. klasa I/I p=0,879, bimodalna analiza wieku p=0,829).

9.3. Ocena dystrybucji wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej w zależności od miejsca zamieszkania pacjenta

Na podstawie dokładnego testu Fishera nie wykazano znamienych różnic w częstości dystrybucji analizowanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej w zależności od powiatu województwa pomorskiego, w którym na stałe zamieszkiwali obserwowani chorzy.

10. Ocena dystrybucji wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej w zależności od rodzinnego wywiadu w kierunku cukrzycy

Analiza częstości występowania genotypów poszczególnych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w zależności od rodzinnego wywiadu w kierunku cukrzycy nie wyłoniła podgrupy pacjentów, w której typ choroby (T1DM/T2DM) obserwowany u krewnych chorego, powodował istotne różnice w dystrybucji genotypów ocenianych polimorfizmów (dokładny test Fishera; wywiad rodzinny w kierunku T1DM: polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* p=0,753, polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* p=1,0, polimorfizm 5'VNTR genu *INS* p=0,585; wywiad rodzinny w kierunku T2DM: polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* p=0,891, polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* p=0,572, polimorfizm 5'VNTR genu *INS* p=0,339; wywiad rodzinny w kierunku T1DM i T2DM: polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* p=0,789, polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* p=1,0, polimorfizm 5'VNTR genu *INS* p=0,154).

Ocena rozkładu genotypów, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, również nie wykazała znamienych różnic w zależności od rodzinnego wywiadu w kierunku cukrzycy u badanych chorych (dokładny test Fishera; wywiad rodzinny w kierunku T1DM: *CTLA-4* c.49AA vs. *CTLA-4* c.49GG+AG $p=0,867$, *PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TT+ TC $p=1,0$, *INS* 5'VNTR klasa III/III vs. klasa I/I + I/III $p=1,0$; wywiad rodzinny w kierunku T2DM: *CTLA-4* c.49AA vs. *CTLA-4* c.49GG+AG $p=0,772$, *PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TT+ TC $p=0,779$, *INS* 5'VNTR klasa III/III vs. klasa I/I + I/III $p=0,873$; wywiad rodzinny w kierunku T1DM i T2DM: *CTLA-4* c.49AA vs. *CTLA-4* c.49GG+AG $p=0,887$, *PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TC+TT $p=0,882$, *INS* 5'VNTR klasa III/III vs. klasa I/I + I/III $p=0,965$).

Istotnych zależności nie wykazano również pomiędzy dystrybucją genotypów, stratyfikowanych względem dawki allelu związanego z wysokim ryzykiem rozwoju choroby, a występowaniem określonego typu cukrzycy u krewnych obserwowanych pacjentów (dokładny test Fishera; wywiad rodzinny w kierunku T1DM: *CTLA-4* c.49AG vs. *CTLA-4* c.49GG $p=1,0$, *PTPN22* c.1858TC vs. *PTPN22* c.1858TT $p=1,0$, *INS* 5'VNTR klasa I/III vs. klasa I/I $p=0,913$; wywiad rodzinny w kierunku T2DM: *CTLA-4* c.49AG vs. *CTLA-4* c.49GG $p=1,0$, *PTPN22* c.1858TC vs. *PTPN22* c.1858TT $p=0,882$, *INS* 5'VNTR klasa I/III vs. klasa I/I $p=0,933$; wywiad rodzinny w kierunku T1DM i T2DM: *CTLA-4* c.49AG vs. *CTLA-4* c.49GG $p=1,0$, *PTPN22* c.1858TC vs. *PTPN22* c.1858TT $p=1,0$, *INS* 5'VNTR klasa I/III vs. klasa I/I $p=0,921$).

11. Ocena zależności pomiędzy dystrybucją wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

W badanej populacji nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy dystrybucją poszczególnych genotypów analizowanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM (dokładny test Fishera, polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* $p=0,145$; polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* $p=0,334$; polimorfizm 5'VNTR genu *INS* $p=0,554$).

Nie wykazano również znamienych różnic w rozkładzie genotypów, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w okresie ujawniania się choroby (dokładny test Fishera, *CTLA-4* c.49AA vs. *CTLA-4* c.49AG+GG $p=0,976$; *PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TC+ TT $p=0,944$; *INS* 5'VNTR klasa III/III vs. klasa I/III + I/I $p=0,942$).

Jednocześnie wśród badanych pacjentów nie obserwowano istotnego związku pomiędzy występowaniem określonego genotypu analizowanych polimorfizmów, a stopniem ciężkości DKA w momencie diagnozy (dokładny test Fishera, polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* $p=0,529$; polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* $p=0,317$; polimorfizm 5'VNTR genu *INS* $p=0,183$).

Ocena częstość współwystępowania genotypów polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, nie wykazała istotnej zależności pomiędzy rozwojem DKA na początku choroby a kumulacją genotypów o wysokim ryzyku rozwoju T1DM u pacjenta (dokładny test Fishera, współwystępowanie genotypów *CTLA-4* c.49GG, *PTPN22* c.1858TT, klasy I/I polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* vs. rozwój DKA: obecność jednego genotypu vs. dwóch genotypów u pacjenta $p=1,0$; obecność dwóch genotypów vs. trzech genotypów u pacjenta $p=1,0$).

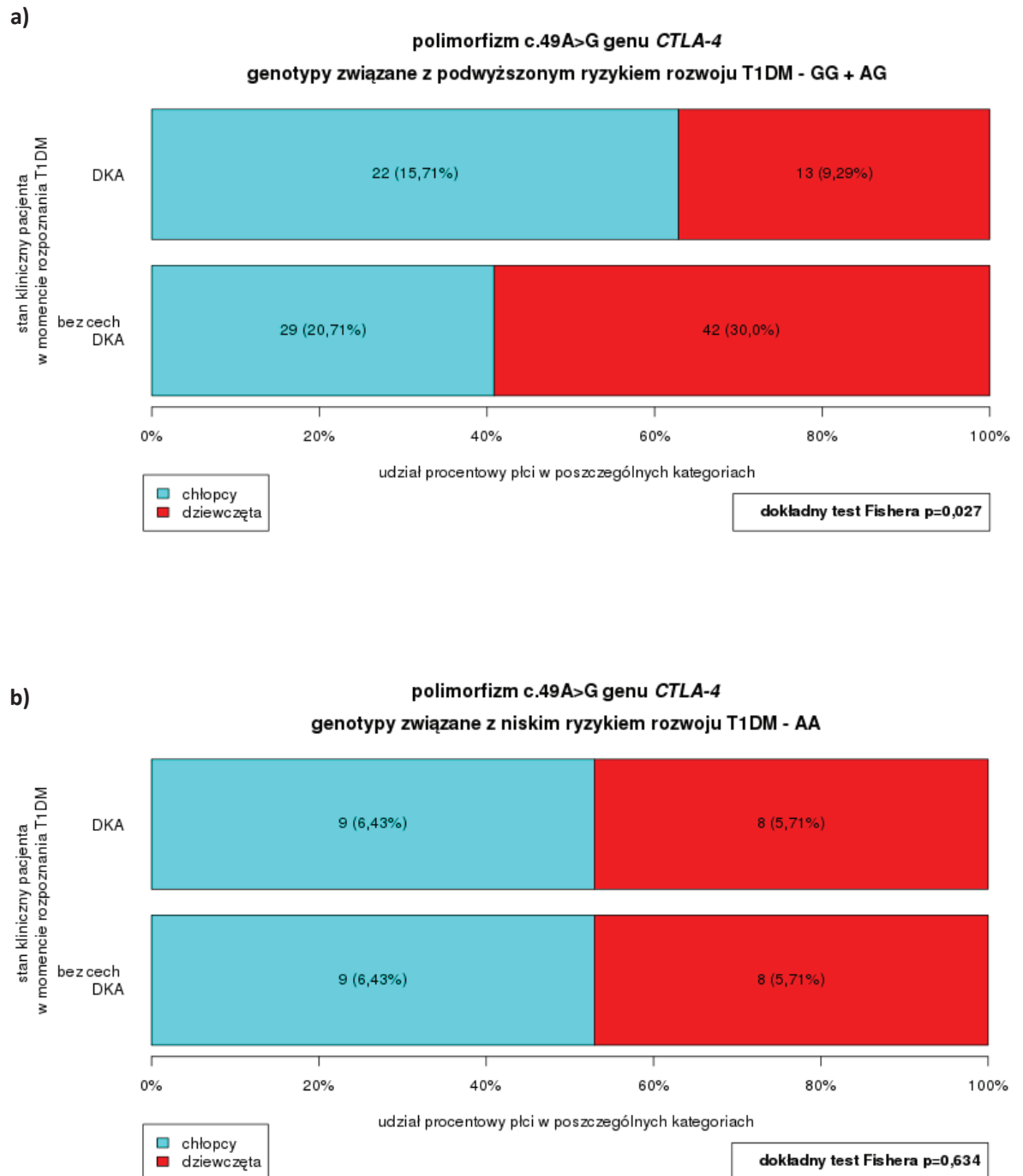
11.1. Płeć pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

W przypadku wszystkich analizowanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* stwierdzono znamienne modulujące oddziaływanie płci pacjenta na zależność pomiędzy rozkładem genotypów, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w okresie ujawniania się choroby.

W analizie dotyczącej polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, u dziewcząt posiadających jeden z genotypów związanych z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM (*CTLA-4* c.49GG lub *CTLA-4* c.49AG) wykazano znamienne mniejszą częstość występowania DKA w momencie rozpoznania choroby, niż wśród chłopców o podobnym układzie genetycznym w badanym miejscu polimorficznym (dokładny test Fishera, $p=0,027$) (ryc. 4.4a). Jednocześnie w grupie pacjentów o genotypie *CTLA-4* c.49AA (genotyp związany z niskim ryzykiem rozwoju T1DM) nie obserwowano różnic pomiędzy płciami w częstości rozwoju DKA na początku choroby (dokładny test Fishera $p=0,634$) (ryc. 4.4b).

Natomiast w przypadku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* płeć, jako czynnik modulujący, oddziaływała głównie w grupie pacjentów z genotypem związanym z niskim ryzykiem rozwoju T1DM (genotyp *PTPN22* c.1858CC) czyli odmiennie niż w analizie dotyczącej polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*. Wśród pacjentów o genotypie *PTPN22* c.1858CC, DKA w okresie ujawniania się choroby istotnie rzadziej obserwowano w podgrupie dziewcząt (dokładny test Fishera $p=0,008$) (ryc. 4.5a). Natomiast w grupie chorych posiadających jeden z genotypów związanych z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858TT lub *PTPN22* c.1858TC) różnice w częstości występowania DKA pomiędzy płciami pozostawały niezamienne (dokładny test Fishera $p=0,698$) (ryc. 4.5b).

Istotnie mniejszą częstość występowania DKA w momencie diagnozy T1DM u dziewcząt wykazano również przy porównaniu obu płci w grupie pacjentów posiadających jeden z genotypów predysponujących do rozwoju T1DM polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* (klasa I/I lub klasa I/III; polimorfizm markerowy -23HphIA>T genu *INS*: genotypy AA oraz AT) (dokładny test Fishera, $p=0,027$) (ryc. 4.6). Przeprowadzenie podobnej analizy w grupie chorych z genotypem klasy III/III badanego polimorfizmu (genotyp związany z niskim ryzykiem rozwoju T1DM; polimorfizm markerowy -23HphIA>T genu *INS*: genotyp TT) nie było możliwe, ze względu na występowanie tego układu genowego tylko u 6 osób w badanej populacji (1 osoba z DKA vs. 5 osób bez stwierdzonej DKA w momencie rozpoznania T1DM).

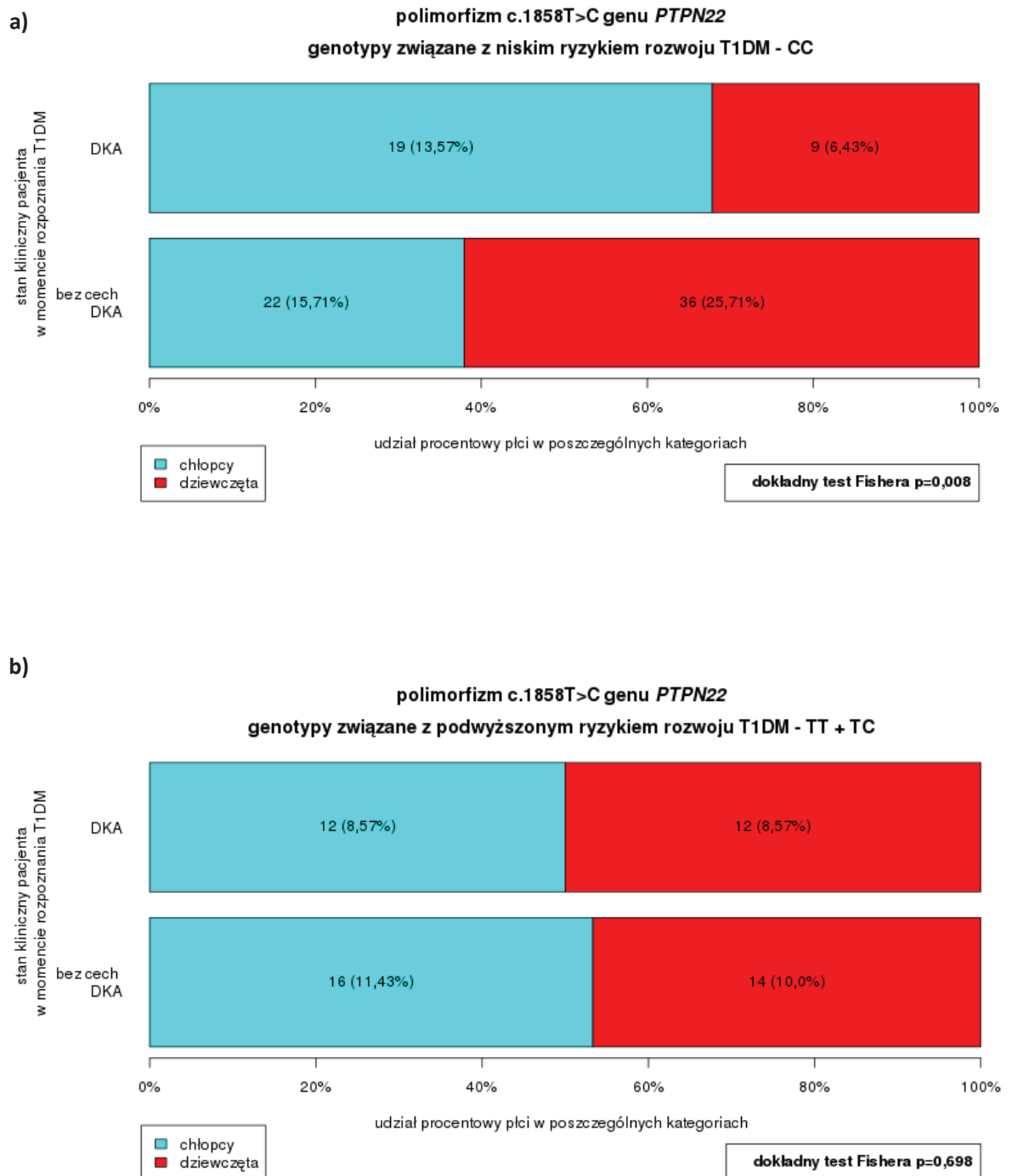


Rycina 4.4. Płeć pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

Dane liczbowe na słupkach wykresów:

n (%) – liczba pacjentów w danej kategorii (udział procentowy pacjentów danej kategorii w całej populacji badanej)

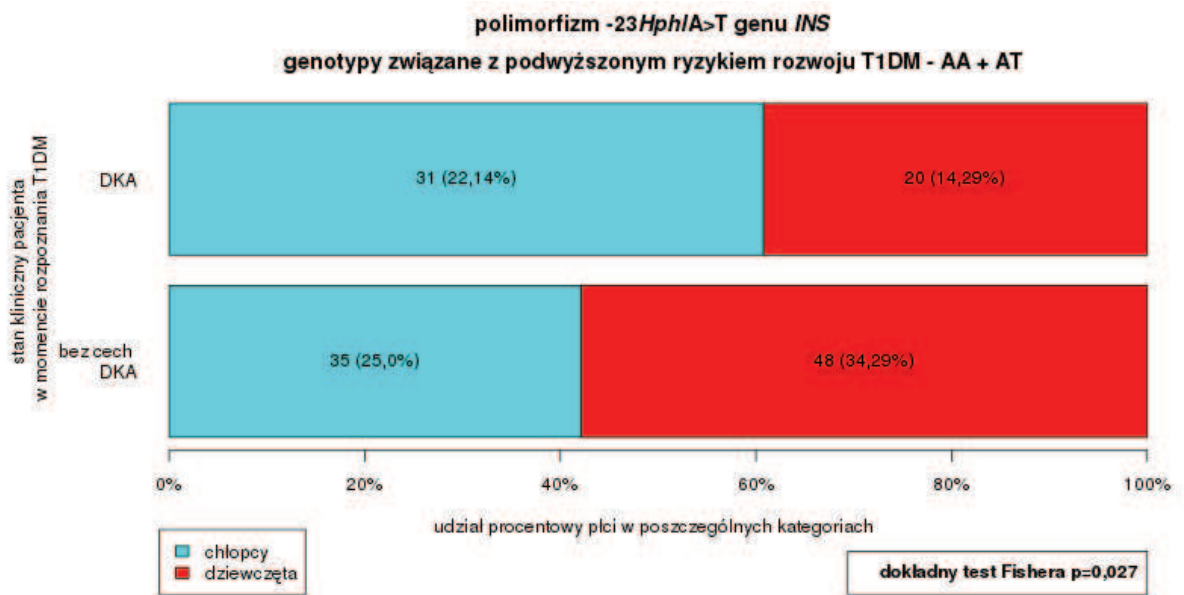


Rycina 4.5. Płeć pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

Dane liczbowe na słupkach wykresów:

n (%) – liczba pacjentów w danej kategorii (udział procentowy pacjentów danej kategorii w całej populacji badanej)



Rycina 4.6. Płeć pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu -23HphIA>T genu INS (markera polimorfizmu 5'VNTR genu INS) w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

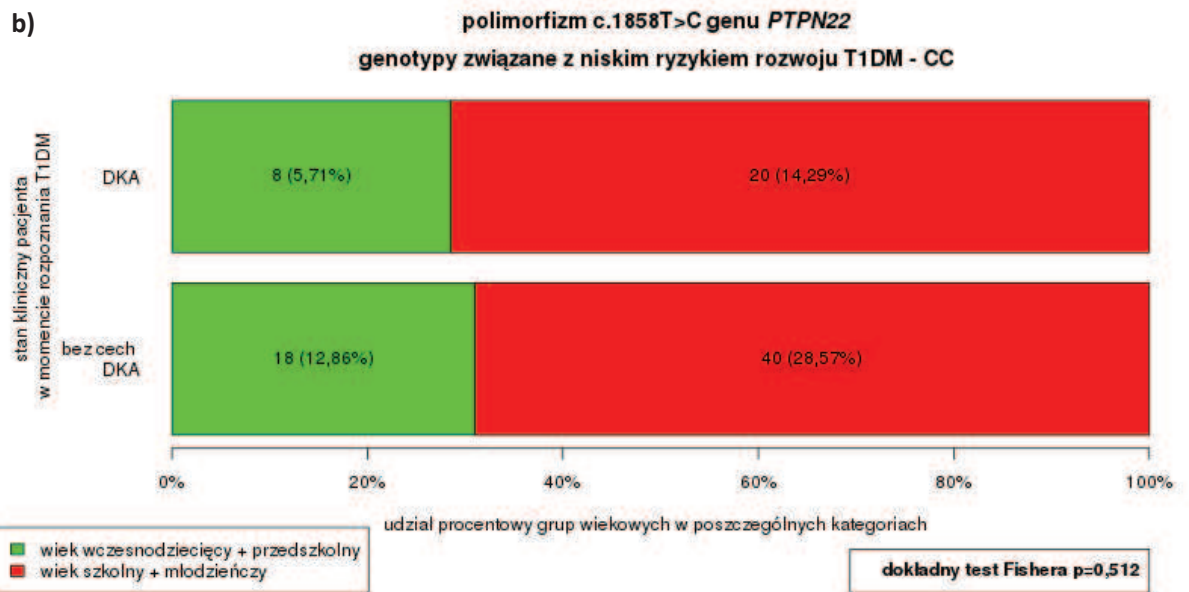
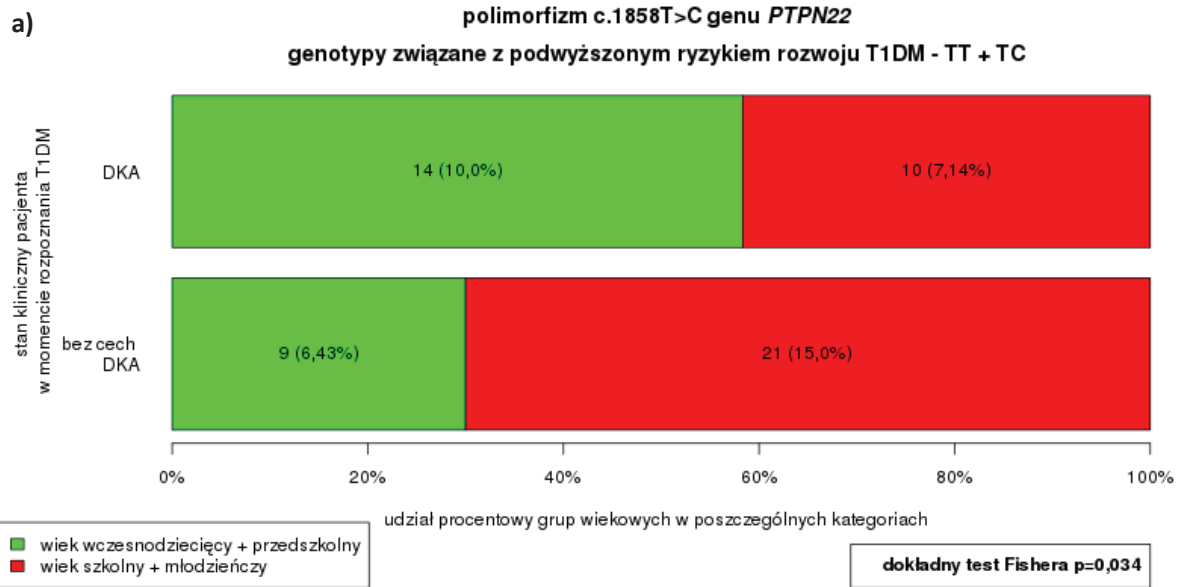
Dane liczbowe na słupkach wykresów:

n (%) – liczba pacjentów w danej kategorii (udział procentowy pacjentów danej kategorii w całej populacji badanej)

11.2. Wiek pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

Podczas analizy wszystkich badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* jedynie w przypadku polimorfizmu c.1858>T genu *PTPN22* wykazano znamienne modulujące oddziaływanie wieku pacjenta na zależność pomiędzy rozkładem genotypów, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w okresie ujawniania się choroby.

Na podstawie powyższej analizy stwierdzono istotnie mniejszą częstość występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM u pacjentów w starszej grupie wiekowej (wiek szkolny + młodzieńczy), posiadających jeden z genotypów związanych z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858TT lub *PTPN22* c.1858TC) w porównaniu z chorymi o podobnym układzie genetycznym w badanym miejscu polimorficznym należącymi do młodszej kategorii wiekowej (wiek wczesnodziecięcy + wiek przedszkolny) (dokładny test Fishera, $p=0,034$) (ryc. 4.7a). Natomiast wśród pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC (genotyp związany z niskim ryzykiem rozwoju T1DM) różnice w częstości występowania DKA pomiędzy młodszą i starszą grupą wiekową pozostawały nieznamienne (dokładny test Fishera $p=0,512$) (ryc. 4.7b).



Rycina 4.7. Wiek pacjenta jako moderator zależności pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w populacji badanej a rozwojem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

Dane liczbowe na słupkach wykresów:

n (%) – liczba pacjentów w danej kategorii (udział procentowy pacjentów danej kategorii w całej populacji badanej)

12. Ocena aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM

Analizę aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w okresie ujawniania się T1DM przeprowadzono stosując podział na kategorie uwzględniające ocenę jakościową miana swoistych autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) oraz autoprzeciwciał przeciwiinsulinowych (IAA).

W momencie rozpoznania T1DM w grupie badanych pacjentów dominowała humoralna odpowiedź autoimmunologiczna skierowana przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (autoprzeciwciała GAD) – 135 chorych (91,84%; miano autoprzeciwciał GAD mediana 129,31 U/ml). Natomiast izolowane występowanie autoprzeciwciał przeciwiinsulinowych (IAA) wykazano tylko u 5 pacjentów (10,64%; miano autoprzeciwciał IAA mediana 4,39 U/ml). U 42 chorych z dodatnim mianem autoprzeciwciał GAD (31,11%) stwierdzono współwystępowanie dodatniego miana autoprzeciwciał IAA (miano autoprzeciwciał IAA mediana 3,83 U/ml). Jednocześnie nie obserwowano znamienych różnic w rozkładzie miana autoprzeciwciał GAD w zależności od współistnienia odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciwko natywnej insulinie (test Wilcoxon, $p=0,378$; miano autoprzeciwciał GAD mediana: grupa chorych z ujemnym mianem autoprzeciwciał IAA vs. z dodatnim mianem autoprzeciwciał IAA 126,16 U/ml vs. 140,41 U/ml). Analogicznie, nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie miana autoprzeciwciał IAA w zależności od jakościowej oceny odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciwko głównemu antygenowi komórek β trzustki – dekarboksylazie kwasu glutaminowego GAD (test Wilcoxon, $p=0,288$).

Jednocześnie do grupy badanej zakwalifikowano 7 chorych (4,76%) z izolowaną odpowiedzią autoimmunologiczną w kierunku antygenów komórek wysp trzustki (ICA), przy ujemnym mianie autoprzeciwciał GAD oraz IAA (miano autoprzeciwciał ICA mediana 1:40).

W dalszym przebiegu rocznej obserwacji pacjentów nie wykazano znamienych różnic w ilościowej ocenie miana autoprzeciwciał GAD (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,342$; 6 vs. 12 miesięcy $p=0,233$)

Natomiast w przypadku autoimmunologicznej odpowiedzi skierowanej przeciw natywnej insulinie stwierdzono istotny wzrost miana autoprzeciwciał w 6 miesiącu trwania T1DM (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p<0,001$), ze stabilizacją ich poziomu do zakończenia rocznej obserwacji (test Wilcoxon, miesiąc choroby 6 vs. 12 $p=0,261$; miano autoprzeciwciał IAA: 6 miesiąc choroby mediana 6,08 U/ml; 12 miesiąc mediana 4,94 U/ml).

12.1. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM a płcią pacjenta

W momencie rozpoznania T1DM znamienne wyższe miano autoprzeciwciał GAD obserwowano u dziewcząt (test Wilcoxon, $p=0,008$; miano autoprzeciwciał GAD: chłopcy mediana 54,12 U/ml; dziewczęta mediana 157,31 U/ml).

W przypadku każdej z płci stwierdzano nieznamienne obniżenie się miana autoprzeciwciał GAD w kolejnych miesiącach trwania T1DM (test Wilcoxon; chłopcy: miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,453$, 6 vs. 12 $p=0,179$, 0 vs. 12 $p=0,177$; dziewczęta: miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,319$, 6 vs. 12 $p=0,419$, 0 vs. 12 $p=0,216$), przy czym w 12 miesiącu obserwacji nadal występowała istotna różnica pomiędzy dziewczętami i chłopcami, z tendencją do wyższych wartości miana GAD u dziewcząt (test Wilcoxon, $p=0,015$; miano autoprzeciwciał GAD: chłopcy mediana 44,75 U/ml; dziewczęta: mediana 123,36 U/ml).

W analizie dotyczącej miana autoprzeciwciał IAA nie wykazano znamienych różnic pomiędzy płciami na początku choroby (test Wilcoxon, $p=0,323$; miano autoprzeciwciał IAA: chłopcy mediana 1,11 U/ml; dziewczęta mediana 1,33 U/ml), jak również w kolejnych miesiącach rocznej obserwacji (test Wilcoxon; 6 miesiąc choroby $p=0,447$, 12 miesiąc choroby $p=0,07$). Jednocześnie podczas analizy dynamiki zmian miana autoprzeciwciał IAA u chłopców, podobnie jak u dziewcząt, dochodziło do istotnego wzrostu ich

miana w 6 miesiącu trwania T1DM (test Wilcoxon, $p < 0,001$; miano autoprzeciwciał IAA: chłopcy mediana 6,96 U/ml; dziewczęta mediana 5,11 U/ml), z następującym w 12 miesiącu choroby nieznamiennym obniżeniem się aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (test Wilcoxon, chłopcy $p = 0,43$; dziewczęta $p = 0,142$)

12.2. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM a wiekiem pacjenta

W momencie rozpoznania T1DM nie stwierdzano istotnych różnic w wartości miana autoprzeciwciał GAD w zależności od wieku (test Wilcoxon, $p = 0,065$; miano autoprzeciwciał GAD: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny mediana 107,95 U/ml; wiek szkolny + młodzieńczy mediana 112,96 U/ml).

W każdej z podgrup wiekowych w dalszym przebiegu rocznej obserwacji wykazano stopniowe oraz nieznamienne obniżanie się miana autoprzeciwciał GAD (test Wilcoxon; wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: miesiąc choroby 0 vs. 6 $p = 0,204$, 6 vs. 12 $p = 0,249$, 0 vs. 12 $p = 0,073$; wiek szkolny + młodzieńczy: miesiąc choroby 0 vs. 6 $p = 0,423$, 6 vs. 12 $p = 0,338$, 0 vs. 12 $p = 0,398$), przy jednocześnie utrzymujących się istotnie wyższych wartościach miana autoprzeciwciał GAD w starszej grupie wiekowej (test Wilcoxon, 6 miesiąc choroby $p = 0,006$; 12 miesiąc choroby $p = 0,002$; miano autoprzeciwciał GAD 12 miesiąc choroby: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny mediana 20,8 U/ml; wiek szkolny + młodzieńczy mediana 89,35 U/ml).

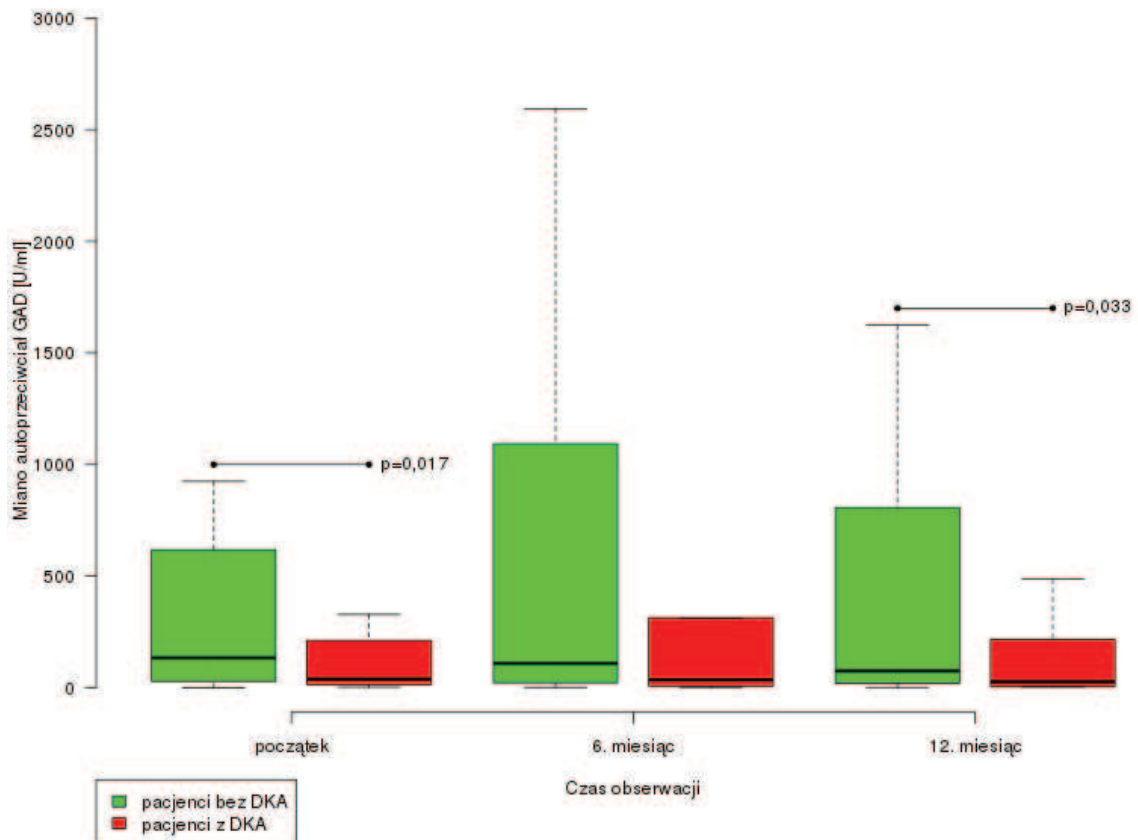
W przypadku miana autoprzeciwciał IAA nie stwierdzano istotnych różnic w jego wartości w zależności od wieku na początku choroby (test Wilcoxon, początek choroby $p = 0,186$; miano autoprzeciwciał IAA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny mediana 0,96 U/ml; wiek szkolny + młodzieńczy mediana 1,2 U/ml), jak również w kolejnych miesiącach trwania T1DM (6 miesiąc choroby $p = 0,305$, 12 miesiąc choroby $p = 0,304$). Natomiast w przypadku każdej z grup wiekowych, ocenianych pojedynczo, obserwowano znamienny wzrost miana autoprzeciwciał IAA w 6 miesiącu trwania choroby (test Wilcoxon, $p < 0,001$ dla każdej z ocenianych grup wiekowych; miano autoprzeciwciał IAA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny mediana 6,08 U/ml; wiek szkolny + młodzieńczy mediana 6,12 U/ml), po czym w 12 miesiącu trwania T1DM dochodziło do nieistotnego spadku aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (test Wilcoxon, wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny $p = 0,289$; wiek szkolny + młodzieńczy $p = 0,35$).

12.3. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

Nie stwierdzono znamiennej zależności pomiędzy występowaniem dodatniego miana jednego ze swoistych autoprzeciwciał GAD lub IAA a rozwojem DKA w momencie ujawniania się T1DM (dokładny test Fishera: dodatnie miano autoprzeciwciał GAD vs. rozwój DKA $p = 0,898$; dodatnie miano autoprzeciwciał IAA vs. rozwój DKA $p = 0,727$). Nie wykazano również zwiększonego ryzyka rozwoju DKA u pacjentów z dodatnim mianem obu swoistych autoprzeciwciał (GAD oraz IAA) w odniesieniu do chorych z dodatnim mianem jednego z autoprzeciwciał (GAD lub IAA) (dokładny test Fishera: dodatnie miano autoprzeciwciał GAD vs. rozwój DKA vs. miano autoprzeciwciał IAA dodatnie/ujemne $p = 1,0$; dodatnie miano autoprzeciwciał IAA vs. rozwój DKA vs. miano autoprzeciwciał GAD dodatnie/ujemne $p = 0,84$). W przypadku współwystępowania obu typów odpowiedzi autoimmunologicznej (GAD oraz IAA) nie stwierdzono istotnego modulującego wpływu dodatniego miana autoprzeciwciał jednego rodzaju na ocenę ilościową poziomu drugiego z autoprzeciwciał obecnych u pacjenta (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

Analiza ilościowa miana autoprzeciwciał GAD w grupie badanej w momencie rozpoznania T1DM uwidoczniła znamienne niższe miano u chorych ze stwierdzoną DKA w odniesieniu do pacjentów bez cech

DKA w momencie diagnozy (test Wilcoxon, $p=0,017$; miano auto przeciwciał GAD: grupa bez DKA mediana 134,33 U/ml vs. grupa z DKA mediana 39,27 U/ml). W 6 miesiącu obserwacji powyższa różnica pozostawała na granicy istotności (test Wilcoxon, $p=0,051$; miano auto przeciwciał GAD: grupa bez DKA mediana 109,1 U/ml vs. grupa z DKA mediana 35,54 U/ml), a po 12 miesiącach była ponownie znamienne (test Wilcoxon, $p=0,033$; miano auto przeciwciał GAD: grupa bez DKA mediana 73,39 U/ml vs. grupa z DKA mediana 27,09 U/ml). Przy ocenie każdej z powyższych podgrup pojedynczo, nie wykazano istotnych zmian w dynamice miana auto przeciwciał GAD w pierwszym roku choroby (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon). (ryc. 4.8)



Rycina 4.8. Ocena zależności pomiędzy dynamiką zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej u chorego w momencie rozpoznania choroby

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

auto przeciwciała GAD – auto przeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego w klasie IgG

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

W dalszej analizie, zawężonej do grupy chorych ze stwierdzoną DKA w momencie rozpoznania T1DM, nie obserwowano istotnych różnic w ocenie ilościowej miana auto przeciwciał GAD w kolejnych miesiącach obserwacji pacjentów, w zależności od stopnia ciężkości DKA (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

Natomiast w analizie ilościowej miana auto przeciwciał IAA na początku choroby nie wykazano znamienych różnic pomiędzy grupą chorych z rozpoznaną DKA a pacjentami bez DKA w momencie diagnozy (test Wilcoxon, $p=0,07$; miano auto przeciwciał IAA: grupa bez DKA mediana 1,36 U/ml vs. grupa z DKA mediana 0,9 U/ml). Powyższa zależność nie ulegała istotnej modyfikacji przez cały okres rocznej

obserwacji (test Wilcozona, 6 miesiąc choroby $p=0,066$; 12 miesiąc choroby $p=0,378$). Jednocześnie w każdej z analizowanych grup, ocenianej pojedynczo, stwierdzano znamiennej wzrost miana autooprzeciwciał IAA w 6 miesiącu trwania T1DM (test Wilcozona, $p<0,001$ dla każdej z analizowanych grup; miano autooprzeciwciał IAA: grupa bez DKA mediana 4,68 u/ml vs. grupa z DKA mediana 8,62 U/ml), z następującą stabilizacją jego poziomu w 12 miesiącu obserwacji (test Wilcozona, grupa bez DKA $p=0,489$; grupa z DKA $p=0,144$).

W analizie, zawężonej do grupy chorych z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM, nie stwierdzono, podobnie jak w przypadku odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD, znamiennych różnic w ocenie ilościowej miana autooprzeciwciał IAA w kolejnych miesiącach obserwacji chorych, w zależności od stopnia ciężkości DKA (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona).

W grupie z izolowaną odpowiedzią przeciw antygenom wysp trzustki (ICA), przy ujemnym mianie autooprzeciwciał GAD oraz IAA, DKA obserwowano u 4 pacjentów (57,14% pacjentów z izolowaną odpowiedzią przeciw ICA).

12.4. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z płcią pacjenta

W momencie rozpoznania T1DM oraz w 12 miesiącu obserwacji stwierdzano znamienne różnice w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD pomiędzy płciami w grupie pacjentów, u których nie rozpoznano DKA na początku choroby (test Wilcozona, początek choroby $p=0,008$; miano autooprzeciwciał GAD: chłopcy mediana 66,88 U/ml vs. dziewczęta mediana 331,77 U/ml; 12 miesiąc choroby $p=0,003$; miano autooprzeciwciał GAD: chłopcy mediana 53,43 U/ml vs. dziewczęta mediana 161,4 U/ml). Jednocześnie najwyższe miano autooprzeciwciał GAD wykazano w grupie dziewcząt bez stwierdzonej DKA w okresie ujawniania się T1DM i pozostawało ono istotnie wyższe w porównaniu do poziomu autooprzeciwciał GAD obserwowanych u chłopców z DKA zarówno na początku choroby, jak i w kolejnych miesiącach trwania T1DM (test Wilcozona; początek choroby $p<0,001$; 6 miesiąc choroby $p=0,023$; 12 miesiąc choroby $p=0,003$; miano autooprzeciwciał GAD – chłopcy z DKA: początek choroby mediana 25,7 U/ml; 6 miesiąc choroby mediana 26,2 U/ml; 12 miesiąc choroby mediana 19,13 U/ml). Pod koniec rocznej obserwacji w grupie dziewcząt z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się choroby stwierdzano znamienne niższe miano autooprzeciwciał GAD względem poziomów wykazanych wśród dziewcząt bez cech DKA w momencie diagnozy T1DM (test Wilcozona, $p=0,046$; miano autooprzeciwciał GAD – dziewczęta z DKA mediana 68,48 U/ml).

Obserwowane zmiany w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD pomiędzy ocenianymi podgrupami pacjentów w znacznym stopniu korespondowały również z wykazanim zróżnicowaniem dynamiki zaniku resztkowej insulinosekrecji w powyższych podgrupach.

Jednocześnie dynamika zmian miana autooprzeciwciał GAD stwierdzana w obrębie każdej z analizowanych podgrup w pierwszym roku trwania T1DM nie wykazywała cech istotności (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona).

Podczas rocznej obserwacji chorych nie stwierdzono potencjalnie modulującego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z płcią pacjenta, na dynamikę odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (analizy statystyczne w oparciu o test Wilcozona).

12.5. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a występowaniem zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z wiekiem pacjenta

Ocena dynamiki zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD wykazała szczególnie niskie poziomy tych autooprzeciwciał podczas całej rocznej obserwacji w młodszej grupie wiekowej z rozpozną DKA na początku choroby (miano autooprzeciwciał GAD mediana: początek choroby 25,99 U/ml, 6 miesiąc choroby 15,2 U/ml, 12 miesiąc choroby 6,2 U/ml). W tej podgrupie pacjentów zmiany w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD korespondowały z obserwowanym szybkim zanikiem funkcji resztkowej komórek β trzustki (\rightarrow Wyniki pkt.13.1.7 str.124). W powyższej podgrupie przez cały pierwszy rok trwania T1DM stwierdzano istotnie niższe miana autooprzeciwciał GAD w odniesieniu do grupy pacjentów bez cech DKA w okresie ujawniania się T1DM, niezależnie od kategorii wiekowej (test Wilcoxona, wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny z DKA vs. bez DKA: początek choroby $p=0,023$; 6 miesiąc choroby $p=0,019$; 12 miesiąc choroby $p=0,004$; wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny z DKA vs. wiek szkolny + młodzieńczy bez DKA: początek choroby $p=0,008$; 6 miesiąc choroby $p=0,002$; 12 miesiąc choroby $p<0,001$), a od 6 miesiąca obserwacji również względem grupy chorych z rozpozną DKA i należących do starszej kategorii wiekowej (test Wilcoxona, 6 miesiąc choroby $p=0,005$; 12 miesiąc choroby $p<0,001$).

Jednocześnie podczas oceny dynamiki zmian miana autooprzeciwciał GAD w pierwszym roku trwania T1DM nie wykazano znamienych różnic w obrębie każdej z analizowanych grup (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxona).

Zmiany w dynamice aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (IAA) w zależności od występowania DKA, w powiązaniu z wiekiem pacjenta, w znacznym stopniu były zbliżone do specyfiki zmian obserwowanych w mianie autooprzeciwciał GAD. Do 6 miesiąca choroby stwierdzano istotnie niższe miana autooprzeciwciał IAA w młodszej grupie wiekowej z rozpozną DKA w okresie ujawniania się T1DM w porównaniu do starszej kategorii wiekowej bez cech DKA (test Wilcoxona, początek choroby $p=0,049$; 6 miesiąc choroby $p=0,004$). Jednocześnie w 6 miesiącu obserwacji miano autooprzeciwciał IAA w młodszej grupie wiekowej z rozpozną DKA na początku choroby pozostawało znamienne niższe od miana występującego w tej samej kategorii wiekowej, ale z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA (test Wilcoxona, $p=0,003$; miano autooprzeciwciał IAA – wiek wczesnodziecięcy i przedszkolny: z DKA mediana 15,2 U/ml vs. bez DKA 78,35 U/ml) oraz od miana stwierdzanego w starszej grupie wiekowej z wykazaną DKA w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxona, $p=0,041$, miano autooprzeciwciał IAA wiek szkolny + młodzieńczy mediana 86,3 U/ml).

Jednocześnie podczas oceny dynamiki zmian miana autooprzeciwciał IAA w pierwszym roku trwania T1DM w obrębie każdej z analizowanych podgrup obserwowano typowy znamieny wzrost poziomu autooprzeciwciał w 6 miesiącu choroby, z następującą stabilizacją aktywności w 12 miesiącu (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxona).

12.6. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM

W momencie rozpoznania T1DM nie wykazano znamienych różnic w ocenie ilościowej miana autooprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) w powiązaniu z poszczególnymi genotypami polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test rozwoju T1DM (genotyp związany niskim ryzykiem rozwoju T1DM – AA; genotypy związane z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM – GG + AG) (test Wilcoxona $p=0,066$; miano autooprzeciwciał GAD: genotyp *CTLA-4* c.49AA mediana 66,36 U/ml; genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 115,05 U/ml).

Następnie w ciągu rocznej obserwacji stwierdzano stopniowe obniżanie się miana autooprzeciwciał GAD, niewykazujące cech znamienności w zależności od genotypu analizowanego polimorfizmu (analiza

statystyczna przeprowadzona w oparciu o test Wilcozona). Jednocześnie w 6 miesiącu trwania choroby wśród osób posiadających genotypy *CTLA-4* c.49GG oraz *CTLA-4* c.49AG obserwowano występowanie istotnie wyższego miana autooprzeciwciał GAD w odniesieniu do pacjentów będących homozygotami AA badanego polimorfizmu (test Wilcozona $p=0,025$; miano autooprzeciwciał GAD: genotyp *CTLA-4* c.49AA mediana 58,68 U/ml; genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 100,6 U/ml). Powyższa zależność była warunkowana głównie znamioną różnicą w mianie autooprzeciwciał GAD pomiędzy grupą chorych z genotypem *CTLA-4* c.49AG i genotypem *CTLA-4* c.49AA (test Wilcozona, $p=0,019$). Po 12 miesiącach trwania choroby miano autooprzeciwciał GAD w ocenianych podgrupach było porównywalne (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona; dla analizy uwzględniającej stratyfikację genotypów $p=0,078$; miano autooprzeciwciał GAD: genotyp *CTLA-4* c.49AA mediana 53,91 U/ml; genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 60,83 U/ml).

W przypadku humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (IAA) niezależnie od genotypu polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* obserwowano znamionny wzrost miana autooprzeciwciał w 6 miesiącu trwania T1DM w odniesieniu do wartości stężeń odnotowywanych na początku choroby, z późniejszą stabilizacją poziomu autooprzeciwciał w 12 miesiącu choroby (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona). Jednocześnie ani w momencie rozpoznania T1DM, ani podczas rocznej obserwacji nie wykazano istotnych różnic w mianie autooprzeciwciał IAA w zależności od genotypu analizowanego polimorfizmu, także po uwzględnieniu stratyfikacji genotypów co do ryzyka rozwoju choroby (analiza statystyczna przeprowadzona w oparciu o test Wilcozona).

12.6.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM, z uwzględnieniem płci i wieku pacjenta

Nie wykazano istotnego modulującego oddziaływania polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, w powiązaniu z płcią chorego, na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona). Natomiast w przypadku zmian aktywności autooprzeciwciał IAA stwierdzono występowanie szczególnie wysokich mian analizowanych autooprzeciwciał wśród chłopców posiadających genotyp *CTLA-4* c.49AA od 6 miesiąca trwania choroby (miano autooprzeciwciał IAA mediana: początek choroby 1,15 U/ml; 6 miesiąc choroby 9,6 U/ml; 12 miesiąc choroby 7,74 U/ml). Jednocześnie w 6 miesiącu trwania T1DM w tej grupie chorych wykazane poziomy autooprzeciwciał IAA pozostawały istotnie wyższe od mian obserwowanych u chłopców o genotypach *CTLA-4* c.49GG oraz *CTLA-4* c.49AG (test Wilcozona, $p=0,015$; miano autooprzeciwciał IAA – chłopcy o genotypach *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 4,71 U/ml), jak również u dziewcząt o genotypie *CTLA-4* c.49AA (test Wilcozona, $p=0,016$; miano autooprzeciwciał IAA – dziewczęta o genotypie *CTLA-4* c.49AA mediana 4,52 U/ml).

W badanej populacji nie stwierdzono znamionnego modulującego oddziaływania analizowanego polimorfizmu, w powiązaniu z wiekiem pacjenta, na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD oraz IAA w pierwszym roku trwania T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona).

12.6.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby, z uwzględnieniem występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM

Od momentu rozpoznania T1DM do zakończenia rocznej obserwacji, w grupie pacjentów bez rozpoznanej DKA na początku choroby stwierdzano znamionnie wyższe miano autooprzeciwciał GAD u osób posiadających genotypy *CTLA-4* c.49GG oraz *CTLA-4* c.49AG (test Wilcozona, początek choroby $p=0,003$, miano autooprzeciwciał GAD: *CTLA-4* c.49AA mediana 42,2 U/ml, *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 196,46 U/ml;

6 miesiąc choroby $p=0,004$, miano autoprzeciwciał GAD: *CTLA-4* c.49AA mediana 50,86 U/ml, *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 135,13 U/ml; 12 miesiąc choroby $p=0,017$, miano autoprzeciwciał GAD: *CTLA-4* c.49AA mediana 53,43 U/ml, *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 126,34 U/ml). Jednocześnie były to najwyższe wartości miana autoprzeciwciał GAD obserwowane w odniesieniu do innych analizowanych grup. Powyższe różnice korespondowały z istotnymi różnicami w poziomach wydzielania C-peptydu w grupie chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA w zależności od genotypu badanego polimorfizmu (→ Wyniki pkt.13.5.1.2 str.132).

Jednocześnie wśród chorych z grupy podwyższonego ryzyka genetycznego rozwoju T1DM (genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG), miana autoprzeciwciał GAD obserwowane u pacjentów bez cech kwasicy na początku choroby pozostawały znamienne wyższe niż w grupie chorych z rozpoznaną DKA (test Wilcoxon, $p<0,001$; miano autoprzeciwciał GAD: grupa z DKA mediana 29,34 U/ml). Powyższa istotna zależność utrzymywała się przez cały pierwszy rok trwania T1DM (test Wilcoxon, 6 miesiąc choroby $p=0,01$; 12 miesiąc choroby $p=0,009$). Wśród pacjentów będących homozygotami *CTLA-4* c.49AA nie wykazano istotnych różnic w mianie autoprzeciwciał GAD w zależności od występowania DKA w okresie ujawniania się T1DM (test Wilcoxon, początek choroby $p=0,096$; 6 miesiąc choroby $p=0,138$; 12 miesiąc choroby $p=0,291$).

W przypadku dynamiki zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw IAA nie wykazano istotnego modulującego oddziaływania polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, w powiązaniu z występowaniem DKA w momencie rozpoznania T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

12.6.3. Aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/

W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem płci na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (→ Wyniki pkt. 11.1 str.93), przeprowadzono analizę potencjalnego oddziaływania powyższego modelu strukturalnego na aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM.

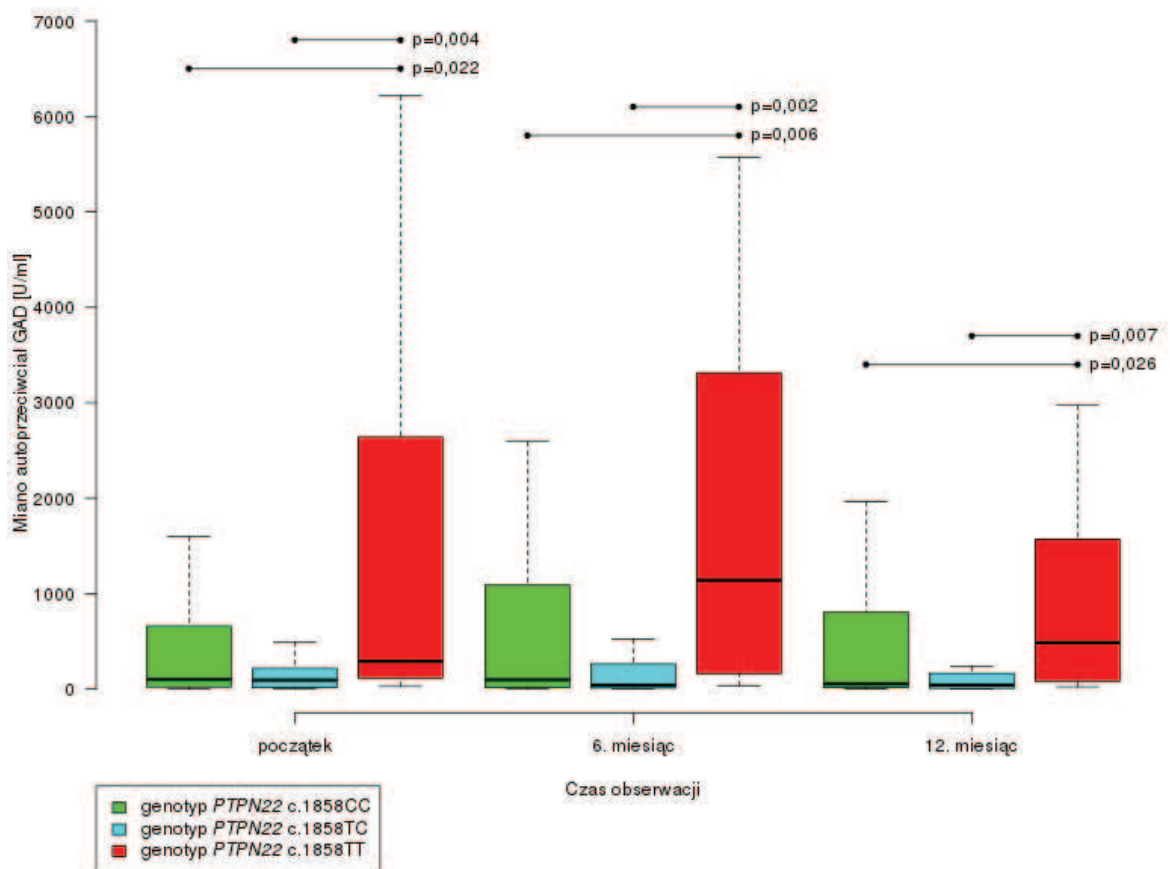
Powyższa ocena nie potwierdziła istotnego modulującego oddziaływania badanego modelu strukturalnego na aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD, jak i przeciw IAA w pierwszym roku trwania T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

12.7. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM

Od momentu zachorowania, przez cały okres rocznej obserwacji w grupie pacjentów będących homozygotami TT polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* stwierdzano znamienne wyższe miana autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) w porównaniu do homozygot CC oraz heterozygot TC badanego polimorfizmu (test Wilcoxon, genotyp *PTPN22* c.1858TT vs. *PTPN22* c.1858CC: początek choroby $p=0,022$, 6 miesiąc choroby $p=0,006$, 12 miesiąc choroby $p=0,026$; genotyp *PTPN22* c.1858TT vs. *PTPN22* c.1858TC: początek choroby $p=0,004$, 6 miesiąc choroby $p=0,002$, 12 miesiąc choroby $p=0,007$) (ryc.4.9).

W przypadku każdego genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* stwierdzano odmienną dynamikę aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w pierwszym roku trwania T1DM, przy czym obserwowane zmiany w mianie autoprzeciwciał w poszczególnych podgrupach chorych nie wykazywały cech istotności (analiza statystyczna

przeprowadzona w oparciu o test Wilcoxona). Wśród pacjentów będących homozygotami CC badanego polimorfizmu miano auto przeciwciał GAD na początku choroby i w 6 miesiącu było porównywalne i dopiero w 12 miesiącu dochodziło do obniżenia się jego wartości (miano auto przeciwciał GAD mediana: początek choroby 99,78 U/ml, 6 miesiąc choroby 97,34 U/ml, 12 miesiąc choroby 54,05 U/ml). W przypadku heterozygot TC obniżenie poziomu auto przeciwciał GAD obserwowano już w 6 miesiącu trwania choroby, po czym następowała stabilizacja odnotowywanych wartości miana auto przeciwciał (miano auto przeciwciał GAD mediana: początek choroby 94,3 U/ml, 6 miesiąc choroby 41,3 U/ml, 12 miesiąc choroby 42,9 U/ml). Natomiast u pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858TT, po znacznym wzroście miana auto przeciwciał GAD w 6 miesiącu obserwacji, po roku trwania choroby dochodziło do gwałtownego spadku wartości miana auto przeciwciał, do poziomu zbliżonego do wartości odnotowanych w tej grupie w momencie rozpoznania T1DM (miano auto przeciwciał GAD mediana: początek choroby 290,28 U/ml, 6 miesiąc choroby 1139,9 U/ml, 12 miesiąc choroby 486,86 U/ml). (ryc.4.9)



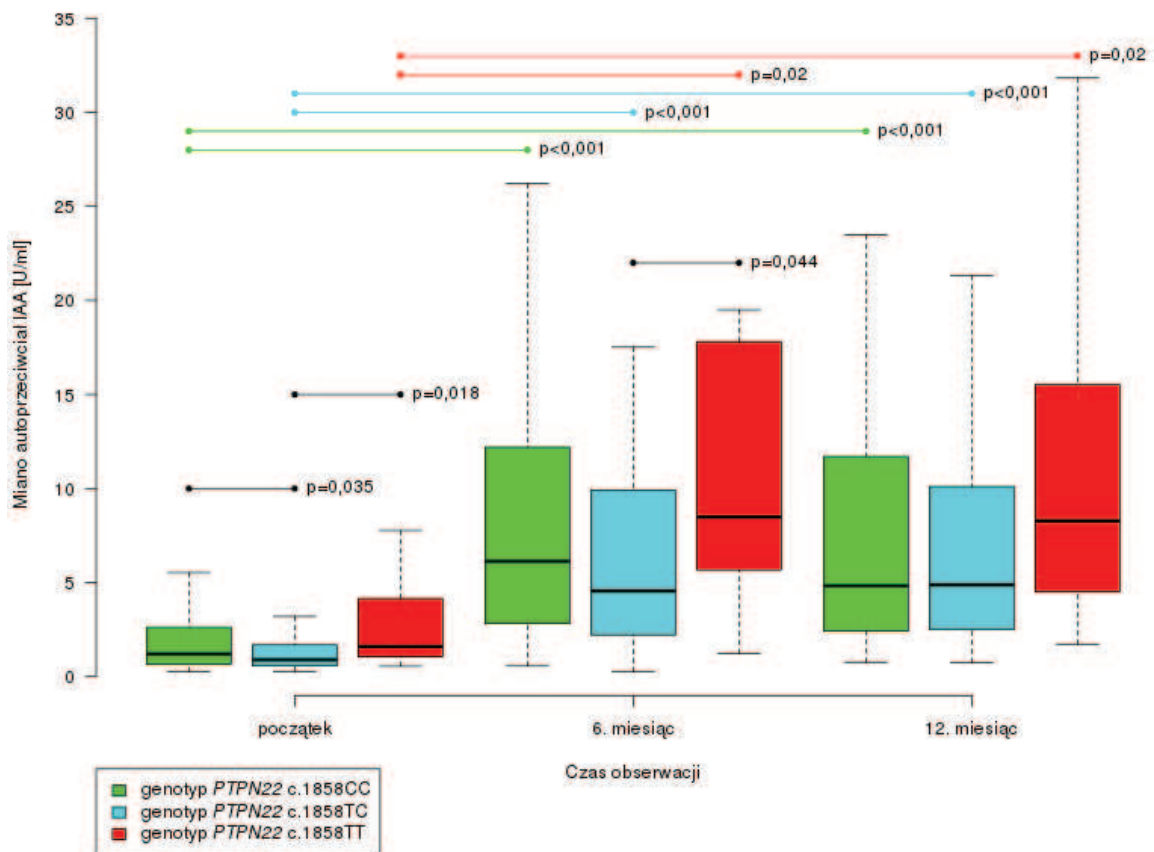
Rycina 4.9. Ocena oddziaływania polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w pierwszym roku trwania T1DM

auto przeciwciała GAD – auto przeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego w klasie IgG
analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p < 0,05$)

Podczas analizy dynamiki zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w powiązaniu z genotypami badanego polimorfizmu, stratyfikowanymi względem ryzyka rozwoju T1DM, nie stwierdzano już tak wyraźnych różnic, z uwagi na włączenie osób posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC do jednej grupy (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxona).

Obserwowane zmiany w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w znacznym stopniu korespondowały z dynamiką zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki w zależności od stwierdzonego genotypu badanego polimorfizmu (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2 str.132).

Natomiast w przypadku humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (IAA) istotne różnice w jej aktywności w odniesieniu do poszczególnych genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* obserwowano głównie w momencie rozpoznania choroby oraz w 6 miesiącu trwania T1DM (ryc.4.10). Na początku choroby stwierdzano znamienne wyższe miano antyprzeciwciał IAA w grupie pacjentów będących homozygotami TT badanego polimorfizmu w porównaniu z grupą chorych o genotypie *PTPN22* c.1858TC (test Wilcozona, $p=0,018$; miano antyprzeciwciał IAA: genotyp *PTPN22* c.1858TT mediana 1,6 U/ml; genotyp *PTPN22* c.1858TC mediana 0,89 U/ml). Jednocześnie miano antyprzeciwciał IAA w momencie rozpoznania T1DM u chorych będących heterozygotami TC analizowanego polimorfizmu pozostawały istotnie niższe także w stosunku do poziomów antyprzeciwciał IAA odnotowywanych u homozygot CC (test Wilcozona, $p=0,035$; miano antyprzeciwciał IAA: genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 1,2 U/ml; genotyp *PTPN22* c.1858TC mediana 0,89 U/ml). (ryc.4.10)



Rycina 4.10. Ocena oddziaływania polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw IAA w pierwszym roku trwania T1DM

antyprzeciwciała IAA – antyprzeciwciała przeciwiinsulinowe w klasie IgG
analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

W 6 miesiącu trwania T1DM obserwowano nadal utrzymywanie się istotnie wyższych poziomów antyprzeciwciał IAA u homozygot TT w odniesieniu do pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858TC (test Wilcozona, $p=0,044$; miano antyprzeciwciał IAA: genotyp *PTPN22* c.1858TT mediana 8,48 U/ml; genotyp *PTPN22* c.1858TC mediana 4,55 U/ml) (ryc.4.10).

Jednocześnie miana autoprzeciwciał IAA obserwowane w 6 i 12 miesiącu trwania T1DM pozostawały znamienne wyższe od miana stwierdzanego na początku choroby w przypadku każdego z genotypów analizowanego polimorfizmu (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon) (ryc.4.10).

12.7.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby, z uwzględnieniem występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM

Podczas rocznej obserwacji nie wykazano modulującego oddziaływania polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, w powiązaniu z występowaniem DKA w okresie ujawniania się T1DM, na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) w badanej populacji (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

Natomiast w przypadku humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (IAA) w 6 miesiącu trwania T1DM stwierdzono istotne, modulujące oddziaływanie badanego polimorfizmu w powiązaniu z występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby. W tym okresie obserwacji we wszystkich analizowanych grupach dochodziło do znamiennego wzrostu miana autoprzeciwciał IAA (test Wilcoxon, $p < 0,001$ dla każdej analizowanej grupy), przy czym najbardziej dynamiczne narastanie poziomu autoprzeciwciał wykazano w grupie chorych z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC. Powodowało to powstanie istotnych różnic pomiędzy mianem autoprzeciwciał IAA stwierdzanym w grupie chorych zwiększonego ryzyka genetycznego w zależności od wywiadu w kierunku występowania DKA na początku choroby (test Wilcoxon, $p = 0,007$; miano autoprzeciwciał IAA – genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC: bez DKA mediana 4,28 U/ml; z DKA mediana 9,3 U/ml). Jednocześnie w tym okresie trwania T1DM wśród chorych, u których nie stwierdzano DKA w momencie rozpoznania T1DM obserwowano znamienne niższe miano autoprzeciwciał IAA u pacjentów będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu (test Wilcoxon, $p = 0,049$; miano autoprzeciwciał IAA – grupa chorych bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 6,08 U/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 4,28 U/ml).

12.7.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM, z uwzględnieniem płci pacjenta

W grupie pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC, w momencie rozpoznania T1DM, jak również po 12 miesiącach trwania choroby stwierdzano występowanie znamienne wyższych mian autoprzeciwciał GAD wśród dziewcząt (test Wilcoxon, początek choroby $p = 0,005$; miano autoprzeciwciał GAD – genotyp *PTPN22* c.1858CC początek choroby: chłopcy mediana 46,8 U/ml, dziewczęta mediana 218,84 U/ml; 12 miesiąc choroby $p = 0,018$; miano autoprzeciwciał GAD – genotyp *PTPN22* c.1858CC 12 miesiąc choroby: chłopcy mediana 44,75 U/ml, dziewczęta mediana 143,73 U/ml). Wśród pacjentów należących do grupy zwiększonego ryzyka genetycznego nie wykazano istotnych zmian w dynamice aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w zależności od płci przez cały okres rocznej obserwacji (test Wilcoxon, początek choroby $p = 0,347$; 6 miesiąc choroby $p = 0,386$; 12 miesiąc choroby $p = 0,219$).

Powyższe zmiany, szczególnie w grupie chorych będących homozygotami CC badanego polimorfizmu w znacznym stopniu korespondowały z obserwowaną dynamiką zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.2 str.135).

Jednocześnie w ciągu rocznej obserwacji nie stwierdzono istotnych różnic w mianie autoprzeciwciał GAD w obrębie każdej z płci, w zależności od występującego u pacjenta genotypu badanego polimorfizmu. Również w poszczególnych z analizowanych grup chorych nie wykazano znamienych zmian w dynamice

aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w pierwszym roku trwania T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona).

W czasie rocznej obserwacji nie stwierdzono istotnych zmian w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw IAA w badanej populacji w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w powiązaniu z płcią chorego (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona).

12.7.3. Aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/

W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem płci na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (→ *Wyniki* pkt. 11.1 str.93), dokonano oceny potencjalnego oddziaływania powyższego modelu strukturalnego na aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM.

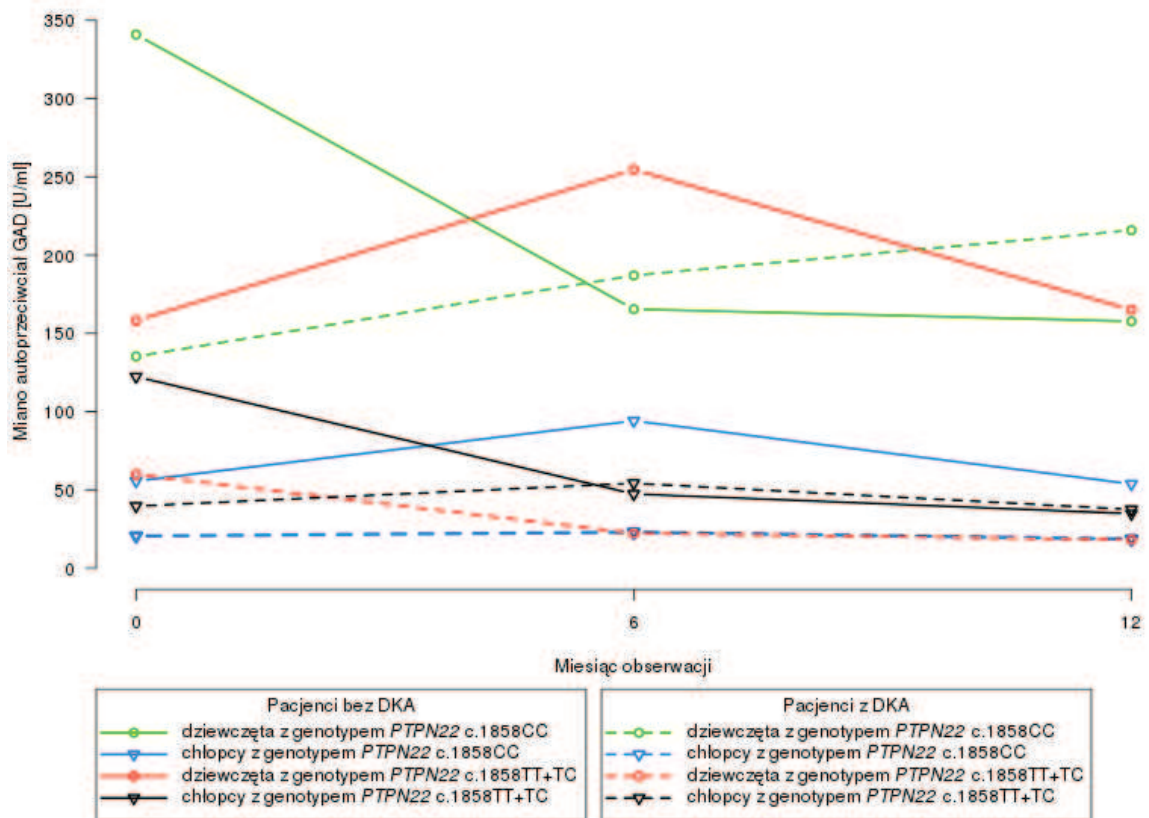
Analiza humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) na początku choroby wśród pacjentów będących homozygotami CC badanego polimorfizmu nie wykazała znamienych różnic w mianie autoprzeciwciał w obrębie każdej z płci w zależności od występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcozona, grupa bez DKA vs. chorzy z DKA: chłopcy $p=0,104$; dziewczęta $p=0,489$) (ryc. 4.11). Jedynie w 6 miesiącu obserwacji w tej podgrupie chorych stwierdzono istotne różnice w mianie autoprzeciwciał GAD wśród chłopców w zależności od rozwoju u nich DKA w okresie ujawniania się T1DM (test Wilcozona, $p=0,042$; miano autoprzeciwciał GAD: grupa bez DKA mediana 94,08 U/ml; chorzy z DKA mediana 22,9 U/ml). Natomiast u dziewczynek posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC, pomimo nieodnotowania znamienych różnic w wartościach miana autoprzeciwciał GAD w powiązaniu z występowaniem DKA podczas rocznej obserwacji (analiza statystyczna przeprowadzona w oparciu o test Wilcozona), w obu podgrupach wykazano odmienną dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD. U dziewczynek bez obciążonego wywiadu w kierunku DKA stwierdzano stopniowe obniżanie się miana autoprzeciwciał GAD w ciągu rocznej obserwacji, podczas gdy w grupie z DKA wykazano ciągły wzrost miana w tym samym okresie czasu. (ryc. 4.11)

W grupie dziewczynek z negatywnym wywiadem w kierunku DKA na początku choroby, posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC stwierdzano znaczną aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD zarówno w momencie rozpoznania T1DM, jak i przez cały okres rocznej obserwacji. Wykazane w tej podgrupie miana autoprzeciwciał GAD pozostawały przez cały okres rocznej obserwacji znamienne wyższe od poziomów autoprzeciwciał u dziewczynek z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się choroby (test Wilcozona, początek choroby $p=0,048$; 6 miesiąc choroby $p=0,021$; 12 miesiąc choroby $p=0,009$). Jednocześnie były to najwyższe miana autoprzeciwciał GAD odnotowywane w pierwszym roku trwania T1DM wśród pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC. (ryc. 4.11)

Opisane powyżej zmiany w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD pozostawały w związku czasowym ze zmianami funkcji resztkowej komórek β trzustki, które obserwowano w poszczególnych podgrupach chorych analizowanego modelu strukturalnego (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.3 str.138).

Jednocześnie podczas rocznej obserwacji pacjentów w obrębie każdej z płci nie wykazano znamienych różnic w mianie autoprzeciwciał GAD pomiędzy osobami posiadającymi różne genotypy badanego polimorfizmu, stratyfikowane względem ryzyka rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22*

c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC), w zależności od występowania DKA w okresie ujawniania się choroby (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).



Rycina 4.11. Oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w pierwszym roku trwania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

autooprzeciwciała GAD – autooprzeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego w klasie IgG

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon

Celem zachowania czytelności ryciny na wykresie przedstawiono wyłącznie mediany poziomów autooprzeciwciał GAD, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, uwzględnianych w analizie.

W przypadku humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (IAA) nie wykazano istotnego modulującego oddziaływania analizowanego modelu strukturalnego na dynamikę zmian jej aktywności w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

12.7.4. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM, z uwzględnieniem wieku pacjenta

Modulujące oddziaływanie polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w zależności od wieku pacjenta na aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w badanej populacji obserwowano od początku choroby do 12 miesiąca trwania T1DM.

W momencie rozpoznania choroby w grupie pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC w młodszej i starszej grupie wiekowej (młodsza grupa wiekowa – wiek wczesnodziecięcy i przedszkolny; starsza grupa wiekowa – wiek szkolny + młodzieńczy) stwierdzano zbliżone miano

autoprzeciwciał GAD (test Wilcozona, $p=0,47$; miano autoprzeciwciał GAD: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny mediana 94,3 U/ml; wiek szkolny + młodzieńczy mediana 111,25 U/ml), podczas gdy wśród chorych będących homozygotami CC badanego polimorfizmu odnotowano istotnie niższe miano autoprzeciwciał GAD u młodszych dzieci w odniesieniu do pacjentów zakwalifikowanych do starszych kategorii wiekowych (test Wilcozona, $p=0,029$; miano autoprzeciwciał GAD: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny mediana 28,67 U/ml; wiek szkolny + młodzieńczy mediana 121,14 U/ml). Powyższa zależność stwierdzana w grupie chorych o genotypie *PTPN22* c.1858CC pozostawała znamienna do zakończenia pierwszego roku choroby (test Wilcozona, 6 miesiąc choroby $p=0,007$; 12 miesiąc choroby $p=0,013$).

W 6 miesiącu trwania obserwacji we wszystkich analizowanych grupach dochodziło do obniżenia się miana autoprzeciwciał GAD, przy czym szczególnie silny, choć niewykazujący cech istotności, spadek poziomu autoprzeciwciał stwierdzano u młodszych dzieci o genotypach *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,225$; 6 miesiąc choroby miano autoprzeciwciał GAD mediana 46,01 U/ml). Pomimo to w grupie pacjentów o zwiększonym ryzyku genetycznym nadal nie stwierdzano istotnych różnic w mianie autoprzeciwciał GAD w zależności od wieku chorego (test Wilcozona, $p=0,159$). Dopiero w 12 miesiącu obserwacji miano autoprzeciwciał GAD u młodszych dzieci należących do grupy zwiększonego ryzyka obniżało się do poziomów obserwowanych w tej samej kategorii wiekowej u homozygot CC badanego polimorfizmu (miano autoprzeciwciał GAD – wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: *PTPN22* c.1858CC mediana 20,01 U/ml; *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 20,9 U/ml). Powodowało to powstanie istotnych różnic pomiędzy młodszą i starszą grupą wiekową, niezależnie od genotypu analizowanego polimorfizmu (test Wilcozona, wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny vs. wiek szkolny + młodzieńczy: *PTPN22* c.1858CC $p=0,013$; *PTPN22* c.1858TT+TC $p=0,049$).

W czasie rocznej obserwacji nie stwierdzono istotnych zmian w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw IAA w badanej populacji w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w powiązaniu z wiekiem chorego (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona).

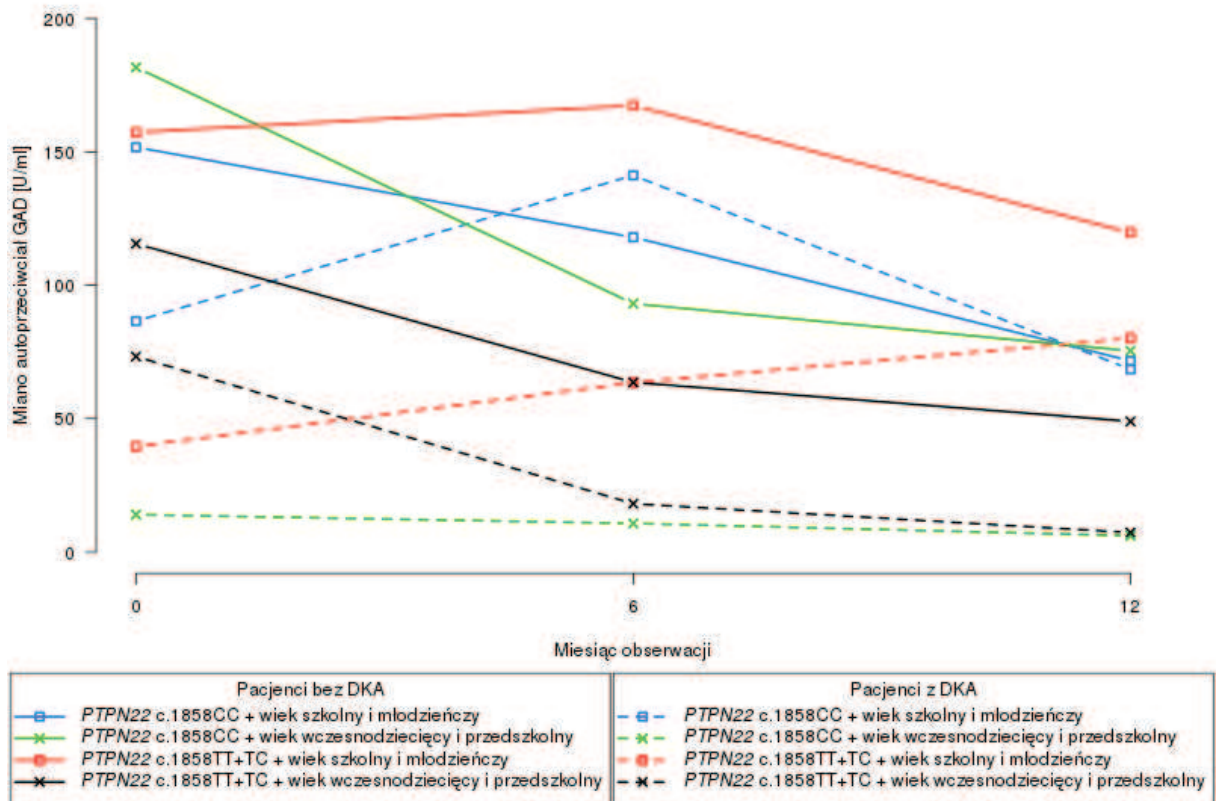
12.7.5. Aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/

W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem wieku na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (→ *Wyniki* pkt.11.2 str.97), dokonano oceny potencjalnego oddziaływania powyższego modelu strukturalnego na aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM.

W grupie chorych będących homozygotami CC badanego polimorfizmu przez cały okres rocznej obserwacji nie stwierdzano znamiennych różnic w rozkładach miana autoprzeciwciał GAD, które mogłyby wskazywać na modulujące oddziaływanie analizowanego modelu strukturalnego. W tej grupie pacjentów, wśród osób z rozpoznaną DKA na początku choroby i należących do młodszych kategorii wiekowych (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny) obserwowano szczególnie małą aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciwko GAD przez cały pierwszy rok trwania T1DM. Jednocześnie miana autoprzeciwciał GAD odnotowywane wśród tych chorych pozostawały najniższe w porównaniu z poszczególnymi podgrupami chorych w analizowanym modelu strukturalnym (ryc.4.12).

W dalszej analizie grupy pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC, wśród chorych z obciążonym wywiadem w kierunku DKA i należących do starszych kategorii wiekowych (wiek szkolny + młodzieńczy) obserwowano odmienną dynamikę aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w 6 miesiącu trwania T1DM. U tych pacjentów w 6 miesiącu obserwacji stwierdzano znaczny, ale niewykazujący cech znamienności, wzrost poziomu

autoprzeciwciał GAD, podczas gdy w pozostałych podgrupach chorych będącymi homozygotami CC badanego polimorfizmu wykazywano stopniowy zanik aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD (ryc.4.12).



Rycina 4.12. Oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w pierwszym roku trwania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

autoprzeciwciała GAD – autoprzeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego w klasie IgG

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona

Celem zachowania czytelności ryciny na wykresie przedstawiono wyłącznie mediany poziomów przeciwciał GAD, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, uwzględnianych w analizie.

Opisane powyżej zmiany w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD pozostawały w związku czasowym ze zmianami funkcji resztkowej komórek β trzustki, które obserwowano w poszczególnych podgrupach chorych posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC w analizowanym modelu strukturalnym (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.5 str.140).

Natomiast wśród pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka genetycznego rozwoju T1DM (genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC), w pierwszym roku trwania choroby, obserwowano występowanie znamienne wyższych mian przeciwciał GAD w młodszych grupach wiekowych z negatywnym wywiadem w kierunku DKA w porównaniu z chorymi w tym samym wieku i z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM (test Wilcozona, początek choroby $p=0,042$; 6 miesięcy choroby $p=0,034$; 12 miesięcy choroby $p=0,017$). Podobnej zależności nie wykazano w starszych grupach wiekowych w zależności od występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcozona, początek choroby $p=0,361$; 6 miesięcy choroby $p=0,418$; 12 miesięcy choroby $p=0,491$). (ryc.4.12)

Jednocześnie w grupie chorych posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC obserwowano odmienną dynamikę aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w zależności od wieku i występowania DKA w okresie ujawniania się T1DM. W młodszych grupach wiekowych (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny) stwierdzano stopniowe obniżanie się miana autoprzeciwciał GAD podczas rocznej obserwacji, przy czym wśród pacjentów z wywiadem obciążonym wystąpieniem DKA na początku choroby zanik odpowiedzi autoimmunologicznej był bardziej dynamiczny w porównaniu z chorymi, u których nie doszło do rozwoju DKA w momencie rozpoznania T1DM. (ryc.4.10) W starszych grupach wiekowych (wiek szkolny + młodzieńczy) w 6 miesiącu trwania choroby obserwowano nieznamienny wzrost miana autoprzeciwciał GAD niezależnie od występowania DKA w okresie ujawniania się T1DM. Natomiast w 12 miesiącu obserwacji wśród chorych z DKA w wywiadzie stwierdzano dalszy, niewykazujący cech znamienności, wzrost miana autoprzeciwciał GAD, podczas gdy u osób z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA następował stopniowy zanik odpowiedzi autoimmunologicznej. (ryc.4.10)

Powyższe zmiany w aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w znacznym stopniu korespondowały ze zmianami funkcji resztkowej komórek β trzustki, które obserwowano w poszczególnych podgrupach chorych posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC w analizowanym modelu strukturalnym (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.5 str.140).

Jednocześnie podczas rocznej obserwacji pacjentów w obrębie poszczególnych kategorii wiekowych, ocenianych pojedynczo, nie wykazano znamiennych różnic w mianie autoprzeciwciał GAD pomiędzy osobami posiadającymi różne genotypy badanego polimorfizmu, stratyfikowane względem ryzyka rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC), w zależności od występowania DKA w okresie ujawniania się choroby (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

W przypadku humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (IAA) nie potwierdzono istotnego oddziaływania analizowanego modelu strukturalnego na dynamikę zmian jej aktywności w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

12.8. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* z aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej w pierwszym roku trwania T1DM

Ostateczna interpretacja przeprowadzonych analiz, dotyczących potencjalnego związku pomiędzy polimorfizmem 5'VNTR genu *INS* (ocena za pomocą polimorfizmu markerowego -23HphIA>T) a aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) oraz przeciw natywnej insulinie (IAA) u obserwowanych pacjentów w pierwszym roku trwania T1DM pozostaje niemożliwa, z uwagi na dystrybucję poszczególnych genotypów analizowanego polimorfizmu w badanej populacji (\rightarrow Wyniki pkt.7 str.86).

13. Ocena funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM

W badanej grupie ocenę funkcji resztkowej komórek β trzustki w momencie rozpoznania T1DM oraz dynamiki jej zmian w pierwszym roku trwania choroby przeprowadzono za pomocą pomiarów stężenia C-peptydu na czczo. Analizy wyników oznaczeń C-peptydu dokonano zgodnie z kryteriami przedstawionymi w punkcie 4.3 rozdziału *Materiały i metody* (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.4.3 str.66). Ponieważ wszystkie oznaczenia stężeń C-peptydu zostały wykonane na czczo, w dalszym tekście rozprawy posłużono się skróconym zapisem *stężenie C-peptydu* zamiast pełnego określenia *stężenie C-peptydu na czczo*.

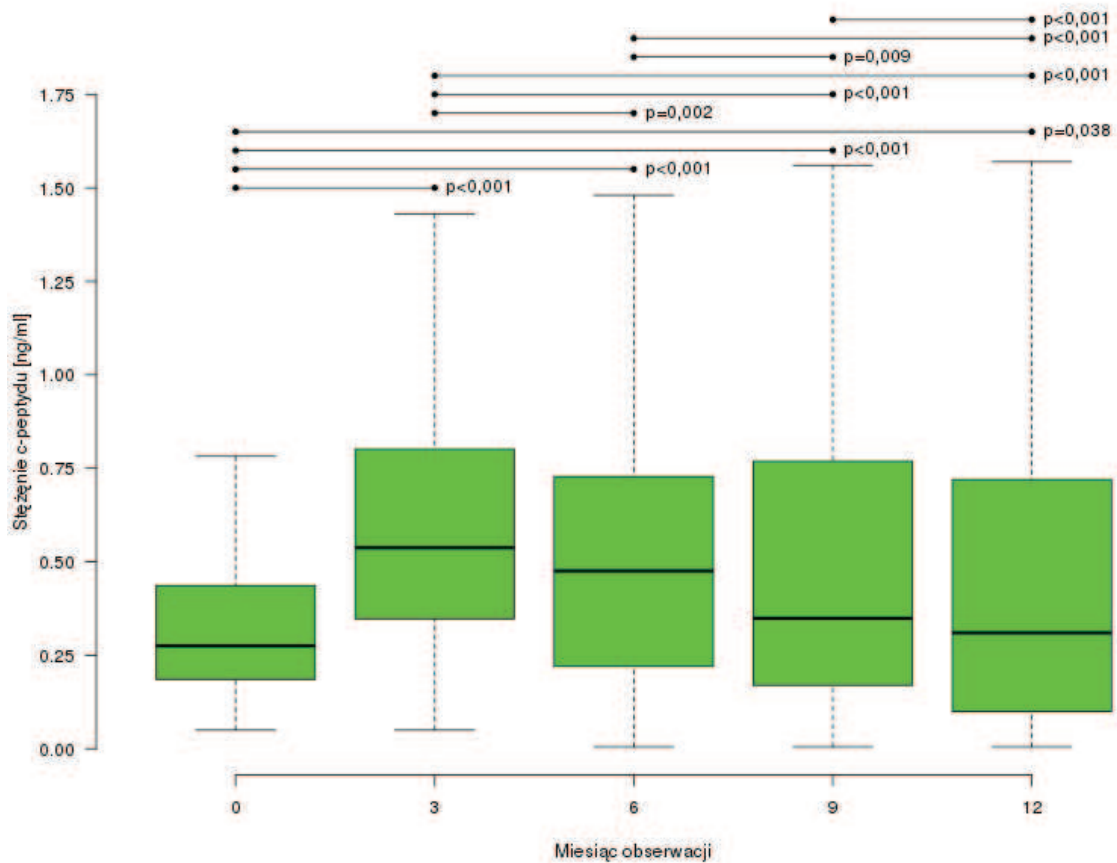
W tabeli 4.12 przedstawiono zestawienie wszystkich pomiarów stężenia C-peptydu, których dokonano w grupie badanych pacjentów w ciągu rocznej obserwacji, ze szczególnym uwzględnieniem wytycznych Immunology of Diabetes Society oraz ADA.

Tabela 4.12. Zestawienie pomiarów stężenia C-peptydu dokonanych w ciągu rocznej obserwacji w badanej populacji, z uwzględnieniem wytycznych Immunology of Diabetes Society (Greenbaum and Harrison, 2003) oraz ADA (Palmer et al., 2004)

<i>punkt obserwacji</i>	<i>liczba wykonanych pomiarów C-peptydu</i>	<i>liczba pomiarów C-peptydu spełniających kryteria IDS oraz ADA^{*)}</i>	<i>liczba pomiarów C-peptydu niespełniających kryteriów IDS oraz ADA^{*)}</i>
moment rozpoznania choroby (<i>n=147</i>)	147	119 (80,95%)	28 (19,05%)
I wizyta kontrolna (3 miesiąc choroby) (<i>n=140</i>)	140	124 (88,57%)	16 (11,43%)
II wizyta kontrolna (6 miesiąc choroby) (<i>n=133</i>)	133	114 (85,71%)	19 (14,29%)
III wizyta kontrolna (9 miesiąc choroby) (<i>n=132</i>)	132	99 (75,0%)	33 (25,0%)
IV wizyta kontrolna (12 miesiąc choroby) (<i>n=135</i>)	135	109 (80,74%)	26 (19,26%)

^{*)} dane w poszczególnych kolumnach przedstawiono jako liczbę pacjentów przyporządkowanych do określonej kategorii, uwzględniającej kryteria IDS/ADA, w nawiasach podano ich udział procentowy w analizowanej populacji w danym punkcie rocznej obserwacji
n – liczba pacjentów uwzględnionych w analizie w danym punkcie rocznej obserwacji

Wśród badanych pacjentów mediana stężenia C-peptydu w momencie rozpoznania choroby wynosiła 0,275 ng/ml (zakres 0,186 – 0,436 ng/ml). Podczas rocznej obserwacji chorych maksymalne stężenia C-peptydu stwierdzano po 3 miesiącach od zachorowania na T1DM (mediana 0,538 ng/ml). Natomiast w kolejnych miesiącach trwania choroby obserwowano stopniową, ale istotną utratę funkcji resztkowej komórek β trzustki. Jednocześnie, we wszystkich punktach obserwacyjnych resztkowa insulinosekrecja u badanych pacjentów pozostawała znamienne wyższa w odniesieniu do stężeń C-peptydu w momencie rozpoznania T1DM. Po 12 miesiącach trwania cukrzycy mediana stężenia C-peptydu w obserwowanej grupie wynosiła 0,31 ng/ml. (ryc.4.13)



Rycina 4.13. Ogólna ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p < 0,05$)

13.1. Ocena potencjalnego związku dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM z pozagenetycznymi czynnikami modyfikującymi

Analizę wpływu badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* na funkcję resztkową komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM, poprzedzono oceną występowania potencjalnych oddziaływań na powyższą funkcję innych czynników modyfikujących. W ocenie tej uwzględniono następujące czynniki, mogące nasilać autoimmunologiczne uszkodzenie komórek β trzustki lub modyfikujące insulinowrażliwość tkanek obwodowych:

- płeć
- wiek
- stadium dojrzewania płciowego
- BMI z-score
- występowanie infekcji w okresie poprzedzającym ujawnienie się T1DM
- stopień ciężkości zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM

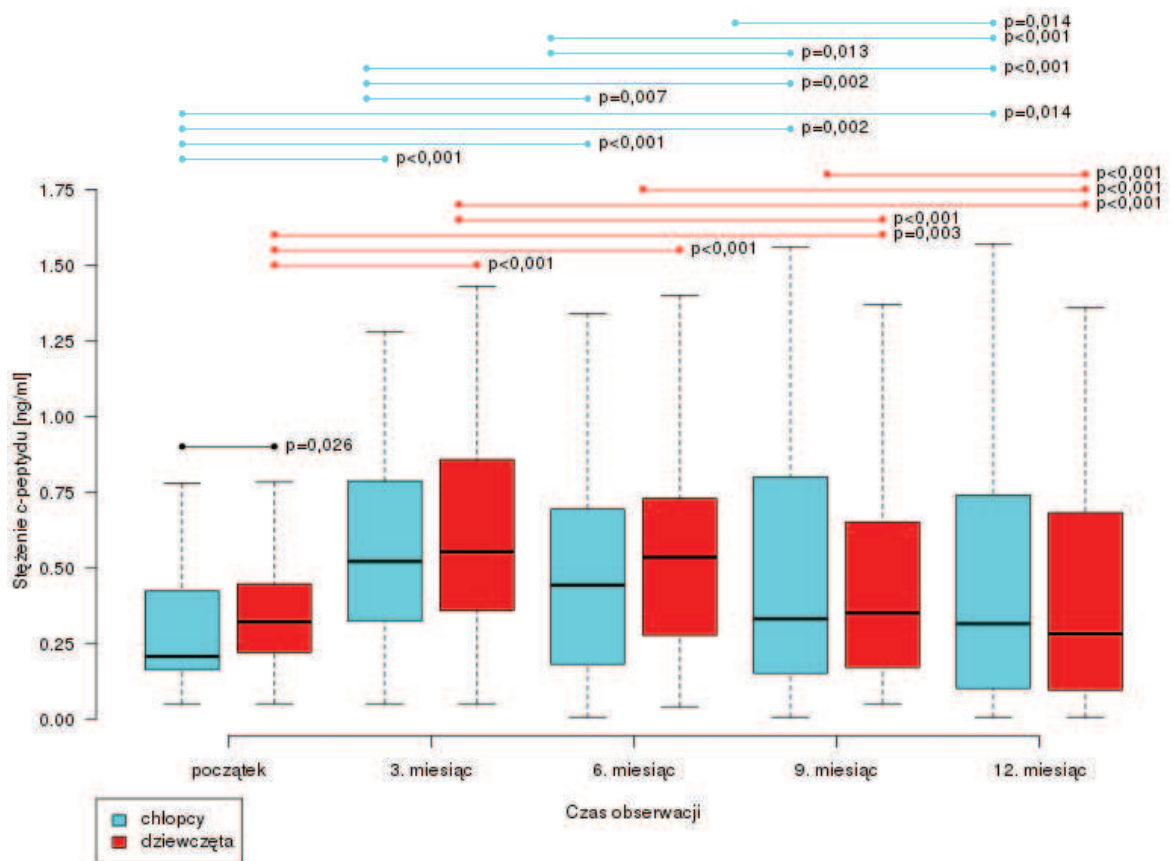
13.1.1. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy płcią i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM

W momencie rozpoznania T1DM w badanej grupie pacjentów obserwowano istotne różnice w rozkładzie stężeń C-peptydu w zależności od płci (test Wilcozona, $p = 0,026$), z tendencją do wyższych

stężeń u dziewcząt (stężenie C-peptydu u chłopców vs. u dziewcząt: mediana 0,206 ng/ml vs. mediana 0,32 ng/ml). (ryc.4.14)

Po uwzględnieniu wieku pacjentów, istotne różnice w rozkładzie stężeń C-peptydu pomiędzy płciami w momencie rozpoznania T1DM wykazano jedynie w grupie wiekowej przedszkolnej (test Wilcozona, $p=0,042$; stężenie C-peptydu u chłopców vs. u dziewcząt: mediana 0,191 ng/ml vs. mediana 0,318 ng/ml) oraz szkolnej (test Wilcozona, $p=0,013$; stężenie C-peptydu u chłopców vs. u dziewcząt: mediana 0,215 ng/ml vs. mediana 0,358 ng/ml).

Istotna zależność pomiędzy stężeniem C-peptydu na początku choroby a płcią nie była warunkowana zmiennymi różnicami w długości trwania objawów T1DM (test Wilcozona, wartości p dla kolejnych przedziałów długości trwania objawów T1DM wynosiły odpowiednio: 1-6 dni $p=0,164$; 7-13 dni $p=0,256$; 14-20 dni $p=0,17$; 21-60 dni $p=0,106$; >60 dni $p=0,222$), jak również stopniem ciężkości zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcozona, chorzy bez DKA $p=0,087$; z łagodną DKA $p=0,082$; z umiarkowaną DKA $p=0,176$; z ciężką DKA $p=0,265$) (rozszerzenie analizy → Wyniki pkt.13.1.7 str.124 oraz pkt.13.5.2.2 str.135).



Rycina 4.14. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM w zależności od płci pacjenta

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

Podczas rocznej obserwacji klinicznej chorych stwierdzano odmienną dynamikę zmian stężeń C-peptydu w zależności od płci, ale poza momentem rozpoznania T1DM, nie wykazano znamienych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu pomiędzy płciami (ryc.4.14).

W 3 miesiącu choroby, zarówno u dziewcząt, jak i chłopców obserwowano istotny wzrost stężeń C-peptydu (test Wilcozona, dla dziewcząt i chłopców $p<0,001$), przy nieznamienne wyższym stężeniu

C-peptydu u dziewcząt (test Wilcoxon, $p=0,22$; stężenie C-peptydu u chłopców vs. u dziewcząt: mediana 0,52 ng/ml vs. mediana 0,55 ng/ml) (ryc.4.14).

Po 3 miesiącu trwania T1DM u dziewcząt spadek stężeń C-peptydu był mniej dynamiczny niż u chłopców. U dziewcząt istotną różnicę w rozkładach stężeń C-peptydu pomiędzy kolejnymi punktami obserwacyjnymi stwierdzano jedynie w okresie pomiędzy 9 i 12 miesiącem (test Wilcoxon, $p<0,001$). Natomiast u chłopców od 3 miesiąca trwania choroby rozkłady stężeń C-peptydu były znamienne różne w kolejnych punktach czasowych obserwacji klinicznej (test Wilcoxon, 3 miesiące vs. 6 miesięcy $p=0,007$; 6 miesięcy vs. 9 miesięcy $p=0,013$; 9 miesięcy vs. 12 miesięcy $p=0,014$). (ryc.4.14)

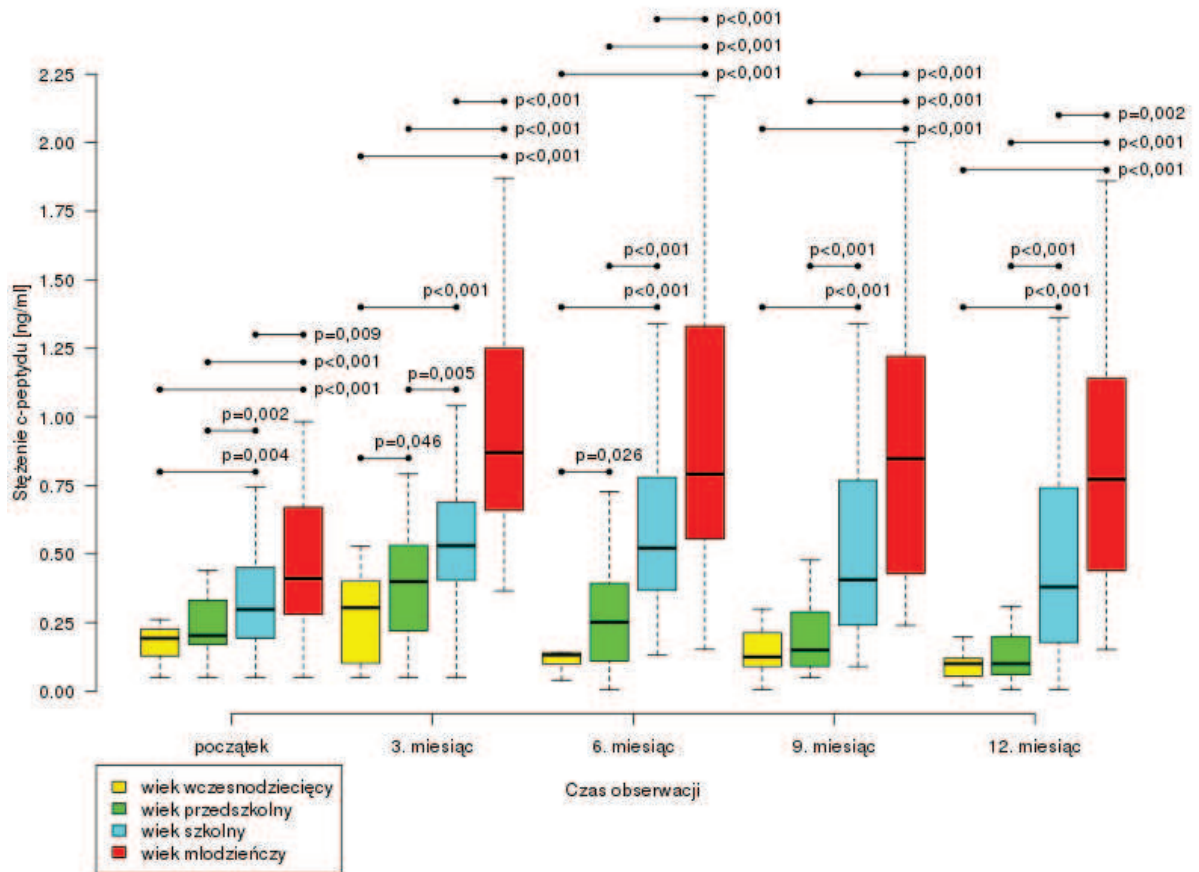
U dziewcząt, pomimo znamienne wyższych stężeń C-peptydu w momencie diagnozy T1DM i mniej dynamicznego zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku choroby w porównaniu z chłopcami, nie wykazano istotnych różnic w rozkładzie stężeń C-peptydu na początku choroby i po 12 miesiącach obserwacji klinicznej (test Wilcoxon, $p=0,352$; stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,32 ng/ml vs. 12 miesiąc choroby mediana 0,28 ng/ml). (ryc.4.14)

Natomiast u chłopców, pomimo obserwowanego niższego średniego stężenia C-peptydu w momencie rozpoznania T1DM i bardziej dynamicznego jego spadku od 3 miesiąca obserwacji klinicznej w odniesieniu do dziewcząt, po 12 miesiącach trwania choroby stężenia C-peptydu pozostawały istotnie wyższe w porównaniu ze stężeniami początkowymi (test Wilcoxon, $p=0,014$; stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,206 ng/ml vs. 12 miesiąc choroby mediana 0,314 ng/ml) i były jednocześnie porównywalne ze stężeniem C-peptydu u dziewcząt po rocznym okresie choroby (test Wilcoxon, $p=0,398$). (ryc.4.14)

13.1.2. Ocena potencjalnego związku pomiędzy wiekiem pacjenta i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM

W momencie rozpoznania T1DM nie obserwowano istotnych różnic w rozkładzie stężenia C-peptydu jedynie pomiędzy grupą pacjentów w wieku wczesnodziecięcym i przedszkolnym (test Wilcoxon, $p=0,126$; stężenie C-peptydu wiek wczesnodziecięcy vs. wiek przedszkolny: mediana 0,193 ng/ml vs. mediana 0,203 ng/ml). W tych grupach wiekowych stwierdzane stężenia C-peptydu były najniższe. Znamienne różnice w rozkładach stężeń C-peptydu w momencie diagnozy T1DM wykazane w porównaniach pozostałych grup wiekowych przedstawiono na rycinie 4.15. Najwyższe poziomy C-peptydu przy rozpoznaniu T1DM obserwowano u pacjentów w wieku młodzieńczym (stężenie C-peptydu mediana 0,411 ng/ml) (ryc.4.15).

We wczesnym okresie obserwacji klinicznej (3 i 6 miesiąc choroby) istotne różnice w rozkładzie stężeń C-peptydu występowały pomiędzy wszystkimi grupami wiekowymi (ryc.4.15), przy czym nadal najwyższe stężenia C-peptydu obserwowano wśród pacjentów w wieku młodzieńczym (stężenie C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,87 ng/ml; 6 miesiąc choroby mediana 0,792 ng/ml), a najniższe u chorych w wieku wczesnodziecięcym (stężenie C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,304 ng/ml; 6 miesiąc choroby mediana 0,132 ng/ml). Natomiast w drugim półroczu obserwacji klinicznej (9 i 12 miesiąc choroby), podobnie jak w momencie rozpoznania T1DM, nie wykazywano już znamienych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu pomiędzy grupą w wieku wczesnodziecięcym i przedszkolny (test Wilcoxon, 9 miesiąc choroby $p=0,24$; 12 miesiąc choroby $p=0,187$) (ryc.4.15).



Rycina 4.15. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM w zależności od wieku pacjenta (kategorii wiekowej uwzględniającej etapy rozwoju psychosomatycznego dziecka)

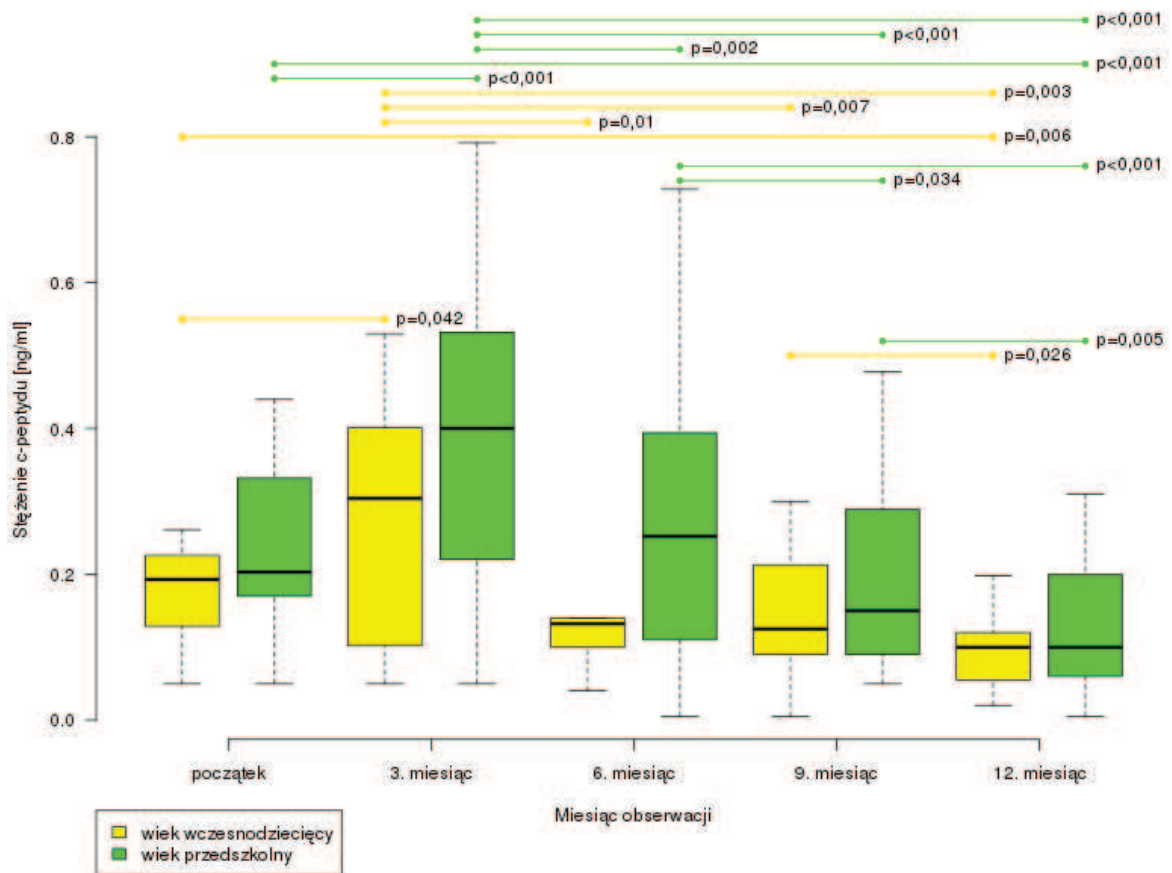
analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p < 0,05$)

Na rycinie uwzględniono wyłącznie istotne różnice w stężeniach C-peptydu w czasie rocznej obserwacji pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi, natomiast znamienne różnice w obrębie określonych kategorii wiekowych przedstawiono na rycinie 4.16 (wiek wczesnodziejęcy i przedszkolny) oraz rycinie 4.17 (wiek szkolny i młodzieńczy).

W czasie rocznej obserwacji klinicznej stwierdzono istnienie odmiennej dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki u pacjentów z młodszych grup wiekowych (wiek wczesnodziejęcy i wiek przedszkolny) w porównaniu z chorymi ze starszych kategorii wiekowych (wiek szkolny i młodzieńczy) (ryc.4.15).

We wszystkich grupach wiekowych obserwowano istotny wzrost stężenia C-peptydu w 3 miesiącu od zachorowania (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona) (ryc.4.16 oraz ryc.4.17). Jednocześnie poziomy C-peptydu osiągnięte w 3 miesiącu choroby w poszczególnych kategoriach wiekowych stanowiły maksymalne stężenia C-peptydu stwierdzane podczas rocznej obserwacji pacjentów (stężenie C-peptydu: wiek wczesnodziejęcy mediana 0,304 ng/ml; wiek przedszkolny mediana 0,4 ng/ml; wiek szkolny mediana 0,53 ng/ml; wiek młodzieńczy mediana 0,87 ng/ml) (ryc.4.16 oraz ryc.4.17). Od 6 miesiąca trwania T1DM w młodszych grupach wiekowych (wiek wczesnodziejęcy i przedszkolny) dochodziło do stopniowego, istotnego spadku średnich stężeń C-peptydu w odniesieniu do poziomów C-peptydu w 3 miesiącu choroby. Jednocześnie u tych pacjentów do 9 miesiąca obserwacji rozkłady stężeń C-peptydu nie różniły się znamienne od wartości C-peptydu w momencie rozpoznania (test Wilcozona, wiek wczesnodziejęcy $p=0,527$; wiek przedszkolny $p=0,388$). Natomiast po 12 miesiącach trwania T1DM poziomy C-peptydu u młodszych pacjentów pozostawały istotnie niższe od stężeń na początku choroby

(test Wilcozona, wiek wczesnodziecięcy $p=0,006$; stężenie C-peptydu w 12 miesiącu choroby mediana 0,1 ng/ml; wiek przedszkolny $p<0,001$; stężenie C-peptydu w 12 miesiącu choroby mediana 0,1 ng/ml). (ryc.4.16)



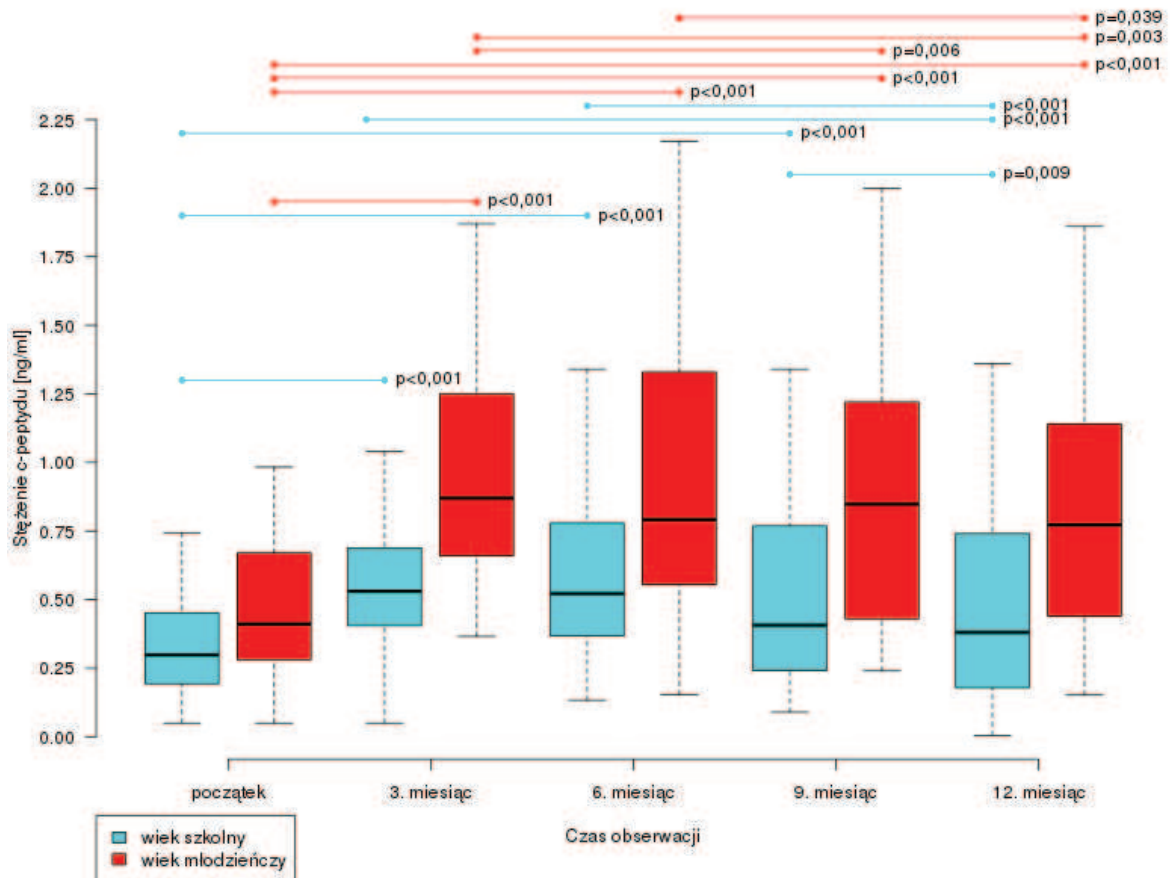
Rycina 4.16. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM u pacjentów należących do młodszych kategorii wiekowych

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

Na rycinie uwzględniono wyłącznie istotne różnice w stężeniach C-peptydu w czasie rocznej obserwacji w obrębie określonej kategorii wiekowej, natomiast znamienne różnice pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi przedstawiono na rycinie 4.15.

Odrębną dynamikę zmian resztkowej insulinosekrecji w pierwszym roku trwania T1DM obserwowano w starszych grupach wiekowych (wiek szkolny i młodzieńczy) (ryc.4.17). U pacjentów w wieku szkolnym po istotnym wzroście stężenia C-peptydu w 3 miesiącu obserwacji nie stwierdzano istotnych zmian w rozkładzie stężeń C-peptydu aż do 9 miesiąca choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby: 3 vs.6 $p=0,272$; 6 vs. 9 $p=0,056$; 3 vs. 9 $p=0,075$). Następnie, pomiędzy 9 i 12 miesiącem trwania T1DM, w tej grupie wiekowej dochodziło do znamiennego obniżenia się stężenia C-peptydu (test Wilcozona, miesiąc choroby 9 vs. 12 $p=0,009$; 3 vs.12 $p<0,001$), przy czym obserwowane do tego momentu poziomy C-peptydu pozostawały znamienne wyższe od wartości C-peptydu na początku choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 9 $p<0,001$; 0 vs. 12 $p=0,072$; stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,298 ng/ml; 9 miesiąc choroby mediana 0,406 ng/ml; 12 miesiąc choroby mediana 0,38 ng/ml). (ryc.4.17) W najstarszej grupie wiekowej nie wykazywano istotnych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu w kolejnych punktach obserwacyjnych od 3 do 12 miesiąca trwania T1DM (test Wilcozona, miesiąc choroby: 3 vs.6 $p=0,228$; 6 vs. 9 $p=0,089$; 9 vs. 12 $p=0,158$). Jednocześnie w tej grupie pacjentów znamienne spadek stężenia C-peptydu w odniesieniu do maksymalnych poziomów C-peptydu w 3 miesiącu obserwacji stwierdzano już od 9 miesiąca choroby (test Wilcozona, $p=0,006$), ale przez cały okres 12-miesięcznej obserwacji wartości

C-peptydu pozostawały znacznie wyższe od tych przy rozpoznaniu T1DM (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 12 $p<0,001$; stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,411 ng/ml; 12 miesiąc choroby mediana 0,772 ng/ml). (ryc.4.17)



Rycina 4.17. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM u pacjentów należących do starszych kategorii wiekowych

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

Na rycinie uwzględniono wyłącznie istotne różnice w stężeniach C-peptydu w czasie rocznej obserwacji w obrębie określonej kategorii wiekowej, natomiast istotne różnice pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi przedstawiono na rycinie 4.15.

Analiza dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w czasie rocznej obserwacji pacjentów z uwzględnieniem bimodalnego rozkładu wieku w momencie rozpoznania T1DM potwierdziła odrębność zmian w obu podgrupach wiekowych: 1-6 rok życia (wiek wczesnodziecięcy + wiek przedszkolny) oraz 7-18 rok życia (wiek szkolny + wiek młodzieńczy). W każdym punkcie pomiarowym podczas 12-miesięcznej obserwacji chorych rozkłady stężeń C-peptydu w powyższych podgrupach wiekowych wykazywały istotne różnice (test Wilcozona, $p<0,001$). Jednocześnie poziom istotności obserwowanych statystycznie różnic w dynamice zmian resztkowej insulinosekrecji w obu podgrupach wiekowych nie był modyfikowany przez wystąpienie infekcji w okresie poprzedzającym rozpoznanie T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona).

13.1.3. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy stadium rozwoju płciowego i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM

Zależność pomiędzy stadium rozwoju płciowego a dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki stanowiła odzwierciedlenie powiązania pomiędzy wiekiem pacjenta a resztkową insulinosekrecją. Podobnie, jak w analizie dotyczącej modulującego oddziaływania wieku na dynamikę zmian stężenia

C-peptydu, przez cały okres rocznej obserwacji chorych stwierdzano znamienne wyższe wartości C-peptydu w grupie znajdującej się w okresie pokwitania w porównaniu z pacjentami w okresie przedpokwitaniowym (test Wilcoxon, przez cały okres obserwacji $p < 0,001$).

Dynamika zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki u chorych w stadium przedpokwitaniowym odpowiadała dynamice zmian stężeń C-peptydu obserwowanej w młodszych grupach wiekowych (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny), a u chorych w stadium pokwitania – zmianom resztkowej insulinosekrecji stwierdzanym w starszych kategoriach wiekowych (wiek szkolny + młodzieńczy) (\rightarrow Wyniki pkt.13.1.2 str.117).

13.1.4. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy wskaźnikiem BMI z-score i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM

Na podstawie modelu regresji liniowej nie wykazano istotnych zależności pomiędzy stężeniami C-peptydu podczas rocznej obserwacji pacjentów oraz wartościami wskaźnika BMI z-score w kolejnych punktach prowadzonej obserwacji.

13.1.5. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy występowaniem infekcji w okresie poprzedzającym ujawnienie się T1DM i dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby

W badanej grupie pacjentów od momentu rozpoznania T1DM aż do zakończenia rocznej obserwacji nie stwierdzano znamienych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu w zależności od występowania infekcji w okresie poprzedzającym ostateczną diagnozę.

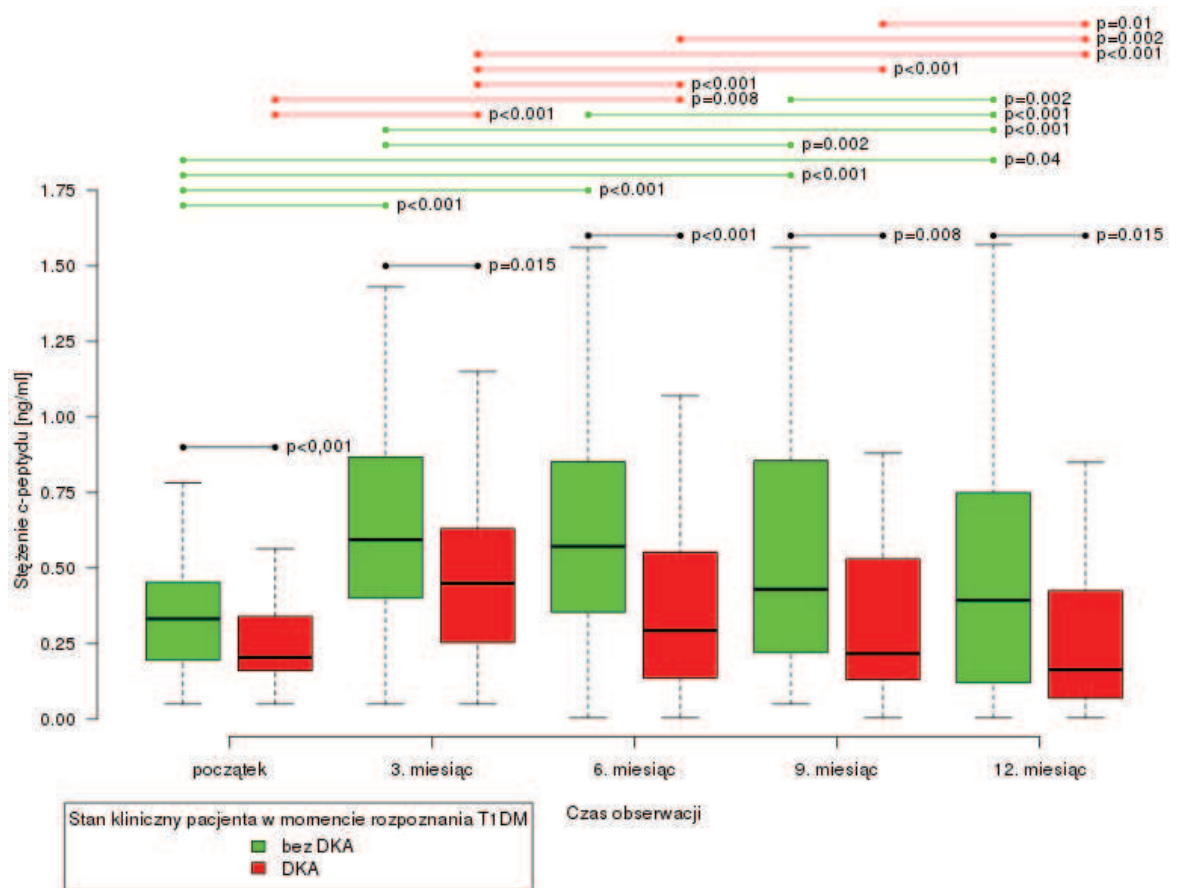
13.1.6. Ocena modulującego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na funkcję resztkową komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby

W grupie pacjentów bez istotnych zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej w momencie rozpoznania T1DM przez cały okres rocznej obserwacji wykazywano znamienne wyższe stężenia C-peptydu w odniesieniu do chorych, u których w okresie ujawniania się choroby doszło do rozwoju DKA (test Wilcoxon, początek choroby $p = 0,01$; 3 miesiąc choroby $p = 0,015$; 6 miesiąc choroby $p < 0,001$; 9 miesiąc choroby $p = 0,008$; 12 miesiąc choroby $p = 0,015$) (ryc.4.18).

Analiza porównawcza chorych z rozpoznaniem zespołu nakładania DKA-HHS w momencie zdiagnozowania T1DM z grupą pacjentów z rozpoznaniem DKA, jak również z chorymi, u których nie stwierdzano DKA na początku choroby, nie wykazała istotnych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu przez cały pierwszy rok trwania T1DM. Dodatkowo w analizowanej podgrupie obserwowane zmiany w dynamice utraty funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM pozostawały nieznamienne. (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon)

Ze względu na wystąpienie HHS w momencie diagnozy T1DM tylko u jednego z obserwowanych pacjentów, analiza porównawcza z grupami chorych, u których rozpoznano inne rodzaje zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, była niemożliwa.

Wśród chorych bez stwierdzonej DKA w momencie rozpoznania T1DM, po istotnym wzroście stężenia C-peptydu w 3 miesiącu od zachorowania, następnie aż do 9 miesiąca trwania choroby nie obserwowano znamienego zmniejszenia się resztkowej insulinosekrecji. Natomiast od 9 miesiąca obserwacji w tej grupie pacjentów dochodziło do istotnego ubytku funkcji resztkowej komórek β trzustki, w odniesieniu do maksymalnych wartości C-peptydu odnotowywanych w 3 miesiącu choroby. Jednocześnie w momencie zakończenia rocznej obserwacji stężenia C-peptydu u tych chorych pozostawały nadal znamienne wyższe w porównaniu z wartościami C-peptydu w momencie rozpoznania T1DM (ryc.4.18).



Rycina 4.18. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania choroby

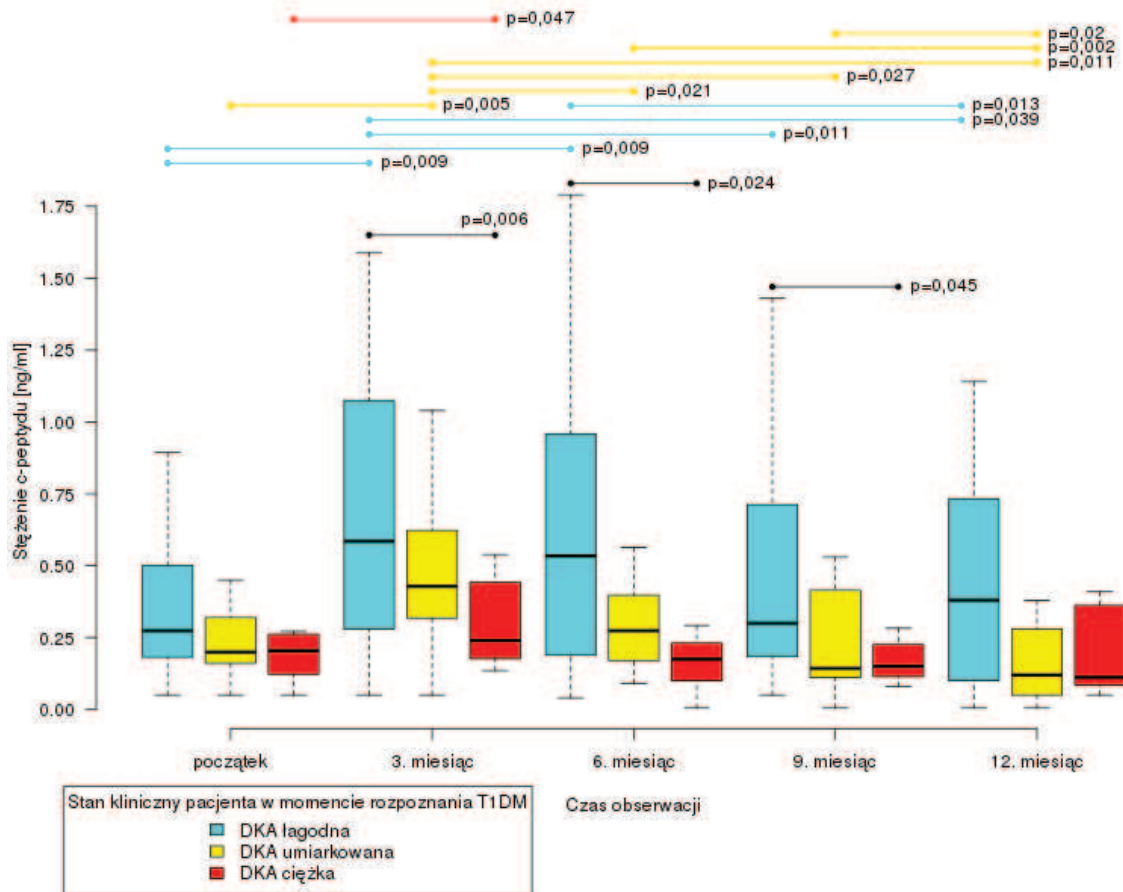
DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p < 0,05$)

Natomiast wśród pacjentów z rozpoznaną DKA w momencie diagnozy T1DM obserwowano szczególnie nasiloną utratę funkcji resztkowej komórek β trzustki. W tej grupie chorych po istotnym wzroście stężenia C-peptydu w 3 miesiącu obserwacji, następnie dochodziło dwukrotnie do znamiennego obniżenia się resztkowej insulinosekrecji: w 6, a następnie w 12 miesiącu choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 3 $p < 0,001$; 3 vs. 6 $p < 0,001$; 6 vs. 9 $p = 0,051$; 9 vs. 12 $p = 0,01$). Jednocześnie od 6 miesiąca trwania T1DM u tych pacjentów obserwowano istotny spadek stężeń C-peptydu w odniesieniu do maksymalnych wartości stwierdzanych w 3 miesiącu choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p < 0,001$; 3 vs. 9 $p < 0,001$; 3 vs. 12 $p < 0,001$), a od 9 miesiąca obserwacji rozkłady stężeń C-peptydu nie różniły się znamienne od wartości C-peptydu oznaczonych na początku choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 9 $p = 0,132$; 0 vs. 12 $p = 0,465$). (ryc.4.18)

Kolejna analiza dotyczyła tylko grupy pacjentów z rozpoznaną DKA w momencie diagnozy T1DM, po uwzględnieniu klasyfikacji stopnia ciężkości DKA według kryteriów ISPAD (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.2.1.2.1 str.38). Podczas niej stwierdzono występowanie znamienych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu w podgrupie chorych z łagodną i ciężką DKA od 3 do 9 miesiąca trwania T1DM (test Wilcozona, 3 miesiąc choroby $p = 0,006$; 6 miesiąc choroby $p = 0,024$; 9 miesiąc choroby $p = 0,045$) (ryc.4.19). Jednocześnie w obu podgrupach pacjentów rozkłady stężeń C-peptydu na początku choroby nie wykazywały istotnych różnic (test Wilcozona, $p = 0,096$; stężenie C-peptydu: chorzy z DKA łagodną mediana 0,274 ng/ml vs. chorzy z DKA ciężką mediana 0,205 ng/ml). W 3 miesiącu trwania T1DM stwierdzano

znamienny wzrost resztkowej insulinosekrecji w obu podgrupach (test Wilcozona, chorzy z DKA łagodną $p=0,009$; chorzy z DKA ciężką $p=0,047$), przy jednocześnie istotnie wyższych stężeniach C-peptydu u chorych z rozpoznaniem łagodnej DKA (test Wilcozona, $p=0,006$; stężenie C-peptydu 3 miesiąc choroby: chorzy z łagodną DKA mediana 0,585 ng/ml vs. chorzy z ciężką DKA 0,24 ng/ml). Natomiast w kolejnych miesiącach obserwacji, przy analizie każdej z obu podgrup pojedynczo, nie wykazywano już znamienych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu (test Wilcozona, grupa z łagodną DKA: miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,057$; 6 vs. 9 $p=0,084$; 9 vs. 12 $p=0,252$; grupa z ciężką DKA: miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,062$; 6 vs. 9 $p=0,422$; 9 vs. 12 $p=0,109$). (ryc.4.19)



Rycina 4.19. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM wśród pacjentów z rozpoznaną DKA na początku choroby, w zależności od stopnia ciężkości DKA (klasyfikacja według kryteriów ISPAD)

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

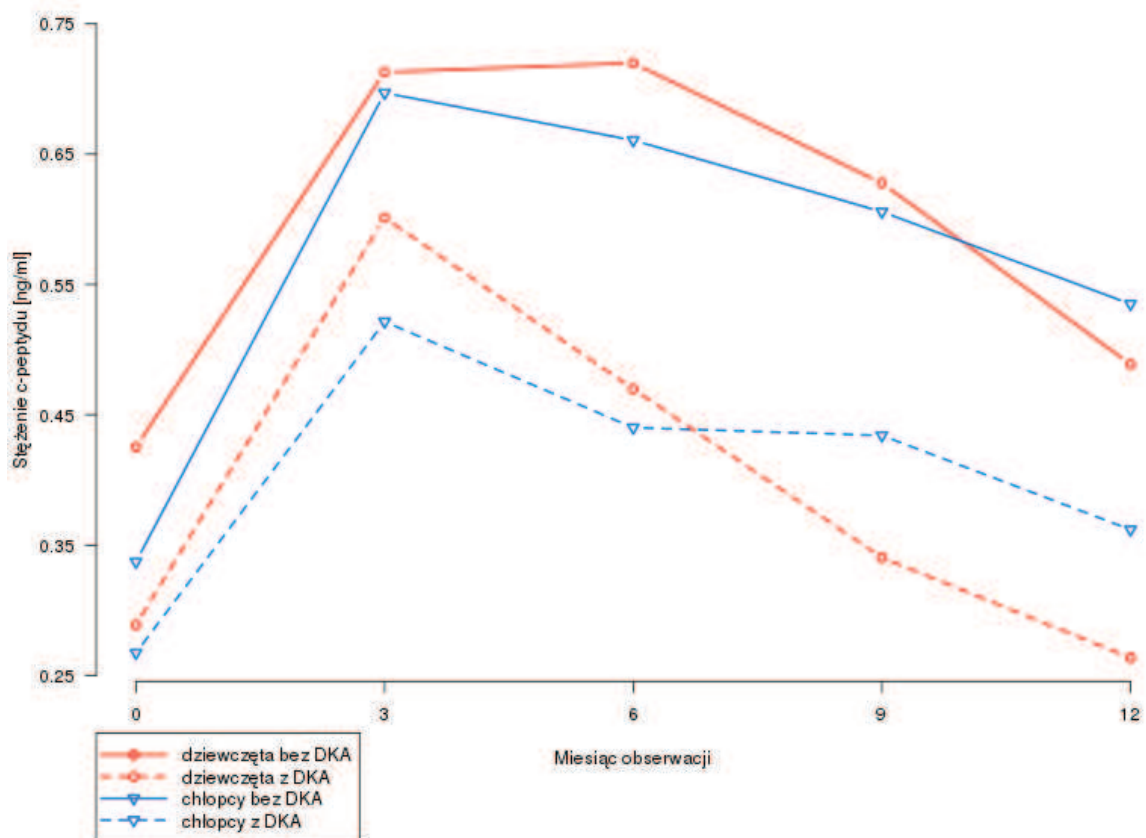
ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

Jednocześnie u pacjentów z ciężką DKA, pomimo znamienego wzrostu wartości stężeń C-peptydu w 3 miesiącu trwania T1DM, resztkowa insulinosekrecja utrzymywała się przez cały okres obserwacji na stałym poziomie, w zakresie stosunkowo niskich wartości stężeń C-peptydu (0,206 – 0,308 ng/ml) (ryc.4.19). Natomiast w podgrupie chorych z łagodną DKA do 6 miesiąca trwania T1DM stwierdzano utrzymywanie się istotnie wyższych wartości stężeń C-peptydu w odniesieniu do poziomów C-peptydu przy rozpoznaniu T1DM (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,009$), a znamienne obniżenie się wartości C-peptydu w porównaniu z maksymalnymi poziomami obserwowanymi w 3 miesiącu choroby następowało po 9 miesiącach od zachorowania (test Wilcozona, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,057$; 3 vs. 9 $p=0,011$; 3 vs. 12 $p=0,039$). (ryc.4.19)

13.1.7. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania a występowaniem DKA w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z płcią pacjenta

Od momentu rozpoznania T1DM do 9 miesiąca trwania obserwacji stwierdzano znamienne niższe stężenia C-peptydu u chłopców z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się choroby w porównaniu z wydzieleniem C-peptydu u dziewcząt z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA (test Wilcoxon, początek choroby $p < 0,001$; 3 miesiąc choroby $p = 0,011$; 6 miesiąc choroby $p = 0,003$; 9 miesiąc choroby $p = 0,049$). Od 9 miesiąca obserwacji stwierdzano również istotnie niższe wartości resztkowej insulinosekrecji u dziewcząt ze stwierdzoną DKA na początku choroby w odniesieniu do chłopców bez rozpoznanej DKA (test Wilcoxon, 9 miesiąc choroby $p = 0,037$; 12 miesiąc choroby $p = 0,023$). Powyższe różnic wyraźnie wykazały istnienie zróżnicowania czasowego w modulującym oddziaływaniu DKA na dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w obrębie każdej z płci: u chłopców – w 3-6 miesiącu trwania T1DM, natomiast u dziewczynek – w 9-12 miesiącu choroby. (ryc.4.20)



Rycina 4.20. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od płci chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania choroby

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

Celem czytelnego odzwierciedlenia zmian zachodzących w resztkowej insulinosekrecji podczas rocznej obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, na wykresie przedstawiono średnie stężenia C-peptydu, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w każdej z analizowanych podgrup. Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o nieparametryczny test Wilcoxon, porównując rozkłady stężeń C-peptydu i ich mediany (opis zależności umieszczono w tekście rozprawy).

U chłopców, u których doszło do rozwoju DKA w okresie ujawniania się choroby, stwierdzano znamienne niższy wzrost wydzielenia C-peptydu w 3 miesiącu trwania T1DM w odniesieniu do chłopców z

negatywnym wywiadem w kierunku DKA (test Wilcoxon, $p=0,022$; stężenie C-peptydu: chłopcy bez DKA mediana 0,514 ng/ml; chłopcy z DKA mediana 0,415 ng/ml). W obu podgrupach w 6 miesiącu obserwacji dochodziło do stopniowego, nie wykazującego cech znamienności obniżenia się resztkowej insulinosekrecji (test Wilcoxon, chłopcy bez DKA $p=0,409$; chłopcy z DKA $p=0,103$), przy czym nadal u chłopców z rozpoznaną DKA poziomy C-peptydu pozostawały istotnie niższe niż u chłopców bez DKA (test Wilcoxon, $p=0,004$; stężenie C-peptydu: chłopcy bez DKA mediana 0,394 ng/ml; chłopcy z DKA mediana 0,292 ng/ml). (ryc.4.20)

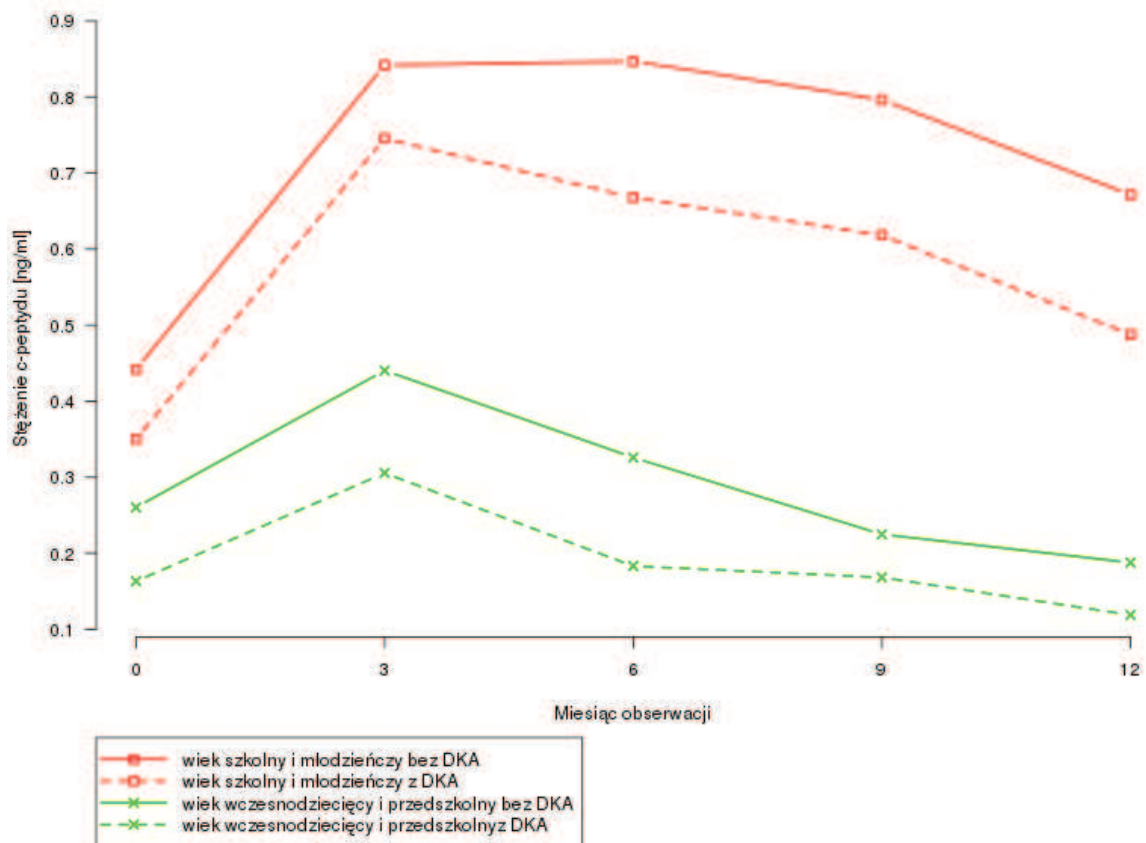
Natomiast u dziewcząt znamienne niższe stężenia C-peptydu w związku z dodatnim wywiadem w kierunku DKA w momencie rozpoznania T1DM obserwowano dopiero od 9 miesiąca choroby (test Wilcoxon, 9 miesiąc choroby $p=0,036$; stężenie C-peptydu: dziewczęta bez DKA mediana 0,431g/ml; dziewczęta z DKA mediana 0,17 ng/ml; 12 miesiąc choroby $p=0,024$; stężenie C-peptydu: dziewczęta bez DKA mediana 0,393 ng/ml; dziewczęta z DKA mediana 0,112 ng/ml), pomimo iż w obrębie każdej z podgrup stwierdzany zanik resztkowej insulinosekrecji był stopniowy i nie wykazywał cech istotności (test Wilcoxon, dziewczęta bez DKA: miesiąc choroby 6 vs.9 $p=0,109$, 9 vs. 12 $p=0,182$; dziewczęta z DKA: miesiąc choroby 6 vs.9 $p=0,177$, 9 vs. 12 $p=0,129$). (ryc.4.20)

13.1.8. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania a występowaniem DKA w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z wiekiem pacjenta

W badanej populacji jedynie w ciągu pierwszych 6 miesięcy trwania choroby obserwowano modulujące oddziaływanie układu dwóch zmiennych: DKA występującej w okresie ujawniania się T1DM – wiek pacjenta, na dynamikę zmian resztkowej insulinosekrecji.

Od momentu rozpoznania T1DM do 6 miesiąca obserwacji u chorych z młodszymi grupami wiekowymi (wiek wczesnodziecięcy + wiek przedszkolny), u których stwierdzono DKA w okresie ujawniania się choroby, wykazano znamienne niższe wartości C-peptydu w odniesieniu do pacjentów w tej samej kategorii wiekowej, z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA (test Wilcoxon, początek choroby $p=0,22$; 3 miesiąc choroby $p=0,014$; 6 miesiąc choroby $p=0,012$; stężenie C-peptydu na początku choroby: grupa bez DKA mediana 0,219 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,191 ng/ml). W obu analizowanych podgrupach chorych obserwowano istotny wzrost wydzielania C-peptydu w 3 miesiącu trwania T1DM (test Wilcoxon, grupa bez DKA $p=0,002$; stężenie C-peptydu mediana 0,401 ng/ml; grupa z DKA $p=0,038$; stężenie C-peptydu mediana 0,24 ng/ml), po czym jedynie w grupie ze stwierdzoną DKA w momencie diagnozy T1DM wykazany w 6 miesiącu zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki posiadał cechy istotności (test Wilcoxon, grupa bez DKA $p=0,052$; stężenie C-peptydu mediana 0,31 ng/ml; grupa z DKA $p=0,032$; stężenie C-peptydu mediana 0,116 ng/ml). (ryc.4.21)

Natomiast w starszych grupach wiekowych (wiek szkolny + wiek młodzieńczy) modulujące oddziaływanie DKA na dynamikę zmian resztkowej insulinosekrecji obserwowano w 6 miesiącu trwania T1DM (test Wilcoxon, $p=0,046$). Wówczas wśród pacjentów z pozytywnym wywiadem w kierunku DKA stwierdzano bardziej dynamiczny zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki w porównaniu z grupą chorych bez DKA w wywiadzie (stężenie C-peptydu w 3 miesiącu choroby: grupa bez DKA mediana 0,702 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,614 ng/ml; stężenie C-peptydu w 6 miesiącu choroby: grupa bez DKA mediana 0,667 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,535 ng/ml). Jednocześnie w obrębie każdej z analizowanych podgrup obniżenie się stężenia C-peptydu w 6 miesiącu pozostawało nieznamienne w odniesieniu do poziomów obserwowanych w 3 miesiącu trwania T1DM (test Wilcoxon, grupa bez DKA $p=0,453$; grupa z DKA $p=0,181$). (ryc.4.21)



Rycina 4.21. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od wieku chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania choroby

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

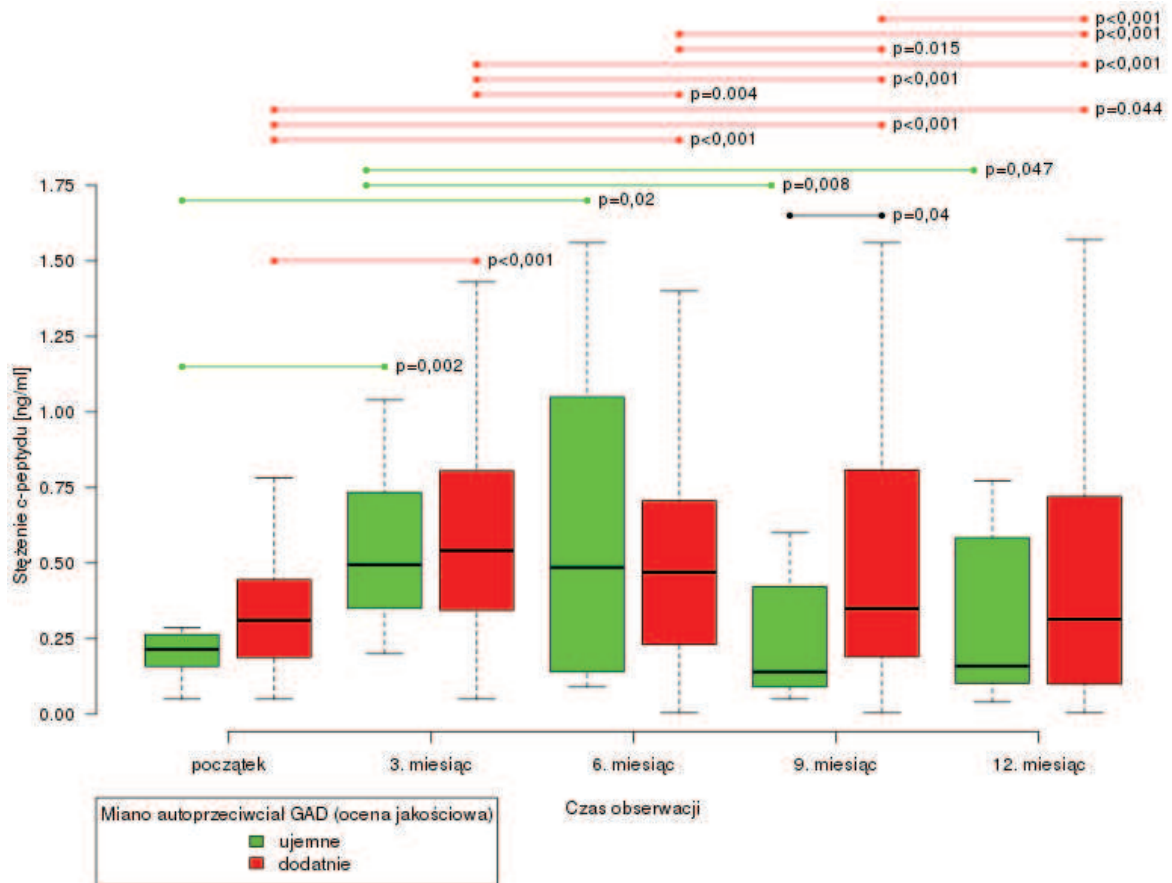
Celem czytelnego odzwierciedlenia zmian zachodzących w resztkowej insulinosекреkcji podczas rocznej obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, na wykresie przedstawiono średnie stężenia C-peptydu, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w każdej z analizowanych podgrup. Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o nieparametryczny test Wilcoxona, porównując rozkłady stężeń C-peptydu i ich mediany (opis zależności umieszczono w tekście rozprawy).

13.2. Ocena zależności pomiędzy aktywnością humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej a funkcją resztkową komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM

Analiza aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD) nie wykazała znamienych różnic w stężeniach C-peptydu na początku choroby w zależności od oceny jakościowej miana autoprzeciwciał GAD (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.6.3 str.68) (test Wilcoxona, $p=0,082$; stężenie C-peptydu u pacjentów z ujemnym mianem GAD: mediana 0,215 ng/ml; stężenie C-peptydu u chorych z dodatnim mianem GAD: mediana 0,311 ng/ml). Jednocześnie podczas dalszej rocznej obserwacji pacjentów, poza 9 miesiącem trwania T1DM, nadal nie stwierdzano istotnych różnic w stężeniach C-peptydu w powiązaniu z jakościową oceną miana autoprzeciwciał GAD (test Wilcoxona, 3 miesiąc choroby $p=0,48$; 6 miesiąc choroby $p=0,464$; 9 miesiąc choroby $p=0,04$; 12 miesiąc choroby $p=0,357$). (ryc.4.22)

W obu grupach pacjentów, z dodatnim, jak i ujemnym mianem autoprzeciwciał GAD, w 3 miesiącu trwania choroby dochodziło do znamienego wzrostu resztkowej insulinosекреkcji (test Wilcoxona, chorzy ujemnym mianem GAD: $p=0,002$, stężenie C-peptydu mediana 0,495 ng/ml; pacjenci z dodatnim mianem GAD: $p<0,001$; stężenie C-peptydu mediana 0,542 ng/ml). Następnie u chorych z dodatnim mianem

autoprzeciwciał GAD obserwowano stopniowy oraz znamieny zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki w kolejnych miesiącach trwania T1DM (test Wilcoxon, miesiąc choroby: 3 vs. 6 $p=0,004$; 6 vs. 9 $p=0,015$; 9 vs. 12 $p<0,001$), przy czym w 12 miesiącu choroby nadal stężenia C-peptydu pozostawały istotnie wyższe od stężeń stwierdzanych w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxon, $p=0,044$; stężenie C-peptydu mediana 0,314 ng/ml). Natomiast u pacjentów z ujemnym mianem autoprzeciwciał GAD, pomimo utrzymującej się do 6 miesiąca trwania T1DM stabilnej resztkowej insulinosekrecji (test Wilcoxon, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,188$), w 9 miesiącu dochodziło do gwałtownego zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki (test Wilcoxon, miesiąc choroby 6 vs. 9 $p=0,147$; 3 vs. 9 $p=0,008$), do poziomu porównywalnego z początkowym okresem choroby (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 9 $p=0,326$; stężenie C-peptydu w 9 miesiącu choroby mediana 0,14 ng/ml). (ryc.4.22)

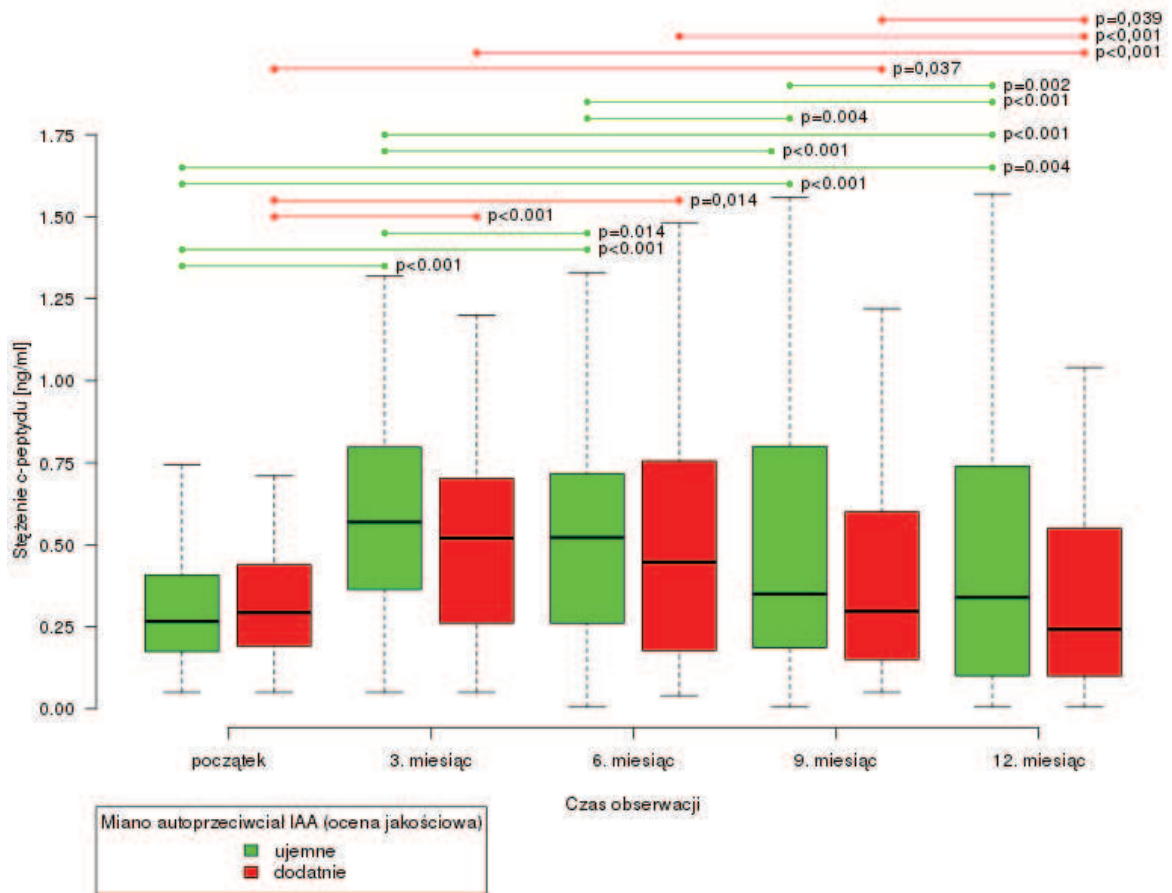


Rycina 4.22. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD

autoprzeciwciała GAD – autoprzeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego w klasie IgG
analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

Podczas analizy aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (IAA) nie stwierdzono znamienych różnic w stężeniach C-peptydu na początku choroby w zależności od oceny jakościowej miana autoprzeciwciał IAA (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.6.5 str.70) (test Wilcoxon, $p=0,374$; stężenie C-peptydu u pacjentów z ujemnym mianem IAA: mediana 0,266 ng/ml; stężenie C-peptydu u chorych z dodatnim mianem IAA: mediana 0,293 ng/ml). W kolejnych miesiącach rocznej obserwacji pacjentów również nie wykazano istotnych różnic w stężeniach C-peptydu pomiędzy grupą chorych z dodatnim mianem IAA oraz pacjentami z ujemną odpowiedzią humoralną

przeciw natywnej insulinie (test Wilcozona, 3 miesiąc choroby $p=0,185$; 6 miesiąc choroby $p=0,227$; 9 miesiąc choroby $p=0,435$; 12 miesiąc choroby $p=0,253$). (ryc.4.23)



Rycina 4.23. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw IAA

autoprzeciwciała IAA – autoprzeciwciała przeciwinulinowe w klasie IgG

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p < 0,05$)

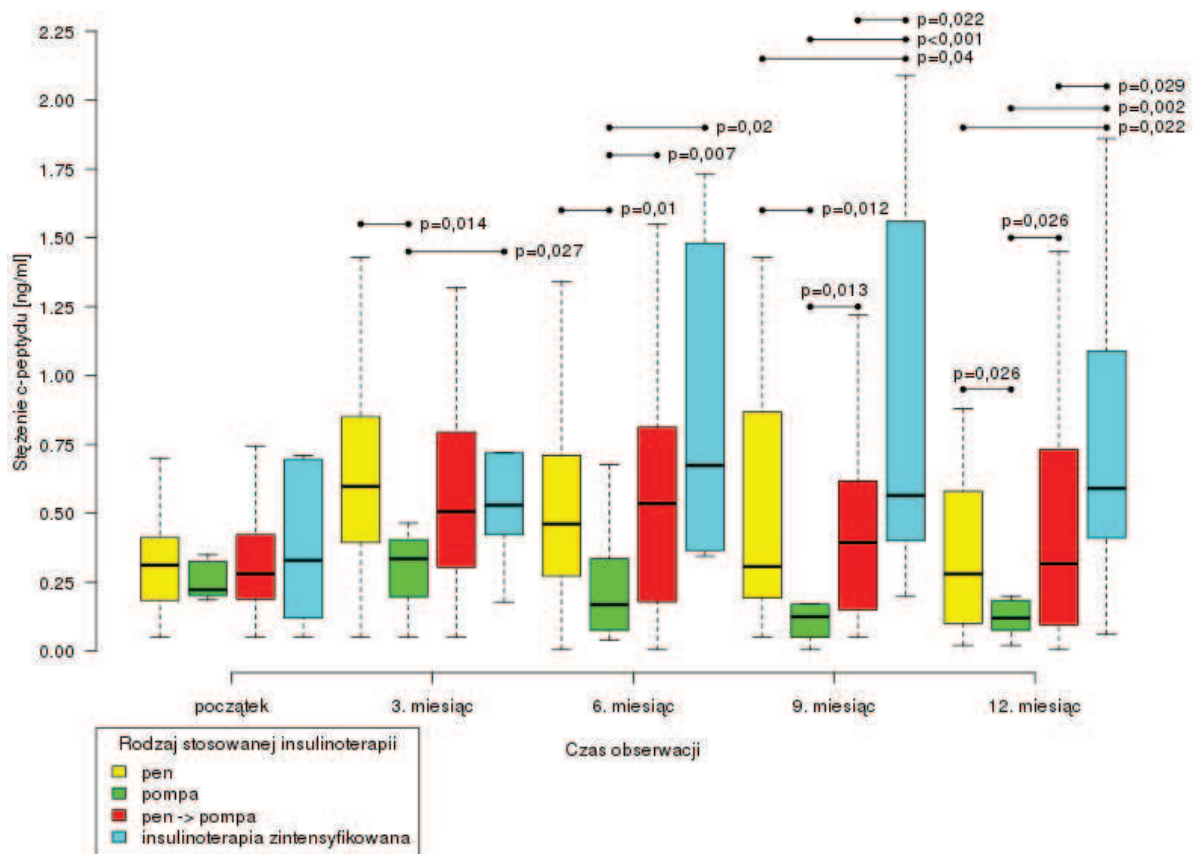
W 3 miesiącu trwania choroby, niezależnie od oceny jakościowej miana autoprzeciwciał IAA u pacjenta, obserwowano znamienne wzrost funkcji resztkowej komórek β trzustki (test Wilcozona, chorzy z ujemnym mianem IAA: $p < 0,001$, stężenie C-peptydu mediana 0,569 ng/ml; pacjenci z dodatnim mianem IAA: $p < 0,001$; stężenie C-peptydu mediana 0,52 ng/ml). Następnie u chorych z ujemnym mianem autoprzeciwciał IAA dochodziło do stopniowego i zmiennego zaniku resztkowej insulinosekrecji w kolejnych miesiącach trwania T1DM (test Wilcozona, miesiąc choroby: 3 vs. 6 $p=0,014$; 6 vs. 9 $p=0,004$; 9 vs. 12 $p=0,002$), przy czym w momencie zakończenia rocznej obserwacji stężenia C-peptydu utrzymywały się na istotnie wyższym poziomie w odniesieniu do stężeń stwierdzanych na początku choroby (test Wilcozona, $p=0,044$; stężenie C-peptydu mediana 0,339 ng/ml). (ryc.4.23) U pacjentów z dodatnim mianem autoprzeciwciał IAA nie stwierdzano istotnych różnic pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu od 3 do 9 miesiąca obserwacji (test Wilcozona, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,084$; 6 vs. 9 $p=0,078$; 3 vs. 9 $p=0,08$), ale w 12 miesiącu dochodziło do znaczącej utraty funkcji resztkowej komórek β trzustki (test Wilcozona, miesiąc choroby 9 vs. 12 $p=0,039$), do wartości porównywalnych z początkowym okresem choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 12 $p=0,274$; stężenie C-peptydu w 12 miesiącu choroby mediana 0,242 ng/ml). (ryc.4.23)

W dalszej analizie nie wykazano znamienych różnic pomiędzy stężeniami C-peptydu w grupie chorych z dodatnim mianem obu swoistych autooprzeciwciał (GAD oraz IAA) w porównaniu ze stężeniami C-peptydu obserwowanymi u pacjentów z dodatnim mianem jednego z autooprzeciwciał (GAD lub IAA) (ocena statystyczna przeprowadzona w oparciu o test Wilcozona).

W grupie chorych z izolowaną odpowiedzią przeciw antygenom wysp trzustki (ICA), przy ujemnym mianie autooprzeciwciał GAD oraz IAA, w 3 miesiącu trwania T1DM dochodziło do nieznamienego wzrostu stężenia C-peptydu (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 3 $p=0,062$; stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,2 ng/ml; 3 miesiąc choroby mediana 0,425 ng/ml), a w kolejnych miesiącach obserwacji stwierdzano stopniowy, niewykazujący cech istotności, zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki (test Wilcozona, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,25$; 6 vs. 9 $p=0,5$; 9 vs. 12 $p=0,125$).

13.3. Ocena potencjalnej zależności pomiędzy rodzajem prowadzonej insulinoterapii a dynamiką zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM

W momencie rozpoznania T1DM nie stwierdzano znamienych różnic pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu w zależności od rodzaju włączonej insulinoterapii (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.2.1.3 str.39), przy czym najwyższe średnie stężenia C-peptydu obserwowano wśród pacjentów leczonych za pomocą insulinoterapii zintensyfikowanej (mediana 0,622 ng/ml), a najniższe – u dzieci leczonych wyłącznie za pomocą osobistej pompy insulinowej (mediana 0,222 ng/ml). (ryc.4.24)



Rycina 4.24. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od rodzaju stosowanej insulinoterapii

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

U pacjentów leczonych wyłącznie za pomocą osobistej pompy insulinowej w okresie rocznej obserwacji chorych odnotowywano istotnie niższe stężenia C-peptydu w odniesieniu do grupy leczonej intensywnie z wykorzystaniem wyłącznie penów (test Wilcoxon, 3 miesiąc choroby $p=0,014$; 6 miesiąc choroby $p=0,01$; 9 miesiąc choroby $p=0,012$; 12 miesiąc choroby $p=0,026$), jak również przy porównaniu z grupą pacjentów leczonych za pomocą insulinoterapii zintensyfikowanej (test Wilcoxon, 3 miesiąc choroby $p=0,027$; 6 miesiąc choroby $p=0,002$; 9 miesiąc choroby $p<0,001$; 12 miesiąc choroby $p=0,002$). Od 6 do 12 miesiąca obserwacji stwierdzano dodatkowo występowanie istotnych różnic pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu wśród pacjentów leczonych wyłącznie za pomocą osobistej pompy insulinowej i w grupie leczonej intensywnie początkowo za pomocą penów, a następnie za pomocą osobistej pompy insulinowej (test Wilcoxon, 6 miesiąc choroby $p=0,007$; 9 miesiąc choroby $p=0,013$; 12 miesiąc choroby $p=0,026$). (ryc.4.24)

W ciągu rocznej obserwacji nie wykazano natomiast istotnych różnic w dynamice zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki pomiędzy grupą chorych leczonych intensywnie wyłącznie za pomocą penów oraz pacjentów leczonych intensywnie w sposób sekwencyjny – początkowo za pomocą penów, a następnie za pomocą osobistej pompy insulinowej (test Wilcoxon, 3 miesiąc choroby $p=0,1$; 6 miesiąc choroby $p=0,444$; 9 miesiąc choroby $p=0,361$; 12 miesiąc choroby $p=0,447$). (ryc.4.24)

W grupie pacjentów leczonych intensywnie wyłącznie za pomocą penów, po znamienym wzroście stężenia C-peptydu w 3 miesiącu choroby, do najwyższych wartości obserwowanych w tej grupie w pierwszym roku trwania T1DM (test Wilcoxon, $p<0,001$; stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,312 ng/ml; 3 miesiąc choroby 0,598 ng/ml), stwierdzano następnie stopniowy, istotny zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki (test Wilcoxon, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,014$; 6 vs. 9 $p=0,037$). Odnotowywane pomiędzy 6 a 12 miesiącem obserwacji stężenia C-peptydu pozostawały istotnie niższe w porównaniu do maksymalnych poziomów stwierdzanych w 3 miesiącu trwania T1DM (test Wilcoxon, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,014$; 3 vs. 9 $p=0,003$; 3 vs. 12 $p<0,001$), a jednocześnie dopiero od 12 miesiąca choroby obniżały się do wartości porównywalnych z poziomami oznaczonymi w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p<0,001$; 0 vs. 9 $p=0,007$; 0 vs. 12 $p=0,168$; stężenie C-peptydu 12 miesiąc choroby mediana 0,28 ng/ml). (ryc.4.24)

Zbliżoną dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki obserwowano wśród pacjentów leczonych intensywnie w sposób sekwencyjny – początkowo za pomocą penów, a następnie za pomocą osobistej pompy insulinowej. W tej grupie stężenia C-peptydu w 3 i 6 miesiącu trwania T1DM były porównywalne (test Wilcoxon, $p=0,193$) i odpowiadały maksymalnym wartościom C-peptydu oznaczonym wśród tych chorych podczas całorocznej obserwacji (stężenie C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,506 ng/ml; 6 miesiąc choroby mediana 0,535 ng/ml). Od 6 miesiąca w analizowanej grupie dochodziło do stopniowego i znamienego zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki (test Wilcoxon, miesiąc choroby 6 vs. 9 $p=0,021$; 9 vs. 12 $p<0,001$), ale stężenia C-peptydu obserwowane w 12 miesiącu trwania T1DM pozostawały nadal istotnie wyższe od wartości oznaczonych w momencie rozpoznania choroby (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p<0,001$; 0 vs. 9 $p=0,004$; 0 vs. 12 $p=0,034$; stężenie C-peptydu: 12 miesiąc choroby 0,317 ng/ml). (ryc.4.24)

Wśród chorych leczonych intensywnie wyłącznie za pomocą osobistej pompy insulinowej, po nieistotnym wzroście stężenia C-peptydu w 3 miesiącu obserwacji (test Wilcoxon, $p=0,125$), do maksymalnych wartości stwierdzanych podczas całorocznej obserwacji (stężenie C-peptydu 3 miesiąc choroby mediana 0,335 ng/ml), następował stopniowy, nieznamienny zanik resztkowej insulinosekrecji w kolejnych miesiącach trwania T1DM (test Wilcoxon, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,078$; 6 vs. 9 $p=0,295$; 9 vs. 12 $p=0,14$). (ryc.4.24)

Zupełnie odmienna dynamika zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki występowała w grupie początkowo leczonej za pomocą zintensyfikowanej insulinoterapii. Po istotnym wzroście stężenia

C-peptydu w 3 miesiącu choroby (test Wilcoxon, $p=0,011$; stężenie C-peptydu 3 miesiąc choroby mediana 0,529 ng/ml), następnie do 6 miesiąca trwania T1DM obserwowano dalszy, choć niezamienny wzrost resztkowej insulinosekrecji (test Wilcoxon, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,148$; stężenie C-peptydu 6 miesiąc choroby mediana 0,674 ng/ml). Pomiędzy 6 a 12 miesiącem choroby w analizowanej grupie dochodziło do nieistotnego obniżenia się stężenia C-peptydu (test Wilcoxon, miesiąc choroby 6 vs. 9 $p=0,445$; 9 vs. 12 $p=0,323$; stężenie C-peptydu: 9 miesiąc choroby mediana 0,565 ng/ml; 12 miesiąc choroby mediana 0,59 ng/ml). Jednocześnie od 12 miesiąca trwania T1DM nie stwierdzano istotnych różnic pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu w odniesieniu do momentu rozpoznania choroby (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,034$; 0 vs. 9 $p=0,04$; 0 vs. 12 $p=0,156$). (ryc.4.24)

13.4. Ocena potencjalnego wpływu poziomu edukacji pacjenta/opiekunów chorego na temat choroby na funkcję resztkową komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby

Pacjentów biorących udział w badaniu w zależności od poziomu edukacji na temat choroby kwalifikowano do 4 grup (poziom wiedzy bardzo dobry, dobry, zadowalający, niezadowalający), zgodnie z kryteriami oceny badania ankietowego przedstawionymi w punkcie 2.1.6.1 rozdziału *Materiały i metody* (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.2.1.6.1 str.42).

Podczas rocznej obserwacji pacjentów nie wykazano znamienych różnic pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu w zależności od stopnia edukacji chorego/ opiekunów na temat T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

13.5. Ocena potencjalnego związku wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby

13.5.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby

W momencie rozpoznania T1DM, jak również przez cały okres rocznej obserwacji nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu w zależności od rodzaju genotypu polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* (genotypy AA, AG, GG) (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon). Dalsza analiza, z uwzględnieniem stratyfikacji genotypów co do ryzyka rozwoju T1DM (genotyp o niskim ryzyku rozwoju T1DM – AA; genotypy związane z podwyższonym ryzykiem wystąpienia T1DM – GG oraz AG), również nie wykazała istotnych różnic pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu w pierwszym roku trwania choroby (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

Jednocześnie u pacjentów posiadających genotyp *CTLA-4* c.49AA, jak również w grupie chorych z genotypami związanymi z wyższym ryzykiem rozwoju T1DM – *CTLA-4* c.49GG oraz *CTLA-4* c.49AG, stwierdzono podobną dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β w pierwszym roku trwania choroby. W obu grupach w 3 miesiącu choroby obserwowano typowy, znamieny wzrost resztkowej insulinosekrecji (test Wilcoxon $p<0,001$; genotyp *CTLA-4* c.49AA – stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,215 ng/ml; 3 miesiąc choroby mediana 0,52 ng/ml; genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG – stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,314 ng/ml; 3 miesiąc choroby mediana 0,552 ng/ml). W kolejnych miesiącach trwania T1DM postępował stopniowy, ale nie wykazujący cech istotności, zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon), prowadzący w każdej z analizowanych grup do znamienego obniżenia się resztkowej insulinosekrecji w 9 miesiącu w odniesieniu do maksymalnego wydzielania stwierdzanego w 3 miesiącu choroby (test Wilcoxon, genotyp *CTLA-4* c.49AA: miesiąc choroby 3 vs. 9 $p=0,047$; stężenie C-peptydu w 9 miesiącu choroby mediana 0,35 ng/ml; genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG: miesiąc choroby 3 vs. 9 $p=0,005$; stężenie C-peptydu w 9 miesiącu choroby mediana 0,34 ng/ml). Jednocześnie w obu grupach pacjentów od 9

miesiąca trwania choroby rozkłady stężeń C-peptydu były porównywalne z poziomami C-peptydu stwierdzanymi w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxon, genotyp *CTLA-4* c.49AA $p=0,21$; genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG $p=0,066$).

13.5.1.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, z uwzględnieniem płci i wieku pacjenta

Analiza potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM, z uwzględnieniem płci i wieku pacjenta, nie wykazała modulującego oddziaływania badanego polimorfizmu genetycznego na resztkową insulinosekrecję podczas rocznej obserwacji chorych (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

13.5.1.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, z uwzględnieniem występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM

Przez cały okres rocznej obserwacji, w obrębie poszczególnych grup osób o tym samym genotypie polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* nie wykazano znamienych różnic pomiędzy stężeniami C-peptydu, w zależności od występowania DKA w okresie ujawniania się choroby (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

Natomiast podczas analizy przeprowadzonej wyłącznie wśród pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, obserwowano znamienne różnice w rozkładach stężeń C-peptydu w początkowym okresie trwania T1DM w zależności od genotypu polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju choroby (test Wilcoxon, początek choroby $p=0,032$). Powyższa zależność wykazywała cechy znamienności również w okresie od 6 do 12 miesiąca trwania choroby (test Wilcoxon, 6 miesiąc choroby $p<0,001$; 9 miesiąc choroby $p=0,008$; 12 miesiąc choroby $p=0,007$). Paradoksalnie istotnie mniejsze wydzielanie C-peptydu w poszczególnych punktach czasowych stwierdzano w podgrupie pacjentów będących homozygotami AA badanego polimorfizmu (stężenie C-peptydu w grupie bez DKA początek choroby: genotyp *CTLA-4* c.49AA mediana 0,214 ng/ml; genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 0,336 ng/ml; 12 miesiąc trwania T1DM: genotyp *CTLA-4* c.49AA mediana 0,16 ng/ml; genotypy *CTLA-4* c.49GG+AG mediana 0,433 ng/ml).

13.5.1.3. Dynamika zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* - DKA w momencie rozpoznania T1DM - płęć/

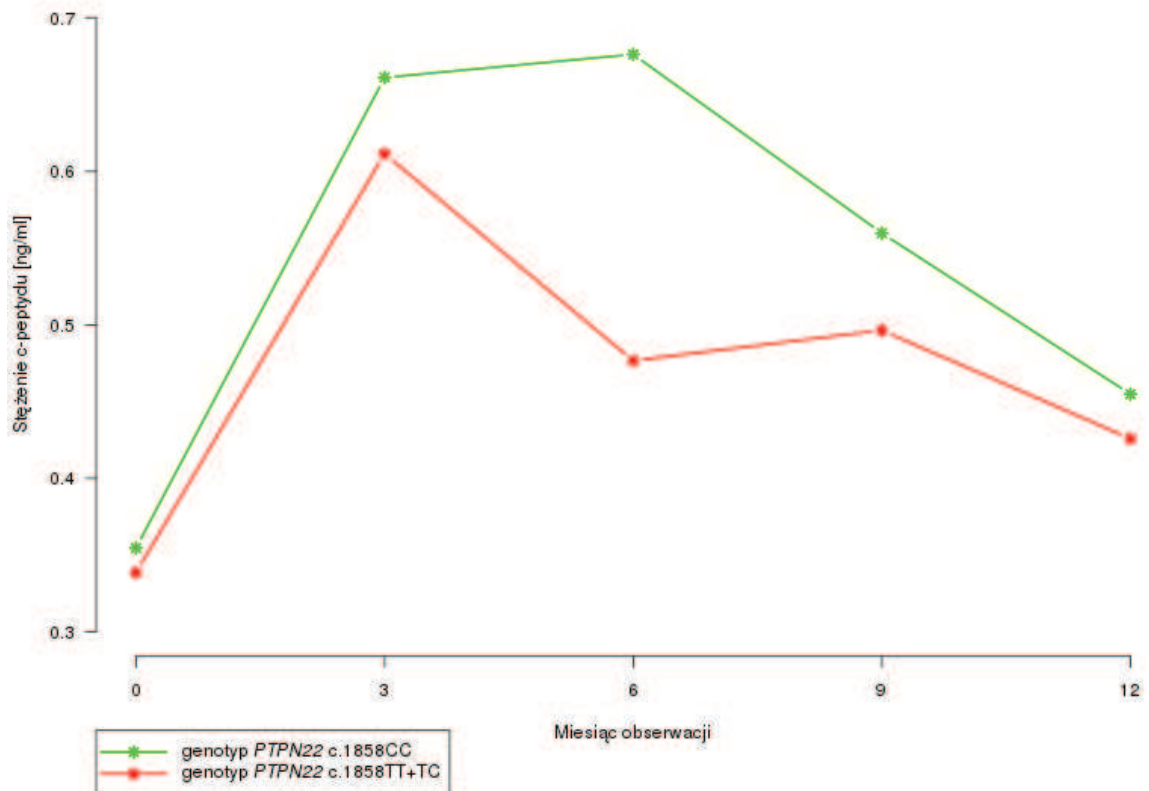
W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem płci na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (\rightarrow Wyniki pkt. 11.1 str.93), przeprowadzono kolejną analizę – dotyczącą potencjalnego oddziaływania powyższego układu trzech zmiennych na dynamikę zmian resztkowej insulinosekrecji w pierwszym roku trwania T1DM. Powyższa ocena nie potwierdziła modulującego wpływu badanego układu strukturalnego na dynamikę zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki podczas rocznej obserwacji pacjentów (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

13.5.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby

W momencie rozpoznania T1DM, jak i w kolejnych miesiącach trwania choroby, nie obserwowano znamienych różnic pomiędzy rozkładami stężenia C-peptydu w grupach pacjentów posiadających

poszczególne genotypy (CC, TC, TT) polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona).

W dalszej analizie, uwzględniającej stratyfikację genotypów badanego polimorfizmu co do ryzyka rozwoju T1DM (genotyp związany z niskim ryzykiem rozwoju T1DM – CC; genotypy związane z podwyższonym ryzykiem wystąpienia T1DM – TT oraz TC), wykazano znamiennej różnicę pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu w 6 miesiącu trwania T1DM w zależności od występowania u chorego podwójnej dawki allelu C (test Wilcozona, $p=0,046$; stężenie C-peptydu: genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,484 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,442 ng/ml) (ryc.4.25).



Rycina 4.25. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM

Celem czytelnego odzwierciedlenia zmian zachodzących w resztkowej insulinosekrecji podczas rocznej obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, na wykresie przedstawiono średnie stężenia C-peptydu, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w każdej z analizowanych podgrup. Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o nieparametryczny test Wilcozona, porównując rozkłady stężeń C-peptydu i ich mediany (opis zależności umieszczono w tekście rozprawy).

Jednocześnie u pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC obserwowano odmienną dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w porównaniu z grupą chorych, u których stwierdzono występowanie genotypów związanych z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858TT+TC) (ryc.4.25).

W obu podgrupach chorych w 3 miesiącu trwania T1DM dochodziło do typowego, istotnego wzrostu wydzielania C-peptydu (test Wilcozona, $p<0,001$ dla obu analizowanych grup). Następnie u osób posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC okres maksymalnej resztkowej insulinosekrecji ulegał przedłużeniu do 6 miesiąca obserwacji (test Wilcozona, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,32$; stężenie

C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,53 ng/ml; 6 miesiąc choroby mediana 0,484 ng/ml), po czym dochodziło do stopniowego, niewykazującego cech istotności, obniżenia się poziomu C-peptydu (test Wilcoxon, miesiąc choroby 6 vs. 9 $p=0,064$; miesiąc choroby 9 vs. 12 $p=0,061$). Stężenia C-peptydu porównywalne z wartościami notowanymi na początku choroby w tej podgrupie pacjentów stwierdzano dopiero w 12 miesiącu trwania obserwacji (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 12 $p=0,478$; stężenie C-peptydu: 12 miesiąc choroby mediana 0,252 ng/ml). (ryc.4.25)

Natomiast wśród chorych posiadających genotypy związane z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858TT+TC), w 6 miesiącu trwania T1DM obserwowano znamienne obniżenie się resztkowej insulinosekrecji (test Wilcoxon, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,038$; stężenie C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,558 ng/ml; 6 miesiąc choroby mediana 0,442 ng/ml), a stężenia C-peptydu porównywalne z poziomami wykazanymi na początku choroby stwierdzano już od 9 miesiąca trwania obserwacji (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 9 $p=0,218$; stężenie C-peptydu: 9 miesiąc choroby mediana 0,314 ng/ml). (ryc.4.25)

13.5.2.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, w powiązaniu z występowaniem DKA w momencie rozpoznania T1DM

W momencie rozpoznania T1DM wykazano znamienne różnice w poziomach C-peptydu, w zależności od występowania DKA, jedynie wśród pacjentów posiadających genotypy o podwyższonym ryzyku rozwoju T1DM – *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (test Wilcoxon $p=0,025$; stężenie C-peptydu: pacjenci bez DKA mediana 0,359 ng/ml; chorzy z DKA mediana 0,214 ng/ml). Podobnych różnic w wartościach resztkowej insulinosekrecji na początku choroby nie obserwowano w grupie chorych będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu (test Wilcoxon $p=0,096$; stężenia C-peptydu: pacjenci bez DKA mediana 0,32 ng/ml; chorzy z DKA mediana 0,202 ng/ml). (ryc.4.26)

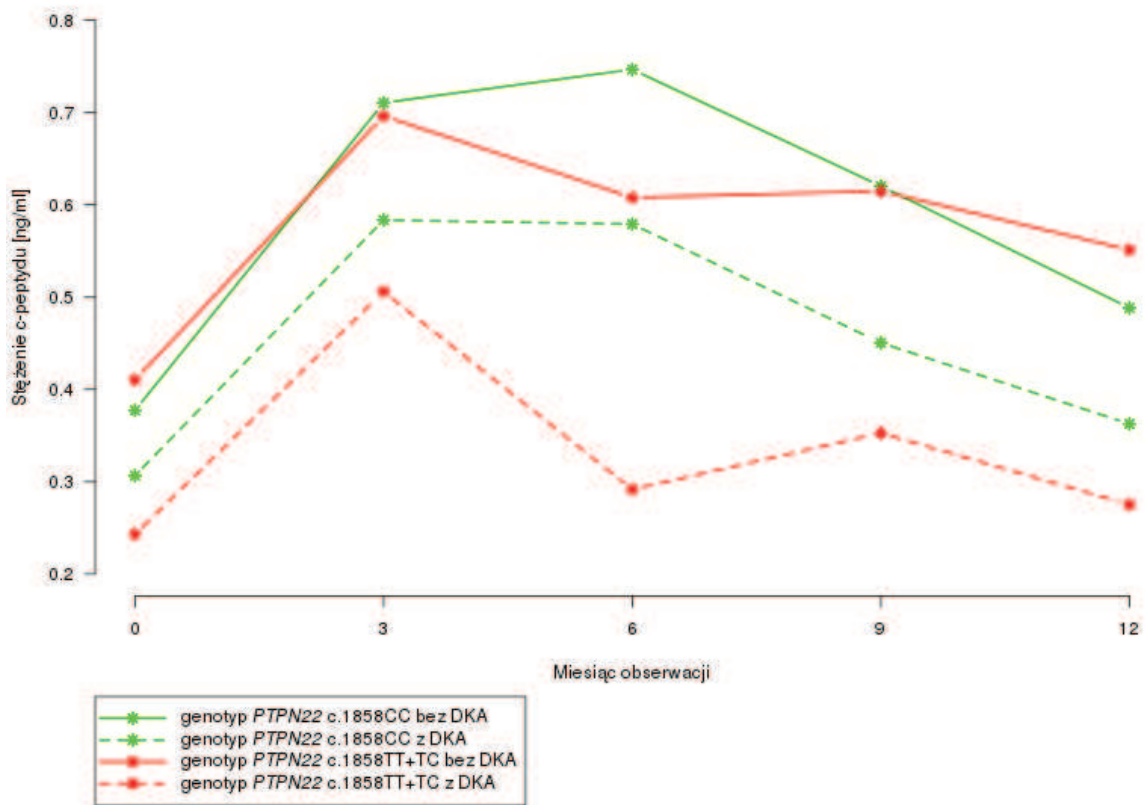
W 3 miesiącu choroby we wszystkich analizowanych grupach dochodziło do typowego i znamienego wzrostu stężenia C-peptydu, przy czym najwyższe poziomy C-peptydu stwierdzono wśród pacjentów, u których nie obserwowano DKA w momencie rozpoznania T1DM, niezależnie od posiadanego genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* (test Wilcoxon, pacjenci bez DKA: *PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TT+TC $p=0,399$). Jednocześnie wśród chorych z genotypem *PTPN22* c.1858CC wykazano istotne różnice w wartościach resztkowej insulinosekrecji w zależności od obciążonego wywiadu w kierunku DKA (test Wilcoxon $p=0,049$; stężenie C-peptydu: chorzy bez DKA mediana 0,58 ng/ml; pacjenci z DKA mediana 0,448 ng/ml). Natomiast w przypadku pacjentów z grupy zwiększonego ryzyka genetycznego powyższe różnice w wydzielaniu C-peptydu pozostawały nieznamienne (test Wilcoxon $p=0,076$; stężenie C-peptydu: chorzy bez DKA mediana 0,637 ng/ml; pacjenci z DKA mediana 0,485 ng/ml). (ryc.4.26)

W 6 miesiącu trwania choroby w badanej populacji znamieny zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki obserwowano jedynie wśród chorych z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, należących do grupy podwyższonego ryzyka genetycznego (*PTPN22* c.1858TT+TC) (test Wilcoxon $p=0,025$; stężenie C-peptydu mediana 0,242 ng/ml), co powodowało wystąpienie istotnych różnic w wydzielaniu C-peptydu w porównaniu z chorymi o genotypie *PTPN22* c.1858CC, u których również rozpoznano DKA w okresie ujawniania się T1DM (test Wilcoxon $p=0,004$; stężenie C-peptydu mediana 0,372 ng/ml). (ryc.4.26)

W tym samym okresie choroby najkorzystniejszą dynamikę zmian resztkowej insulinosekrecji obserwowano u pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu. W tej podgrupie chorych stwierdzano jedynie minimalne obniżenie się wartości C-peptydu w stosunku do poziomu stwierdzanego w 3 miesiącu trwania T1DM (test Wilcoxon $p=0,427$; stężenie C-peptydu mediana 0,535 ng/ml). (ryc.4.26)

W kolejnych miesiącach trwania choroby wykazano dalsze utrzymywanie się znamienne niższych stężeń C-peptydu u pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA i należących do grupy

podwyższonego ryzyka genetycznego (test Wilcoxona, 9 miesiąc choroby $p=0,005$; 12 miesiąc choroby $p=0,009$). Natomiast w tym samym okresie obserwacji, wśród chorych posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC nie stwierdzano istotnych różnic w zależności od występowania DKA w momencie diagnozy T1DM (test Wilcoxona, 9 miesiąc choroby $p=0,2$; 12 miesiąc choroby $p=0,207$). (ryc.4.26)



Rycina 4.26. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

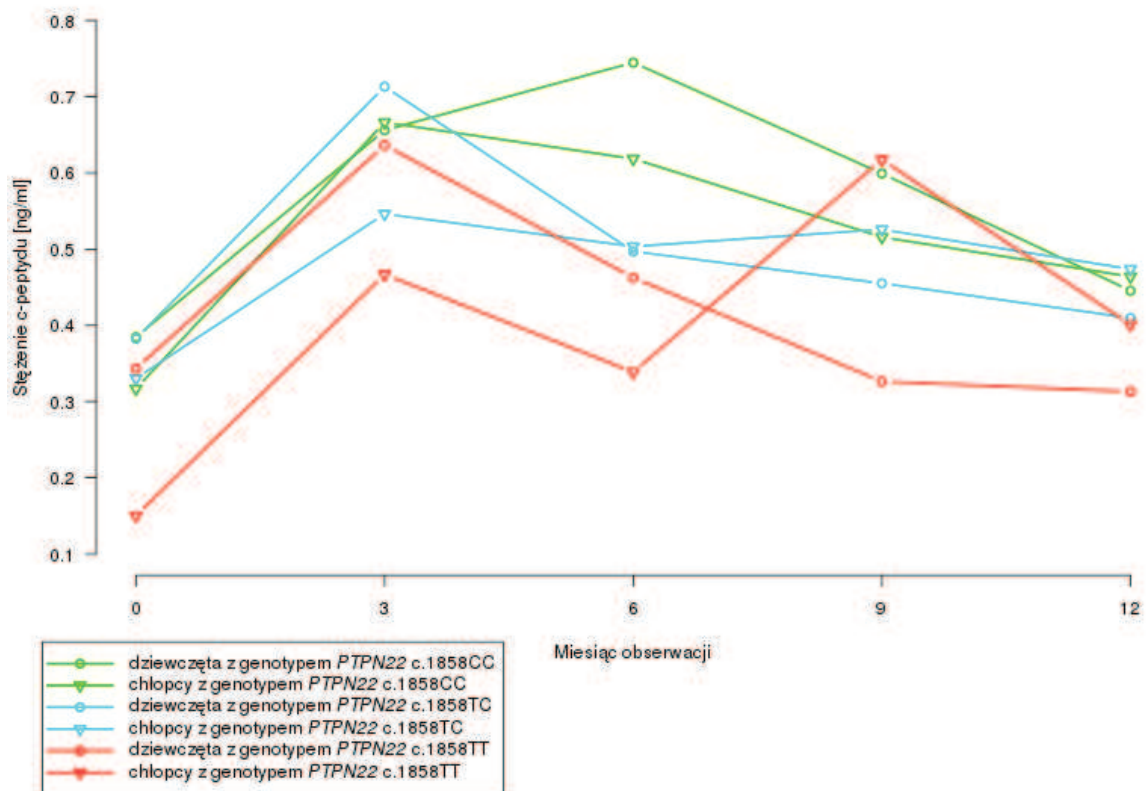
Celem czytelnego odzwierciedlenia zmian zachodzących w resztkowej insulinosekrecji podczas rocznej obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, na wykresie przedstawiono średnie stężenia C-peptydu, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w każdej z analizowanych podgrup. Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o nieparametryczny test Wilcoxona, porównując rozkłady stężeń C-peptydu i ich mediany (opis zależności umieszczono w tekście rozprawy).

13.5.2.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, w powiązaniu z płcią pacjenta

Analiza związku pomiędzy poszczególnymi genotypami (CC, TC, TT) polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* a funkcją resztkową komórek β trzustki w momencie rozpoznania choroby, w powiązaniu z płcią pacjenta, wykazała istotnie niższe stężenia C-peptydu u chłopców w grupie pacjentów będących homozygotami TT (test Wilcoxona $p=0,029$; stężenie C-peptydu: chłopcy mediana 0,195 ng/ml; dziewczęta mediana 0,336 ng/ml). W przypadku pozostałych genotypów – CC oraz TC, nie stwierdzono znamienych różnic w poziomach C-peptydu na początku choroby pomiędzy chłopcami i dziewczętami (test Wilcoxona, genotyp *PTPN22* c.1858CC $p=0,058$; genotyp *PTPN22* c.1858TC $p=0,352$). (ryc.4.27)

W kolejnych miesiącach rocznej obserwacji chorych nie wykazano istotnych różnic w dynamice zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, w powiązaniu z płcią pacjenta (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona). (ryc.4.27)

Jednocześnie podczas analizy zmian resztkowej insulinosekrecji w pierwszym roku trwania T1DM w poszczególnych układach genotyp polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – płęć, u dziewcząt posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC zaobserwowano przedłużony aż do 6 miesiąca obserwacji wzrost stężenia C-peptydu, niewykazujący cech znamienności w stosunku do poziomu C-peptydu odnotowanego w 3 miesiącu trwania choroby (test Wilcozona, $p=0,484$; stężenie C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,536 ng/ml; 6 miesiąc choroby mediana 0,548 ng/ml). W tym samym okresie trwania choroby w pozostałych podgrupach stwierdzano stabilizację (chłopcy będący heterozygotami TC analizowanego polimorfizmu) lub niewykazujący cech istotności zanik resztkowej insulinosekrecji (pozostałe z ocenianych podgrup) (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona). (ryc.4.27)



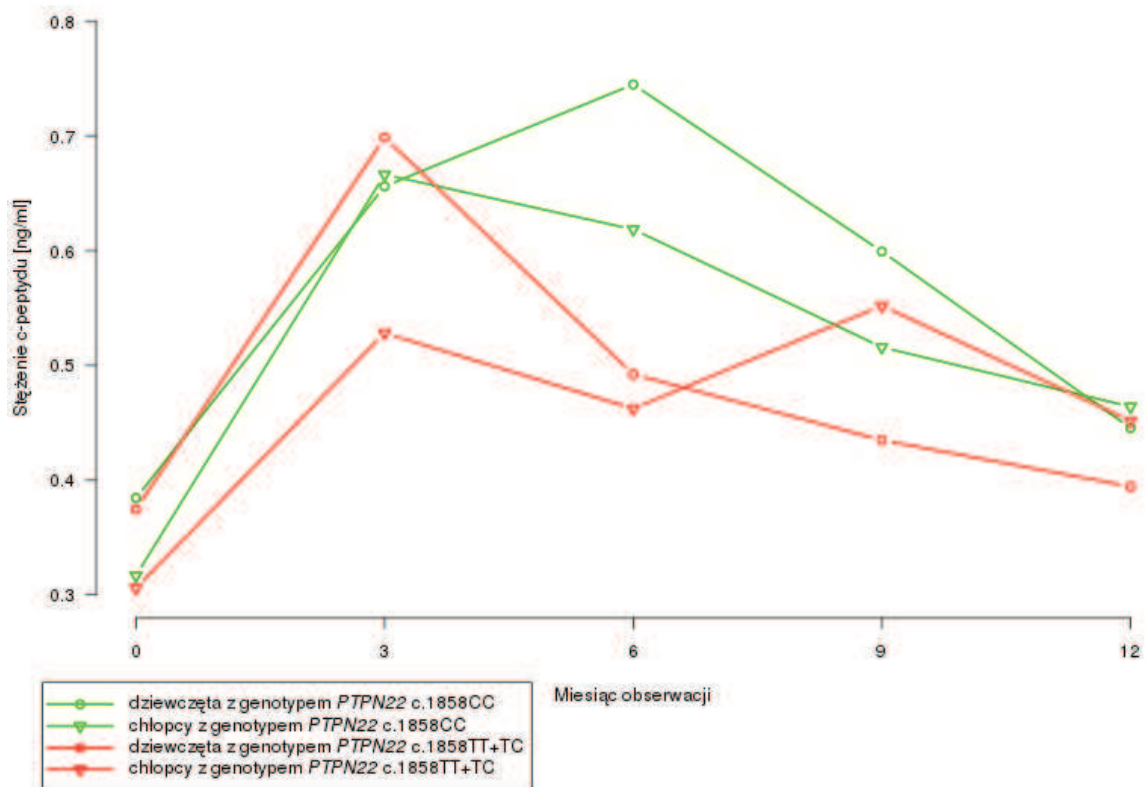
Rycina 4.27. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, w powiązaniu z płcią chorego

Celem czytelnego odzwierciedlenia zmian zachodzących w resztkowej insulinosekrecji podczas rocznej obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, na wykresie przedstawiono średnie stężenia C-peptydu, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w każdej z analizowanych podgrup. Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o nieparametryczny test Wilcozona, porównując rozkłady stężeń C-peptydu i ich mediany (opis zależności umieszczono w tekście rozprawy).

Dalsza analiza dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β w pierwszym roku trwania choroby w układach genotyp polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – płęć, uwzględniających stratyfikację genotypów co do ryzyka rozwoju T1DM, wykazała w momencie rozpoznania T1DM bardzo wyraźne

pogrupowanie pacjentów na: grupę chłopców, u których niezależnie od rodzaju genotypu (CC lub TT+TC) obserwowano prawie identyczne rozkłady stężenia C-peptydu z medianą rzędu 0,21 ng/ml oraz grupę dziewczynek, w której również, niezależnie od rodzaju genotypu (CC lub TT+TC), rozkłady stężeń C-peptydu pozostawały zbliżone, z medianą o wartości w granicach 0,31 – 0,32 ng/ml. Tak wyraźne grupowanie stężeń C-peptydu na początku choroby ze względu na płeć pacjenta obserwowano jedynie podczas analizy rozkładów stężeń C-peptydu przeprowadzonej dla całej badanej populacji (→ Wyniki pkt.13.1.1 str.115). (ryc.4.28)

Kontynuując powyższą analizę w poszczególnych układach, w 6 miesiącu trwania T1DM stwierdzono zmiennie wyższe stężeniach C-peptydu u dziewczynek będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu (podwójna dawka allelu C związanego z niskim ryzykiem rozwoju T1DM) w odniesieniu do chłopców posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (genotypy o podwyższonym ryzyku rozwoju T1DM) (test Wilcoxon, $p=0,039$; stężenie C-peptydu: dziewczęta o genotypie *PTPN22* c.1858CC mediana 0,548 ng/ml; chłopcy o genotypach *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,436 ng/ml). (ryc.4.28)

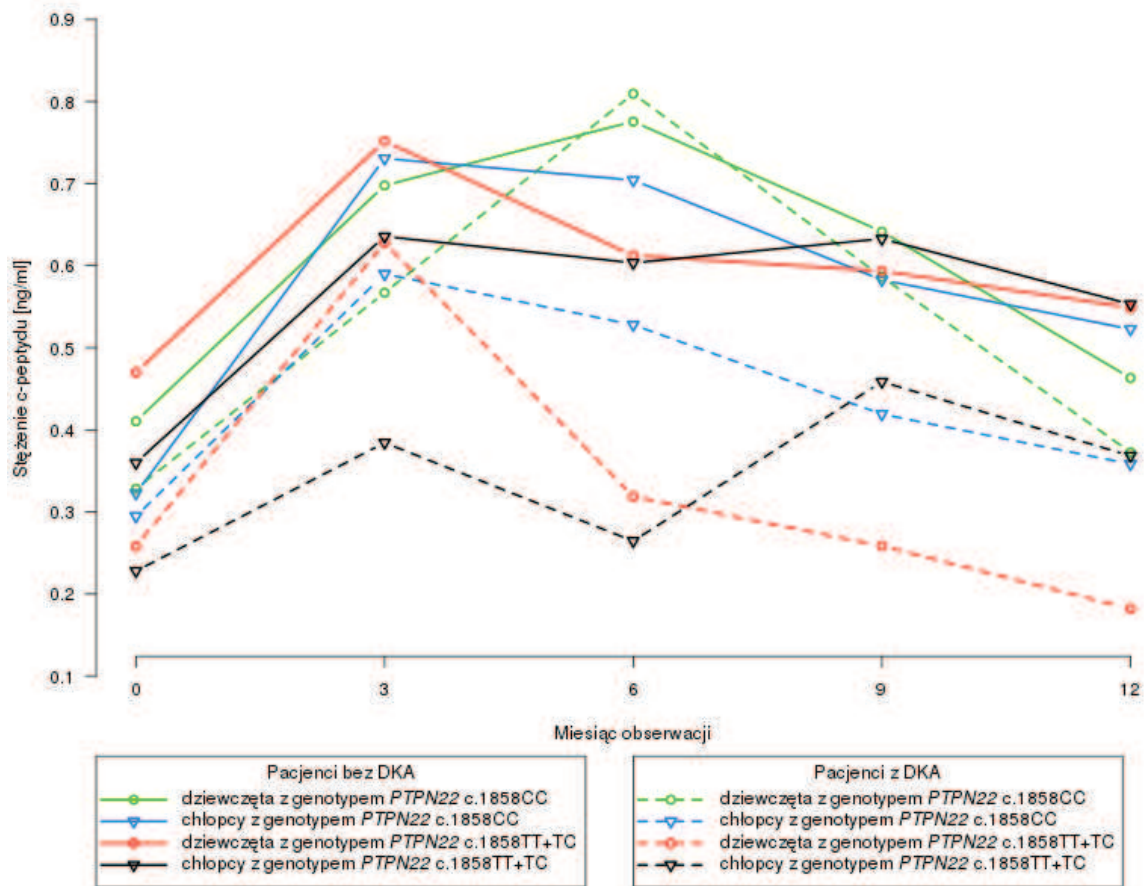


Rycina 4.28. Ocena dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM w populacji badanej, w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z płcią chorego

Celem czytelnego odzwierciedlenia zmian zachodzących w resztkowej insulinosekrecji podczas rocznej obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, na wykresie przedstawiono średnie stężenia C-peptydu, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w każdej z analizowanych podgrup. Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o nieparametryczny test Wilcoxon, porównując rozkłady stężeń C-peptydu i ich mediany (opis zależności umieszczono w tekście rozprawy).

13.5.2.3. Dynamika zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/

W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem płci na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (\rightarrow Wyniki pkt.11.1 str.93), przeprowadzono analizę dotyczącą potencjalnego oddziaływania powyższego modelu strukturalnego na dynamikę zmian resztkowej insulinosekrecji w pierwszym roku trwania T1DM. (ryc.4.29)



Rycina 4.29. Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

Celem czytelnego odzwierciedlenia zmian zachodzących w resztkowej insulinosekrecji podczas rocznej obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, na wykresie przedstawiono średnie stężenia C-peptydu, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w każdej z analizowanych podgrup. Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o nieparametryczny test Wilcozona, porównując rozkłady stężeń C-peptydu i ich mediany (opis zależności umieszczono w tekście rozprawy).

W momencie rozpoznania T1DM nie obserwowano znamiennej różnicy w rozkładach stężeń C-peptydu w zależności od układu poszczególnych zmiennych w analizowanym modelu strukturalnym, które to różnice mogłyby wskazywać na istotne oddziaływanie powyższego modelu na funkcję resztkową komórek β trzustki w początkowym okresie choroby. Wśród pacjentów będących homozygotami CC badanego polimorfizmu stwierdzano nieznamienne niższe stężenia C-peptydu u chłopców, przy czym w obrębie każdej płci poziomy C-peptydu były porównywalne w grupie z DKA i bez DKA (stężenie C-peptydu: chłopcy bez DKA mediana 0,22 ng/ml, z DKA mediana 0,2 ng/ml; dziewczęta bez DKA mediana 0,35 ng/ml,

z DKA mediana 0,32 ng/ml). (ryc.4.29) Natomiast w grupie chorych posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, szczególnie niskie wartości C-peptydu wykazano u chłopców, u których w okresie ujawniania się choroby doszło do rozwoju DKA (stężenie C-peptydu: chłopcy z DKA mediana 0,191 ng/ml; chłopcy bez DKA mediana 0,386 ng/ml). Jednocześnie były to najniższe stężenia C-peptydu stwierdzone w badanej populacji w momencie diagnozy. U dziewcząt z grupy podwyższonego ryzyka genetycznego obserwowano słabiej wyrażone różnice w poziomach C-peptydu w zależności od występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM (stężenie C-peptydu: dziewczęta z DKA mediana 0,274 ng/ml; dziewczęta bez DKA mediana 0,332 ng/ml). (ryc.4.29)

W 3 miesiącu trwania choroby w poszczególnych układach zmiennych analizowanego modelu strukturalnego stwierdzano typowy wzrost wydzielania C-peptydu, przy czym pozostawał on nieznamienny w porównaniu z wartościami C-peptydu obserwowanymi w momencie rozpoznania T1DM w dwóch grupach chorych: u chłopców z genotypami *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC i DKA w okresie ujawniania się choroby (test Wilcoxon $p=0,145$) oraz u dziewcząt z genotypem *PTPN22* c.1858CC i DKA w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxon $p=0,169$). W tym okresie choroby u dziewcząt posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, u których w momencie diagnozy T1DM występowała DKA, obserwowano szczególnie wysokie stężenia C-peptydu (stężenia C-peptydu w grupie z DKA: chłopcy z genotypem *PTPN22* c.1858CC mediana 0,427 ng/ml; dziewczęta z genotypem *PTPN22* c.1858CC mediana 0,47 ng/ml; chłopcy z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,415 ng/ml; dziewczęta z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,558 ng/ml), porównywalne z wartościami stwierdzanymi w grupach z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, niezależnie od płci i genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* (stężenia C-peptydu w grupie z bez DKA: chłopcy z genotypem *PTPN22* c.1858CC mediana 0,669 ng/ml; dziewczęta z genotypem *PTPN22* c.1858CC mediana 0,563 ng/ml; chłopcy z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,596 ng/ml; dziewczęta z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,686 ng/ml). Wykazane powyżej różnice pozostawały nieznamienne statystycznie (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon). (ryc.4.29)

U dziewcząt z genotypem *PTPN22* c.1858CC i DKA w okresie ujawniania się choroby obserwowano przedłużony, trwający aż do 6 miesiąca choroby wzrost stężenia C-peptydu, umożliwiając ostatecznie również i tej grupie pacjentów osiągnięcie istotnego wzrostu resztkowej insulinosekrecji w porównaniu z poziomem C-peptydu stwierdzanym w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,044$). (ryc.4.29) Jednocześnie obserwowane w tej grupie stężenia C-peptydu pozostawały istotnie wyższe w odniesieniu do tożsamyh poziomów C-peptydu odnotowywanych w grupach chorych podwyższonego ryzyka genetycznego, u których również doszło do rozwoju DKA w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxon, dziewczęta z genotypem *PTPN22* c.1858CC vs. pacjenci z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC: chłopcy $p=0,017$; dziewczęta $p=0,027$). Dodatkowo poziom resztkowej insulinosekrecji stwierdzany u dziewcząt z pozytywnym wywiadem w kierunku DKA, będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu, był porównywalny do wydzielania C-peptydu w pozostałych grupach pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC, niezależnie od płci oraz występowania DKA w okresie ujawniania się T1DM (test Wilcoxon, dziewczęta z genotypem *PTPN22* c.1858CC oraz DKA vs. pacjenci z genotypem *PTPN22* c.1858CC: chłopcy bez DKA $p=0,287$; chłopcy z DKA $p=0,058$; dziewczęta bez DKA $p=0,241$). (ryc.4.29)

Zupełnie odmienną dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w 6 miesiącu trwania T1DM wykazano wśród dziewcząt z pozytywnym wywiadem w kierunku DKA w momencie rozpoznania choroby, posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC. W tej grupie pacjentów, jako jedynej w analizowanym modelu strukturalnym, dochodziło do znamiennego obniżenia się wartości C-peptydu w stosunku do stężeń odnotowywanych w 3 miesiącu choroby (test Wilcoxon, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,026$), do wartości porównywalnych z poziomem resztkowej insulinosekrecji w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxon, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,465$). Jednocześnie obserwowany u tych dziewcząt

poziom C-peptydu w 6 miesiącu trwania T1DM był najniższym stężeniem odnotowanym przy porównaniu wszystkich grup badanego modelu strukturalnego (stężenie C-peptydu mediana 0,231 ng/ml). (ryc.4.29) Wykazano również istotne statystycznie różnice pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu w tej grupie dziewcząt w odniesieniu do dziewcząt o podobnym, podwyższonym ryzyku genetycznym rozwoju T1DM, u których nie stwierdzono występowania DKA w momencie rozpoznania choroby (test Wilcoxon, $p=0,036$; stężenie C-peptydu u dziewcząt bez DKA posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,583 ng/ml). Ta znamienna różnica pomiędzy powyższymi grupami dziewcząt utrzymywała się do końca rocznej obserwacji chorych (test Wilcoxon, 9 miesiąc choroby $p=0,009$; 12 miesiąc choroby $p=0,005$). (ryc.4.29)

Natomiast znamienne różnice wykazywane w 6 miesiącu choroby u chłopców, wskazywały na szczególnie dekompensujące oddziaływanie DKA na funkcję resztkową komórek β trzustki w przypadku płci męskiej, zarówno u osób posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC (test Wilcoxon, chłopcy bez DKA vs. z DKA $p=0,02$), jak i należących do grupy zwiększonego ryzyka genetycznego - genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (test Wilcoxon, chłopcy bez DKA vs. z DKA $p=0,024$). (ryc.4.29)

W 9 i 12 miesiącu trwania T1DM, poza opisaną powyżej znamieną różnicą w rozkładach stężeń C-peptydu wśród dziewcząt z grupy podwyższonego ryzyka genetycznego, w zależności od występowania DKA, nie obserwowano istotnych różnic w poziomach C-peptydu w zależności od układu poszczególnych zmiennych w analizowanym modelu strukturalnym, które to różnice mogłyby wskazywać na dalsze modulujące oddziaływanie powyższego modelu na funkcję resztkową komórek β trzustki w badanej populacji. (ryc.4.29)

W przypadku ocenianego modelu strukturalnego wykazane w powyższych analizach istotne różnice w dynamice zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji nie wynikały z ewentualnych znamienych różnic w rodzaju stosowanej insulinoterapii (dokładny test Fishera $p=0,488$).

13.5.2.4. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby, w powiązaniu z wiekiem pacjenta

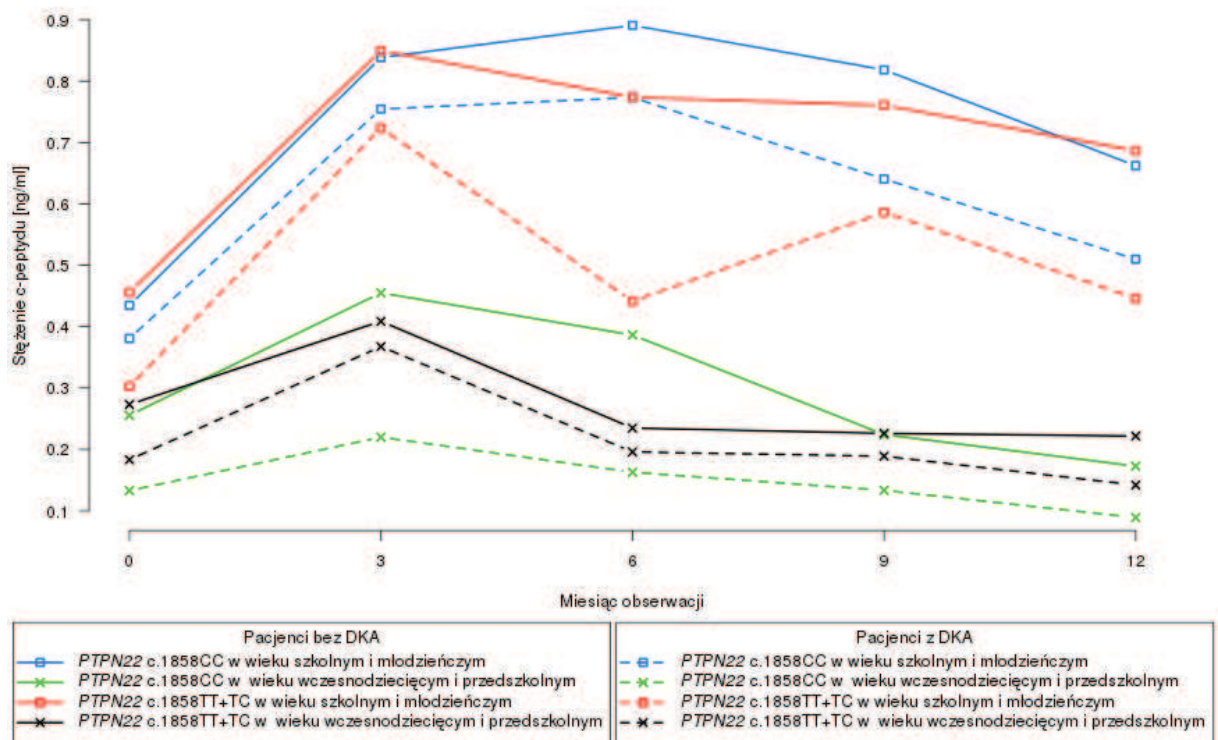
Analiza potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM, z uwzględnieniem wieku pacjenta, nie wykazała modulującego oddziaływania badanego polimorfizmu genetycznego na resztkową insulinosekrecję podczas rocznej obserwacji chorych w ocenianym układzie strukturalnym (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

13.5.2.5. Dynamika zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/

W związku z wykazanim w badanej populacji istotnym modulującym wpływem wieku pacjenta na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (\rightarrow Wyniki pkt. 11.2 str.97), przeprowadzono analizę dotyczącą potencjalnego oddziaływania powyższego modelu strukturalnego na dynamikę zmian resztkowej insulinosekrecji w pierwszym roku trwania T1DM. (ryc.4.30)

Już w momencie rozpoznania T1DM obserwowano modulujące oddziaływanie analizowanego modelu strukturalnego na stężenia C-peptydu, szczególnie wśród pacjentów będących homozygotami CC badanego polimorfizmu. W młodszej grupie wiekowej (wiek wczesnodziecięcy + wiek przedszkolny), u chorych posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC, wykazano znamienne niższe stężenia C-peptydu w podgrupie z pozytywnym wywiadem w kierunku DKA w odniesieniu do pacjentów, u których nie rozpoznano DKA (test Wilcoxon $p=0,037$; stężenie C-peptydu: grupa bez DKA mediana 0,215 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,148 ng/ml). Jednocześnie w tej podgrupie obserwowane wartości C-peptydu

pozostawały najniższe w całej badanej populacji. (ryc.4.30) W starszej grupie wiekowej (wiek szkolny +wiek młodzieńczy) nie stwierdzono podobnej zależności (test Wilcozona $p=0,245$; stężenie C-peptydu: grupa bez DKA mediana 0,378 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,282 ng/ml). Również w analizie dotyczącej pacjentów z genotypami *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC nie stwierdzano znamiennej różnicy w rozkładach stężeń C-peptydu w zależności od występowania DKA zarówno w obrębie młodszej (test Wilcozona $p=0,087$; stężenie C-peptydu: grupa bez DKA mediana 0,29 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,2 ng/ml), jak i starszej grupy wiekowej (test Wilcozona $p=0,158$; stężenie C-peptydu: grupa bez DKA mediana 0,408 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,274 ng/ml). (ryc.4.30)



Rycina 4.30. Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej

DKA – cukrzyca kwasica ketonowa

Celem czytelnego odzwierciedlenia zmian zachodzących w resztkowej insulinosekrecji podczas rocznej obserwacji w poszczególnych podgrupach pacjentów, na wykresie przedstawiono średnie stężenia C-peptydu, które odnotowano w kolejnych punktach czasowych obserwacji w każdej z analizowanych podgrup. Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o nieparametryczny test Wilcozona, porównując rozkłady stężeń C-peptydu i ich mediany (opis zależności umieszczono w tekście rozprawy).

W 3 miesiącu trwania T1DM wśród chorych będących homozygotami *PTPN22* c.1858CC, jedynie u pacjentów z młodszych kategorii wiekowych, z pozytywnym wywiadem w kierunku DKA w momencie rozpoznania choroby, nie obserwowano znamiennej zmiany wydzielania C-peptydu (test Wilcozona $p=0,097$; stężenie C-peptydu mediana 0,21 ng/ml). Powodowało to istotną różnicę w rozkładach stężeń C-peptydu w młodszej grupie wiekowej u osób posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC w zależności od występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcozona $p=0,004$; stężenie C-peptydu: grupa bez DKA mediana 0,4 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,21 ng/ml). W starszej grupie wiekowej wśród pacjentów posiadających ten sam genotyp badanego polimorfizmu nie wykazano znamiennej różnicy w poziomie resztkowej insulinosekrecji w zależności od wywiadu w kierunku DKA w okresie ujawniania się

choroby (test Wilcoxon $p=0,224$; stężenie C-peptydu: grupa bez DKA mediana 0,689 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,539 ng/ml). (ryc.4.30)

Natomiast wśród chorych, z grupy podwyższonego genetycznego ryzyka rozwoju T1DM (genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC), nie stwierdzano istotnych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu w poszczególnych kategoriach wiekowych, w zależności od obciążonego wywiadu w kierunku DKA (test Wilcoxon, wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny $p=0,3$; wiek szkolny + młodzieńczy $p=0,336$).

Jednocześnie w młodszej grupie wiekowej obserwowano wzrost wydzielania C-peptydu w 3 miesiącu trwania T1DM, w odróżnieniu od pacjentów ze starszych kategorii wiekowych (test Wilcoxon, grupa bez DKA $p<0,001$; grupa z DKA $p<0,001$; stężenie C-peptydu w 3 miesiącu choroby: grupa bez DKA mediana 0,702 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,63 ng/ml), nie wykazywał cech znamienności, niezależnie od występowania DKA w okresie ujawniania się choroby (test Wilcoxon, grupa bez DKA $p=0,172$; grupa z DKA $p=0,085$; stężenie C-peptydu w 3 miesiącu choroby: grupa bez DKA mediana 0,412 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,304 ng/ml). (ryc.4.30)

W 6 miesiącu choroby wśród pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC, w młodszej grupie wiekowej, niezależnie od obciążonego wywiadu w kierunku DKA, obserwowano stopniowy, choć nieznamienny zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki (test Wilcoxon, grupa bez DKA $p=0,239$; grupa z DKA $p=0,177$; stężenie C-peptydu w 6 miesiącu choroby: grupa bez DKA mediana 0,347 ng/ml; grupa z DKA mediana 0,14 ng/ml). Jednocześnie w powyższej grupie chorych, nadal utrzymywały się istotnie niższe wartości C-peptydu u pacjentów z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM (test Wilcoxon, $p=0,009$). (ryc.4.30)

Odmianą dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w 6 miesiącu obserwacji wykazano wśród chorych ze starszej grupy wiekowej, będących homozygotami CC badanego polimorfizmu. W tym okresie choroby u pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA obserwowano dalszy, choć niewykazujący cech istotności, wzrost wydzielania C-peptydu (test Wilcoxon, $p=0,497$; stężenie C-peptydu w 6 miesiącu choroby mediana 0,727 ng/ml). Jednocześnie wśród chorych z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM rozkłady stężeń C-peptydu w 3 i 6 miesiącu obserwacji pozostawały porównywalne (test Wilcoxon, $p=0,497$; stężenie C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,539 ng/ml; 6 miesiąc choroby 0,54 ng/ml). (ryc.4.30)

Natomiast w grupie chorych posiadających genotypy związane z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC), niezależnie od grupy wiekowej oraz występowania DKA w momencie rozpoznania choroby, w 6 miesiącu trwania T1DM stwierdzano obniżenie się poziomu resztkowej insulinosekrecji. Wśród chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, powyższe zmniejszenie się wydzielania C-peptydu nie wykazywało cech znamienności statystycznej (test Wilcoxon, wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny $p=0,097$; wiek szkolny + młodzieńczy $p=0,326$). Natomiast u pacjentów z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM, zarówno w młodszej, jak i starszej grupie wiekowej, obserwowano istotny zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki w odniesieniu do poziomów C-peptydu odnotowywanych w 3 miesiącu choroby (test Wilcoxon, wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny $p=0,047$, stężenie C-peptydu w 6 miesiącu choroby mediana 0,1 ng/ml; wiek szkolny + młodzieńczy $p=0,036$, stężenie C-peptydu w 6 miesiącu choroby mediana 0,43 ng/ml). Jednocześnie w starszej grupie wiekowej, ze względu na znaczną dynamikę spadku stężenia C-peptydu wśród pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, wykazano istotne różnice w poziomie resztkowej insulinosekrecji w zależności od występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcoxon, $p=0,012$). (ryc.4.30)

W 9 i 12 miesiącu trwania T1DM nie obserwowano istotnych różnic w poziomach C-peptydu w zależności od układu poszczególnych zmiennych w analizowanym modelu strukturalnym, mogących wskazywać na dalsze modulujące oddziaływanie powyższego modelu na funkcję resztkową komórek β trzustki w badanej populacji. (ryc.4.30)

Podczas analizy każdej z grup wiekowych pojedynczo, nie wykazano znamiennej różnicy w poziomie resztkowej insulinosekrecji przez cały okres obserwacji pomiędzy osobami posiadającymi różne genotypy badanego polimorfizmu, stratyfikowane względem ryzyka rozwoju T1DM (*PTPN22* c.1858CC vs. *PTPN22* c.1858TT+TC), w powiązaniu z wywiadem w kierunku DKA (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon).

W przypadku ocenianego modelu strukturalnego wykazane w powyższych analizach istotne różnice w dynamice zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji nie wynikały z ewentualnych znamiennej różnic w rodzaju stosowanej insulinoterapii (dokładny test Fishera $p=0,124$).

13.5.3. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania choroby

Ostateczna interpretacja przeprowadzonych analiz, dotyczących potencjalnego związku pomiędzy polimorfizmem 5'VNTR genu *INS* (ocena za pomocą polimorfizmu markerowego $-23HphIA>T$) a dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki u obserwowanych pacjentów w pierwszym roku trwania T1DM pozostaje niemożliwa, z uwagi na dystrybucję poszczególnych genotypów analizowanego polimorfizmu w badanej populacji (\rightarrow Wyniki pkt.7 str.86).

14. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM w pierwszym roku trwania choroby

W badanej populacji pacjentów ocenę wyrównania metabolicznego przeprowadzono za pomocą oznaczeń poziomu hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) z wykorzystaniem certyfikowanej metody HPLC (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.5.2 str.67). Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono zgodnie z aktualnymi kryteriami ISPAD oraz PTD (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67). Z uwagi na zbliżone rezultaty oceny wyrównania metabolicznego T1DM za pomocą powyższych kryteriów, w dalszej części rozprawy omówiono głównie wyniki analiz dokonanych na podstawie wytycznych ISPAD, zaś wyniki oceny według wytycznych PTD przedstawiono w przypadku występowania pewnych odrębności lub szczególnie interesujących trendów czasowych.

W momencie rozpoznania T1DM, z powodu istniejących zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej oraz innych zaburzeń metabolicznych typowych dla okresu ujawniania się choroby, jedynie u 5 pacjentów (3,4%) wykazano poziomy hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} spełniające kryteria wyrównania metabolicznego T1DM według ISPAD (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67). W 3 miesiącu obserwacji, w związku z naturalną historią choroby (wzrost resztkowej insulinosekrecji, występowanie zjawiska remisji klinicznej), u około 75% chorych dochodziło do poprawy kontroli metabolicznej T1DM, natomiast w 22% przypadków odnotowywane poziomy HbA_{1c} nadal przekraczały 7,5%. Od 3 miesiąca trwania choroby, w kolejnych okresach obserwacyjnych stwierdzano stopniowe, wykazujące cechy istotności statystycznej, pogarszanie się kontroli metabolicznej T1DM. Jednocześnie odsetek pacjentów, u których dochodziło do dekompensacji metabolicznej choroby, pozostawał stały w kolejnych miesiącach obserwacji i wynosił około 18-19%.

Podczas porównania stopnia wyrównania metabolicznego choroby w badanej populacji w 3 oraz 12 miesiącu obserwacji, stabilną kontrolę T1DM stwierdzono u około 44% chorych. Osiemnaście procent pacjentów, w obu punktach czasowych, nie spełniało kryteriów właściwego wyrównania metabolicznego choroby według ISPAD, natomiast u około 34% chorych obserwowano pogorszenie kontroli T1DM.

Szczegółowe zestawienie danych dotyczących wyrównania metabolicznego choroby według kryteriów ISPAD w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM przedstawiono w tabeli 4.13

Tabela 4.13. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM (według kryteriów ISPAD) w pierwszym roku choroby w badanej populacji przeprowadzona na zasadzie porównań dwóch punktów obserwacji pacjentów

punkt obserwacji – porównanie	kryteria wyrównania metabolicznego T1DM według ISPAD				analiza porównawcza wartość p ^{**})
	HbA _{1c} <7,5% ^{*)} (T1DM wyrównana metabolicznie)		HbA _{1c} ≥7,5% ^{*)} (T1DM niewyrównana metabolicznie)		
	pacjenci o stabilnej kontroli metabolicznej T1DM (pacjenci pozostający w danej kategorii)	pacjenci z poprawą kontroli metabolicznej T1DM (pacjenci, u których nastąpiła zmiana kategorii)	pacjenci, z pogorszeniem kontroli metabolicznej T1DM (pacjenci, u których nastąpiła zmiana kategorii)	pacjenci z przewlekłe niewyrównaną metabolicznie T1DM (pacjenci pozostający w danej kategorii)	
miesiąc choroby: 0 vs. 3 n=140	4 (2,86%)	104 (74,29%)	1 (0,71%)	31 (22,14%)	NS
miesiąc choroby: 3 vs. 6 n=132	76 (57,57%)	9 (6,82%)	25 (18,94%)	22 (16,67%)	<0,001
miesiąc choroby: 6 vs. 9 n=129	60 (46,51%)	10 (7,75%)	25 (19,38%)	34 (26,36%)	<0,001
miesiąc choroby: 9 vs. 12 n=131	48 (36,64%)	16 (12,21%)	24 (18,32%)	43 (32,83%)	<0,001
miesiąc choroby: 3 vs. 12 n=133	58 (43,61%)	6 (4,51%)	45 (33,83%)	24 (18,05%)	<0,001

^{*)} dane w poszczególnych kolumnach przedstawiono jako liczbę pacjentów przyporządkowanych do określonej kategorii, w nawiasach podano ich udział procentowy w analizowanej populacji przy porównaniu określonych punktów czasowych rocznej obserwacji

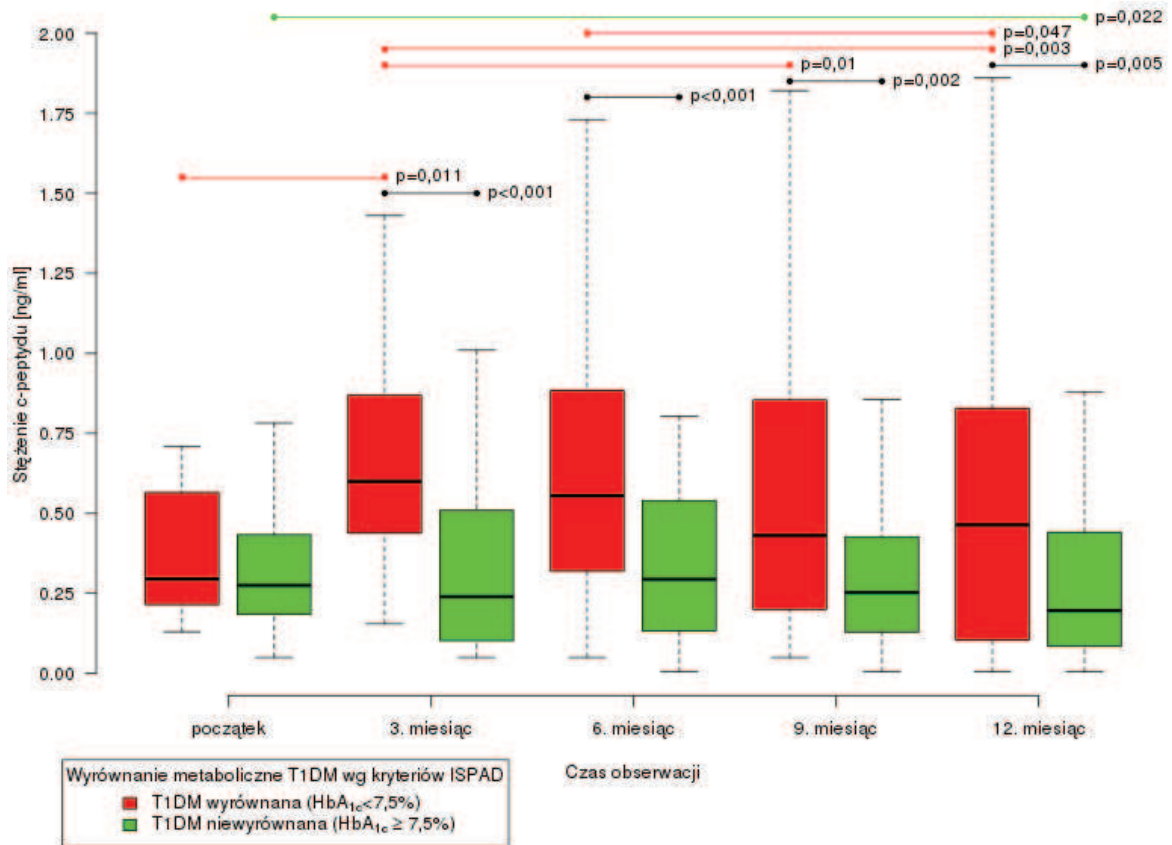
^{**)} analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

n – liczba pacjentów uwzględnionych w analizie przy porównaniu określonych punktów czasowych rocznej obserwacji

NS – wartości p>0,05 (nieistotnie statystycznie)

14.1. Funkcja resztkowa komórek β trzustki a wyrównanie metaboliczne T1DM w pierwszym roku trwania choroby

Uwzględniając kryteria wyrównania metabolicznego T1DM według ISPAD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67), u pacjentów z wyrównaną T1DM (HbA_{1c}<7,5%) od 3 do 12 miesiąca obserwacji stwierdzano znamienne wyższe średnie stężenia C-peptydu w porównaniu do tożsamyh poziomów C-peptydu w grupie z nieprawidłową kontrolą metaboliczną choroby (HbA_{1c}≥7,5%) (test Wilcozona, 3 miesiąc choroby p<0,001; 6 miesiąc choroby p<0,001; 9 miesiąc choroby p=0,002; 12 miesiąc choroby p=0,005). Jednocześnie w momencie rozpoznania T1DM rozkłady stężeń C-peptydu w powyższych podgrupach chorych były porównywalne (test Wilcozona, p=0,324; stężenie C-peptydu początek choroby: grupa z wyrównaną T1DM mediana 0,295 ng/ml; grupa z niewyrównaną T1DM mediana 0,275 ng/ml). (ryc.4.31)



Rycina 4.31. Ocena związku pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki a wyrównaniem metabolicznym T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p < 0,05$)

W grupie pacjentów z wyrównaną T1DM po istotnym wzroście stężenia C-peptydu w 3 miesiącu trwania choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 3 $p=0,011$; stężenie C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,6 ng/ml), w kolejnych miesiącach obserwacji stwierdzano stopniowy, ale nieznamienisty zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki (test Wilcozona, 3 vs. 6 $p=0,096$; 6 vs. 9 $p=0,142$; 9 vs. 12 $p=0,195$). U tych chorych w 9 miesiącu obserwacji dochodziło do istotnego obniżenia się stężeń C-peptydu względem maksymalnych poziomów C-peptydu stwierdzanych w 3 miesiącu choroby (test Wilcozona, $p=0,01$). Jednocześnie od 6 miesiąca obserwacji nie wykazywano znamiennych różnic przy odniesieniu rozkładów stężeń C-peptydu do wartości odnotowywanych na początku choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby 0 vs. 6 $p=0,067$; 0 vs. 9 $p=0,191$; 0 vs. 12 $p=0,286$). (ryc.4.31)

Wśród pacjentów z niewyrównaną T1DM nie obserwowano typowego istotnego wzrostu stężenia C-peptydu w 3 miesiącu trwania choroby (test Wilcozona, $p=0,271$; stężenie C-peptydu: 3 miesiąc choroby mediana 0,24 ng/ml). Stwierdzano natomiast przesunięcie czasu osiągnięcia maksymalnych wartości C-peptydu aż do 6 miesiąca trwania T1DM, przy czym pozostawały one nieznamienne wyższe od stężeń C-peptydu na początku choroby (test Wilcozona, $p=0,495$; stężenie C-peptydu: 6 miesiąc choroby mediana 0,294 ng/ml). W kolejnych miesiącach obserwacji również nie wykazywano istotnych zmian w wydzielaniu C-peptydu (test Wilcozona, miesiąc choroby 6 vs. 9 $p=0,24$; 9 vs. 12 $p=0,236$), a stwierdzane wartości resztkowej insulinosekrecji nie różniły się znamienne od maksymalnych wartości w 6 miesiącu trwania T1DM (test Wilcozona, miesiąc choroby 3 vs. 6 $p=0,303$; 6 vs. 12 $p=0,091$). Dopiero w 12 miesiącu choroby

obserwowano znamienne obniżenie się poziomu C-peptydu względem wartości oznaczonych w momencie rozpoznania T1DM (test Wilcozona, $p=0,022$). (ryc.4.31)

Analiza stężeń C-peptydu z uwzględnieniem kryteriów wyrównania metabolicznego według PTD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67) wykazała bardzo stabilny przebieg choroby w grupie z wyrównaną T1DM ($HbA_{1c}<6,5\%$). W podgrupie tej nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy rozkładami stężeń C-peptydu w poszczególnych miesiącach trwania T1DM, a maksymalne stężenia C-peptydu w pierwszym roku choroby odnotowano w 9 miesiącu obserwacji (stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,462 ng/ml; 9 miesiąc choroby mediana 0,823 ng/ml). Jednocześnie w okresie od 3 do 9 miesiąca obserwacji poziomy C-peptydu w tej grupie chorych pozostawały istotnie wyższe niż u pacjentów z nieprawidłową kontrolą metaboliczną T1DM ($HbA_{1c}\geq 6,5\%$) (test Wilcozona, początek choroby $p=0,225$; 3, 6 i 9 miesiąc choroby $p<0,001$, 12 miesiąc choroby $p=0,052$).

Natomiast w podgrupie z niewyrównaną metabolicznie T1DM, po istotnym wzroście stężenia C-peptydu w 3 miesiącu choroby do maksymalnych wartości odnotowywanych w pierwszym roku trwania T1DM (test Wilcozona $p<0,001$; stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,275 ng/ml; 3 miesiąc choroby mediana 0,484 ng/ml), do znamienego obniżenia się resztkowej insulinosekrecji dochodziło już w 6 miesiącu choroby (test Wilcozona $p=0,037$; stężenie C-peptydu: 6 miesiąc choroby mediana 0,38 ng/ml). W kolejnych miesiącach obserwacji zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki był stopniowy i nie wykazywał cech istotności (test Wilcozona, miesiąc choroby: 6 vs. 9 $p=0,169$; 9 vs. 12 $p=0,159$), a odnotowywane wartości stężeń C-peptydu pozostawały znamienne niższe w odniesieniu do maksymalnych stężeń w 3 miesiącu choroby (test Wilcozona, miesiąc choroby: 3 vs. 9 $p=0,003$; 3 vs. 12 $p<0,001$). Jednocześnie od 9 miesiąca trwania T1DM rozkłady stężeń C-peptydu były porównywalne z wartościami C-peptydu oznaczonymi w momencie zachorowania (test Wilcozona, miesiąc choroby: 0 vs. 9 $p=0,307$; 0 vs. 12 $p=0,159$).

14.2. Ocena potencjalnego związku pomiędzy płcią pacjenta a wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM

Podczas rocznej obserwacji pacjentów nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy płcią chorego a wyrównaniem metabolicznym choroby, ocenianym zgodnie z kryteriami ISPAD oraz PTD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67) (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

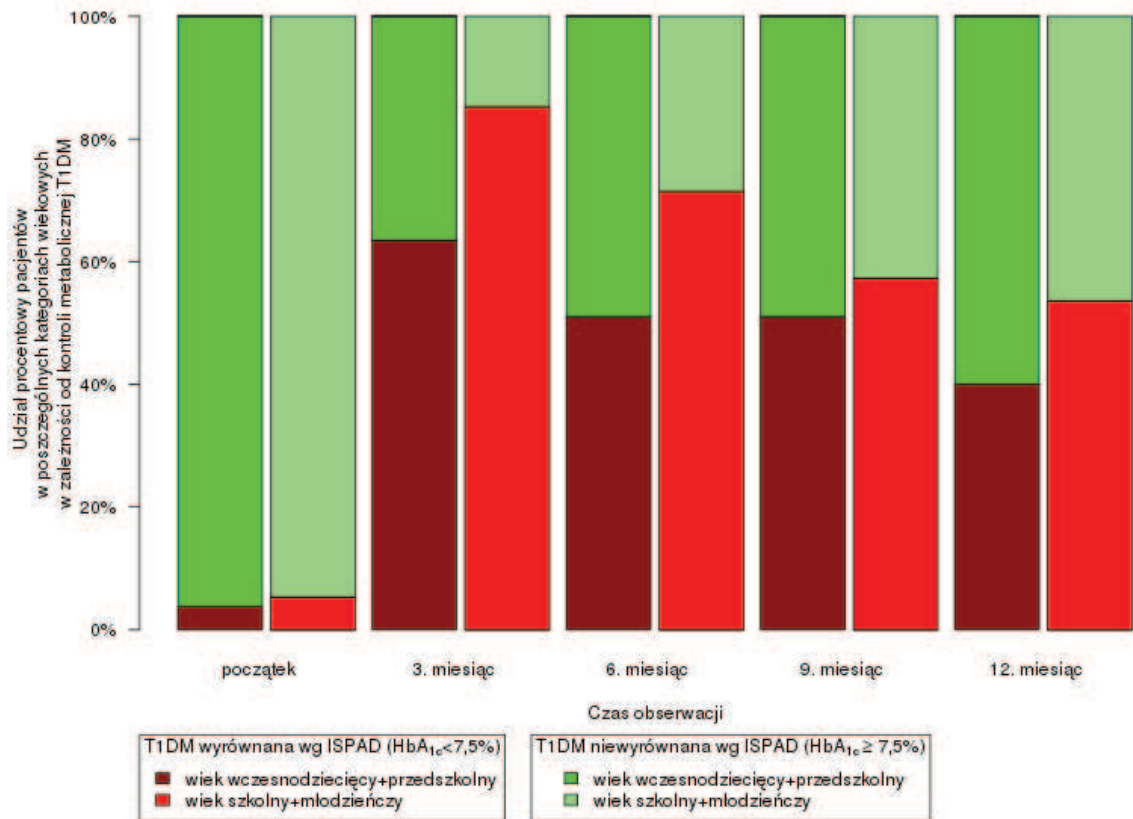
14.3. Ocena potencjalnego związku pomiędzy wiekiem pacjenta a wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM

Podczas rocznej obserwacji pacjentów w początkowej jej fazie (3 – 6 miesiąc) stwierdzano znamienne różnice w częstości występowania prawidłowego wyrównania T1DM, definiowanego zgodnie z kryteriami ISPAD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67), w zależności od wieku pacjenta. W 3 miesiącu trwania T1DM powyższe różnice wynikały głównie z mniejszego odsetka dzieci w wieku wczesnodziecięcym i przedszkolnym, które osiągnęły poprawę kontroli metabolicznej po wstępnej fazie niewyrównania w okresie ujawniania się choroby, w porównaniu z grupą chorych w wieku szkolnym i młodzieńczym (dokładny test Fishera $p=0,003$). W 6 miesiącu obserwowano zmniejszenie się odsetka pacjentów z prawidłową kontrolą metaboliczną T1DM w podobnym stopniu w młodszej (wiek wczesnodziecięcy i przedszkolny), jak i starszej grupie wiekowej, a stwierdzane istotne różnice w odsetku chorych z wyrównaną T1DM wynikały prawdopodobnie z różnic wykazanych w 3 miesiącu choroby (dokładny test Fishera, 6 miesiąc choroby $p=0,015$). (ryc.4.32)

W drugiej połowie obserwacji (9 – 12 miesiąc) nie stwierdzano istotnych różnic w częstości występowania prawidłowego wyrównania T1DM w powiązaniu z wiekiem chorego (dokładny test Fishera, 9 miesiąc choroby $p=0,301$; 12 miesiąc choroby $p=0,09$). Jednocześnie w młodszej grupie wiekowej, pomiędzy 6 oraz 9 miesiącem trwania T1DM, nie obserwowano zmian w rozkładzie procentowym w

zależności od kontroli metabolicznej choroby, po czym w 12 miesiącu choroby dochodziło do kolejnego obniżenia się odsetka pacjentów z prawidłowo wyrównaną T1DM. Natomiast w starszej grupie wiekowej stwierdzono przesunięcie się okresu stabilizacji w proporcji pacjentów w zależności od kontroli metabolicznej T1DM na 9 – 12 miesięcy choroby. (ryc.4.32)

W badanej populacji opisane powyżej zmiany w częstości występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego T1DM w zależności od wieku, w znacznym stopniu korespondowały z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w poszczególnych grupach wiekowych podczas rocznej obserwacji (→ Wyniki pkt.13.1.2 str.117).



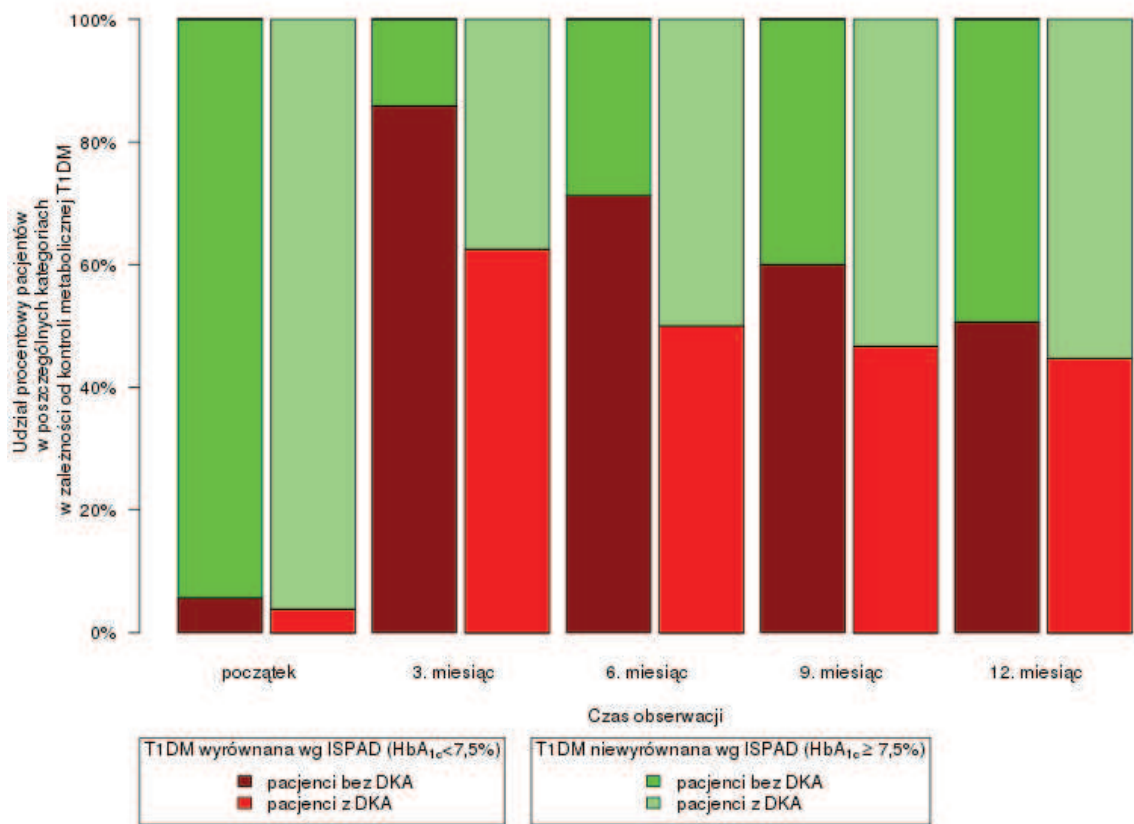
Rycina 4.32. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od wieku pacjenta

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes
analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

14.4. Ocena potencjalnego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na wyrównanie metabolicznej choroby w pierwszym roku jej trwania

Analiza wyrównania metabolicznego T1DM, z uwzględnieniem kryteriów ISPAD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67) wykazała istotnie częstszą możliwość osiągnięcia prawidłowej kontroli metabolicznej choroby w pierwszym półroczu jej trwania u pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA w momencie diagnozy T1DM. Natomiast w drugim półroczu trwania obserwacji, w grupie pacjentów, u których nie rozpoznano DKA w okresie ujawniania się T1DM, dochodziło do znamienego pogorszenia kontroli metabolicznej (dokładny test Fishera; miesiąc choroby 3 vs. 6 p=0,004; 6 vs.9 p<0,001; 9 vs. 12 p=0,012), co powodowało wyrównanie obserwowanych wcześniej różnic w kontroli metabolicznej T1DM

w zależności od występowania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej u chorego w momencie rozpoznania T1DM. (ryc.4.33)



Rycina 4.33. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

Jednocześnie opisane powyżej zmiany w częstości występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego T1DM, w zależności od rozpoznania DKA w okresie ujawniania się choroby, w znacznym stopniu korespondowały z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w poszczególnych, analizowanych podgrupach (\rightarrow Wyniki pkt.13.1.6 str.121).

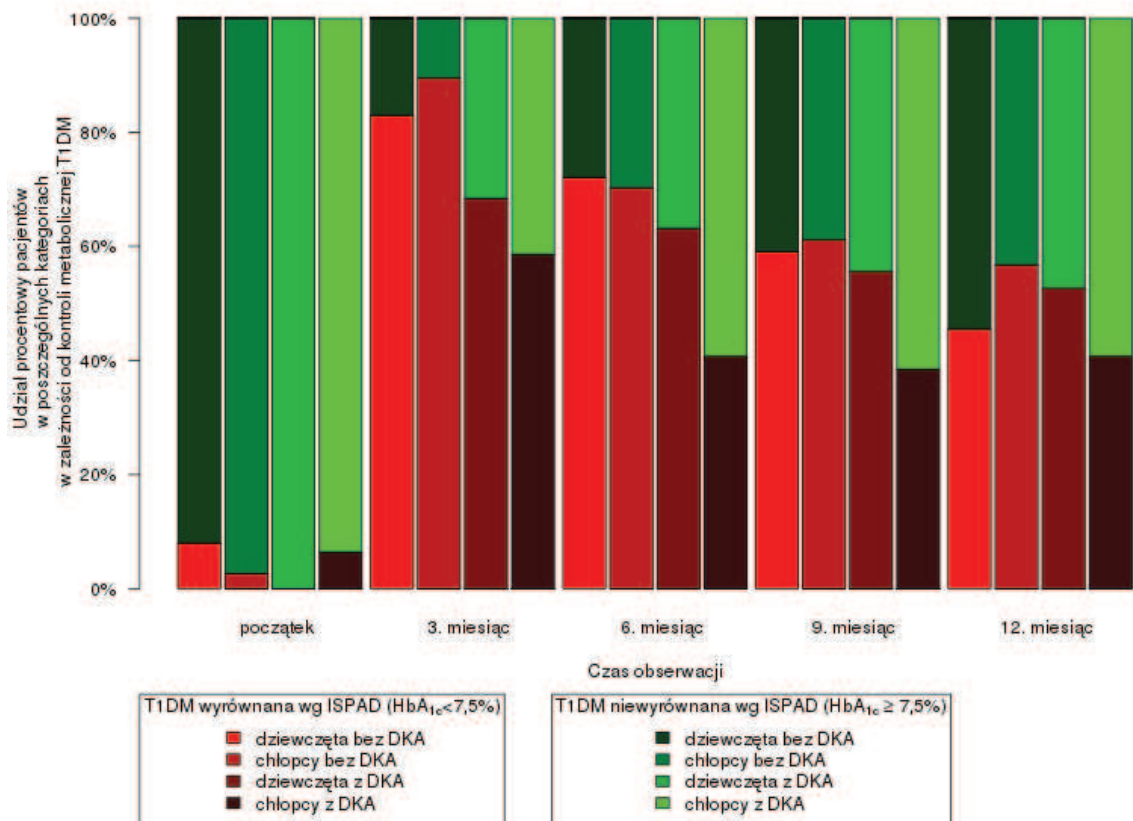
Porównanie dobowego zapotrzebowania na insulinę w zależności od występowania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej w momencie ujawniania się T1DM, z uwzględnieniem wytycznych ISPAD (\rightarrow Materiały i metody pkt.2.1.4 str.40), nie wykazało znamiennych różnic pomiędzy analizowanymi grupami w okresie rocznej obserwacji (dokładny test Fishera, 3 miesiąc choroby $p=0,098$; 6 miesiąc choroby $p=0,104$; 9 miesiąc choroby $p=0,095$; 12 miesiąc choroby $p=0,236$).

14.4.1. Płeć pacjenta jako moderator oddziaływań zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku jej trwania

W badanej populacji płeć, jako czynnik modulujący wyrównanie metaboliczne choroby w zależności od występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM, odgrywała istotną rolę w pierwszej połowie rocznej obserwacji pacjentów. W 3 miesiącu choroby wśród pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku

DKA, prawidłową kontrolę metaboliczną T1DM stwierdzano w porównywalnym odsetku u chłopców i dziewcząt (chłopcy 89,48%; dziewczęta 82,98%). Natomiast w grupie chorych, u których doszło do rozwoju DKA w okresie ujawniania się T1DM, prawidłowe wyrównanie metaboliczne obserwowano częściej u dziewcząt (chłopcy 58,62%; dziewczęta 68,42%). Przedstawione powyżej różnice w częstości występowania prawidłowej kontroli metabolicznej T1DM w 3 miesiącu obserwacji w zależności od rozwoju DKA na początku choroby, w powiązaniu z płcią pacjenta, wykazywały cechy istotności (dokładny test Fishera, $p=0,014$) (ryc.4.34). W 6 miesiącu trwania T1DM obserwowane różnice w częstości występowania prawidłowego wyrównania choroby w analizowanych podgrupach pacjentów pozostawały na granicy znamienności (dokładny test Fishera, $p=0,05$). W tym okresie obserwacji wśród dziewcząt z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM odsetek osób z prawidłowo wyrównaną chorobą był zbliżony do proporcji stwierdzanych u chłopców oraz dziewcząt z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA (dziewczęta z DKA 63,15%; chłopcy bez DKA 70,27%; dziewczęta bez DKA 72,09%) (ryc.4.34). Natomiast w grupie chłopców, u których doszło do rozwoju DKA na początku choroby, prawidłową kontrolę metaboliczną T1DM wykazano jedynie u 40,74% osób.

W drugiej połowie rocznej obserwacji (9 – 12 miesiąc choroby) nie stwierdzano istotnych różnic w rozkładach częstości występowania prawidłowej kontroli metabolicznej T1DM w zależności od wywiadu w kierunku DKA na początku choroby, w powiązaniu z płcią pacjenta (dokładny test Fishera, 9 miesiąc choroby $p=0,309$; 12 miesiąc choroby $p=0,584$). (ryc.4.34)



Rycina 4.34. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od płci chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

Opisane powyżej zmiany w częstości występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego T1DM podczas rocznej obserwacji badanej grupy, w zależności od płci i rozwoju DKA w okresie ujawniania się choroby, korespondowały z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w analizowanych podgrupach pacjentów (\rightarrow Wyniki pkt.13.1.7 str.124)

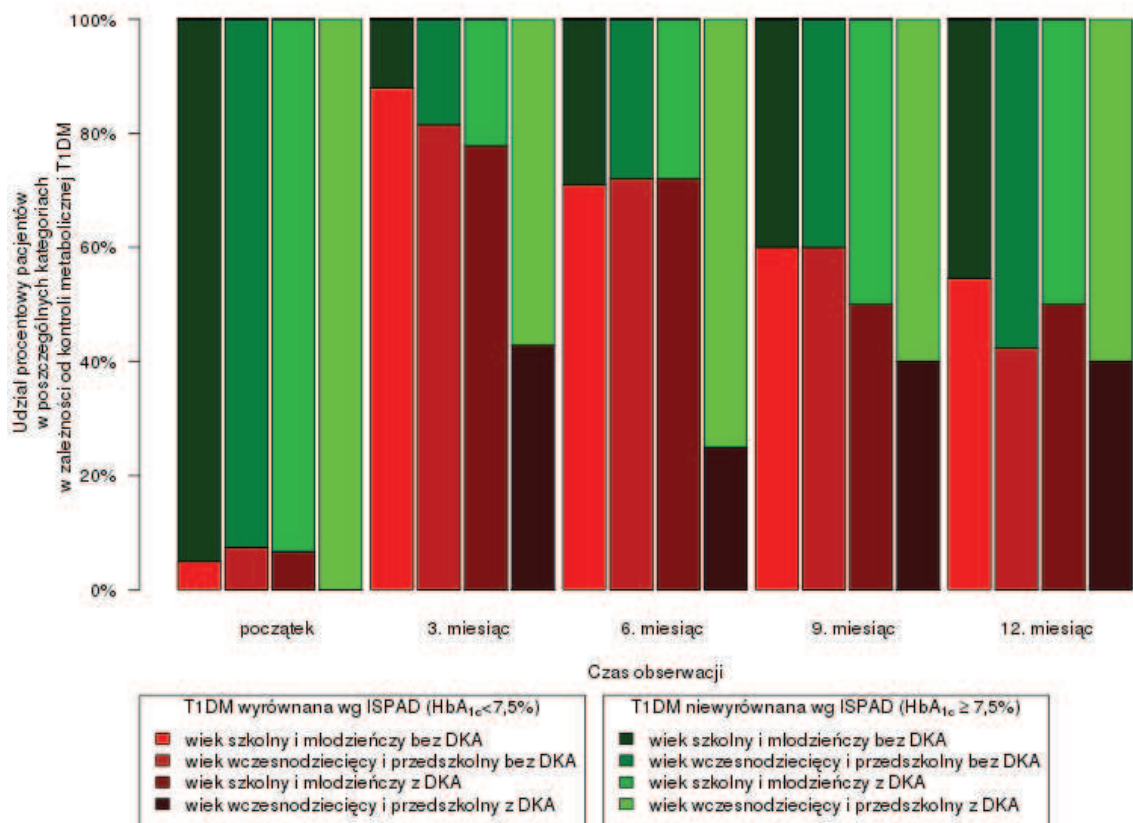
14.4.2. Wiek pacjenta jako moderator oddziaływań zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, występujących u chorego w momencie rozpoznania T1DM, na wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku jej trwania

W badanej populacji również wiek chorego pełnił funkcję moderatora w przypadku zależności pomiędzy stopniem wyrównania metabolicznego T1DM a występowaniem DKA na początku choroby, przy czym jego istotne modulujące oddziaływanie stwierdzano w pierwszej połowie rocznej obserwacji pacjentów.

Wśród pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, w 3 miesiącu trwania T1DM prawidłowe wyrównanie metaboliczne choroby, według kryteriów ISPAD (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67), osiągało ponad 80% chorych, niezależnie od grupy wiekowej (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny 81,48%, wiek szkolny + młodzieńczy 87,93%). Zbliżony odsetek pacjentów z prawidłową kontrolą metaboliczną choroby wykazano również wśród chorych z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM, należących do starszej kategorii wiekowej (wiek szkolny + młodzieńczy 77,78% pacjentów). Natomiast w grupie młodszych dzieci (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny), z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, jedynie 42,86% pacjentów osiągało w tym okresie choroby właściwą kontrolę T1DM. (ryc.4.35) Jednocześnie powyższe różnice w częstościach występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby, w zależności od stwierdzonej DKA w momencie diagnozy T1DM, w powiązaniu z wiekiem pacjenta, wykazywały cechy znamienności statystycznej (dokładny test Fishera, $p < 0,001$).

W 6 miesiącu trwania obserwacji dochodziło do zmniejszenia się odsetka pacjentów z prawidłowo wyrównaną metabolicznie T1DM – do około 70% chorych w grupie bez obciążonego wywiadu w kierunku DKA, niezależnie od kategorii wiekowej (pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny 72,0%, wiek szkolny + młodzieńczy 70,91%), a także wśród pacjentów z rozpoznaną DKA na początku choroby, należących do starszej kategorii wiekowej (pacjenci z DKA: wiek szkolny + młodzieńczy 69,23%). W grupie młodszych dzieci (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny) z obciążonym wywiadem w kierunku DKA odsetek osób z prawidłowo kontrolowaną chorobą wynosił jedynie 25%, co powodowało utrzymywanie się istotnych różnic w częstości występowania właściwego wyrównania T1DM w analizowanych podgrupach pacjentów (dokładny test Fishera, $p = 0,002$). (ryc.4.35)

W drugiej połowie rocznej obserwacji nie wykazywano znamiennych różnic pomiędzy ocenianymi podgrupami w częstości prawidłowej kontroli metabolicznej choroby (dokładny test Fishera, 9 miesiąc choroby $p = 0,409$; 12 miesiąc choroby $p = 0,643$). Jednocześnie dopiero w 12 miesiącu trwania T1DM obserwowano wyrównanie się odsetka pacjentów z prawidłowo wyrównaną chorobą w obrębie poszczególnych kategorii wiekowych, niezależnie od wywiadu w kierunku DKA w momencie diagnozy T1DM (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: chorzy bez DKA 44,0% vs. z DKA 40,0%; wiek szkolny + młodzieńczy: chorzy bez DKA 54,54% vs. z DKA 50,0%). (ryc.4.35)



Rycina 4.35. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od wieku chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

14.5. Poziom edukacji pacjenta na temat własnej choroby a wyrównanie metaboliczne T1DM w pierwszym roku trwania choroby

Nie wykazano znamienych różnic pomiędzy poziomem edukacji pacjenta na temat własnej choroby, ocenianym na podstawie badania ankietowego, a wyrównaniem metabolicznym T1DM (według kryteriów ISPAD oraz PTD) podczas rocznej obserwacji pacjentów (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera oraz test Wilcozona).

14.6. Ocena potencjalnego związku wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* z wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM

14.6.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* z wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM

Analiza dotycząca wyrównania metabolicznego T1DM, definiowanego zgodnie z kryteriami ISPAD oraz PTD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67), nie wykazała związku pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, w tym również genotypami stratyfikowanymi względem ryzyka rozwoju T1DM, a kontrolą metaboliczną choroby w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

14.6.1.1. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/

W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem płci na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93), przeprowadzono analizę dotyczącą potencjalnego oddziaływania powyższego układu strukturalnego na częstość występowania prawidłowej kontroli metabolicznej choroby, definiowanej zgodnie z kryteriami ISPAD oraz PTD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67) w pierwszym roku trwania T1DM. Powyższa ocena nie potwierdziła modulującego wpływu analizowanego układu strukturalnego na częstość występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego T1DM w populacji badanej podczas rocznej obserwacji chorych (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera). Nie wykazano również modulującego wpływu na kontrolę metaboliczną choroby następujących par zmiennych tworzących badany układ strukturalny: polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – płeć, polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – występowanie DKA w momencie rozpoznania T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

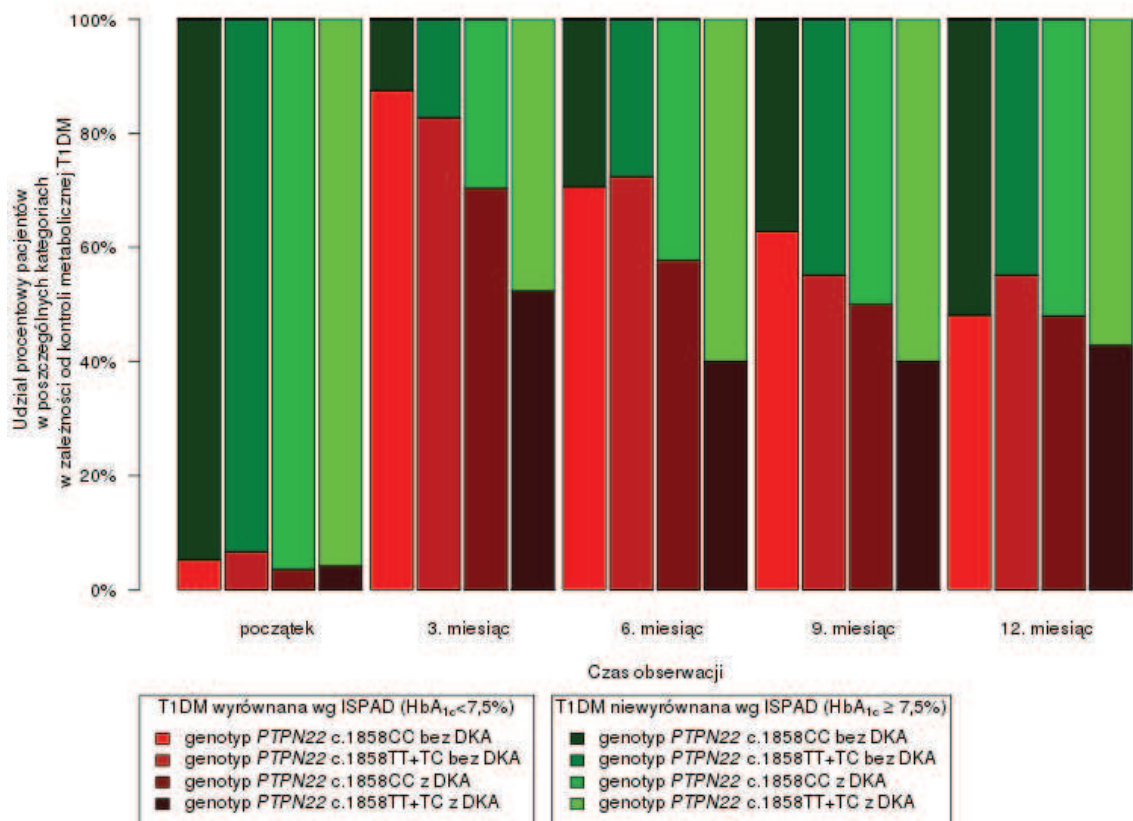
14.6.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM

Ocena wyrównania metabolicznego T1DM, definiowanego zgodnie z kryteriami ISPAD oraz PTD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67), nie wykazała istotnego związku pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, w tym również genotypami stratyfikowanymi względem ryzyka rozwoju T1DM, a kontrolą metaboliczną choroby w badanej populacji w pierwszym roku trwania T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

14.6.2.1. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22*, w zależności od występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM

W badanej populacji istotny modulujący wpływ poszczególnych genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, na częstość występowania prawidłowej kontroli metabolicznej T1DM, w zależności od rozpoznania DKA w okresie ujawniania się choroby wykazano w 3 miesiącu trwania obserwacji (dokładny test Fishera, $p=0,009$). Wśród pacjentów bez obciążonego wywiadu w kierunku DKA w momencie diagnozy T1DM, niezależnie od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stwierdzano porównywalny odsetek chorych z prawidłowo wyrównaną metabolicznie T1DM (pacjenci bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC 87,5%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 82,76%, cała badana populacja 85,88%). Natomiast w grupie chorych z rozpoznaną DKA na początku T1DM, wśród pacjentów z genotypami *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC wykazano znacznie niższy odsetek pacjentów z prawidłową kontrolą metaboliczną choroby w odniesieniu do osób będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu (pacjenci z DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC 70,37%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 52,38%, cała badana populacja 62,5%). (ryc.4.36)

Opisane powyżej zmiany w częstości występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego T1DM podczas rocznej obserwacji badanej grupy w znacznym stopniu korespondowały z dynamiką zmian resztkowej insulinosekrecji w analizowanych podgrupach pacjentów (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.1 str.134).



Rycina 4.36. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

14.6.2.2. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22*, z uwzględnieniem płci pacjenta

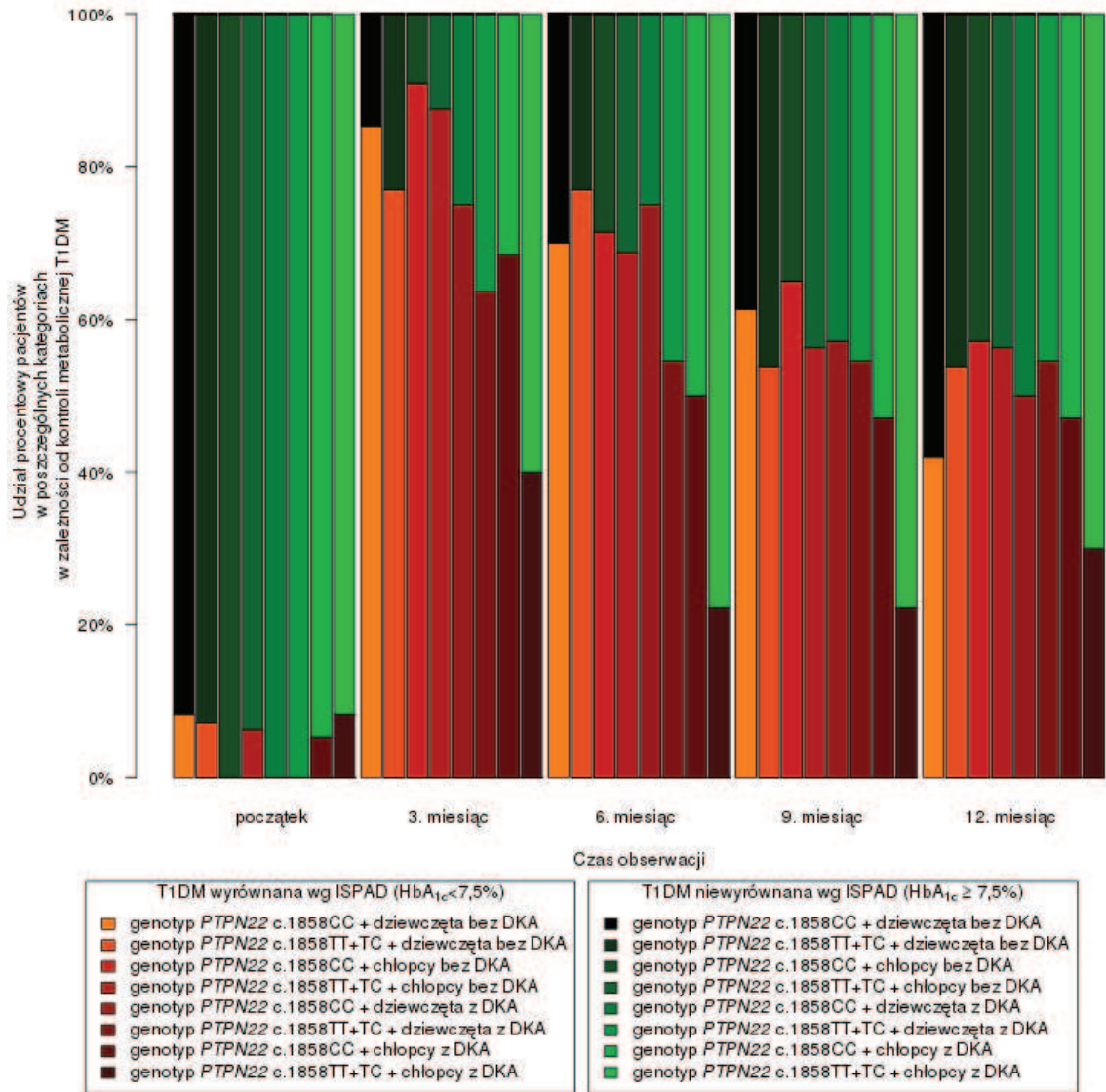
Nie stwierdzono znamiennej zależności między występowaniem prawidłowego wyrównania metabolicznego T1DM podczas rocznej obserwacji chorych a oddziaływaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z płcią pacjenta (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

14.6.2.3. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/

W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem płci na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93), przeprowadzono analizę dotyczącą potencjalnego oddziaływania powyższego układu strukturalnego na częstość występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby w pierwszym roku jej trwania. Z uwagi na zbieżne wyniki oceny kontroli metabolicznej choroby według

kryteriów ISPAD oraz PTD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67), poniżej przedstawiono rezultaty analiz przeprowadzonych zgodnie z wytycznymi ISPAD.

Analiza dotycząca oddziaływania badanego modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na częstość występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby, potwierdziła jego modulujący wpływ w pierwszej połowie trwania rocznej obserwacji pacjentów. (ryc.4.37)



Rycina 4.37. Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na wyrównanie metaboliczne T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

W 3 miesiącu choroby stwierdzono znamienne różnice w częstości występowania prawidłowej kontroli metabolicznej w poszczególnych układach zmiennych analizowanego modelu strukturalnego (dokładny test Fishera, p=0,046). W tym okresie choroby wśród pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA w momencie rozpoznania T1DM, największą częstość prawidłowego wyrównania metabolicznego

choroby obserwowano u chłopców będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu, a najniższą – u dziewcząt posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (pacjenci bez DKA: chłopcy z genotypem *PTPN22* c.1858CC 90,91%; dziewczęta z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC 76,92%). Natomiast u dziewcząt będących homozygotami CC badanego polimorfizmu i u chłopców z grupy zwiększonego ryzyka genetycznego (genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC) odsetek osób z prawidłowo wyrównaną T1DM był porównywalny i odpowiadał udziałowi procentowemu obserwowanemu w całej populacji badanej (pacjenci bez DKA: dziewczęta z genotypem *PTPN22* c.1858CC 85,29%; chłopcy z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC 87,5%, cała badana populacja 85,88%). (ryc.4.37)

W powyższych podgrupach pacjentów rozkłady stężeń C-peptydu w tym okresie choroby nie różniły się istotnie statystycznie, a najwyższe wartości mediany dla analizowanych stężeń C-peptydu odnotowano u dziewcząt posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (stężenie C-peptydu mediana 0,686 ng/ml) oraz u chłopców z genotypem *PTPN22* c.1858CC (stężenie C-peptydu mediana 0,669 ng/ml) (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.3 str.138 → ryc.4.29). W ocenianych podgrupach pacjentów nie wykazano także znamienych różnic w dobowym zapotrzebowaniu na insulinę (TDID) (→ *Materiały i metody* pkt.2.1.4 str.40) (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxon). Jednocześnie najniższe wartości TDID stwierdzano w podgrupach chorych, w których obserwowano również najwyższe stężenia C-peptydu (3 miesiąc choroby: TDID – pacjenci bez DKA: dziewczęta z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,37 j/kg m.c./dobę; chłopcy z genotypem *PTPN22* c.1858CC mediana 0,38 j/kg m.c./dobę).

Natomiast wśród pacjentów z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się choroby, najczęściej prawidłowe wyrównanie T1DM stwierdzano u dziewcząt będących homozygotami CC polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*. U chłopców posiadających ten sam genotyp badanego polimorfizmu odsetek prawidłowej kontroli metabolicznej był obserwowany znacznie rzadziej (pacjenci z DKA: dziewczęta z genotypem *PTPN22* c.1858CC 75,0%, chłopcy z genotypem *PTPN22* c.1858CC 68,42%, cała badana populacja 62,5%). Szczególną sytuację wykazano również wśród chorych należących do podgrupy podwyższonego ryzyka genetycznego (osoby posiadające genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC): u chłopców odnotowywano najniższy odsetek prawidłowej kontroli metabolicznej T1DM spośród wszystkich pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, natomiast u dziewcząt częstość występowania prawidłowego wyrównania T1DM była porównywalna z częstością obserwowaną w podgrupie z rozpoznaną DKA w całej populacji badanej (pacjenci z DKA: chłopcy z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC 40,0%, dziewczęta z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC 63,64%, cała badana populacja 62,5%). (ryc.4.37)

Jednocześnie w powyższych podgrupach pacjentów rozkłady stężeń C-peptydu w tym okresie choroby nie różniły się istotnie statystycznie, a najwyższe wartości mediany dla analizowanych stężeń C-peptydu odnotowano u dziewcząt posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (stężenie C-peptydu mediana 0,558 ng/ml) oraz u dziewcząt z genotypem *PTPN22* c.1858CC (stężenie C-peptydu mediana 0,47 ng/ml) (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.3 str.138 → ryc.4.29).

Wśród pacjentów z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się choroby najniższe dobowe zapotrzebowanie na insulinę (TDID) wykazano w grupie chorych będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu (3 miesiąc choroby: TDID – pacjenci z DKA: dziewczęta z genotypem *PTPN22* c.1858CC mediana 0,53 j/kg m.c./dobę; chłopcy z genotypem *PTPN22* c.1858CC mediana 0,45 j/kg m.c./dobę). Jednocześnie u chłopców z obciążonym wywiadem w kierunku DKA obserwowano znamienne różnice w wartościach TDID w zależności od genotypu badanego polimorfizmu (test Wilcoxon $p=0,045$; 3 miesiąc choroby: chłopcy z DKA – TDID: genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,45 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,56 j/kg m.c./dobę). Natomiast u dziewcząt powyższe różnice pozostawały nieistotne statystycznie (test Wilcoxon $p=0,241$; 3 miesiąc choroby: dziewczęta z DKA – TDID: genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,53 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,62 j/kg m.c./dobę).

W 6 miesiącu trwania obserwacji wykazywane różnice w częstości występowania prawidłowej kontroli metabolicznej T1DM pomiędzy poszczególnymi układami zmiennych analizowanego modelu strukturalnego pozostawały nieistotne statystycznie (dokładny test Fishera, $p=0,154$), ale nadal w znacznym stopniu korespondowały ze zmianami dynamiki funkcji resztkowej komórek β trzustki w analizowanych podgrupach chorych (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.3 str.138).

W podgrupie pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA obserwowano zbliżone częstości występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego T1DM, przy czym najczęściej prawidłową kontrolę choroby stwierdzano u dziewcząt posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC. Natomiast wśród chłopców z tym samym układem genetycznym, odnotowany odsetek osób z prawidłowo wyrównaną chorobą pozostawał najniższy (pacjenci bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC: chłopcy 71,43%, dziewczęta 70,0%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC: chłopcy 68,75%, dziewczęta 76,92%; cała badana populacja 71,25%). (ryc.4.37)

Jednocześnie w obu powyższych podgrupach stwierdzano najwyższe wartości mediany dla analizowanych stężeń C-peptydu (genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC – stężenie C-peptydu: chłopcy mediana 0,619 ng/ml; dziewczęta mediana 0,583 ng/ml), przy czym rozkłady stężeń C-peptydu w grupie pacjentów bez rozpoznanej DKA na początku choroby nie wykazywały istotnych statystycznie różnic w zależności od genotypu badanego polimorfizmu, w powiązaniu z płcią pacjenta (test Wilcozona, 6 miesiąc choroby – chłopcy bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC vs. genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC $p=0,282$; dziewczęta bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC vs. genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC $p=0,494$) (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.3 str.138). W powyższych podgrupach pacjentów nie wykazano także znamienych różnic w dobowym zapotrzebowaniu na insulinę (TDID) (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona). Jednocześnie w podgrupach chorych, w których odnotowano najwyższe stężenia C-peptydu, wartości TDID pozostawały najniższe (6 miesiąc choroby: TDID – pacjenci bez DKA: dziewczęta z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,46 j/kg m.c./dobę; chłopcy z genotypami *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,45 j/kg m.c./dobę).

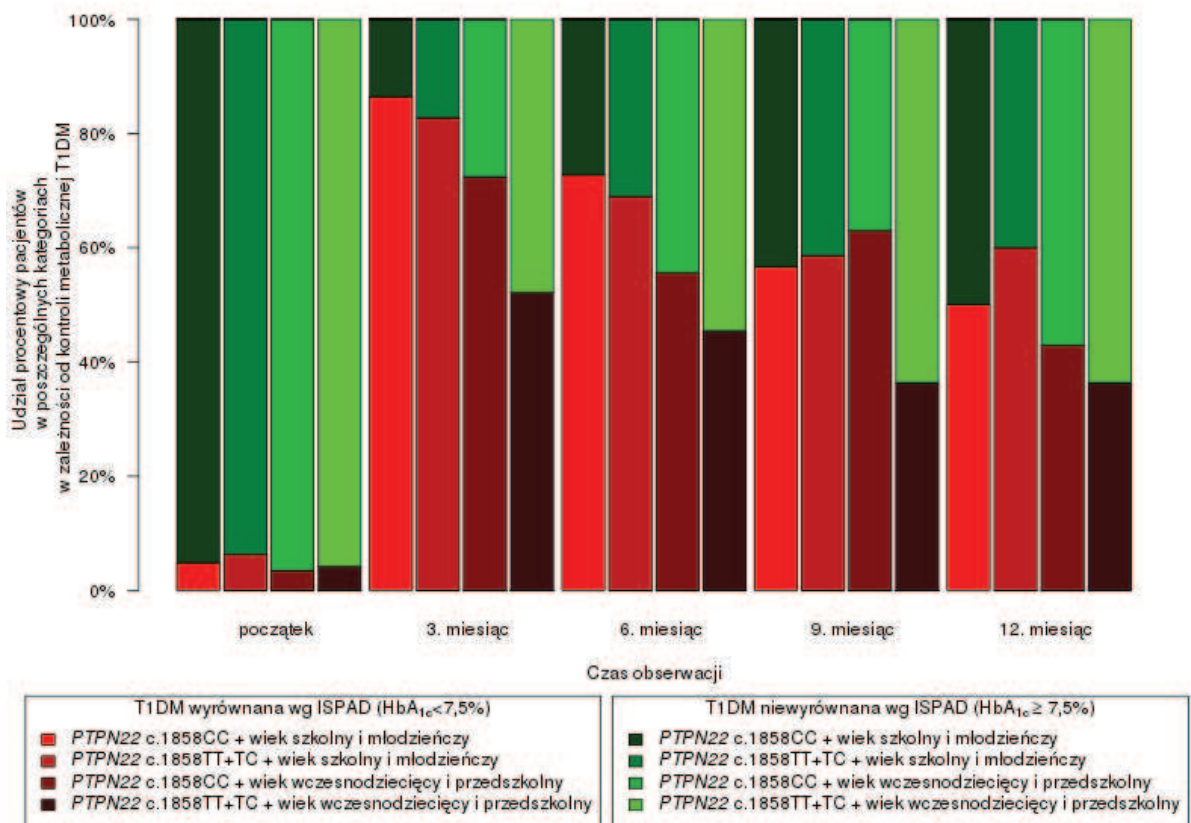
Natomiast wśród pacjentów z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM, szczególnie wysoki odsetek chorych z prawidłowo wyrównaną chorobą obserwowano u dziewcząt będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu, który był porównywalny z wartościami procentowymi stwierdzanymi wśród chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA. Z kolei najniższy odsetek osób z prawidłowo wyrównaną chorobą odnotowano wśród chłopców należących do grupy podwyższonego ryzyka genetycznego (genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC) (pacjenci z DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC: chłopcy 50,0%, dziewczęta 75,0%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC: chłopcy 22,22%, dziewczęta 54,54%; cała badana populacja 50,0%). (ryc.4.37)

Opisane powyżej zmiany w częstości występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego T1DM w 6 miesiącu obserwacji w podgrupie z rozpoznaną DKA w znacznym stopniu korespondowały z dynamiką zmian resztkowej insulinosekrecji w analizowanym modelu strukturalnym (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.3 str.138 \rightarrow ryc.4.29). W tym okresie choroby wśród pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA najwyższe wartości mediany stężeń C-peptydu stwierdzano u dziewcząt będących homozygotami *PTPN22* c.1858CC (6 miesiąc choroby: dziewczęta *PTPN22* c.1858CC z DKA – stężenie C-peptydu mediana 0,817 ng/ml). Jednocześnie powyższe poziomy C-peptydu pozostawały istotnie wyższe w porównaniu ze stężeniami obserwowanymi w podgrupie chorych z genotypami *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, niezależnie od płci, a w odniesieniu do wartości odnotowywanych w podgrupie chłopców o tym samym genotypie – utrzymywały się na granicy istotności (test Wilcozona, 6 miesiąc choroby – dziewczęta *PTPN22* c.1858CC z DKA: vs. genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC z DKA – chłopcy $p=0,017$; dziewczęta $p=0,027$; vs. genotyp *PTPN22* c.1858CC z DKA: chłopcy $p=0,058$). Natomiast analiza dobowego zapotrzebowania na insulinę (TDID) w 6 miesiącu trwania T1DM wśród pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA wykazała znamienne niższe wartości TDID u chłopców o genotypie *PTPN22* c.1858CC w odniesieniu do dziewcząt,

niezależnie od genotypu badanego polimorfizmu (test Wilcoxon 6 miesiąc choroby – pacjenci z DKA: chłopcy *PTPN22* c.1858CC vs. dziewczęta *PTPN22* c.1858CC $p=0,01$; chłopcy *PTPN22* c.1858CC vs. dziewczęta *PTPN22* c.1858TT+TC $p=0,006$; chłopcy *PTPN22* c.1858CC vs. chłopcy *PTPN22* c.1858TT+TC $p=0,128$).

14.6.2.4. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22*, z uwzględnieniem wieku pacjenta

W badanej populacji modulujące oddziaływanie poszczególnych genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, na stopień wyrównania metabolicznego choroby, z uwzględnieniem wieku pacjenta, wykazano jedynie w 3 miesiącu trwania obserwacji (dokładny test Fishera $p=0,011$). W tym okresie choroby wśród pacjentów zakwalifikowanych do starszej grupy wiekowej (wiek szkolny + młodzieńczy), niezależnie od genotypu badanego polimorfizmu, odsetek chorych z prawidłowo kontrolowaną T1DM przekraczał 80% (3 miesiąc choroby – wiek szkolny + młodzieńczy: genotyp *PTPN22* c.1858CC 86,44%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 82,75%). Natomiast wśród młodszych dzieci (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny) częstość występowania prawidłowego wyrównania choroby wyraźnie różniła się w zależności od genotypu analizowanego polimorfizmu (3 miesiąc choroby – wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: genotyp *PTPN22* c.1858CC 72,41%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 50,17%). (ryc.4.38)



Rycina 4.38. Ocena wyrównania metabolicznego T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM, w powiązaniu z wiekiem chorego

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes
 analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

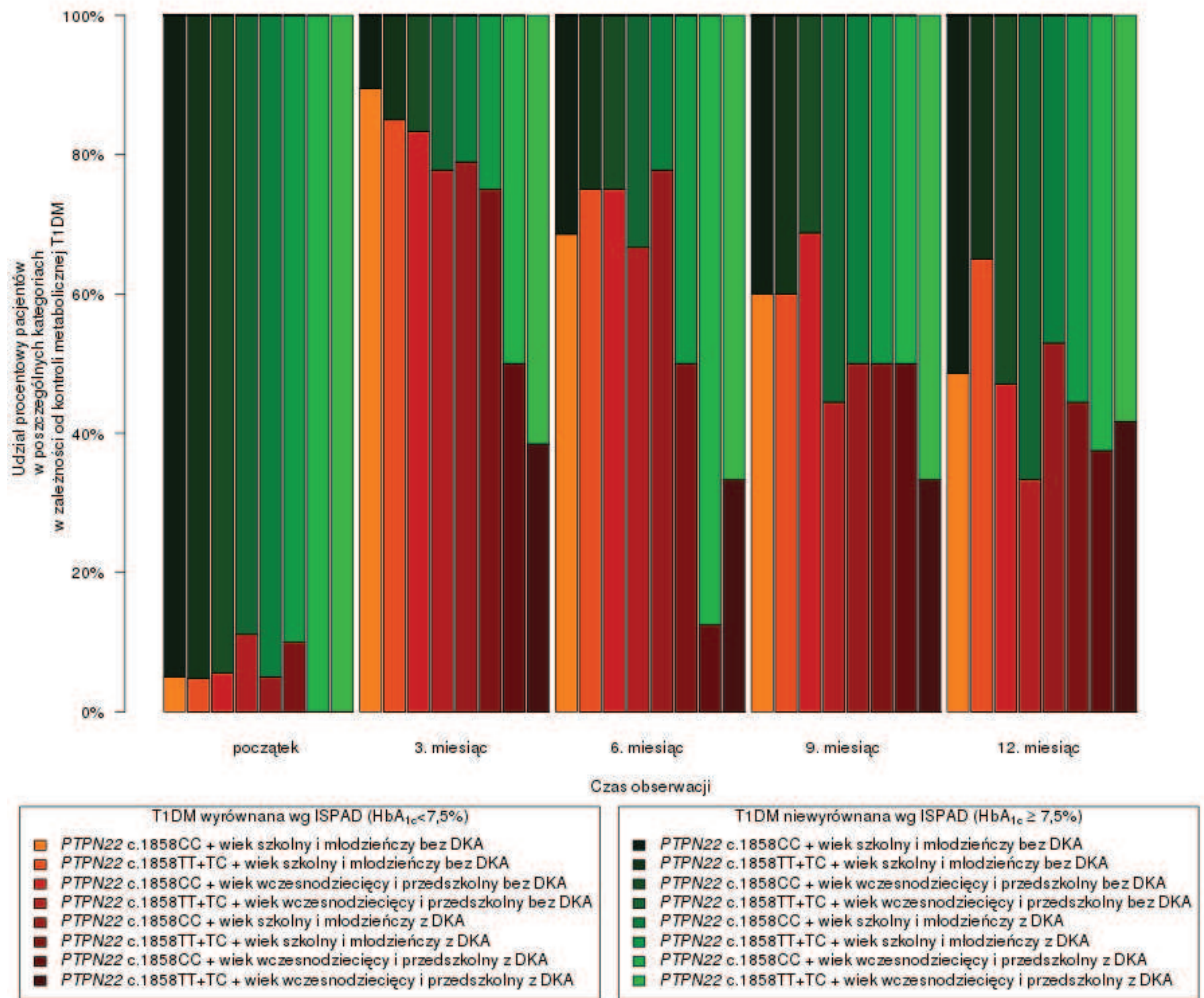
14.6.2.5. Wyrównanie metaboliczne choroby w pierwszym roku trwania T1DM a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/

W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem wieku na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (→ *Wyniki* pkt.11.2 str.97), przeprowadzono analizę dotyczącą potencjalnego oddziaływania powyższego układu strukturalnego na częstość występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby w pierwszym roku jej trwania. W dalszej części omówienia przedstawiono rezultaty analiz przeprowadzonych zgodnie z wytycznymi ISPAD, ze względu na dużą zbieżność wyników oceny kontroli metabolicznej choroby dokonanej na podstawie kryteriów ISPAD oraz PTD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67).

Analiza dotycząca oddziaływania badanego modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na częstość występowania prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby, wykazała jego istotny modulujący wpływ od 3 do 6 miesiąca trwania rocznej obserwacji pacjentów (dokładny test Fishera, 3 miesiąc choroby $p=0,01$; 6 miesiąc choroby $p=0,012$). (ryc.4.39)

W 3 miesiącu trwania choroby, u pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, należących do starszej grupy wiekowej (wiek szkolny + młodzieńczy), częstość występowania prawidłowej kontroli metabolicznej T1DM była porównywalna, niezależnie od genotypu analizowanego polimorfizmu i przekraczała 80%. Wśród młodszych dzieci (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny), bez stwierdzonych cech DKA w momencie diagnozy T1DM, odsetek osób z prawidłowym wyrównaniem metabolicznym choroby pozostawał zbliżony do wartości obserwowanych w starszej kategorii wiekowej u pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC, a w podgrupie zwiększonego ryzyka genetycznego (genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC) wynosił około 78% (pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: genotyp *PTPN22* c.1858CC 83,33%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 77,78%; wiek szkolny + młodzieńczy: genotyp *PTPN22* c.1858CC 89,47%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 85,0%; cała badana populacja 85,88%). (ryc.4.39)

Jednocześnie w tym samym okresie obserwacji, wśród chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, stężenia C-peptydu w każdej z kategorii wiekowych pozostawały porównywalne, niezależnie od genotypu badanego polimorfizmu (pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny – test Wilcoxon $p=0,334$; stężenie C-peptydu genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,4 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,412 ng/ml; wiek szkolny + młodzieńczy – test Wilcoxon $p=0,313$; stężenie C-peptydu genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,689 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,702 ng/ml) (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.5 str.140 → ryc.4.30 str.141) Natomiast analiza dobowego zapotrzebowania na insulinę (TDID) w 3 miesiącu trwania T1DM wśród pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA wykazała istotne, ale rozbieżne w poszczególnych grupach wiekowych zależności. Wśród młodszych dzieci (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny) stwierdzono znamienne niższe TDID u osób będących homozygotami CC badanego polimorfizmu (test Wilcoxon $p=0,008$; TDID – genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,33 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,53 ng/ml). U pacjentów o genotypie *PTPN22* c.1858CC, zakwalifikowanych do starszych kategorii wiekowych odnotowano natomiast istotnie wyższe wartości TDID w porównaniu z chorymi z grupy podwyższonego ryzyka genetycznego (test Wilcoxon $p=0,014$; TDID – genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,49 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,37 ng/ml).



Rycina 4.39. Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na wyrównanie metaboliczne T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa
 ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes
 analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

W tym samym okresie choroby wśród pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, częstość występowania prawidłowej kontroli metabolicznej T1DM, zbliżoną do wartości obserwowanych w grupie bez cech DKA na początku choroby, stwierdzano jedynie w starszych kategoriach wiekowych, niezależnie od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*. Natomiast u młodszych dzieci, po początkowym okresie dekompensacji spowodowanym występowaniem DKA, rzadziej dochodziło do wyrównania metabolicznego T1DM, a najsilniejsze oddziaływanie DKA na kontrolę metaboliczną choroby obserwowano wśród pacjentów o genotypach *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (pacjenci z DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: genotyp *PTPN22* c.1858CC 50,0%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 38,46%; wiek szkolny + młodzieńczy: genotyp *PTPN22* c.1858CC 78,95%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 75,0%; cała badana populacja 62,5%). (ryc.4.39)

Wśród chorych z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, najlepiej z poziomami C-peptydu korespondowała ocena wyrównania metabolicznego T1DM przeprowadzona u pacjentów zakwalifikowanych do starszych kategorii wiekowych, niezależnie od genotypu badanego polimorfizmu.

Jednocześnie obserwowane w obrębie każdej kategorii wiekowej rozkłady stężeń C-peptydu nie wykazywały istotnych statystycznie różnic w zależności od genotypu badanego polimorfizmu (pacjenci z DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny – test Wilcoxon $p=0,182$; stężenie C-peptydu genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,21 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,304 ng/ml; wiek szkolny + młodzieńczy – test Wilcoxon $p=0,313$; stężenie C-peptydu genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,539 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,63 ng/ml) (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.5 str.140 → ryc.4.30 str.141). Analiza dobowego zapotrzebowania na insulinę (TDID) w 3 miesiącu obserwacji wśród chorych z obciążonym wywiadem w kierunku DKA nie wykazała znamienych różnic w TDID u młodszych dzieci w zależności od genotypu badanego polimorfizmu (test Wilcoxon $p=0,5$; TDID – genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,53 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,56 ng/ml). Natomiast w starszej grupie wiekowej stwierdzono istotnie niższe TDID wśród pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC (test Wilcoxon $p=0,008$; TDID – genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,44 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,65 ng/ml).

W 6 miesiącu trwania T1DM w grupie chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, najwyższy odsetek pacjentów z prawidłowo wyrównaną metabolicznie T1DM obserwowano u osób zakwalifikowanych do starszej kategorii wiekowej i posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, a także wśród młodszych dzieci będących homozygotami CC badanego polimorfizmu. W pozostałych analizowanych podgrupach wykazano nieco niższą częstość występowania prawidłowej kontroli metabolicznej choroby, nieprzekraczającą 70% (pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: genotyp *PTPN22* c.1858CC 75,0%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 66,67%; wiek szkolny + młodzieńczy: genotyp *PTPN22* c.1858CC 68,57%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 75,0%; cała badana populacja 71,25%). (ryc.4.39)

Jednocześnie w tym samym okresie trwania T1DM, wśród chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, w obrębie każdej z kategorii wiekowych nie stwierdzano istotnych różnic w rozkładach stężeń C-peptydu, w zależności od genotypu badanego polimorfizmu. Najwyższe wartości mediany dla analizowanych stężeń C-peptydu obserwowano w starszej grupie wiekowej, natomiast poziomy C-peptydu odnotowane wśród młodszych dzieci lepiej korespondowały z wykazanymi częstościami prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby (pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny – test Wilcoxon $p=0,108$; stężenie C-peptydu genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,347 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,206 ng/ml; wiek szkolny + młodzieńczy – test Wilcoxon $p=0,449$; stężenie C-peptydu genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,727 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,647 ng/ml) (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.5 str.140 → ryc.4.30 str.141). Podczas analizy dobowego zapotrzebowania na insulinę (TDID) w powyższych podgrupach nie wykazano istotnych różnic w TDID w młodszych kategoriach wiekowych, w zależności od genotypu badanego polimorfizmu (test Wilcoxon $p=0,072$; TDID – genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,47 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,64 ng/ml). Natomiast u pacjentów o genotypie *PTPN22* c.1858CC, zakwalifikowanych do starszej grupy wiekowej stwierdzono istotnie wyższe wartości TDID w odniesieniu do podgrupy chorych podwyższonego ryzyka genetycznego (test Wilcoxon $p=0,036$; TDID – genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,52 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,42 ng/ml).

Wśród pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, największy odsetek chorych o prawidłowym wyrównaniu metabolicznym T1DM odnotowano u osób będących homozygotami CC badanego polimorfizmu genu *PTPN22* i należących do starszej kategorii wiekowej. Jednocześnie stwierdzana w tej podgrupie chorych częstość właściwej kontroli metabolicznej T1DM pozostawała najwyższa w całej badanej populacji w tym okresie obserwacji. Natomiast w młodszej grupie wiekowej, u osób posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC dochodziło do znacznego pogorszenia wyrównania metabolicznego choroby w odniesieniu do oceny przeprowadzonej w 3 miesiącu trwania T1DM, podczas gdy w tym samym okresie obserwacji poziom prawidłowej kontroli metabolicznej w podgrupie

zwiększonego ryzyka genetycznego pozostawał bardzo stabilny (pacjenci z DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: genotyp *PTPN22* c.1858CC 12,5%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 33,33%; wiek szkolny + młodzieńczy: genotyp *PTPN22* c.1858CC 77,78%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 50,0%; cała badana populacja 50,0%). (ryc.4.39)

W grupie chorych z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, u pacjentów zakwalifikowanych do starszych kategorii wiekowych, niezależnie od genotypu badanego polimorfizmu, stwierdzano najwyższe wartości median dla analizowanych stężeń C-peptydu, które najlepiej korespondowały z ocenianym wyrównaniem metabolicznym T1DM. Jednocześnie w obrębie każdej grupy wiekowej nie wykazano istotnych statystycznie różnic w rozkładach stężeń C-peptydu w zależności od genotypu badanego polimorfizmu (pacjenci z DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny – test Wilcoxon $p=0,357$; stężenie C-peptydu genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,14 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,1 ng/ml; wiek szkolny + młodzieńczy – test Wilcoxon $p=0,13$; stężenie C-peptydu genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,54 ng/ml; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,43 ng/ml) (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.5 str.140→ ryc.4.30 str.141). Analiza dobowego zapotrzebowania na insulinę (TDID) wśród pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, podobnie jak w 3 miesiącu obserwacji, nie potwierdziła występowania znamienych różnic w TDID u młodszych dzieci w zależności od genotypu badanego polimorfizmu (test Wilcoxon $p=0,35$; TDID – genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,65 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,58 ng/ml). Natomiast w starszej kategorii wiekowej wykazano istotnie niższe TDID wśród pacjentów będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu (test Wilcoxon $p=0,035$; TDID – genotyp *PTPN22* c.1858CC mediana 0,53 j/kg m.c./dobę; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC mediana 0,58 ng/ml).

14.6.3. Ocena potencjalnego związku polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* z wyrównaniem metabolicznym choroby w pierwszym roku trwania T1DM

Ostateczna interpretacja przeprowadzonych analiz, dotyczących potencjalnego związku pomiędzy polimorfizmem 5'VNTR genu *INS* (ocena za pomocą polimorfizmu markerowego –23H ϕ IA>T) a wyrównaniem metabolicznym T1DM, według kryteriów ISPAD i PTD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67), u obserwowanych pacjentów w pierwszym roku trwania choroby pozostaje niemożliwa, z uwagi na dystrybucję poszczególnych genotypów analizowanego polimorfizmu w badanej populacji (→ *Wyniki* pkt.7 str.86).

15. Ocena częstości występowania remisji klinicznej w badanej populacji z uwzględnieniem czynników potencjalnie modyfikujących jej wystąpienie

Ocenę częstości występowania remisji klinicznej w badanej populacji w poszczególnych miesiącach rocznej obserwacji przeprowadzono u wszystkich pacjentów, którzy posiadali komplet danych klinicznych umożliwiających kwalifikację chorego do odpowiedniej grupy według kryteriów remisji klinicznej ISPAD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67). Szczegółowe dane dotyczące powyższego zagadnienia przedstawiono w tabeli 4.14.

W grupie 128 pacjentów (87,07%) z kompletną roczną obserwacją oraz pełnym zestawieniem danych klinicznych, umożliwiającym ocenę kryteriów remisji klinicznej według ISPAD, dokonano analizy częstości występowania wejścia w remisję w określonym punkcie rocznej obserwacji. U 66 chorych (51,56%) podlegających ocenie, w okresie rocznej obserwacji nigdy nie stwierdzono wystąpienia remisji klinicznej. Wśród pacjentów spełniających kryteria remisji klinicznej według ISPAD oceniono również długość utrzymywania się remisji. Szczegółowe wyniki powyższych analiz zamieszczono w tabeli 4.15.

Tabela 4.14. Ocena częstości występowania remisji klinicznej według kryteriów ISPAD podczas rocznej obserwacji badanych pacjentów

<i>punkt obserwacji</i>	<i>liczba pacjentów uwzględniana w analizie</i>	<i>pacjenci spełniający kryteria remisji klinicznej według ISPAD^{*)}</i>	<i>pacjenci niespełniający kryteriów remisji klinicznej według ISPAD^{*)}</i>
moment rozpoznania choroby	147	3 (2,04%)	144 (97,96%)
I wizyta kontrolna (3 miesiąc choroby)	140	55 (39,29%)	85 (60,71%)
II wizyta kontrolna (6 miesiąc choroby)	133	38 (28,57%)	95 (71,43%)
III wizyta kontrolna (9 miesiąc choroby)	128	22 (17,19%)	106 (82,81%)
IV wizyta kontrolna (12 miesiąc choroby)	134	13 (9,70%)	121 (90,30%)

^{*)} dane w poszczególnych kolumnach przedstawiono jako liczbę pacjentów przyporządkowanych do określonej kategorii, w nawiasach podano ich udział procentowy w analizowanej populacji w danym punkcie rocznej obserwacji

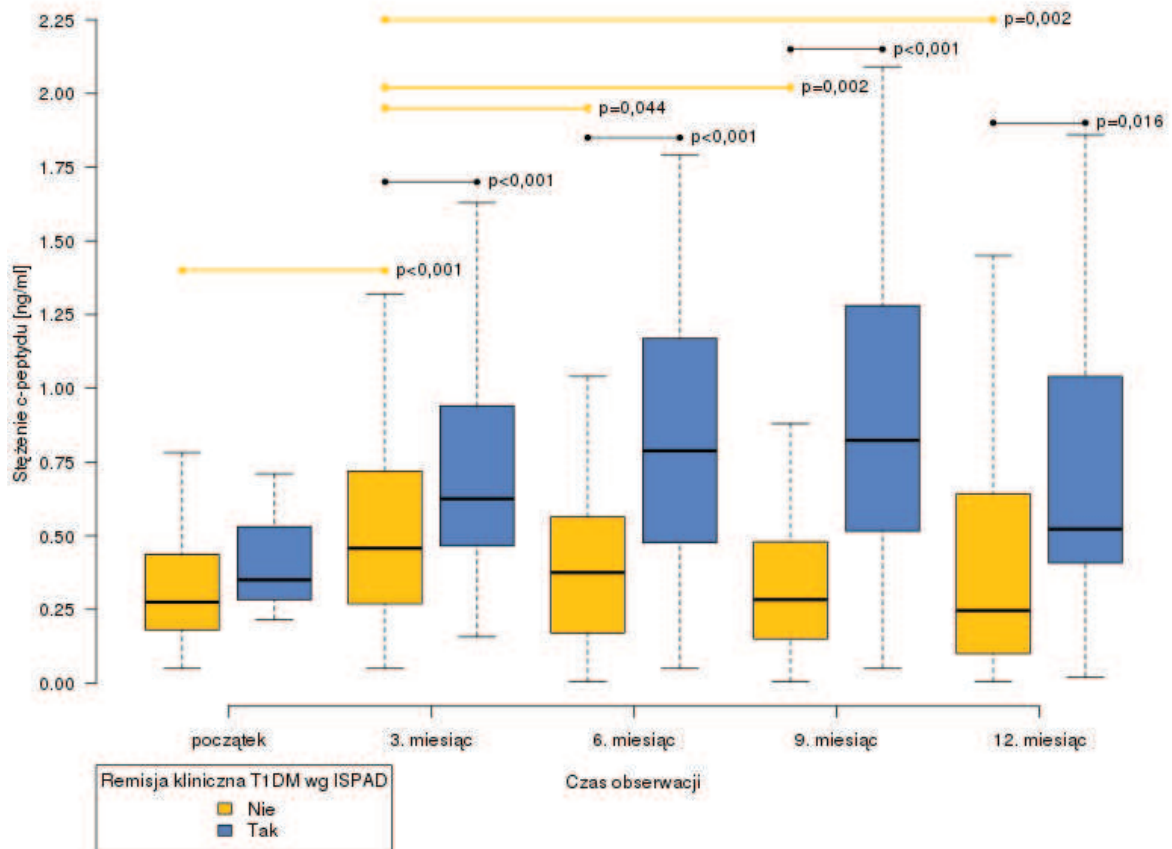
Tabela 4.15. Ocena częstości występowania wejścia w remisję kliniczną według kryteriów ISPAD w określonym punkcie rocznej obserwacji z uwzględnieniem długości utrzymywania się remisji w populacji badanej

	<i>liczba pacjentów spełniających kryteria remisji klinicznej według ISPAD w analizowanej populacji (n=128)</i>	<i>udział procentowy pacjentów spełniających kryteria remisji klinicznej według ISPAD w analizowanej populacji</i>
częstość występowania pierwszego wejścia w remisję kliniczną		
moment rozpoznania choroby	2	1,56%
I wizyta kontrolna (3 miesiąc choroby)	50	39,06%
II wizyta kontrolna (6 miesiąc choroby)	7	5,47%
III wizyta kontrolna (9 miesiąc choroby)	1	0,78%
IV wizyta kontrolna (12 miesiąc choroby)	2	1,56%
długość utrzymywania się remisji klinicznej		
do 3 miesięcy	30	23,44%
do 6 miesięcy	16	12,5%
do 9 miesięcy	7	5,47%
do 12 miesięcy	8	6,25%
od momentu rozpoznania T1DM do zakończenia obserwacji	1	0,78%

Ocena statystyczna przeprowadzona w oparciu o uproszczoną analizę łańcuchów Markowa

15.1. Funkcja resztkowa komórek β trzustki a występowanie remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM

W momencie rozpoznania T1DM nie stwierdzano istotnych różnic w stężeniu C-peptydu w grupie badanej w zależności od występowania remisji klinicznej definiowanej według kryteriów ISPAD (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67) (test Wilcozona, $p=0,201$). Natomiast od 3 miesiąca trwania choroby do zakończenia rocznej obserwacji u chorych spełniających kryteria rozpoznania remisji klinicznej obserwowano istotnie wyższe stężenia C-peptydu w porównaniu z pacjentami bez cech remisji (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu test Wilcozona) (ryc.4.40).



Rycina 4.40. Ocena związku pomiędzy dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki a występowaniem remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcozona, na rycinie zaznaczono zależności istotne statystycznie ($p<0,05$)

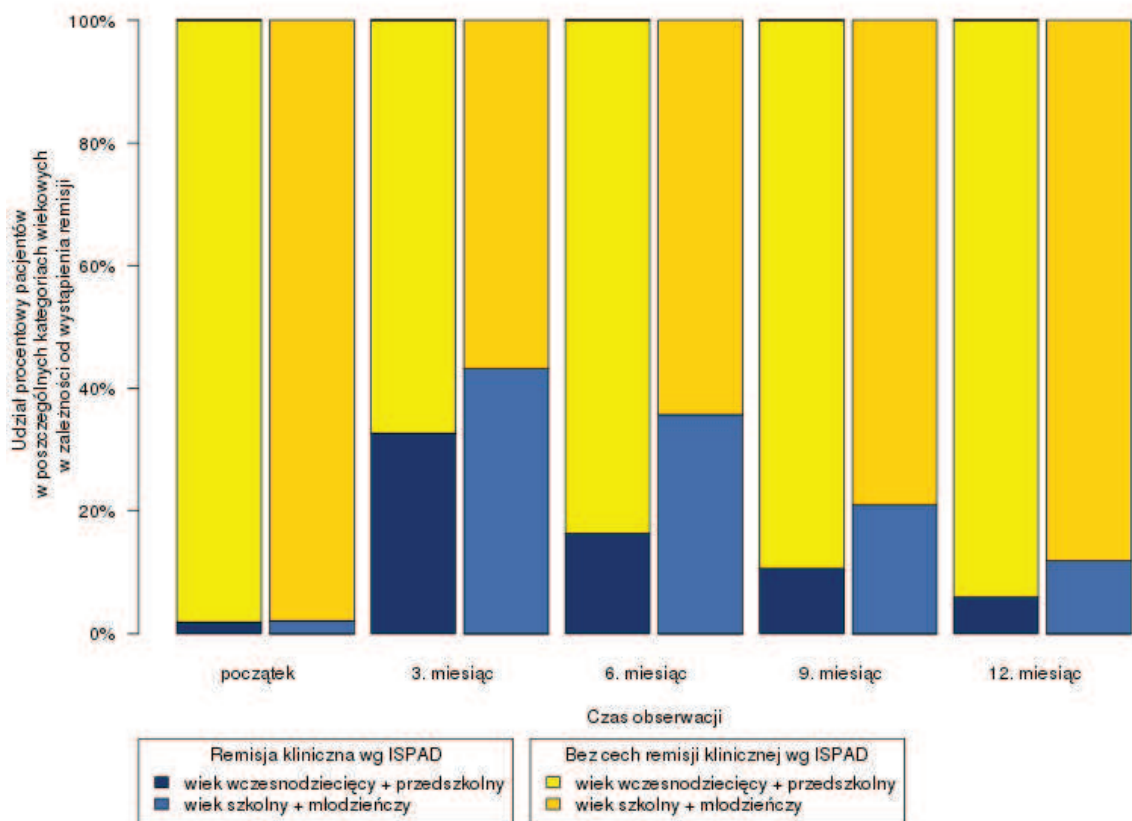
Jednocześnie w grupie pacjentów z rozpoznaną remisją kliniczną obserwowano zupełnie odmienną dynamikę zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki w pierwszym roku trwania T1DM. Od początku choroby aż do 9 miesiąca obserwacji dochodziło do stopniowego, nie wykazującego cech istotności, wzrostu wydzielania C-peptydu (test Wilcozona, miesiąc choroby: 0 vs. 3 $p=0,08$; 3 vs.6 $p=0,136$; 6 vs. 9 $p=0,432$). Stwierdzane w 9 miesiącu trwania T1DM wartości resztkowej insulinosекреcji były maksymalnymi poziomami obserwowanymi w pierwszym roku choroby (stężenia C-peptydu: początek choroby mediana 0,35 ng/ml; 9 miesiąc choroby mediana 0,823 ng/ml). W okresie od 9 do 12 miesiąca trwania T1DM w analizowanej grupie pacjentów dochodziło do nieistotnego statystycznie obniżenia się wydzielania C-peptydu (test Wilcozona, $p=0,154$; stężenie C-peptydu: 12 miesiąc choroby mediana 0,522 ng/ml). (ryc.4.40)

Natomiast wśród pacjentów, którzy nie spełniali kryteriów rozpoznania remisji klinicznej po istotnym wzroście stężeń C-peptydu w 3 miesiącu trwania T1DM (test Wilcoxona, $p < 0,001$; stężenie C-peptydu: początek choroby mediana 0,274 ng/ml; 3 miesiąc choroby mediana 0,458 ng/ml), dochodziło do znacznego i znamienego obniżenia się wartości resztkowej insulinosekrecji już w 6 miesiącu obserwacji (test Wilcoxona, $p = 0,044$; stężenie C-peptydu mediana 0,375 ng/ml). W kolejnych miesiącach postępował stopniowy zanik funkcji resztkowej komórek β trzustki, niewykazujący cech istotności statystycznej (test Wilcoxona, miesiąc choroby: 6 vs. 9 $p = 0,118$; 9 vs. 12 $p = 0,22$). Jednocześnie obserwowane od 6 miesiąca trwania T1DM poziomy C-peptydu pozostawały porównywalne ze stężeniami na początku choroby (test Wilcoxona, miesiąc choroby: 0 vs. 6 $p = 0,062$; 0 vs. 9 $p = 0,452$; 0 vs. 12 $p = 0,254$). (ryc.4.40)

15.2. Ocena częstości występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji w zależności od płci i wieku pacjenta

Podczas rocznej obserwacji pacjentów nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy płcią chorego a częstością występowania remisji klinicznej, definiowanej według kryteriów ISPAD (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67) (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

Jednocześnie w badanej populacji wykazano istotne modulujące oddziaływanie wieku na częstość występowania remisji klinicznej w 6 miesiącu trwania T1DM (ryc.4.41).



Rycina 4.41. Ocena częstości występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od wieku pacjenta

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes
analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

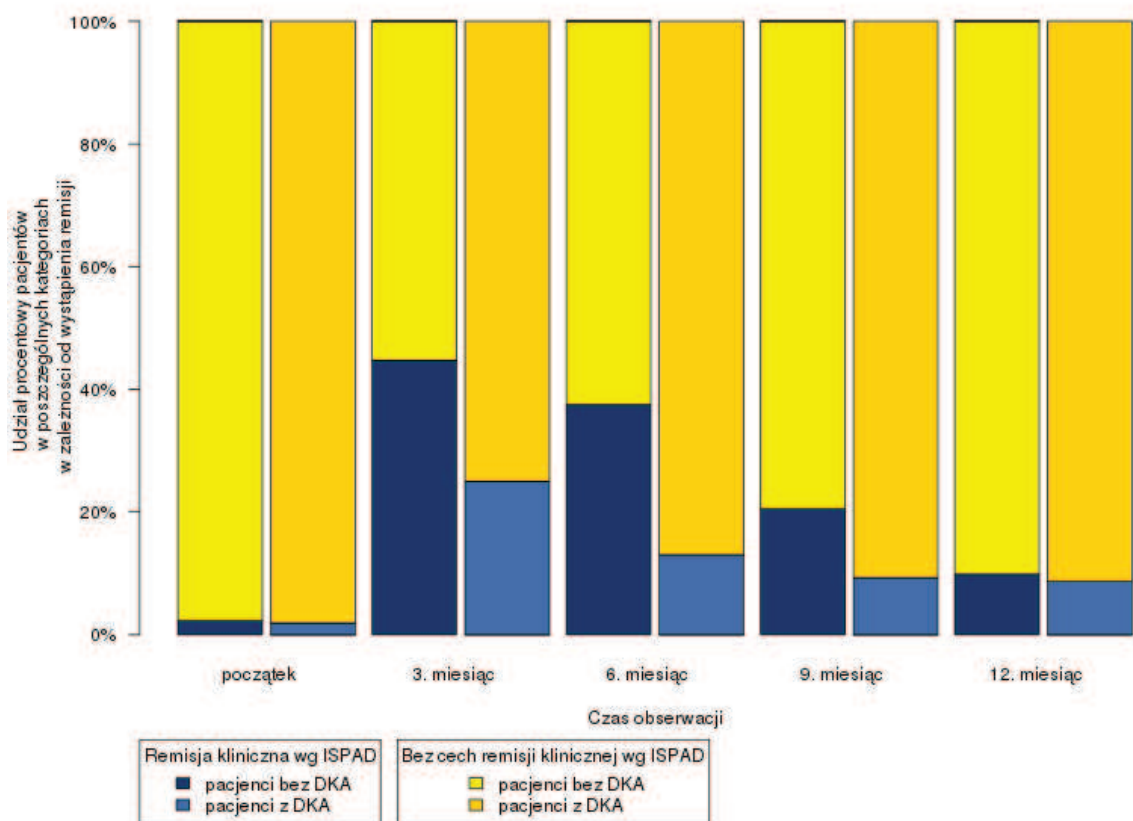
W 3 miesiącu obserwacji odsetek remisji klinicznej stwierdzany w młodszej grupie wiekowej pozostawał na nieco niższym, choć porównywalnym poziomie jak wśród pacjentów należących do

starszych kategorii wiekowych (dokładny test Fishera $p=0,147$; częstość występowania remisji: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny 32,69%; wiek szkolny + młodzieńczy 43,18%). (ryc.4.41) Natomiast w 6 miesiącu choroby wśród młodszych dzieci remisję kliniczną obserwowano praktycznie dwukrotnie rzadziej niż w starszej grupie wiekowej, w której odsetek stwierdzanej remisji utrzymywał się na poziomie zbliżonym do wartości wykazanych w 3 miesiącu obserwacji (dokładny test Fishera $p=0,013$; częstość występowania remisji: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny 16,33%; wiek szkolny + młodzieńczy 35,71%). (ryc.4.41)

Powyższe różnice w częstości występowania remisji klinicznej w zależności od wieku chorego korespondowały z wykazanymi zmianami w dynamice funkcji resztkowej komórek β trzustki w badanej populacji w poszczególnych grupach wiekowych (\rightarrow Wyniki pkt.13.1.2 str.117).

15.3. Ocena częstości występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji w zależności od występowania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej w momencie rozpoznania choroby

W badanej populacji, u pacjentów z rozpoznaną DKA na początku choroby rzadziej stwierdzano występowanie remisji klinicznej, definiowanej zgodnie z kryteriami ISPAD (\rightarrow Materiały i metody pkt.5.3 str.67). Powyższy trend utrzymywał się praktycznie przez cały okres rocznej obserwacji, a szczególnie istotne oddziaływanie DKA na częstość wystąpienia remisji klinicznej wykazano w 3 oraz 6 miesiącu trwania T1DM (dokładny test Fishera, 3 miesiąc choroby $p=0,018$; 6 miesiąc choroby $p=0,002$). (ryc.4.42)



Rycina 4.42. Ocena częstości występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

W 3 miesiącu obserwacji remisję kliniczną w grupie chorych z obciążonym wywiadem w kierunku DKA stwierdzano prawie dwukrotnie rzadziej niż wśród pacjentów bez rozpoznanej DKA w okresie ujawniania się choroby (3 miesiąc choroby - częstość występowania remisji: pacjenci bez DKA 44,71%; pacjenci z DKA 25%). W 6 miesiącu trwania T1DM stwierdzane różnice były jeszcze większe – chorzy z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA prawie trzykrotnie częściej pozostawali w fazie remisji klinicznej niż pacjenci z uprzednio rozpoznaną DKA (6 miesiąc choroby - częstość występowania remisji: pacjenci bez DKA 37,5%; pacjenci z DKA 13,04%). Podobną częstości występowania remisji w obu podgrupach wykazano dopiero w 12 miesiącu (12 miesiąc choroby - częstość występowania remisji: pacjenci bez DKA 9,88%; pacjenci z DKA 8,7%). (ryc.4.42)

Powyższe różnice w częstości występowania remisji w zależności od stanu klinicznego chorego w momencie rozpoznania T1DM, korespondowały ze zmianami w dynamice resztkowej insulinosekrecji, które obserwowano w analizowanych podgrupach (→ *Wyniki* pkt.13.1.6 str.121).

15.3.1. Ocena potencjalnego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, stwierdzanych u pacjenta na początku choroby, na częstość występowania remisji klinicznej T1DM w pierwszym roku jej trwania, z uwzględnieniem płci pacjenta

W badanej populacji nie stwierdzono istotnego modulującego oddziaływania płci na zależność pomiędzy częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania choroby, a rozpoznaniem DKA w okresie ujawniania się T1DM (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

15.3.2. Ocena potencjalnego oddziaływania zaburzeń gospodarki kwasowo – zasadowej, stwierdzanych u pacjenta na początku choroby, na częstość występowania remisji klinicznej T1DM w pierwszym roku jej trwania, z uwzględnieniem wieku pacjenta

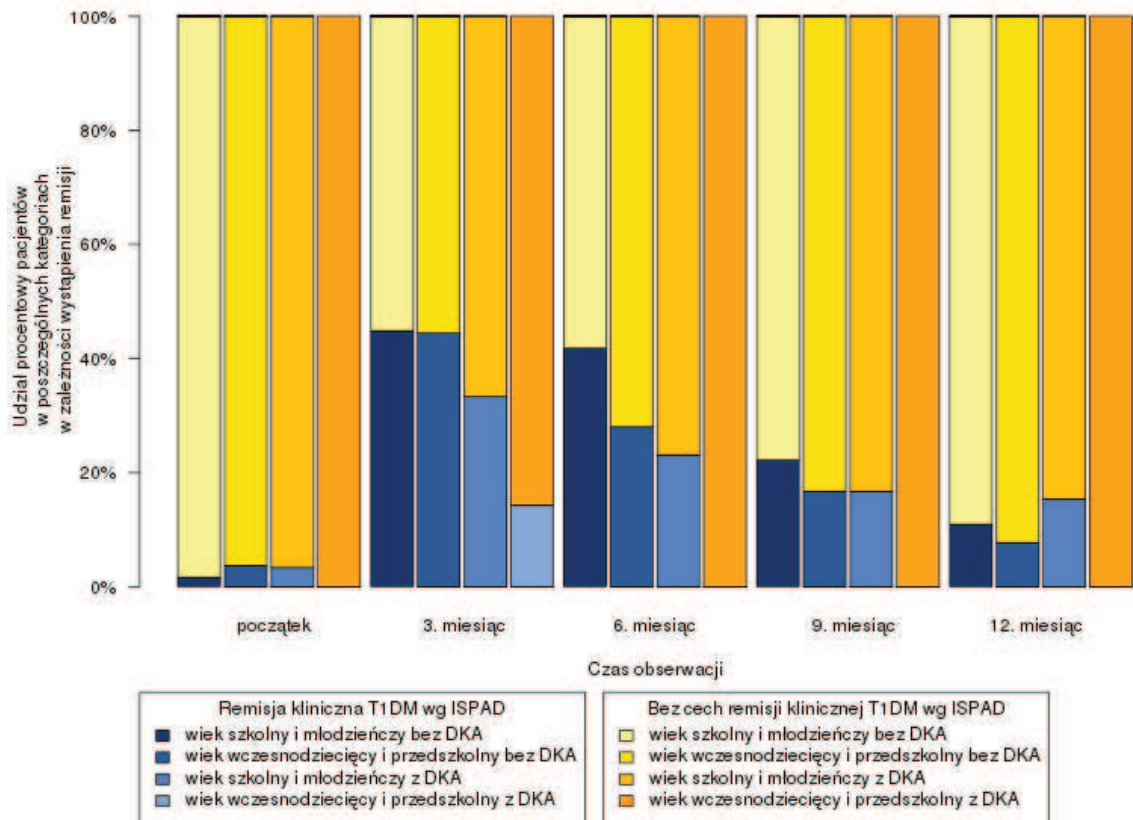
Znamienne, modulujące oddziaływanie wieku na zależność pomiędzy częstością występowania remisji klinicznej w badanej populacji w pierwszym roku choroby, a stwierdzeniem cech DKA w momencie diagnozy T1DM wykazano w 6 miesiącu prowadzonej obserwacji.

W 3 miesiącu choroby wśród pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA w młodszej i starszej kategorii wiekowej obserwowano porównywalne częstości występowania remisji klinicznej T1DM. W grupie chorych z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM występowanie remisji klinicznej wśród młodszych dzieci obserwowano praktycznie dwukrotnie rzadziej niż u pacjentów zakwalifikowanych do starszej kategorii wiekowej. Powyższe różnice pozostawały jednak nieistotne statystycznie (dokładny test Fishera $p=0,064$; częstość występowania remisji: pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny 44,44%; wiek szkolny + młodzieńczy 44,83%; pacjenci z DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny 14,29%; wiek szkolny + młodzieńczy 33,33%). (ryc.4.43)

W 6 miesiącu trwania choroby, w grupie pacjentów bez stwierdzonych cech DKA w momencie diagnozy T1DM i należących do starszej kategorii wiekowej odsetek obserwowanej remisji klinicznej pozostawał porównywalny z częstością wykazaną w 3 miesiącu choroby. Nieco niższą częstość występowania remisji odnotowano wśród pacjentów z tej samej grupy wiekowej, ale z obciążonym wywiadem w kierunku DKA. Najsilniejsze modulujące oddziaływanie DKA wykazano wśród młodszych dzieci – w tej podgrupie nikt nie spełniał kryteriów rozpoznania remisji klinicznej według ISPAD. Natomiast w przypadku negatywnego wywiadu w kierunku DKA częstość remisji obserwowana w młodszej grupie wiekowej wynosiła 28%. Opisane powyżej różnice w odsetku pacjentów spełniających kryteria remisji, w zależności od wzajemnego oddziaływania DKA rozpoznanej na początku choroby i wieku chorego, pozostawały znamienne statystycznie (dokładny test Fishera $p<0,001$; częstość występowania remisji: pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny 28,0%; wiek szkolny + młodzieńczy 41,82%;

pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny nie odnotowano przypadków; wiek szkolny + młodzieńczy 23,08%). (ryc.4.43)

Powyższe różnice w częstości występowania remisji w zależności od stanu klinicznego chorego w momencie rozpoznania T1DM, w powiązaniu z wiekiem pacjenta, korespondowały ze zmianami w dynamice resztkowej insulinosekrecji, które obserwowano w analizowanych podgrupach (→ Wyniki pkt.13.1.8 str.125).



Rycina 4.43. Ocena częstości występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej w zależności od wieku chorego oraz występowania DKA u pacjenta w momencie rozpoznania T1DM

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

15.4. Ocena potencjalnego związku wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* z częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji

15.4.1. Ocena potencjalnego związku polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* z częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji

Na podstawie analizy statystycznej przeprowadzonej w oparciu o dokładny test Fishera nie wykazano istotnego oddziaływania polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* na częstość występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji.

15.4.1.1. Częstość występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć/

W związku z wykazaniem w badanej populacji istotnym modulującym wpływem płci na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93), przeprowadzono kolejną analizę – dotyczącą potencjalnego oddziaływania powyższego układu strukturalnego na częstość występowania remisji klinicznej, definiowanej zgodnie z kryteriami ISPAD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67) w pierwszym roku trwania T1DM. Powyższa ocena nie potwierdziła modulującego wpływu badanego układu strukturalnego na częstość występowania remisji klinicznej w populacji badanej podczas rocznej obserwacji chorych (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

Nie wykazano również istotnego modulującego oddziaływania poszczególnych par zmiennych tworzących analizowany układ strukturalny na częstość występowania remisji klinicznej wśród obserwowanych pacjentów (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

15.4.2. Ocena potencjalnego związku polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* z częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji

Na podstawie analizy statystycznej przeprowadzonej w oparciu o dokładny test Fishera nie potwierdzono modulującego oddziaływania polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* na częstość występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji.

15.4.2.1. Częstość występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/

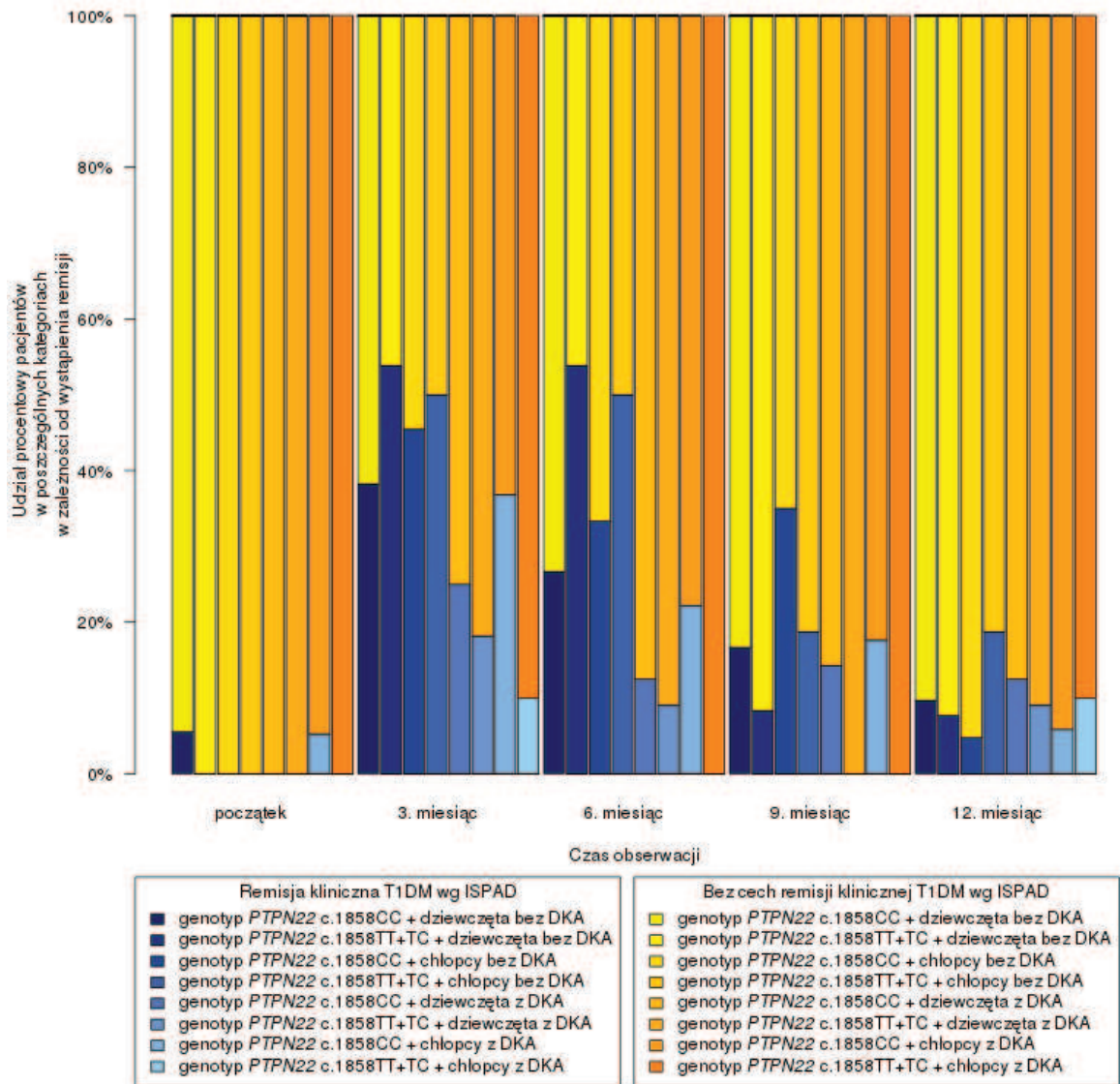
W związku ze stwierdzonym w badanej populacji istotnym modulującym wpływem płci na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93), przeprowadzono analizę dotyczącą potencjalnego oddziaływania powyższego układu strukturalnego na częstość występowania remisji klinicznej, definiowanej zgodnie z kryteriami ISPAD (→ *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67) w pierwszym roku trwania T1DM.

Powyższą ocenę poprzedzono analizami potencjalnego oddziaływania na częstość występowania remisji klinicznej poszczególnych par zmiennych tworzących układ strukturalny. Na podstawie przeprowadzonych analiz nie wykazano istotnych modulujących wpływów badanych par zmiennych na dynamikę fazy remisji w ocenianej populacji (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

Natomiast w przypadku modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ jego istotne oddziaływanie na częstość występowania remisji klinicznej obserwowano głównie w 6 miesiącu trwania choroby (dokładny test Fishera $p=0,039$). (ryc.4.44)

W 3 miesiącu trwania T1DM, wśród pacjentów z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, remisję kliniczną stwierdzano znacznie częściej u chorych posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC, szczególnie w podgrupie chłopców. Natomiast u pacjentów z podwyższonym ryzykiem genetycznym i rozpoznaną DKA na początku choroby wykazano najniższe częstości występowania remisji w badanej populacji (pacjenci z DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC: chłopcy 36,84%, dziewczęta 25,0%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC: chłopcy 10,0%, dziewczęta 18,18%; cała badana populacja 25,0%). (ryc.4.44) Jednocześnie u wszystkich

chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, odsetek remisji pozostawał dość wysoki, niezależnie od genotypu analizowanego polimorfizmu oraz był porównywalny w przypadku dziewcząt i chłopców posiadających ten sam genotyp (pacjenci bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC: chłopcy 45,45%, dziewczęta 38,23%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC: chłopcy 50,0%, dziewczęta 53,84%; cała badana populacja 44,71%). (ryc.4.44). Obserwowane powyżej różnice nie wykazywały jednak cech istotności statystycznej (dokładny test Fishera $p=0,288$), ale w znacznym stopniu korespondowały z dynamiką zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki w analizowanych podgrupach w tożsamym okresie choroby (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.3 str.138).



Rycina 4.44. Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na częstość występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

W 6 miesiącu trwania T1DM najsilniejsze oddziaływanie modulujące badanego układu strukturalnego stwierdzono w grupie pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, z

obciążonym wywiadem w kierunku DKA. U dziewcząt należących do powyższej podgrupy zaobserwowano około dwukrotne zmniejszenie się odsetka remisji klinicznej w odniesieniu do częstości wykazanej w 3 miesiącu choroby. Podobna dynamika fazy remisji występowała u dziewcząt również z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, ale będących homozygotami CC badanego polimorfizmu. W grupie chłopców, ze stwierdzoną DKA na początku choroby, żaden z pacjentów należących do grupy podwyższonego ryzyka genetycznego, nie spełniał kryteriów rozpoznania remisji klinicznej, podczas gdy w podgrupie z genotypem *PTPN22* c.1858CC odsetek remisji wynosił średnio 17,36% (pacjenci z DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC: chłopcy 22,22%, dziewczęta 12,5%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC: chłopcy nie odnotowano żadnego przypadku, dziewczęta 9,09%; cała badana populacja 13,04%). (ryc.4.44)

Odminną sytuację obserwowano w podgrupie chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA. U pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, niezależnie od płci, stwierdzano utrzymywanie się odsetka remisji klinicznej na poziomie porównywalnym z częstościami wykazanymi w 3 miesiącu trwania T1DM. Natomiast wśród chorych będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu w przypadku obu płci remisję kliniczną obserwowano około 1,5-krotnie rzadziej w odniesieniu do częstości stwierdzonych w 3 miesiącu choroby. (pacjenci bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC: chłopcy 33,33%, dziewczęta 26,67%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC: chłopcy 50,0%, dziewczęta 53,84%; cała badana populacja 37,5%). (ryc.4.44).

Wykazane powyżej różnice w częstości występowania remisji w ocenianych podgrupach w pewnym stopniu korespondowały z tożsamymi zmianami w dynamice zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.3 str.138).

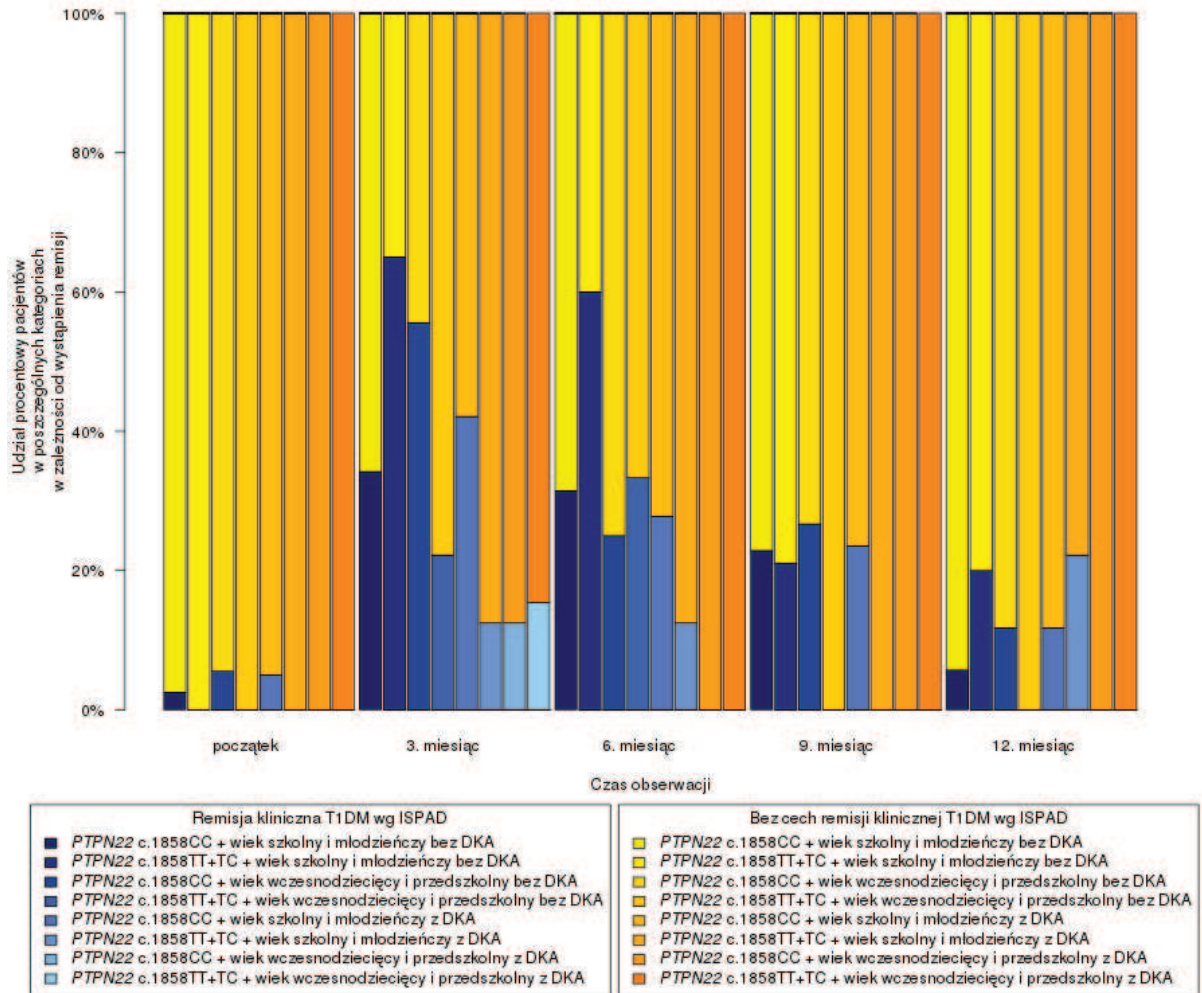
15.4.2.2. Częstość występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania choroby a potencjalne oddziaływanie modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/

W związku z obserwowanym w badanej grupie istotnym modulującym wpływem również i wieku na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby (\rightarrow Wyniki pkt.11.2 str.97), przeprowadzono kolejną analizę, uwzględniającą potencjalne oddziaływanie powyższego układu strukturalnego na częstość występowania remisji klinicznej T1DM, definiowanej zgodnie z kryteriami ISPAD (\rightarrow Materiały i metody pkt.5.3 str.67) w pierwszym roku trwania choroby.

Ocena potencjalnego modulującego wpływu poszczególnych par zmiennych tworzących układ strukturalny na częstość występowania remisji klinicznej w badanej populacji nie wykazała istotnych zależności (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

W 3 miesiącu trwania T1DM stwierdzono szczególnie dekompensujące oddziaływanie DKA, rozpoznanej na początku choroby, na częstość występowania remisji klinicznej T1DM głównie wśród młodszych dzieci, niezależnie od genotypu badanego polimorfizmu oraz w starszych kategoriach wiekowych, u osób posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (pacjenci z DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: genotyp *PTPN22* c.1858CC 12,5%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 15,38%; wiek szkolny + młodzieńczy: genotyp *PTPN22* c.1858CC 42,1%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 12,5%; cała badana populacja 25,0%). Wśród chorych będących homozygotami CC badanego polimorfizmu, należących do starszej grupy wiekowej częstość występowania remisji pozostawała zbliżona, niezależnie od stwierdzonej DKA na początku choroby (wiek szkolny + młodzieńczy – genotyp *PTPN22* c.1858CC: bez DKA 34,21%; z DKA 42,1%). (ryc.4.45) Natomiast znaczny odsetek remisji obserwowano w następujących podgrupach chorych z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA: u młodszych dzieci będących homozygotami *PTPN22* c.1858CC, wśród pacjentów ze starszej grupy wiekowej o genotypach *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (pacjenci bez DKA: wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: genotyp *PTPN22* c.1858CC 55,56%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 22,22%; wiek szkolny +

młodzieńczy: genotyp *PTPN22* c.1858CC 34,21%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 65,0%; cała badana populacja 44,71%). (ryc.4.45) Powyższe różnice w dynamice fazy remisji obserwowane w poszczególnych podgrupach analizowanego modelu strukturalnego wykazywały cechy znamienności statystycznej (dokładny test Fishera $p=0,019$) oraz częściowo korespondowały z tożsamymi zmianami w dynamice zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki (\rightarrow Wyniki pkt.13.5.2.5 str.140).



Rycina 4.45. Ocena oddziaływania modelu strukturalnego / polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ na częstość występowania remisji klinicznej T1DM według kryteriów ISPAD w pierwszym roku trwania choroby w populacji badanej

DKA – cukrzycowa kwasica ketonowa

ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera

W 6 miesiącu trwania choroby nadal stwierdzano modulujące oddziaływanie badanego układu strukturalnego na przebieg fazy remisji w obserwowanej populacji pacjentów (dokładny test Fishera $p=0,006$). Wśród pacjentów z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA, u młodszych dzieci, będących homozygotami CC polimorfizmu genu *PTPN22*, obserwowano znaczne obniżenie się odsetka remisji w odniesieniu do częstości wykazanych w 3 miesiącu trwania choroby, podczas gdy w tej samej kategorii wiekowej, w podgrupie podwyższonego ryzyka genetycznego odsetek remisji utrzymywał się na stabilnym poziomie. Wśród chorych ze stwierdzoną DKA w momencie diagnozy T1DM oraz zakwalifikowanych do młodszych kategorii wiekowych, niezależnie od genotypu analizowanego polimorfizmu, żaden pacjent nie

spełniał kryteriów rozpoznania remisji według ISPAD 1858TC (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny: pacjenci bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC 25,0%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 33,33%; pacjenci z DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC oraz genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC nie odnotowano żadnego przypadku). (ryc.4.45)

Natomiast wśród pacjentów należących do starszej grupy wiekowej, niezależnie od wywiadu w kierunku DKA, jak również genotypu badanego polimorfizmu obserwowano utrzymywanie się odsetka remisji klinicznej na poziomie porównywalnym z częstościami wykazanymi w 3 miesiącu trwania T1DM (wiek szkolny + młodzieńczy: pacjenci bez DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC 31,43%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 60%; pacjenci z DKA: genotyp *PTPN22* c.1858CC 27,78%; genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC 12,5%). (ryc.4.45)

Powyższe zmiany w dynamice przebiegu fazy remisji w poszczególnych grupach modelu strukturalnego częściowo korespondowały z tożsamymi różnicami w dynamice zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki (\rightarrow *Wyniki* pkt.13.5.2.5 str.140).

15.4.3. Ocena potencjalnego związku polimorfizm 5'VNTR genu *INS* z częstością występowania remisji klinicznej w pierwszym roku trwania T1DM w badanej populacji

Ostateczna interpretacja przeprowadzonych analiz, dotyczących potencjalnego związku pomiędzy polimorfizmem 5'VNTR genu *INS* (ocena za pomocą polimorfizmu markerowego –23*Hph*I>T) a częstością występowania remisji, według kryteriów ISPAD (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.5.3 str.67), u obserwowanych pacjentów w pierwszym roku trwania choroby pozostaje niemożliwa, z uwagi na dystrybucję poszczególnych genotypów analizowanego polimorfizmu w badanej populacji (\rightarrow *Wyniki* pkt.7 str.86).

16. Ocena częstości współwystępowania z T1DM innych chorób autoimmunologicznych w pierwszym roku trwania choroby w badanej populacji

16.1. Ocena częstości współwystępowania z T1DM autoimmunologicznego zapalenia tarczycy w badanej populacji w pierwszym roku trwania obserwacji

Przed rozpoznaniem T1DM autoimmunologiczne zapalenie tarczycy (AIT) zostało zdiagnozowane u 6 dzieci (4,08%), w tym u czwórki pacjentów na etapie fazy subklinicznej choroby (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.7.3 str.72). W momencie rozpoznania T1DM w badanej populacji stwierdzono kolejne 3 przypadki AIT oraz 9 przypadków postaci subklinicznej AIT (łącznie w momencie rozpoznania T1DM: AIT 5 chorych – 3,4%; faza subkliniczna AIT 13 pacjentów – 8,84%). Po 12 miesiącach liczba chorych z rozpoznaniem AIT wzrosła do 11 osób (8,15%), a w przypadku postaci subklinicznej AIT – do 14 pacjentów (10,37%).

W momencie rozpoznania T1DM AIT istotnie częściej stwierdzano u dziewcząt, natomiast po 12 miesiącach, pomimo przewagi dziewcząt wśród chorych z rozpoznaniem AIT, powyższa zależność nie wykazywała już cech znamienności (dokładny test Fishera, początek choroby $p=0,003$; odsetek dziewcząt 80%; 12 miesiąc choroby $p=0,057$; odsetek dziewcząt 65,38%). AIT istotnie częściej współlistniało z T1DM wśród pacjentów należących do starszych kategorii wiekowych (dokładny test Fishera, początek choroby $p<0,001$; wiek szkolny + młodzieńczy 95% rozpoznań; 12 miesiąc choroby $p<0,001$; wiek szkolny + młodzieńczy 88,46% rozpoznań).

Przez cały pierwszy roku trwania T1DM u chorych z dodatnim mianem autooprzeciwciał TPO lub autooprzeciwciał TG (\rightarrow *Materiały i metody* pkt.7.3 str.72) stwierdzano występowanie znamienne wyższych mian autooprzeciwciał GAD (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o test Wilcoxa).

W badanej populacji nie wykazano istotnych zależności pomiędzy dystrybucją poszczególnych genotypów (w tym również stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM) wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* a występowaniem dodatniego miana autooprzeciwciał TPO lub TG (analizy statystyczne przeprowadzone w oparciu o dokładny test Fishera).

16.2. Ocena częstości współwystępowania z T1DM celiakii w populacji badanej w pierwszym roku prowadzonej obserwacji

W momencie rozpoznania T1DM celiakię zdiagnozowano u 2 osób (1,36%), a u 5 chorych stwierdzono dodatkowo miano autoprzeciwciał TGA, przy prawidłowym obrazie mikroskopowym śluzówki jelita cienkiego (→ *Materiały i metody* pkt.7.4 str.73). W 12 miesiącu trwania T1DM celiakia występowała u 8 pacjentów (5,93%), głównie w postaci asymptomatycznej, a u 2 osób stwierdzono postać nieklasyczną choroby. Natomiast u jednej pacjentki obserwowano dodatkowo miano autoprzeciwciał TGA, z prawidłowym obrazem mikroskopowym śluzówki jelita cienkiego. U opisanych powyżej chorych nie stwierdzono predylekcji do występowania określonego układu genotypów badanych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS*.

Dyskusja

Prezentowane badanie, według wiedzy autora, stanowi jedno z pierwszych badań oceniających potencjalne oddziaływanie wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* na przebieg kliniczny świeżo rozpoznanej autoimmunologicznej postaci T1DM w populacji wieku rozwojowego, pochodzącej z terenów województwa pomorskiego. Powyższe badanie wpisuje się w nurt nowoczesnych badań typu genotyp – fenotyp, stanowiących podstawę medycyny personalizowanej – medycyny skoncentrowanej na indywidualnych cechach biologicznych pacjenta. Stwarza to możliwość wyboru u każdego chorego najbardziej efektywnej formy leczenia i jednocześnie pozwala zminimalizować ryzyko wystąpienia działań niepożądanych zastosowanej terapii, co nabiera szczególnego znaczenia w przypadku pacjentów pediatrycznych.

Przedstawione w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki obejmują pierwszy rok obserwacji badanej populacji. Obecnie w grupie pacjentów, którzy ukończyli prezentowane badanie kontynuowana jest dalsza obserwacja klinicznego przebiegu choroby, jak również poszerzony jest panel analiz genetycznych, biochemicznych i serologicznych w ramach projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.

Ogólna ocena jakości prezentowanego badania

Ze względu na ścisłe powiązanie mechanizmów działania genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w procesach kontroli rozwoju reakcji autoimmunologicznych, do prezentowanego badania wybrano wyłącznie pacjentów z potwierdzoną autoimmunologiczną postacią T1DM (kryteria kwalifikacji pacjentów → *Materiały i metody* pkt.1 str.35), celem potencjalizacji ewentualnego efektu oddziaływania wybranych polimorfizmów genetycznych (c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS*) na przebieg kliniczny choroby.

Jako markery serologiczne postaci autoimmunologicznej T1DM stosowano oznaczenia trzech swoistych autoprzeciwciał: przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD), przeciwinulinowych (IAA) oraz przeciw wyspom trzustkowym (ICA). Podczas kwalifikacji pacjentów do badania niemożliwe było przeprowadzenie oznaczeń miana autoprzeciwciał skierowanych przeciw transporterowi cynku 8 (ZnT8), z uwagi na niedostępność certyfikowanego testu diagnostycznego w momencie tworzenia projektu, jak również w początkowym etapie trwania badania (kwalifikację pacjentów do badania rozpoczęto w X 2008 roku, natomiast wprowadzenie certyfikowanego, komercyjnego testu diagnostycznego nastąpiło na przełomie 2009/2010 roku).

Kwalifikacja do badania pacjentów stale zamieszkujących na terenie województwa pomorskiego pozwoliła na dokonanie charakterystyki genetycznej grupy osób ściśle związanych z jednym regionem Polski, który zgodnie z notowanymi wskaźnikami zapadalności na T1DM w populacji wieku rozwojowego należy zaliczyć obecnie do regionów o umiarkowanej zapadalności (średni współczynnik zapadalności w latach 1999 – 2010 dla populacji wieku rozwojowego województwa pomorskiego – 14,32 przypadków T1DM/100 tys. mieszkańców/rok, dane autora: z lat 1999-2005 opublikowane (Pawłowicz et al., 2007), z lat 2006-2010 niepublikowane). Zmiana klasyfikacji epidemiologicznej regionu pomorskiego, z terenu o niskiej zapadalności na rejon o średnim wskaźniku zapadalności na T1DM, nastąpiła w latach 1999-2005, podobnie jak w przypadku większości województw w Polsce (Jarosz-Chobot and Otto-Buczkowska, 2010, Szadkowska et al., 2006, Patterson et al., 2012) i spowodowana była istotnym wzrostem wskaźników zapadalności na T1DM głównie w populacji dziecięcej. Chęć wyjaśnienia powyższego zjawiska stała się jednym z powodów stworzenia przez autora prezentowanego badania.

Konstruując projekt prezentowanego badania wprowadzono liczne procedury zwiększające precyzję i dokładność prowadzonych pomiarów oraz obserwacji (Watała, 2011):

zastosowanie kategoryzacji uzyskiwanych danych, zgodnej z obowiązującymi standardami merytorycznymi oraz aktualnymi wytycznymi towarzystw naukowych (ADA, ESPE, IDF, IDS, ISPAD, LWPES, PTD)

- opracowanie protokołu wizyt kontrolnych pacjentów (→ *Materiały i metody* pkt.2.2 str.43)
- standaryzacja sposobu pobierania materiału biologicznego do badań – zastosowanie zamkniętego próżniowego systemu do pobierania krwi, zastosowanie probówek z separatorom żelowym celem wyeliminowania hemolizy w badanych próbkach
- powtarzanie pomiarów – powtórzenia pomiarów antropometrycznych (szczególnie wysokości ciała) w czasie wizyty kontrolnej, dwukrotny pomiar miana autoprzeciwciał GAD i IAA w momencie kwalifikacji pacjenta do badania
- zastosowanie wystandaryzowanych testów laboratoryjnych – oznaczenia HbA_{1c} (metoda HPLC, certyfikat NGSP), oznaczenia autoprzeciwciał (wystandaryzowane testy ELISA, certyfikat CE), oznaczenia C-peptydu (metoda chemiluminescencji certyfikat CE)
- odpowiednie opracowanie metod oznaczeń genetycznych – wprowadzenie tzw. dodatkowego miejsca cięcia enzymu restrykcyjnego w metodzie RFLP, zastosowanie sekwencjonowania DNA jako metody weryfikującej wyniki procedury PCR-RFLP (→ *Dyskusja* pkt. *Ogólna ocena przeprowadzonych analiz genetycznych* str.178)
- maskowanie – wprowadzenie kodowania próbek do badań genetycznych, próbek do oznaczeń biochemicznych i immunologicznych celem zminimalizowania wpływu osoby przeprowadzającej analizy na wyniki badań, szczególnie na wyniki seryjnych pomiarów dokonywanych u poszczególnych pacjentów podczas rocznej obserwacji

W przypadku oceny funkcji resztkowej komórek β trzustki za pomocą pomiarów stężeń C-peptydu na czczo niezwykle istotne pozostaje postępowanie zgodnie z wytycznymi IDS oraz ADA, co pozwala na osiągnięcie wyników korelujących ze stężeniami C-peptydu uzyskiwanymi podczas testu tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego (MMTT) (→ *Materiały i metody* pkt.4.3 str.66). W prezentowanej pracy podczas analiz dotyczących resztkowej insulinosekrecji uwzględniano jedynie pomiary z próbek surowicy pobranych przy stężeniu glukozy we krwi włośniczkowej 70 – 200 mg/dl (→ *Wyniki* pkt.13 str.114). Ze względu na specyfikę populacji badanej (populacja pediatryczna) pomiarów glikemii dokonywano na czczo, za pomocą osobistego glukometru chorego, po odpowiednim przygotowaniu pacjenta (→ *Materiały i metody* pkt.2.2 str.43). Powyższe postępowanie konsultowano z prof. dr hab. n. med. Jackiem Sieradzkim (były Kierownik Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, były Prezes Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego), uzyskując pozytywną opinię, wskazującą na poprawność postępowania, pod warunkiem stosowania nowoczesnych glukometrów kalibrowanych do osocza (korespondencja elektroniczna z dnia 15.01.2009 oraz 9.02.2009). W powyższy rodzaj glukometrów standardowo wyposażeni byli wszyscy pacjenci uczestniczący w badaniu.

W przypadku badań obserwacyjnych o charakterze longitudinalnym, prospektywnym niezwykle ważną kwestią decydującą o jakości i sile badania jest przestrzeganie pełnego okresu obserwacyjnego oraz minimalizacja utraty przypadków (Watała, 2011). W prezentowanym badaniu planowany okres obserwacyjny dla każdego pacjenta wynosił 12 miesięcy i był w pełni zachowywany. Kompletność obserwacji dla całego prezentowanego badania wynosiła 88,43% (dla poszczególnych wizyt kontrolnych 89,8% - 95,24%), a odsetek wizyt kontrolnych zrealizowanych planowo wahał się w granicach 72,59% - 84,09% (→ *Wyniki* pkt.1.1 oraz pkt.1.2 str.76-77).

Populacja badana na tle innych populacji wieku rozwojowego z T1DM, prezentowanych w piśmiennictwie

W populacji województwa pomorskiego, podobnie jak w większości ocenianych populacji europejskich (Craig et al., 2009), nie wykazywano różnic w zapadalności na T1DM w zależności od płci (Pawłowicz et al., 2007), a w badanej grupie stosunek liczby chłopców do liczby dziewcząt wynosił 1:1. (→ *Wyniki* pkt.1 str.76 → ryc.4.1.).

Ze względu na istotne różnice w zapadalności na T1DM w zależności od wieku pacjenta, stwierdzone uprzednio w populacji wieku rozwojowego województwa pomorskiego (Pawłowicz et al., 2007), obecnie również dokonano szczegółowej analizy rozkładu wieku w grupie badanej, wykazując bimodalność rozkładu tej zmiennej (→ *Wyniki* pkt.1.3 str.77 → ryc.4.2.). W większości populacji przedstawianych w piśmiennictwie opisywane są dwa szczyty zachorowań w okresie rozwojowym: pierwszy z nich przypadający w wieku wczesnodziecięcym i przedszkolnym – poniżej 5 roku życia, a drugi – w wieku młodzieńczym: powyżej 12 roku życia (Craig et al., 2009, Harjutsalo et al., 2008, Felner et al., 2005). Podobną sytuację obserwowano również w analizowanej grupie chorych, stwierdzając najliczniejsze przypadki zachorowań na T1DM w wieku 2-6 lat oraz 8-13 lat (→ *Wyniki* pkt.1.3 str.77 → ryc.4.2.). Jednocześnie większość analiz dotyczących wieku pacjenta w prezentowanej rozprawie przeprowadzono z podziałem na dwie kategorie wiekowe, aby zachować specyfikę rozkładu powyższej zmiennej.

W badanej populacji częstość występowania T1DM w rodzinie wynosiła 16,33% i była porównywalna z częstościami opisywanym w innych regionach Polski (Krawczuk-Rybak et al., 1999). Również odsetek rodziców chorujących na T1DM (4,08%) odpowiadał częstościom podawanym w piśmiennictwie (Craig et al., 2009). Stwierdzony dość znaczny odsetek krewnych III stopnia z rozpoznaną T1DM (11,56%) wśród pacjentów zakwalifikowanych do badania wynikał z bardzo dokładnego przeprowadzenia wywiadu, często bezpośrednio ze wskazanym krewnym, weryfikowanego wglądem do dokumentacji medycznej. Jednocześnie częstość rodzinnego występowania T1DM w badanej grupie, w przypadku analizy poszczególnych stopni pokrewieństwa, pozostawała dwukrotnie niższa w porównaniu do częstości obserwowanych w populacji fińskiej i bardziej korespondowała z częstościami obserwowanymi w grupie kontrolnej badania przeprowadzonego przez Alhonen S. et al. (Alhonen et al., 2011). Natomiast częstość występowania pozytywnego wywiadu rodzinnego w kierunku T2DM w analizowanej populacji (→ *Wyniki* pkt.2.1 str.79) stanowiła odzwierciedlenie ogólnej sytuacji epidemiologicznej dotyczącej T2DM (Wild et al., 2004).

Częstość występowania schorzeń z kręgu autoimmunologicznych w rodzinach obserwowanych pacjentów (38,77%) znacznie przewyższała częstości stwierdzane w innych regionach Polski (11,61%) (Krawczuk-Rybak et al., 1999), jak również w populacjach skandynawskich (Szwecja 10,3%) (Hemminki et al., 2009), (Finlandia 22%) (Alhonen et al., 2011), a do najczęściej rejestrowanych schorzeń należały choroby skóry (łuszczyca, łysienie plackowate, bielactwo) (→ *Wyniki* pkt. 2.2 str.80).

Częstość występowania cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA) oraz analiza czynników ryzyka jej rozwoju w badanej populacji w odniesieniu do aktualnych danych z piśmiennictwa. Inne stany ostrej hiperglikemii w okresie ujawniania się T1DM w obserwowanej grupie chorych

W uprzednio raportowanym okresie czasu (lata 1999-2005) DKA, definiowaną zgodnie z wytycznymi ISPAD (Wolfsdorf et al., 2009), stwierdzono u 32,9% dzieci ze świeżo rozpoznaną T1DM, pochodzących z terenów województwa pomorskiego (Pawłowicz et al., 2009). Powyższy raport został uwzględniony w ostatnim przeglądzie systematycznym dotyczącym różnic w częstości występowania DKA w momencie rozpoznania T1DM w 31 krajach (Usher-Smith et al., 2012). Region pomorski, podobnie jak i region łódzki oraz śląski w cytowanym przeglądzie systematycznym zostały zaliczone do rejonów o wysokiej częstości występowania DKA w okresie ujawniania się T1DM (9 miejsc).

W obecnie prezentowanym badaniu, odsetek DKA rozpoznanej w momencie diagnozy T1DM utrzymywał się na podobnym poziomie (35,37%), przy porównywalnej alokacji pacjentów w poszczególnych kategoriach oceniających stopień ciężkości DKA (→ *Wyniki* pkt.3 str.81).

Jednocześnie w badanej populacji przeprowadzono szeroką analizę czynników demograficznych, środowiskowych, autoimmunologicznych oraz genetycznych mogących modulująco oddziaływać na stan chorego w momencie rozpoznania T1DM. Podczas oceny uwzględniającej zależności związane z czynnikami demograficznymi wykazano znamienne częstsze występowanie DKA wśród chłopców. Płeć chorego w przeglądzie systematycznym, dotyczącym czynników ryzyka rozwoju DKA w momencie rozpoznania T1DM (Usher-Smith et al., 2011), została zaliczona do czynników nie wpływających istotnie na częstość występowania DKA. Jednak, jak podkreślili autorzy powyższego przeglądu, dane w piśmiennictwie pozostają niejednoznaczne, co możliwe jest do prześledzenia również na podstawie rezultatów badań przeprowadzonych na terenie Polski: region śląski – istotna przewaga chłopców w grupie z DKA (Olak-Białoń et al., 2007), region łódzki – porównywalna częstość występowania DKA u chłopców i dziewcząt (Młynarski et al., 2003).

Młodszy wiek chorego pozostaje jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju DKA w okresie ujawniania się T1DM w populacjach pediatrycznych. DKA trzykrotnie częściej rozpoznawana jest u najmłodszych dzieci, poniżej 2 roku życia, a tendencja do istotnie częstszego jej występowania utrzymuje się w wielu obserwowanych grupach pacjentów do wieku 5 lat (Usher-Smith et al., 2011). W prezentowanej populacji chorych, podczas analizy ilościowej wieku pacjentów, stwierdzono dyskretne, ale wykazujące cechy znamienności, różnice w zależności od stanu klinicznego chorego w momencie rozpoznania T1DM, szczególnie przy porównaniu dwóch skrajnych stopni ciężkości DKA (DKA łagodna vs. DKA ciężka). Natomiast w przypadku analizy jakościowej, uwzględniającej kategorie wiekowe zgodne z rozwojem psychosomatycznym dziecka, jak również kategorie wiekowe związane z bimodalnym rozkładem wieku w badanej populacji, powyższe różnice pozostawały nieistotne (→ *Wyniki* pkt.3.1 str.82).

Miejsce zamieszkania pacjenta (Trójmiasto/teren miejski/teren wiejski), jako pośredni wskaźnik dostępu lokalnej społeczności do świadczeń zdrowotnych, nie stanowiło na terenie województwa pomorskiego istotnego czynnika modulującego stan kliniczny chorego w momencie rozpoznania T1DM (→ *Wyniki* pkt.3.1 str.82). Powyższa obserwacja pozostaje zgodna z danymi prezentowanymi w piśmiennictwie (Usher-Smith et al., 2011).

W analizowanej populacji, podobnie jak w większości badań w dostępnym piśmiennictwie, nie wykazano istotnych zależności pomiędzy długością trwania wywiadu chorobowego dotyczącego objawów T1DM a rozwojem DKA (Usher-Smith et al., 2011).

Jednocześnie, podobnie jak w uprzednio raportowanym okresie czasu (lata 1999-2005) (Pawłowicz et al., 2008), potwierdzono znamienne częstsze występowanie DKA z powodu opóźnienia właściwej diagnozy T1DM, przy jednocześnie zbliżonym okresie trwania objawów T1DM w grupie z rozpoznaniem postawionym o czasie i opóźnieniem diagnozy (→ *Wyniki* pkt.3.2 str.83). Kilka badań przeprowadzonych w populacji amerykańskiej (Mallare et al., 2003), francuskiej (Blanc et al., 2003), malezyjskiej (Harun, 2005) oraz warszawskiej (Szypowska and Skórka, 2011), wykazało istnienie podobnej zależności, choć w każdym z powyższych badań stosowano odmienną definicję opóźnienia diagnozy. Autorzy przeglądu systematycznego dotyczącego czynników ryzyka rozwoju DKA (Usher-Smith et al., 2011), ustalili ryzyko wystąpienia DKA w okresie ujawniania się T1DM na trzykrotnie wyższe w przypadku zaistnienia opóźnienia rozpoznania T1DM z powodu niewłaściwej diagnozy. Jednocześnie zespoły Vanelli M. et al. (Włochy) (Vanelli et al., 1999, Vanelli et al., 2007) oraz King et al. (Australia) (King et al., 2012) wykazały ogromną skuteczność kampanii edukacyjnych dotyczących wczesnego rozpoznawania objawów T1DM oraz DKA w redukcji odsetka występowania DKA podczas ujawniania się T1DM (redukcja o 64 – 78%).

Choroba infekcyjna w okresie poprzedzającym wystąpienie objawów T1DM została wskazana w ostatnim przeglądzie systematycznym jako jeden z dziewięciu czynników ryzyka rozwoju DKA w momencie

rozpoznania T1DM (Usher-Smith et al., 2011). W badanej populacji nie potwierdzono istotnego związku pomiędzy występowaniem poprzedzającej choroby infekcyjnej a rozpoznaniem DKA w okresie ujawniania się T1DM.

Natomiast pozytywny wywiad rodzinny w kierunku T1DM i/lub T2DM został wskazany przez Usher-Smith et al. (Usher-Smith et al., 2011) za główny czynnik redukujący ryzyko rozwoju DKA w początkowym okresie T1DM. Jednak w badanej grupie nie stwierdzono istnienia powyższej zależności, również po uwzględnieniu stopnia ciężkości DKA w momencie rozpoznania T1DM (→ Wyniki pkt.3.3 str.83).

Wśród pacjentów zakwalifikowanych do badania obserwowano jeden przypadek wystąpienia izolowanej nieketonowej hiperglikemii hiperosmolalnej (HHS), która należy do stosunkowo rzadkich stanów ostrej hiperglikemii, szczególnie w okresie ujawniania się T1DM (Wolfsdorf et al., 2006, McDonnell et al., 2005). HHS istotnie częściej dotyczy pacjentów należących do starszych kategorii wiekowych (powyżej 16 roku życia) (Bagdure et al., 2013), choć może rozwinąć się w każdym wieku (Wolfsdorf et al., 2006). W prezentowanym badaniu HHS rozpoznano u 3,5-letniej dziewczynki, z wywiadem chorobowym nie przekraczającym 2 tygodni. Ważną kwestią pozostaje również właściwa diagnoza zespołów nakładania DKA-HHS, z uwagi na konieczność odpowiedniej modyfikacji i dostosowania prowadzonej intensywnej terapii płynowej u chorego ze świeżo rozpoznaną T1DM (Wolfsdorf et al., 2006). Zespół DKA-HHS, głównie w postaci łagodna DKA-HHS, w badanej populacji stwierdzono u 4 pacjentów, również należących do młodszych grup wiekowych (→ Wyniki pkt.3 str.81). Z reguły do rozwoju zespołu DKA-HHS dochodzi u chorych z pierwotnie występującą HHS, u których w wyniku ciężkiego odwodnienia wtórnie pojawiają się zaburzenia gospodarki kwasowo – zasadowej (Wolfsdorf et al., 2006). W piśmiennictwie istnieją również doniesienia na temat związku pomiędzy rozwojem DKA-HHS/DKA a spożywaniem dużych ilości napojów o wysokim ładunku osmolalnym, w okresie ujawniania się T1DM (McDonnell et al., 2005). W analizowanej populacji nie potwierdzono jednak powyższej zależności (→ Wyniki pkt.3.2 str.83).

Ogólna ocena przeprowadzonych analiz genetycznych

W badanej populacji analiza genetyczna dotyczyła trzech polimorfizmów : c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS* (ocena za pomocą polimorfizmu markerowego –23HphIA>T). Wyboru powyższych polimorfizmów do przeprowadzenia oznaczeń w badanej populacji dokonano na podstawie rezultatów analizy całego genomu ludzkiego (*genome-wide association study* – GWAS) (Todd et al., 2007). W powyższych badaniach wykazano szczególną korelację wybranych polimorfizmów z rozwojem T1DM, a w przypadku polimorfizmu genu *INS* oraz *PTPN22* stwierdzono najsilniejszą zależność, po regionie HLA (Todd et al., 2007).

Wybór polimorfizmów do przeprowadzenia oznaczeń w badanej populacji podyktowany był również potwierdzonym związkiem tych loci z występowaniem osobniczej predyspozycji genetycznej do rozwoju reakcji autoimmunologicznych. Szczególną uwagę zwrócono na mechanizmy modulującego oddziaływania poszczególnych loci, które wydają się pozostawać w ścisłym wzajemnym związku w przypadku kontroli rozwoju potencjalnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw autoantygenom (Ounissi-Benkalha and Polychronakos, 2008). (→ Wstęp ryc.1.2 str.32)

Do prowadzenia analiz genetycznych wybrano metodę PCR-RFLP, która należy do standardowych sposobów analizy polimorfizmów genetycznych (Garczarczyk, 2002). Jednak jako metoda pośrednia obarczona jest pewnym ryzykiem nieprawidłowego odczytu ostatecznego wyniku analizy. W prezentowanym badaniu zastosowano następujące procedury mające na celu zminimalizowanie powyższego ryzyka:

- opracowanie odpowiednich warunków reakcji PCR, pozwalających na uzyskiwanie dobrej jakości produktów PCR wykorzystywanych następnie w metodzie RFLP
- odpowiednie zaprojektowanie specyficznych starterów do reakcji PCR, aby amplifikowana sekwencja DNA zawierała sekwencje stale rozpoznawane i trawione przez enzym restrykcyjny,

które umożliwiają weryfikację działania enzymu w przypadku każdej analizowanej próbki (tzw. dodatkowe miejsca cięcia enzymem)

- przeprowadzenie sekwencjonowania DNA w przypadku próbek stosowanych jako kontrole poszczególnych genotypów podczas reakcji PCR-RFLP
- przeprowadzenie sekwencjonowania DNA w przypadku próbek o wątpliwym wyniku genotypowania metodą PCR-RFLP oraz losowo wybranych próbek (łącznie co 10 badana próbka).

W przypadku analiz genetycznych stworzenie odpowiednio dobranej grupy kontrolnej stanowi niezwykle istotną kwestię, która wiąże się z wieloma aspektami etycznymi, prawnymi oraz medycznymi. W prezentowanym badaniu zrezygnowano z utworzenia grupy kontrolnej składającej się z dzieci zdrowych, z uwagi na wytyczne prowadzenia genetycznych testów prognostycznych u pacjentów niepełnoletnich. Osoby niepełnoletnie nie powinny być poddawane tego rodzaju testom w przypadku, gdy leczenie, które pozwoliłoby zapobiec wystąpieniu choroby lub zahamować/spowolnić jej rozwój, nie jest dostępne (McGillivray, 2002). Taka sytuacja zachodzi w odniesieniu do prób oceny predyspozycji genetycznej do T1DM w populacji pediatrycznej. Grupa kontrolna składająca się z anonimowych próbek (wysuszonych plam krwi, pozostałych po badaniach przesiewowych w kierunku chorób metabolicznych u noworodków), pochodzących z tego samego regionu kraju, co grupa badana, wydaje się w powyższej sytuacji najbardziej optymalnym rozwiązaniem, szczególnie pod względem etycznym, jak i prawnym. Pozwala również na szeroką ocenę dystrybucji analizowanych zmian genetycznych w ogólnej populacji zamieszkującej określony teren. Natomiast do zasadniczych ograniczeń w ten sposób tworzonej grupy referencyjnej należą:

- niemożność prowadzenia obserwacji równoległej z grupą badaną
- ograniczona liczba dostępnych danych ze względu na anonimowość próbek, a przez to niemożność właściwego dobrania grupy kontrolnej do grupy badanej pod względem płci, wieku, oddziaływania specyficznych czynników
- pewien odsetek osób włączonych do grupy kontrolnej, u których w przyszłości dojdzie do rozwoju choroby
- niemożliwe do ustalenia obciążenie rodzinnego wywiadu w kierunku określonych jednostek chorobowych

Częstość występowania wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji badanej i kontrolnej w odniesieniu do populacji kaukaskiej oraz danych z aktualnego piśmiennictwa

Wyniki analiz dotyczących częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* w różnych populacjach, pozostają rozbieżne (Kavvoura and Ioannidis, 2005, Marron et al., 1997), pomimo wykazanego w badaniach GWAS związku badanego polimorfizmu z predyspozycją do rozwoju T1DM (Todd et al., 2007). W badanej populacji nie wykazano istotnych różnic w dystrybucji genotypów i alleli polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4* w porównaniu z grupą kontrolną (→ *Wyniki* pkt.7 str.86), jak również z populacją kaukaską (→ *Wyniki* pkt.8 str.89). Natomiast stwierdzono znamienne różnice pomiędzy populacją badaną i kontrolną podczas analizy uwzględniającej stratyfikację genotypów badanego polimorfizmu co do ryzyka rozwoju T1DM (→ *Wyniki* pkt.7 str.86). Powyższa różnica wynikała głównie ze zmniejszonego udziału homozygot AA oraz zwiększonego odsetka heterozygot AG w grupie badanej. Przy porównaniu powyższych obserwacji z wynikami najnowszej metaanalizy, oceniającej związek pomiędzy analizowanym polimorfizmem a predyspozycją do rozwoju T1DM (Tang et al., 2012), stwierdzono zgodność danych dotyczących częstości występowania allelu G oraz homozygot GG (metaanaliza – rasa kaukaska: częstość allelu G 45,6%, homozygot GG 21,73%; grupa badana: częstość allelu G 47,96%, homozygot GG 19,73%. Natomiast odsetek heterozygot AG i homozygot AA w badanej

populacji w odniesieniu do danych przedstawionych w metaanalizie pozostawał odmienny (metaanaliza – rasa kaukaska: częstość heterozygot AG 49,4%, homozygot AA 29,3%; grupa badana: częstość heterozygot AG 56,46%, homozygot AA 23,81%) (Tang et al., 2012). Jednocześnie porównanie dystrybucji poszczególnych genotypów ocenianego polimorfizmu z dostępnymi w piśmiennictwie danymi z innych ośrodków polskich wykazało znaczne zróżnicowanie regionalne. W populacji warszawskiej w grupie chorych z T1DM stwierdzono istotną przewagę homozygot *CTLA-4* c.49AA, przy odsetku homozygot *CTLA-4* c.49GG podobnym jak w populacji dzieci zdrowych (Kucharska et al., 2009). Natomiast w regionie łódzkim wykazano znamienne częstsze występowanie homozygot GG analizowanego polimorfizmu, przy braku istotnych różnic w dystrybucji genotypów AG i AA przy porównaniu populacji z rozpoznaną T1DM z populacją ogólną (Krokowski et al., 1998).

W przypadku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w prezentowanym badaniu wykazano znamienne różną dystrybucję poszczególnych genotypów w grupie badanej i populacji kontrolnej (→ *Wyniki* pkt.7 str.86). Powyższe różnice wynikały głównie z istotnych zmian w alokacji przypadków w grupach pacjentów posiadających genotypy związane z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM. W populacji kontrolnej odsetek osób o genotypie *PTPN22* c.1858TT wynosił 3,06%, podczas gdy w grupie badanej był ponad 2,5-krotnie wyższy i sięgał 8,16%. Jednocześnie obie grupy różniły się istotnie od populacji kaukaskiej pod względem dystrybucji alleli i genotypów ocenianego polimorfizmu (→ *Wyniki* pkt.8 str.89). Stwierdzona częstość występowania allelu T w populacji referencyjnej wynosiła 21,12% i przewyższała częstość allelu T podaną dla rasy kaukaskiej prawie 2-krotnie w przypadku danych pochodzących z bazy NCBI (12%) oraz ponad 2-krotnie w odniesieniu do wyników ostatniej metaanalizy przeprowadzonej przez Xuan et al. (9,8%) (Xuan et al., 2013). Jednocześnie grupa kontrolna, pochodząca z województwa pomorskiego, wyraźnie różniła się od populacji referencyjnych z innych regionów Polski, w których raportowana częstość występowania allelu T analizowanego polimorfizmu sięgała 11,7% (region poznański) – 12,6% (region warszawski), a częstość genotypu *PTPN22* c.1858TT: 1,3% (region warszawski) – 1,7% (region poznański) (Fichna et al., 2010, Skórka et al., 2005). Znaczne różnice stwierdzono również przy porównaniu populacji osób chorych na T1DM – częstość allelu T: prezentowane badanie 23,13% - region poznański 18,6%; częstość homozygot TT: prezentowane badanie 8,16% - region poznański 3,7% (Fichna et al., 2010).

Obserwowana w populacji badanej i kontrolnej odmienna dystrybucja alleli oraz genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w odniesieniu do rasy kaukaskiej, dotyczy wprawdzie niewielkiej grupy przebadanych osób (grupa badana i kontrolna łącznie 473 próbek), ale pozostaje zgodna z opisanymi trendami innych zmian genetycznych, które stwierdzono w regionie województwa pomorskiego oraz zachodniopomorskiego. W populacji regionu pomorskiego obserwuje się bardzo wysoką częstość występowania niedoboru dehydrogenazy 3-hydroksyacilo-koenzymu A długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCHADD) związanego z obecnością substytucji c.1528G>C genu *HADHA* (województwo pomorskie 1:16 900 żywych urodzeń, pozostałe regiony Polski 1:118 336 żywych urodzeń), a częstość występowania allelu c.1528C genu *HADHA* w populacji pomorskiej oceniono na 1:73, w porównaniu do częstości 1:217 – stwierdzanej w innych regionach Polski (Piekutowska-Abramczuk et al., 2010). W innym wieloośrodkowym badaniu oceniającym strukturę genetyczną populacji europejskiej, za pomocą tzw. analizy głównych składowych (PCA), z wykorzystaniem danych uzyskanych z oznaczeń 270 tysięcy polimorfizmów genetycznych, w populacji regionu zachodniopomorskiego wykazano istnienie wzoru nie zrównoważenia sprzężeń poszczególnych loci zbliżonego do wzoru w regionie Kuusamo (Finlandia) (Nelis et al., 2009). Populacja Kuusamo jest typowym przykładem występowania efektu założyciela, z uwagi na silne odizolowanie małej grupy przodków około 300 lat temu, przy obecnej liczbie mieszkańców nieco przekraczającej 16 tysięcy. Wzór nie zrównoważenia sprzężeń poszczególnych loci obserwowany na terenie Zachodniego Pomorza wskazuje na ogromną homogenność populacji, przemawiającą za istniejącą w przeszłości izolacją grupy. Może być również efektem przesiedleń ludności z Kresów Wschodnich oraz Ukrainy na tereny północnej Polski, po zakończeniu II wojny światowej (Nelis et

al., 2009). Powyższe przypuszczenia nabierają szczególnego znaczenia w odniesieniu do danych dotyczących dystrybucji allelu *PTPN22* c.1858T w Europie, z uwagi na jego najwyższe częstości obserwowane w populacji fińskiej (15,5%) oraz ukraińskiej (14,1%) (Burn et al., 2011).

W związku z powyżej przedstawionymi tezami, niezwykle ciekawe wydaje się badanie przeprowadzone przez zespół Witas et al. (Witas et al., 2010). Badacze z regionu łódzkiego dokonali porównania częstości występowania wybranych polimorfizmów predysponujących do rozwoju T1DM w materiale pochodzącym z czterech miejsc archeologicznych, datowanym na okres późnego średniowiecza, z populacją współcześnie zamieszkującą ten region. Niestety wykonane analizy nie uwzględniały polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*. Natomiast w przypadku pozostałych polimorfizmów stwierdzono istotną przewagę alleli związanych z niskim ryzykiem rozwoju T1DM w populacji współczesnej w porównaniu z grupą średniowieczną (*HLA DQB* oraz *CTLA-4* c.49AA) lub nie wykazano istotnych różnic (polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*) (Witas et al., 2010). Analizę dotyczącą zmian częstości występowania wybranych polimorfizmów genów związanych z rozwojem T1DM, w tym polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, w okresie trzech ostatnich dekad, przeprowadzono z kolei w regionie Lazio (Włochy) (Spoletini et al., 2013). W tym rejonie Włoch obserwuje się zbliżony trend zmian w zapadalności na T1DM w populacji wieku rozwojowego (lata 1989-2009) (Bizzarri et al., 2010), jak w województwie pomorskim. Zespół Spoletini et al. wykazał wyraźne zmiany w dystrybucji genotypów ocenianego polimorfizmu, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, stwierdzając zmniejszenie częstości udziału genotypów podwyższonego ryzyka (*PTPN22* c.1858TT+TC) w ocenianej populacji o około 10% przy porównaniu lat 1980-1995 z okresem 1996-2012 (lata 1980-1995 23,9%; lata 1996-2012 13,6%) (Spoletini et al., 2013).

W prezentowanym badaniu, w przypadku polimorfizmu 5'VNTR genu *INS*, który po regionie HLA oraz polimorfizmie c.1858T>C genu *PTPN22* pozostaje głównym locus szczególnie silnie związanym z predyspozycją do rozwoju T1DM (→ *Wstęp* ryc.1.1 str.31), wykazano znamienne różnice w dystrybucji poszczególnych genotypów i alleli pomiędzy populacją badaną oraz grupą kontrolną (→ *Wyniki* pkt.7 str.86), przy jednoczesnym braku istotnych różnic przy porównaniu powyższych grup z populacją kaukaską (→ *Wyniki* pkt.8 str.89). Obserwacje te pozostają zgodne z danymi prezentowanymi w piśmiennictwie, a dotyczącymi krajów europejskich (Nielsen et al., 2006), w tym również Polski (region łódzki) (Krokowski, 1998). Dystrybucja genotypów oraz alleli polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* w populacji badanej odpowiadała częstościom stwierdzonym w wielośrodkowym badaniu obejmującym 18 krajów europejskich (Nielsen et al., 2006). Natomiast nieco odmiennie kształtowały się rozkłady częstości poszczególnych genotypów i alleli odnotowywane wśród chorych z T1DM pochodzących z terenów województwa pomorskiego oraz łódzkiego (Krokowski, 1998). W przypadku obu regionów obserwowano bardzo wyraźne przesunięcie rozkładów dystrybucji poszczególnych genotypów w kierunku genotypów związanych z wysokim ryzykiem rozwoju T1DM (w grupie badanej w prezentowanej pracy przesunięcie znamienne statystycznie w odniesieniu do populacji kontrolnej → *Wyniki* pkt.7 str.86 → tab. 4.9 str.88), przy czym powyższy trend pozostawał silniejszy na terenach regionu łódzkiego (populacja z T1DM – częstość występowania „ochronnego” allelu T analizowanego polimorfizmu: województwo łódzkie – 10,68%, województwo pomorskie – 16,67%; genotypu TT – województwo łódzkie 0,5%, województwo pomorskie – 4,08%). Jednocześnie w populacji ogólnej regionu pomorskiego i łódzkiego dystrybucja genotypów oraz alleli polimorfizmu 5'VNTR genu *INS* kształtowała się w sposób analogiczny. (Krokowski, 1998)

W piśmiennictwie istnieje niewiele doniesień dotyczących interakcji kilku loci, o potwierdzonym związku z rozwojem T1DM, wskazujących na ich wzajemne modulujące oddziaływanie na ryzyko wystąpienia T1DM wśród osób należących do określonej populacji (Bjornvold et al., 2008, Felner et al., 2005, Fendler et al., 2011, Hermann et al., 2005). Brakuje również prac oceniających wpływ interakcji genowych na przebieg kliniczny T1DM. Wykazanie ewentualnych wzajemnych oddziaływań kilku loci pozostaje niewątpliwie bardzo trudne i jednocześnie wymaga analiz przeprowadzonych w bardzo licznych populacjach (Gauderman, 2002). W prezentowanym badaniu podczas analizy oceniającej

częstość współwystępowania u jednej osoby przynajmniej dwóch genotypów o wysokim ryzyku rozwoju T1DM, nie stwierdzono istotnej predylekcji do określonych par genotypów w grupie badanej, jak również nie obserwowano znamienych różnic przy porównaniu z populacją kontrolną (→ *Wyniki* pkt.7 str.86). Jednak, ze względu na liczebność obu grup, istnieje możliwość niedoszacowania wzajemnych interakcji pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmów, które wybrano do przeprowadzenia oznaczeń.

Modulujące oddziaływanie układów strukturalnych /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ oraz /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ w badanej populacji – próba interpretacji w świetle danych z aktualnego piśmiennictwa

Zróznicowanie dystrybucji poszczególnych genotypów wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* w populacji chorych z T1DM w zależności od płci jest szeroko dyskutowane w piśmiennictwie, głównie z uwagi na fakt wyraźnej predyspozycji kobiet do rozwoju reakcji autoimmunologicznych (Lockshin, 2006). Spośród badanych polimorfizmów najsilniejsze oddziaływanie modulujące przebieg procesów autoimmunologicznych, szczególnie w powiązaniu z płcią pacjenta, przypisywane jest polimorfizmowi c.1858T>C genu *PTPN22*. Jednocześnie istnieje wiele doniesień dotyczących zróznicowanego występowania poszczególnych alleli i genotypów analizowanego polimorfizmu w zależności od płci chorego, których wyniki pozostają rozbieżne. W badaniu przeprowadzonym przez fiński zespół Hermann et al. u chłopców posiadających allel *PTPN22* c.1858T obserwowano istotnie większe ryzyko rozwoju T1DM, jak również wykazano znamienne modulujące oddziaływanie allelu T na rozwój odpowiedzi autoimmunologicznej (Hermann et al., 2006). Również w najnowszej metaanalizie dotyczącej związku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* z rozwojem T1DM stwierdzono istotne powiązanie allelu T z występowaniem T1DM w rasie kaukaskiej, z wyraźną predylekcją do płci męskiej (Xuan et al., 2013). Natomiast wielośrodkowe badania, oceniające interakcje międzygenowe w patogenezie T1DM, nie potwierdziły istotnych przesunięć w dystrybucji genotypów analizowanego polimorfizmu w powiązaniu z płcią (Howson et al., 2012) (Smyth et al., 2008). Również w badanej populacji nie wykazano znamienych różnic w występowaniu poszczególnych genotypów oraz alleli zarówno polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, jak i pozostałych z ocenianych polimorfizmów – c.49A>G genu *CTLA-4* oraz 5'VNTR genu *INS*, w zależności od płci chorego (→ *Wyniki* str.9.1 str.91).

Natomiast w prezentowanej pracy płeć pełniła funkcję modulującą w przypadku zależności pomiędzy dystrybucją genotypów badanych polimorfizmów, stratyfikowanych względem ryzyka rozwoju T1DM, a występowaniem DKA w okresie ujawniania się choroby (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93). Szczególnie wyraźne oddziaływanie płci jako moderatora wykazano dla modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/. Wśród chorych o genotypie *PTPN22* c.1858CC (genotyp związany z niskim ryzykiem rozwoju T1DM) stwierdzono istotnie mniejszą częstość występowania DKA w podgrupie dziewcząt, podczas gdy u pacjentów o genotypach *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC (genotypy związane z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM) różnice w częstości występowania DKA pomiędzy płciami pozostawały nieznamienne. (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93 → ryc.4.5 str.96)

Modulujące oddziaływanie płci obserwowano również w przypadku układu strukturalnego /polimorfizm c.49A>G genu *CTLA-4* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/, przy czym dotyczyło ono grupy chorych posiadających genotypy związane z podwyższonym ryzykiem wystąpienia T1DM. Wykazywało ono jednak mniejszą moc statystyczną niż w poprzednim modelu, z uwagi na brak różnic w częstości występowania DKA na początku choroby w zależności od płci w grupie pacjentów z genotypem *CTLA-4* c.49AA (genotyp związany z niskim ryzykiem rozwoju T1DM). (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93 → ryc.4.4 str.95)

Z kolei ostateczna ocena modulującej funkcji płci w układzie strukturalnym /polimorfizm 5'VNTR genu *INS* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć chorego/ pozostaje utrudniona, ze względu na niemożność oceny sposobu oddziaływania powyższego modelu w grupie pacjentów o genotypie klasy III/III analizowanego polimorfizmu, z uwagi na małą jej licznosc. (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93 → ryc.4.6 str.97)

Powyższe obserwacje dotyczące modulującej roli płci w analizowanych układach strukturalnych nabierają szczególnego znaczenia po uwzględnieniu badań duńskiego zespołu Nielsen et al. Zespół ten wykazał znamienne częstsze występowanie allelu *PTPN22* c.1858T u dziewcząt z rozpoznaną T1DM w odniesieniu do grupy kontrolnej, przy jednoczesnym braku istotnych różnic w analizie porównawczej wśród chłopców (Nielsen et al., 2007b). Podobne wyniki uzyskali również Fedetz et al. w grupie pacjentów pochodzących z Ukrainy (Fedetz et al., 2006) oraz Kahles et al. w populacji niemieckiej (Kahles et al., 2005). Jednocześnie zespół Nielsen et al. (Nielsen et al., 2007b) sformułował, w przypadku ocenianego polimorfizmu, hipotezę o istnieniu w obrębie badanego regionu DNA lub w jego pobliżu miejsca (miejsc) wiążącego czynniki transkrypcyjne specyficzne dla płci (przede wszystkim hormony płciowe – najlepiej poznane czynniki silnie związane z płcią, oddziałujące na transkrypcję genów poprzez receptory wewnątrzjądrowe). W dalszych badaniach dotyczących ekspresji poszczególnych alleli analizowanego polimorfizmu, duńskiemu zespołowi nie udało się niestety potwierdzić istnienia w promotorze genu *PTPN22* miejsc wiążących estrogeny (Nielsen et al., 2007a). Jednocześnie Nielsen et al. wskazali na konieczność kontynuacji badań ze względu na możliwość występowania jeszcze innych potencjalnych mechanizmów regulacji ekspresji polimorfizmu *PTPN22*, niż tylko na poziomie transkrypcji RNA. Oddziaływanie czynników transkrypcyjnych specyficznych dla płci na ekspresję badanego regionu DNA może odbywać się na poziomie translacji i utrzymania właściwej stabilności białek, będących produktem genu (Nielsen et al., 2007a). Hipoteza powyższa pozostaje uzasadniona w świetle wyników badań zespołu Vang et al., które sugerują w przypadku obecności allelu T występowanie zwiększonej wewnętrznej aktywności fosfatazy *PTPN22*, co badacze uznali za równoważne istnieniu mutacji typu nabycia funkcji (Vang et al., 2005). Zwiększona aktywność fosfatazy *PTPN22* powoduje powstanie funkcjonalnej oporności receptora TCR, co z kolei wiąże się z wystąpieniem zaburzeń procesów selekcji tymocytów, jak również ze zmniejszeniem efektywności limfocytów T regulatorowych (Vang et al., 2005). (→ *Wstęp* ryc.1.2 str.32)

Teorię Nielsena et al. (Nielsen et al., 2007b), wskazującą różnice w stężeniach estrogenów u dziewcząt i chłopców za główny czynnik przyczyniający się do występowania dymorfizmu płciowego w analizach dotyczących polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, wydaje się potwierdzać większość zależności stwierdzonych w prezentowanej pracy doktorskiej. Jednocześnie należy uznać powyższą teorię za słuszną w odniesieniu do całej populacji wieku rozwojowego, a nie tylko do okresu pokwitania, ze względu na wyniki badań Klein et al. (Klein et al., 1994) oraz Paris et al. (Paris et al., 2002). W powyższych badaniach zastosowanie wysoce czułej metody z użyciem rekombinowanych komórek drożdży (recombinant cell bioassay – RCBA) umożliwiło stwierdzenie u dziewcząt w okresie przedpokwitaniowym znamienne (8-krotnie) wyższych poziomów estradiolu, jak i całkowitych estrogenów w porównaniu z chłopcami w tym samym stadium rozwoju płciowego.

Za pierwszą obserwację zgodną z teorią Nielsena et al. (Nielsen et al., 2007b) należy uznać wykazane w momencie rozpoznania T1DM w badanej populacji istotnie niższe stężenia C-peptydu u chłopców będących homozygotami *PTPN22* c.1858TT, przy jednoczesnym braku znamiennych różnic w tożsamyach poziomach C-peptydu wśród chorych o genotypach *PTPN22* c.1858TC lub *PTPN22* c.1858CC, w zależności od płci pacjenta (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.2 str.135 → ryc.4.27 str.136).

Ciekawe pozostają również rezultaty analizy stanowiącej continuum powyższych obserwacji, gdy po dokonaniu stratyfikacji genotypów polimorfizmu genu *PTPN22*, względem ryzyka rozwoju T1DM, doszło do bardzo wyraźnego rozdzielania poziomów stężeń C-peptydu na początku choroby i wyłonienia się dwóch grup w zależności od płci (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.2 str.135 → ryc.4.28 str.137). Powyższa analiza w

wyniku zniwelowania efektu podwójnej dawki allelu T w badanej populacji, wydaje się uwidaczniać potencjalne oddziaływanie badanego polimorfizmu poprzez czynniki silnie związane z płcią (→ *Wyniki* pkt.13.1.1 str.115 → ryc.4.14 str.116).

Kolejnym potwierdzeniem teorii Nielsena et al. (Nielsen et al., 2007b) może być również wykazane w niniejszej pracy modulujące oddziaływanie układu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na dynamikę zmian resztkowej insulinosekrecji podczas rocznej obserwacji chorych. Ocena oddziaływania powyższego modelu strukturalnego uwidoczniła szczególnie dekompensujący wpływ DKA na funkcję resztkową komórek β trzustki w dalszym przebiegu T1DM u chłopców posiadających przynajmniej jedną kopię allelu T (brak typowego znamiennego wzrostu stężenia C-peptydu w początkowym okresie obserwacji, istotne obniżenie się resztkowej insulinosekrecji już w 6 miesiącu trwania T1DM) (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.3 str.138 → ryc.4.29 str.138). Niekorzystna dynamika zmian resztkowej insulinosekrecji u chłopców posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, znajdowała swoje istotne odzwierciedlenie w przebiegu klinicznym choroby. W tej podgrupie pacjentów w pierwszym półroczu trwania T1DM stwierdzano najniższy odsetek chorych z prawidłowo kontrolowaną metabolicznie T1DM, przy istotnie wyższym dobowym zapotrzebowaniu na insulinę w porównaniu do chłopców ze stwierdzoną DKA na początku choroby, a będących homozygotami *PTPN22* c.1858CC (→ *Wyniki* pkt.14.6.2.3 str.153 → ryc.4.37 str.154). Również obserwowana w ocenianej podgrupie pacjentów częstość występowania remisji klinicznej w 3 miesiącu choroby pozostawała najniższa, a czas jej trwania był wyraźnie skrócony (w 6 miesiącu choroby żaden z pacjentów nie spełniał kryteriów rozpoznania remisji według ISPAD) (→ *Wyniki* pkt.15.4.2.1 str.168 → ryc.4.44 str.169).

Zestawienie powyższych wyników z obserwacjami dokonanymi w grupie dziewcząt, również z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC może pośrednio wskazywać na istnienie pewnych czynników, specyficznych dla płci, które modulująco oddziałują na ekspresję allelu c.1858T genu *PTPN22*.

Wśród pacjentów ze stwierdzoną DKA w momencie diagnozy T1DM, u dziewcząt posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC obserwowano mniej dekompensujące oddziaływanie DKA na dynamikę zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki w porównaniu z chłopcami o tym samym układzie genetycznym. W tej podgrupie dziewcząt, pomimo rozwoju DKA na początku choroby, dochodziło do typowego, znamiennego wzrostu stężenia C-peptydu w 3 miesiącu trwania T1DM (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.3 str.138 → ryc. 4.29 str.138), co przekładało się na dość znaczny odsetek chorych z prawidłową kontrolą metaboliczną T1DM (63,64%). Częstość właściwego wyrównania choroby wśród tych dziewcząt pozostawała porównywalna z częstością stwierdzaną w całej populacji z rozpoznaną DKA (62,5%), przy zbliżonym dobowym zapotrzebowaniu na insulinę jak u chłopców o tym samym układzie genetycznym (→ *Wyniki* pkt.14.6.2.3 str.153 → ryc.4.37 str.154). W podgrupie tych dziewcząt odnotowano również bardziej korzystny przebieg fazy remisji niż u chłopców z grupy podwyższonego ryzyka genetycznego, stwierdzając prawie dwukrotnie wyższą częstość występowania remisji w 3 miesiącu trwania choroby (18,18%) i dłuższy okres jej utrzymywania się (6 miesiąc choroby 9,09%, 9 miesiąc choroby – nie odnotowano żadnego przypadku) (→ *Wyniki* pkt.15.4.2.1 str.168 → ryc.4.44 str.169).

Kolejną obserwacją potwierdzającą szczególnie modulujące oddziaływanie analizowanego polimorfizmu genu *PTPN22* w obrębie płci żeńskiej, w zależności od obecności allelu T, jest wykazanie nietypowego, przedłużonego aż do 6 miesiąca trwania T1DM, wzrostu stężenia C-peptydu u dziewcząt posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.2 str.135 → ryc.4.27 str.136). Z kolei dalsza analiza dynamiki zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki oraz przebiegu klinicznego T1DM wśród dziewcząt z genotypem *PTPN22* c.1858CC, po uwzględnieniu wywiadu w kierunku DKA, wydaje się wskazywać na wyjątkowo „ochronne” oddziaływanie podwójnej dawki allelu C (lub nieobecności allelu T) w przypadku płci żeńskiej.

U dziewcząt będących homozygotami CC istotnie rzadziej rozpoznawano DKA w okresie ujawniania się T1DM (→ *Wyniki* pkt.11.1 str.93 → ryc.4.5a str.96), a dynamika zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki, nawet w przypadku wystąpienia DKA na początku choroby, pozostawała szczególnie korzystna (przedłużony, trwający do 6 miesięcy choroby wzrost wydzielania C-peptydu, umożliwiający osiągnięcie poziomu resztkowej insulinosekrecji porównywalnego z maksymalnymi stężeniami C-peptydu obserwowanymi wśród pacjentów o tym samym układzie genetycznym, z nieobciążonym wywiadem w kierunku DKA → *Wyniki* pkt.13.5.2.3 str.138 → ryc.4.29 str.138). Jednocześnie zmiany obserwowane w resztkowej insulinosekrecji znajdowały odzwierciedlenie w szczególnie wysokim odsetku prawidłowej kontroli metabolicznej choroby w pierwszym półroczu choroby (→ *Wyniki* pkt.14.6.2.3 str.153 → ryc.4.37 str.154), jak i stabilnym przebiegu fazy remisji (→ *Wyniki* pkt.15.4.2.1 str.168 → ryc.4.44 str.169).

Niezwykle trudno jest dokonać oceny przedstawionego powyżej modulującego oddziaływania układu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na dynamikę zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki oraz przebieg kliniczny T1DM, z uwagi na fakt, iż w piśmiennictwie istnieje zaledwie kilka doniesień dotyczących jedynie samodzielnego wpływu analizowanego polimorfizmu na szereg parametrów biochemicznych i serologicznych, a ich wyniki pozostają rozbieżne.

Zespół Petrone et al. (Petrone et al., 2008) stwierdził utrzymywanie się istotnie niższych stężeń C-peptydu przez cały pierwszy rok trwania T1DM u pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, co z kolei korespondowało ze znamienne gorszą kontrolą metaboliczną choroby w odniesieniu do chorych będących homozygotami CC ocenianego polimorfizmu, przy porównywalnym dobowym zapotrzebowaniu na insulinę w obu grupach. W prezentowanej pracy doktorskiej znamienne różnice w stężeniach C-peptydu pomiędzy grupami pacjentów, w zależności od występowania allelu *PTPN22* c.1858T, wykazano jedynie w 6 miesiącu choroby i wynikały one z odmiennej dynamiki przebiegu zmian resztkowej insulinosekrecji u homozygot *PTPN22* c.1858CC (→ *Wyniki* pkt.13.5.2 str.132 → ryc.4.25 str.133). Natomiast w badaniu Petrone et al. dynamika zmian w wydzielaniu C-peptydu w kolejnych punktach czasowych obserwacji pozostawała podobna, niezależnie od genotypu analizowanego polimorfizmu. Jednocześnie badacze włoscy nie wykazali istotnych odrębności w dynamice resztkowej insulinosekrecji w zależności od płci. (Petrone et al., 2008)

Natomiast w badaniu przeprowadzonym przez zespół Nielsen et al. (Nielsen et al., 2011), a obejmującym międzynarodową kohortę 257 pacjentów, nie wykazano znamienych różnic w poziomach stymulowanego C-peptydu w zależności od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stratyfikowanego względem ryzyka rozwoju T1DM. Jednocześnie wśród chorych posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC obserwowano istotnie wyższe stężenia stymulowanej proinsuliny. Za przyczynę rozbieżności powyższych rezultatów z wynikami badania Petrone et al. fiński zespół uznał różnice w metodyce obu badań (badanie włoskie: ocena stężeń C-peptydu na czczo, średnia wieku pacjentów 9,1 lat vs. badanie fińskie: ocena stymulowanych stężeń C-peptydu, średnia wieku chorych 14,9 lat).

Interpretację modulującego oddziaływania badanego układu strukturalnego, jak również drugiego układu /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/, też wykazującego istotny wpływ na dalszy przebieg T1DM w badanej populacji, komplikuje zarówno ograniczona liczba doniesień powiązanych tematycznie z omawianym problemem, jak i charakter zmiennych, które współdziałają w analizowanych modelach.

W niniejszej pracy, w przypadku analiz wieloczynnikowych podejmowano próby modelowania, ale ich wyniki pozostawały niesatysfakcjonujące, a próbne modele regresji logistycznej nie spełniały wymagań merytorycznych, głównie z powodu znacznej niejednorodności danych. Zastosowanie zatem etapowych analiz, z następową synchroniczną ich oceną, umożliwiło przeprowadzenie wnikliwych interpretacji wpływu poszczególnych zmiennych, a następnie par zmiennych, tworzących model strukturalny, na

parametry dotyczące przebiegu klinicznego choroby (stężenie C-peptydu, poziom HbA_{1c}, miano swoistych autoprzeciwciał, częstość występowania remisji). Powyższe postępowanie pozwoliło finalnie wykazać specyfikę oddziaływania obu modeli strukturalnych w badanej populacji, jak również z pewnym prawdopodobieństwem wskazywać na działanie innych czynników związanych z płcią, wiekiem lub DKA w przypadku pewnych określonych zmian w dynamice analizowanych parametrów.

We wstępnej analizie oceniającej zależność dynamiki zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki od czynników warunkujących zmiany insulinowrażliwości tkanek obwodowych, wykazano modulujący wpływ wieku, DKA, a także płci w momencie diagnozy T1DM, czyli zmiennych wchodzących w skład badanych modeli strukturalnych. Jednocześnie stwierdzone istotne moderujące oddziaływanie płci oraz wieku na zależność pomiędzy dystrybucją genotypów badanego polimorfizmu genu *PTPN22* a występowaniem DKA w momencie rozpoznania choroby nakazało traktować współdziałające zmienne całościowo jako nową jakość, nową zmienną. Zastosowanie następnie analizy etapowej doprowadziło ostatecznie do stwierdzenia specyficznych odchyień w dynamice ocenianych parametrów, będących wynikiem działania modelu jako odrębnej zmiennej.

Przedstawiona poniżej próba interpretacji specyficznego oddziaływania układu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ na dynamikę przebiegu klinicznego choroby w obserwowanej populacji została oparta głównie na aktualnych doniesieniach dotyczących patomechanizmu oddziaływania genu *PTPN22* i stanowi pewną hipotezę badawczą, która wymaga przeprowadzenia dalszych dodatkowych badań celem jej ewentualnego potwierdzenia.

Zespół szwedzki Ronninger et al. (Ronninger et al., 2012), zgodnie z wcześniejszymi przypuszczeniami Nielsena et al. (Nielsen et al., 2007a), wykazał wśród chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) istnienie zaburzeń ekspresji genu *PTPN22* na poziomie splicingu prekursorowego mRNA, które prowadzi do zachwiania równowagi pomiędzy poszczególnymi izoformami fosfatazy tyrozynowej *PTPN22*. U chorych z RZS obserwowano zwiększenie poziomu ekspresji izoformy 1 fosfatazy tyrozynowej *PTPN22* (Lyp1) – tzw. długiej, zawierającej aż cztery miejsca wiążące domeny SH3, które odpowiadają przede wszystkim za interakcję z kinazą Csk (\rightarrow Wstęp ryc.1.3 str.33). Jednocześnie miejsca wiążące Lyp1 wydają się oddziaływać z innym spektrum białek niż izoforma 2 (Lyp2), która posiada tylko jedno miejsce wiążące domeny SH3, a jej ekspresja u pacjentów z RZS pozostaje wyraźnie zredukowana. Izozym Lyp2 nie zawiera również kilku innych konserwatywnych domen, które obecne są w przypadku izoformy Lyp1 i odgrywają istotną rolę w jej interakcjach z białkami regulującymi procesy aktywacji limfocytów. Do powyższych konserwatywnych domen Lyp1 należą: 1) domena CTH, która stanowi miejsce wiążące dla białka CD2BP1 – głównego białka regulującego aktywność cząsteczki CD2, zasadniczej molekuly uczestniczącej w procesie kostymulacji podczas aktywacji limfocytów T; 2) domena CDK1 – wykazująca, zależną od fosforylacji, aktywność kinazy regulującej cykl komórkowy (szczególnie kontrolującej przejście komórki z fazy cyklu G₁ do S); 3) motyw PPPLPERTP odpowiedzialny za wiązanie protonogenu c-Src regulującego aktywność kinazy tyrozynowej Lck – ważnego mediatora podczas aktywacji limfocytów i produkcji cytokin. (Ronninger et al., 2012) (\rightarrow Wstęp ryc.1.3 str.33). Wszystkie te domeny znajdują się w końcu karboksylowym białka, w którym zlokalizowane są również miejsca wiążące domeny SH3, gdzie dochodzi do substytucji aminokwasowej warunkowanej obecnością allelu *PTPN22* c.1858T.

Odkrycie zespołu Ronninger et al., pomimo iż badaczom nie udało się wskazać konkretnego miejsca polimorficznego w obrębie genu *PTPN22* warunkującego opisane zaburzenia splicingu (Ronninger et al., 2012), wydaje się stanowić pewne doprecyzowanie wcześniejszej koncepcji Vang et al. o istnieniu zwiększonej wewnętrznej aktywności *PTPN22*, prawdopodobnie warunkowanej obecnością allelu *PTPN22* c.1858T i równoważnej mutacji typu nabycia funkcji (Vang et al., 2005). Jednocześnie zespół szwedzki zaakcentował konieczność dalszego poszukiwania związku pomiędzy stwierdzonymi zaburzeniami splicingu i poszczególnymi polimorfizmami genu *PTPN22* (Ronninger et al., 2012).

Jednocześnie zespół Kitabchi et al. wykazał, w przypadku zaktywowanych limfocytów CD4⁺ oraz CD8⁺, istnienie szczególnego mechanizmu indukowanego przez hiperglikemię i DKA, a prowadzącego w tych warunkach do rozwoju insulinowrażliwości limfocytów, celem lepszego wykorzystania przez nie wysokich stężeń glukozy oraz uniknięcia uszkodzenia przez czynniki prozapalne i związane ze stresem oksydacyjnym (Kitabchi et al., 2004, Stentz and Kitabchi, 2005). Zespół amerykański zaobserwował, w warunkach hiperglikemii i DKA, pojawianie się na powierzchni limfocytów CD4⁺ oraz CD8⁺ receptorów dla insuliny i czynników wzrostowych oraz cząsteczek transportera glukozy GLUT4, odpowiedzialnego za regulowany przez insulinę transport glukozy do wnętrza komórki. Indukowany hiperglikemią i DKA wzrost liczby powyższych molekuł korelował w czasie ze zmianami stężeń cytokin prozapalnych uwalnianych przez limfocyty T, a uzyskanie stanu równowagi pomiędzy obserwowanymi parametrami, oznaczającego ustabilizowanie poziomu produkcji cytokin stwierdzano po 72 godzinach trwania eksperymentu. (Stentz and Kitabchi, 2005) Główną rolę w rozwoju powyższego mechanizmu zespół Kitabchi przypisał aktywacji szlaku diacyloglicerolu. Ulega ona dodatkowemu wzmocnieniu w zaktywowanych limfocytach T w warunkach hiperglikemii i DKA, prowadząc z kolei do wzmożonej aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF_κB, odpowiedzialnego za ekspresję genów dla niektórych cytokin i białek ostrej fazy oraz prawdopodobnie do indukcji nieznanych mechanizmów kontrregulujących. Powyższe procesy powodują nasiloną ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę receptorów dla insuliny oraz transportera GLUT4, co doprowadza do rozwoju w tych warunkach insulinowrażliwości limfocytów T, chroniącej je przed glukotoksycznością. Dochodzi również do indukcji syntezy receptorów dla IL-2, IGF-1 oraz cząsteczki CD69, co prawdopodobnie ma na celu poprawę przekazywania sygnału w obrębie limfocytu w warunkach DKA, jak również indukcję określonych mechanizmów wyhamowujących nadmierną odpowiedź immunologiczną (aktywacja komórek NK, indukcja apoptozy). (Kitabchi et al., 2004, Stentz and Kitabchi, 2005, Gołąb et al., 2002) Jednocześnie w przypadku obecności allelu *PTPN22* c.1858T, wykazane przez Vang et al. zaburzenia szlaku metabolizmu fosfatydilinozytolu, mogą w istotny sposób wpływać na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF_κB, głównie z powodu nieprawidłowości w procesie uwalniania jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych i aktywacji kalcyneuryny, która odgrywa szczególną rolę w regulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego NF_κB. (Vang et al., 2005, Bottini et al., 2006) (→ *Wstęp* ryc.1.3 str.33)

Z kolei zespół Habib et al. (Habib et al., 2012), u osób posiadających allel *PTPN22* c.1858T, zarówno zdrowych, jak i z rozpoznaną T1DM, stwierdził występowanie istotnych zaburzeń w dojrzewaniu oraz funkcjonowaniu populacji limfocytów B. U tych osób, w porównaniu z osobami posiadającymi allel *PTPN22* c.1858C, obserwowano zaburzenia ilościowe pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami limfocytów B, sugerujące występowanie zaburzeń procesu selekcji negatywnej, warunkowanych opornością receptora BCR. Jednocześnie badacze amerykańscy wykazali u osób predysponowanych genetycznie obecność zwiększonej puli limfocytów B CD19⁺CD27⁺IgD⁺IgM⁻ (B_{ND}), która obecnie uważana jest za rezerwuar autoreaktywnych limfocytów B oraz zwiększoną przeżywalność limfocytów B na obwodzie, z uwagi na zaburzenia procesu apoptozy mediowanego poprzez receptor BCR. (Habib et al., 2012)

Jednocześnie głównymi czynnikami pobudzającymi proces dojrzewania limfocytów B pozostaje szereg cytokin (m.in. IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-6, IL-11, IL-12). Podczas gdy sterydy płciowe, obok IL-1 α , IL-4, TNF, TGF- β oraz IFN- γ , należą do czynników hamujących ten proces. (Gołąb et al., 2002) Istotny wpływ estrogenów został wykazany przez Polanczyk et al. również w subpopulacji limfocytów T_{reg}, w której estrogeny, m. in. przez szlaki związane z cząsteczką PD-1, powodują akcelerację funkcji supresyjnej (Polanczyk et al., 2007). Natomiast w świetle najnowszych doniesień zespołów Maine et al. oraz Zheng et al., gen *PTPN22* wydaje się w znamienny sposób warunkować rozwój limfocytów T_{reg} w grasicy oraz odpowiednią równowagę pomiędzy limfocytami T_{reg} a limfocytami T efektorowymi na obwodzie. (Maine et al., 2012, Zheng and Kissler, 2013)

Synteza przytoczonych powyżej wyników aktualnych badań pozwala postawić pewną hipotezę dotyczącą oddziaływania układu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ w obserwowanej populacji. Udział polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* oraz płci w powyższym modelu nakazuje zwrócić uwagę na dwie populacje limfocytów: T_{reg} oraz B, w funkcjonowaniu których istotną modulującą rolę odgrywają estrogeny. Natomiast występowanie w powyższym modelu dodatkowo jeszcze DKA sugeruje oddziaływanie określonej postaci fosfatazy tyrozynowej *PTPN22*, w przypadku której oceniany polimorfizm może powodować szczególnie istotne zmiany odpowiadające za jej interakcję z kinazą Csk i dalszą aktywację kinazy tyrozynowej Lck, zaangażowanej z kolei w mechanizmy aktywacji szlaku diacyloglicerolu i produkcji cytokin w limfocytach T. (→ Wstęp ryc.1.3 str.33) Uwzględnienie wszystkich trzech zmiennych wchodzących w skład analizowanego modelu strukturalnego pozwala wytypować izoformę *Lyp2* jako faktycznie oddziałujący czynnik, a przy ocenie modulującego wpływu tego układu na dalszy przebieg kliniczny T1DM w badanej populacji nakazuje rozpatrywać ewentualne zmiany nie tylko w subpopulacji limfocytów T efektorowych (T_{eff}), ale również możliwe interakcje pomiędzy trzema populacjami limfocytów: T_{eff} , T_{reg} oraz B.

W analizowanym modelu strukturalnym istotnie rzadsze występowanie DKA u dziewcząt będących homozygotami *PTPN22* c.1858CC można tłumaczyć prawdopodobnie właściwie funkcjonującą izoformą *Lyp2*, nawet w przypadku ewentualnych zaburzeń proporcji *Lyp1:Lyp2*, opisanych przez Ronningera et al. (Ronninger et al., 2012), z uwagi na nieobecność substytucji aminokwasowej warunkowanej allelem *PTPN22* c.1858T. W związku z powyższym w tej grupie pacjentów możliwe jest uruchomienie kompensacyjnych mechanizmów rozwoju insulinowrażliwości limfocytów T_{eff} oraz mechanizmów kontrregulujących produkcję cytokin, wskazanych przez Kitabchi et al. (Kitabchi et al., 2004, Stentz and Kitabchi, 2005), a dodatkowe oddziaływanie estrogenów, prowadzi prawdopodobnie do mniej gwałtownego rozwoju procesu autoimmunologicznego, ze względu na bardziej korzystny, niż u chłopców o podobnym układzie genetycznym, profil limfocytów T_{reg} i limfocytów B (nasilona funkcja supresyjna T_{reg} , ograniczenie dojrzewania i przedostawania się na obwód autoreaktywnych limfocytów B). Pośrednim potwierdzeniem tego korzystnego oddziaływania estrogenów na dynamikę rozwoju reakcji autoimmunologicznej mogą być wykazane znamienne wyższe stężenia C-peptydu na początku choroby u dziewcząt oraz występowanie u nich istotnie wyższych mian autoprzeciwciał GAD. Ostatni argument dotyczący autoprzeciwciał GAD może wydawać się paradoksalnym, ale już w latach 90. Harrison et al. wskazywał na odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy mianem autoprzeciwciał GAD oraz aktywnością limfocytów T, stwierdzając, że wyższe miana autoprzeciwciał GAD korespondują z wolniejszą progresją choroby. (Harrison et al., 1993) Jednocześnie zespół Gabbay et al. w ostatnim badaniu potwierdził wcześniejsze doniesienia Harrisona, jak również wykazał istnienie odwrotnej korelacji pomiędzy poziomami autoprzeciwciał GAD a stężeniem chemokiny CXCL10, która ulega ekspresji wyłącznie w obrębie komórek β znajdujących się w stanie stresu metabolicznego oraz działa chemotaktycznie na limfocyty T_{eff} i nasila proliferację limfocytów T pod wpływem stymulacji antygenem. (Andrade Lima Gabbay et al., 2012) Obserwacje Gabbay et al., a szczególnie wykazane specyficzne powiązanie z działaniem chemokiny CXCL10 w warunkach stresu metabolicznego, w pełni tłumaczą stwierdzone w prezentowanym badaniu istotnie niższe miana autoprzeciwciał GAD wśród pacjentów z rozpoznaną DKA.

Jednocześnie w badanej populacji większość zmian obserwowanych w dynamice humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD, z uwagi na powiązanie czasowe i zachowany tożsamy kierunek ze zmianami resztkowej insulinosekrecji, wskazuje na stwierdzoną przez Gabbay et al. odwrotną korelację z bezpośrednim procesem autoimmunologicznego uszkodzenia komórek β trzustki.

Powracając do oceny oddziaływania modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ w badanej populacji, niezwykle ciekawym zjawiskiem pozostaje szczególnie korzystny przebieg dynamiki zaniku funkcji resztkowej komórek β

trzustki w pierwszym półroczu trwania T1DM u dziewcząt posiadających genotyp *PTPN22* c.1858CC. W tej grupie, nawet w przypadku wystąpienia DKA na początku choroby, obserwowano wystąpienie charakterystycznego piku wydzielania C-peptydu w 6 miesiącu trwania T1DM, przy czym odnotowywane poziomy C-peptydu w grupie z rozpoznaną DKA pozostawały porównywalne ze stężeniami u pacjentek, u których nie doszło do dekompensacji metabolicznej. Powyższe obserwacje wydają się wskazywać na istnienie pewnych genetycznych uwarunkowań przebiegu zaniku resztkowej insulinosekrecji, dodatkowo akcelerowanych oddziaływaniem estrogenów, co z kolei umożliwia osiągnięcie określonej, uwarunkowanej genetycznie wartości C-peptydu, pomimo wpływu niekorzystnych endogennych czynników środowiskowych (DKA). Jednocześnie wśród dziewcząt o genotypie *PTPN22* c.1858CC, z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, stwierdzano w odróżnieniu od innych podgrup analizowanego modelu, bardzo stabilny przebieg choroby oraz odmienną dynamikę humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej. Powyższe zmiany, a szczególnie praktycznie stały odsetek chorych pozostających w fazie remisji choroby oraz narastanie miana autoprzeciwciał GAD podczas rocznej obserwacji, mogą pośrednio świadczyć o mniejszej dynamice procesu autoimmunologicznego w tej podgrupie chorych, co z kolei można tłumaczyć prawidłowym funkcjonowaniem Lyp2 oraz korzystnym profilem limfocytów, warunkowanym działaniem estrogenów.

Natomiast szczególnie niekorzystny przebieg kliniczny T1DM u chłopców posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TC oraz *PTPN22* c.1858TT, z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, można próbować wyjaśnić prawdopodobnym występowaniem u nich Lyp2 wykazującej nieprawidłowe funkcjonowanie ze względu na obecność substytucji aminokwasowej tryptofan → arginina w miejscach wiążących domeny SH3, która warunkowana jest obecnością allelu T analizowanego polimorfizmu.

Szczególnie dekompensujące oddziaływanie DKA w tej podgrupie chorych można prawdopodobnie wiązać z nieprawidłowym działaniem mechanizmów rozwoju insulinowrażliwości limfocytów T_{eff} w odpowiedzi na hiperglikemię oraz DKA, jak również innych mechanizmów kontrregulujących nadmierne wytwarzanie cytokin, które powodowane są zaburzeniami metabolizmu fosfatydyloinozytolu warunkowanymi nieprawidłowo funkcjonującą Lyp2.

Jednocześnie z uwagi na potwierdzoną ekspresję fosfatazy tyrozynowej *PTPN22* w subpopulacjach limfocytów T_{eff} , T_{reg} i B oraz zasadniczy jej wpływ na procesy aktywacji/dezaktywacji tych komórek można przypuszczać, że u pacjentów z allelem *PTPN22* c.1858T najprawdopodobniej dochodzi do rozwoju poważnej dysfunkcji tych subpopulacji limfocytów. To z kolei prowadzi do szczególnie nasilonego procesu autoimmunologicznego w związku z akceleracją przedostawania się na obwód autoreaktywnych limfocytów T, nieprawidłowym dojrzewaniem i funkcjonowaniem limfocytów T_{reg} , z uwagi na ograniczenie ich zdolności supresyjnych, zwiększeniem puli autoreaktywnych limfocytów B w wyniku zaburzenia ich dojrzewania w grasicy, jak również zwiększonej ich przeżywalności z powodu nieprawidłowości przenoszenia sygnału przez receptor BCR i unikania apoptozy mediowanej przez ten receptor. Pośrednim potwierdzeniem szczególnie aktywnego procesu autoimmunologicznego w powyższej grupie chłopców, w świetle badań Gabbay et al. (Andrade Lima Gabbay et al., 2012), mogą być najniższe z obserwowanych w badanej populacji, szczególnie w pierwszym półroczu choroby, miana autoprzeciwciał GAD, choć różnice które obserwowano w przypadku porównania ich z poziomami autoprzeciwciał GAD stwierdzanymi u chłopców będących homozygotami *PTPN22* c.1858CC, z również obciążonym wywiadem w kierunku DKA, nie wykazywały cech znamienności statystycznej.

Natomiast nieco korzystniejszy przebieg choroby u dziewcząt posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TC oraz *PTPN22* c.1858TT, z rozpoznaną DKA w okresie ujawniania się T1DM, w odniesieniu do chłopców o podobnym układzie obciążających czynników, wskazuje z pewnym prawdopodobieństwem na specyficzne oddziaływanie estrogenów na profil populacji limfocytów (głównie limfocyty T_{reg} oraz B), a przez to uzyskanie lepszej zdolności ograniczania aktywności procesu autoimmunologicznego. Dzięki tym przypuszczalnym pozytywnym zmianom w układzie immunologicznym warunkowanym, zgodnie z

obserwacjami Klein et al. (Klein et al., 1994) oraz Paris et al. (Paris et al., 2002), wyższymi poziomami estrogenów obserwowanymi u dziewcząt nawet w okresie prepubertalnym, możliwe było w tej grupie uzyskanie typowego istotnego wzrostu stężenia C-peptydu w 3 miesiącu trwania choroby, co znalazło swoje odzwierciedlenie w korzystniejszym klinicznym przebiegu choroby, szczególnie w pierwszym półroczu jej trwania, z obserwowanym dość znacznym odsetkiem pacjentów z prawidłowo wyrównaną metabolicznie T1DM, jak również z większą szansą na osiągnięcie remisji klinicznej.

W przypadku interpretacji oddziaływania układu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/, podobnie jak w omówionym powyżej modelu strukturalnym uwzględniającym płeć pacjenta, najprawdopodobniej faktycznie oddziałującym czynnikiem pozostaje również izoforma Lyp2, natomiast wiek chorego należy uznać za indyktor narastającego wpływu hormonów płciowych na profil subpopulacji limfocytów. Zgodnie z sugestiami przedstawionymi przez zespół Nielsen et al. (Nielsen et al., 2007b) najkorzystniejsze wydaje się prowadzenie analiz uwzględniających nie tylko samodzielne oddziaływanie płci i wieku, ale również dokonywanie oceny ich łącznego wpływu na przebieg choroby. Niestety w obserwowanej populacji, z uwagi na jej licznosc, wprowadzenie czwartej zmiennej do modelu strukturalnego powodowało jej rozbitcie na bardzo małe podgrupy, w przypadku których prowadzenie analiz statystycznych pozostawało niemiernodajne.

W przypadku oddziaływania modelu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/, główne jego modulujące oddziaływanie, w przeciwieństwie do omówionego powyżej układu uwzględniającego płeć, stwierdzano w obrębie grupy pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TC oraz *PTPN22* c.1858TT, a szczególnie wśród chorych należących do starszych kategorii wiekowych (wiek szkolny + wiek młodzieńczy). W tej podgrupie pacjentów istotnie rzadziej odnotowywano występowanie DKA. Jednocześnie wśród chorych będących homozygotami CC nie wykazano istotnych różnic w proporcji pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi w zależności od wywiadu w kierunku DKA w momencie diagnozy T1DM. (→ *Wyniki* pkt.11.2 str.97 → ryc.4.7 str.98)

Wśród chorych zwiększonego ryzyka genetycznego, należących do starszej grupy wiekowej, nawet w przypadku wystąpienia DKA w momencie rozpoznania T1DM, w 3 miesiącu trwania obserwacji stwierdzano znamienne wzrost wydzielania C-peptydu. Następnie w 6 miesiącu w związku ze zróżnicowaną dynamiką spadku C-peptydu w zależności od występowania DKA, a szczególnie gwałtownym i istotnym spadkiem C-peptydu wśród osób z rozpoznaną DKA, dochodziło do powstania znamienych różnic pomiędzy tymi podgrupami. (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.3 str.138 → ryc.4.29) Przy czym w podgrupie ze stwierdzoną DKA pomimo tak dużych wahań w wydzielaniu C-peptydu obserwowano znaczny odsetek chorych z prawidłowym wyrównaniem metabolicznym, który w 3 miesiącu choroby pozostawał porównywalny z odsetkiem obserwowanym wśród chorych bez obciążonego wywiadu w kierunku DKA (pacjenci bez DKA 77,78% vs. pacjenci z DKA 75,0%), a w 6 miesiącu sięgał 50,0% (pacjenci bez DKA 75,0%). (→ *Wyniki* pkt.14.6.2.5 str.158 → ryc.4.39 str.159) W podgrupie tej, mimo rozpoznanej DKA na początku choroby, stwierdzano również stały odsetek chorych pozostających w fazie remisji w pierwszym półroczu choroby, co pośrednio wskazuje na dość stabilny przebieg kliniczny T1DM w tym okresie obserwacji. (→ *Wyniki* pkt.15.4.2.2 str.170 → ryc.4.45 str.171) Jednocześnie w podgrupie pacjentów z negatywnym wywiadem w kierunku DKA, obserwowano jeszcze bardziej korzystny przebieg T1DM, porównywalny z pacjentami również należącymi do starszej grupy wiekowej, ale będących homozygotami CC analizowanego polimorfizmu. Po znamiennej wzroście stężenia C-peptydu w 3 miesiącu trwania T1DM, następujący w 6 miesiącu spadek resztkowej insulinosekrecji pozostawał nieznamienne. (→ *Wyniki* pkt.13.5.2.3 str.138 → ryc.4.29) Pozwoliło to na utrzymywanie się wysokiego i stabilnego odsetka prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby w pierwszym półroczu trwania obserwacji, przy jednocześnie szczególnie wysokiej częstości występowania remisji (65,0% – 60,0%). (→ *Wyniki* pkt.14.6.2.5 str.158 → ryc.4.39 str.159) oraz (→ *Wyniki* pkt.15.4.2.2 str.170 → ryc.4.45 str.171)

Wśród pacjentów będących homozygotami CC, w podgrupie bez rozpoznanej DKA na początku choroby, częstości prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby pozostawały zbliżone w obu kategoriach wiekowych przez cały okres rocznej obserwacji i stanowiły odzwierciedlenie korzystnej dynamiki zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki u tych chorych. (→ *Wyniki* pkt.14.6.2.5 str.158 → ryc.4.39 str.159) oraz (→ *Wyniki* pkt.14.6.2.5 str.158 → ryc.4.39 str.159) Dodatkowo w młodszej grupie wiekowej odsetek remisji utrzymywał się przez 12 miesięcy na względnie stałym poziomie, porównywalnym ze starszą grupą wiekową, a w 3 miesiącu trwania choroby pozostawał nawet wyższy (w tożsamej grupie osób o genotypach *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC przypadki remisji obserwowano do 6 miesiąca choroby). (→ *Wyniki* pkt.15.4.2.2 str.170 → ryc.4.45 str.171) Jednocześnie w przypadku wystąpienia DKA, odsetek prawidłowej kontroli metabolicznej choroby oraz remisji w starszej grupie wiekowej pozostawał porównywalny z tożsamą podgrupą bez obciążonego wywiadu w kierunku DKA. Natomiast w młodszej grupie wiekowej obserwowano równie silnie dekompensujący wpływ DKA, jak wśród osób należących do tej samej kategorii wiekowej, ale posiadających genotypy związane z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM. W młodszych grupach wiekowych, z obciążonym wywiadem w kierunku DKA, niezależnie od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, przypadki remisji obserwowano jedynie do 3 miesiąca trwania T1DM. (→ *Wyniki* pkt.14.6.2.5 str.158 → ryc.4.39 str.159) oraz (→ *Wyniki* pkt.15.4.2.2 str.170 → ryc.4.45 str.171)

Podjmując próbę interpretacji powyższych wyników oddziaływania układu strukturalnego /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/ w badanej populacji, przy hipotetycznym założeniu, iż faktycznie działającym czynnikiem również i w tym przypadku jest izoforma *Lyp2*, można zauważyć, że wiek w powyższym układzie stanowi bardziej ilościowy indyktor oddziaływania hormonów płciowych, podczas gdy w poprzednio analizowanym modelu pełnił funkcję jakościowego wskaźnika wpływu hormonów płciowych, a szczególnie estrogenów.

Stosunkowo korzystny przebieg kliniczny choroby wśród pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, a należących do starszej grupy wiekowej, można tłumaczyć oddziaływaniem wysokich stężeń hormonów płciowych, w pozytywny sposób modulujących profil subpopulacji limfocytów w tej grupie chorych. Powyższe zmiany w profilu limfocytów pozwalają prawdopodobnie w znacznym stopniu kompensować zaburzenia w funkcjonowaniu subpopulacji limfocytów T_{eff} , T_{reg} oraz B, które powodowane są przez nieprawidłową postać izoformy *Lyp2*, zawierającą substytucję aminokwasową warunkowaną obecnością allelu T analizowanego polimorfizmu. Można przypuszczać, że w powyższej grupie chorych, pomimo istniejącej predyspozycji genetycznej, ograniczenie aktywności procesu autoimmunologicznego może wynikać z następujących zmian w funkcjonowaniu układu immunologicznego indukowanych przez wysokie stężenia hormonów płciowych, a szczególnie estrogenów, jak: wzrost funkcji supresyjnej limfocytów T_{reg} oraz ograniczenie puli autoreaktywnych limfocytów B, a szczególnie subpopulacji B CD19⁺CD27⁻IgD⁺IgM⁻B_{ND}, która stanowi pulę limfocytów łatwo uzyskujących zdolność do produkcji przeciwciał w wyniku kooperacji z limfocytami T, bez konieczności stymulacji receptora BCR natywnym antygenem (Habib et al., 2012). Prawdopodobnie tymi samymi przesunięciami w obrębie konkretnych subpopulacji limfocytów można tłumaczyć zmniejszoną częstość występowania DKA wśród pacjentów ze starszych kategorii wiekowych, posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC. Zmiany w profilu limfocytów warunkowane wysokimi stężeniami hormonów płciowych mogą przypuszczalnie w znacznym stopniu kompensować niewłaściwie funkcjonujące mechanizmy rozwoju insulinowrażliwości limfocytów T_{eff} , jak również mechanizmy kontrregulujące nadmiar produkcji cytokin w warunkach występowania hiperglikemii oraz DKA, opisane przez Kitabchi et al. (Kitabchi et al., 2004, Stentz and Kitabchi, 2005), a powodowane zaburzeniami szlaku metabolizmu fosfatydyloinozytolu wynikającymi z obecności nieprawidłowej izoformy *Lyp2*.

Jednocześnie wśród pacjentów należących do starszej grupy wiekowej, a posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC obserwowano szczególnie korzystną, zważywszy na wyniki badań

Gabbay et al. (Andrade Lima Gabbay et al., 2012), dynamikę humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD. Pośrednio może to potwierdzać przypuszczenia o szczególnych możliwościach kompensacyjnych układu immunologicznego związanych z wysokimi stężeniami hormonów płciowych, które mogą dość skutecznie redukować szczególnie wzmożoną, genetycznie warunkowaną aktywność procesu autoimmunologicznego.

Obserwacje dokonane w grupie pacjentów będących homozygotami CC wydają się wskazywać, iż przy prawidłowej strukturze Lyp2, dochodzi do mniej istotnych zaburzeń w funkcjonowaniu układu immunologicznego, a przez to w mniejszym stopniu uwidacznia się kompensująca rola zmian w profilu subpopulacji limfocytów powodowanych wysokimi stężeniami hormonów płciowych, jak w przypadku grupy osób posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC. Prawdopodobnie prawidłowa struktura Lyp2 umożliwia u młodszych pacjentów rozwój korzystnej, genetycznie uwarunkowanej dynamiki zmian resztkowej insulinosekrecji oraz osiągnięcie znacznej stabilności przebiegu klinicznego choroby, porównywalnego do przebiegu obserwowanego w starszej grupie wiekowej, pod warunkiem nieobciążonego wywiadu w kierunku DKA.

Natomiast obserwowany szczególnie dekompensujący wpływ DKA na przebieg T1DM u pacjentów zakwalifikowanych do młodszych grup wiekowych, niezależnie od genotypu analizowanego polimorfizmu, można tłumaczyć wieloczynnikowo (Usher-Smith et al., 2011). U młodszych dzieci wyjściowa masa komórek β trzustki pozostaje mniejsza, proporcjonalnie do niższej masy ciała. Jednocześnie obserwowana niekorzystna dynamika zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw GAD w młodszych grupach wiekowych wskazuje, w świetle wyników badania Gabbay et al. (Andrade Lima Gabbay et al., 2012), na szczególnie nasilony proces autoimmunologiczny. Prawdopodobnie predysponuje to do wystąpienia DKA na początku choroby, z uwagi na gwałtowny rozwój niedoboru insuliny, który przekracza metaboliczne zdolności kompensacyjne organizmu, jak również w dalszym przebiegu choroby uniemożliwia uzyskanie istotnego wzrostu wydzielania C-peptydu, a tym samym korzystniejszego przebiegu klinicznego choroby. Dodatkowo u młodszych dzieci należy uwzględnić inne fizjologiczne czynniki, które zwiększają predyspozycję do rozwoju DKA, jak zwiększony stosunek powierzchni ciała do masy ciała sprzyjający nasilonej utracie płynów poprzez parowanie, a przez to gwałtowniej postępującemu odwodnieniu organizmu. Dodatkowo u młodszych dzieci z uwagi na gwałtownie rozwijające się i często niespecyficzne objawy istotnie częściej dochodzi do opóźnienia rozpoznania T1DM z powodu niewłaściwej wstępnej diagnozy. (Usher-Smith et al., 2011, Pawłowicz et al., 2009)

Jednocześnie obserwacje dotyczące dystrybucji poszczególnych genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w populacji badanej oraz kontrolnej, z uwzględnieniem opisanego powyżej, modulującego oddziaływania obu modeli strukturalnych na przebieg kliniczny T1DM w pierwszym roku trwania choroby, wskazują na istnienie pewnych implikacji klinicznych przeprowadzonego badania. W populacji województwa pomorskiego, ze względu na szczególnie wysoką częstość występowania allelu *PTPN22* c.1858T, zarówno w populacji ogólnej, jak i wśród chorych z T1DM, uzasadnionym wydaje się wprowadzenie oznaczeń analizowanego polimorfizmu do panelu badań diagnostycznych przeprowadzanych u pacjentów ze świeżo rozpoznaną T1DM. Powyższe oznaczenie miałoby charakter prognostyczny, a wykazana obecność allelu *PTPN22* c.1858T pozwalałaby na kwalifikację pacjenta do grupy zwiększonego ryzyka niepomyślnego przebiegu T1DM, z uwagi na wykazany związek powyższego allelu z niekorzystną dynamiką zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki oraz utrzymywaniem się istotnie wyższych mian autoprzeciwciał skierowanych przeciw natywnej insulinie w pierwszym roku choroby. Obserwacje powyższe wiążą się ze zmniejszonym i skróconym oddziaływaniem angio- oraz neuroprotektynnym C-peptydu, jak również zwiększonym ryzykiem niestabilnego przebiegu choroby, z uwagi na możliwość występowania znacznych fluktuacji glikemii warunkowanych nie tylko znacznie

obniżonymi poziomami C-peptydu, ale również obecnością wysokich mian autoprzeciwciał IAA. (Steffes et al., 2003, Palmer et al., 2004, Martin et al., 1992)

Jednocześnie oznaczenia polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* umożliwiłyby indywidualizację postępowania terapeutycznego u poszczególnych pacjentów, jak również potencjalizację nowych metod leczenia, w tym terapii T_{reg} (Marek-Trzonkowska et al., 2012). Uwzględniając specyficzną dystrybucję genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w badanej grupie pacjentów z T1DM, pochodzących z województwa pomorskiego, szczególnego znaczenia nabierają wyniki badań zespołu Brownlie et al. (Brownlie et al., 2012). Zespół irlandzkich badaczy wykazał znamienne większą zdolność supresji odpowiedzi autoimmunologicznej w przypadku limfocytów T_{reg} pochodzących od myszy pozbawionych ekspresji *PTPN22* (T_{reg} *PTPN22* -/-), w porównaniu z limfocytami T_{reg} pochodzącymi z modelu kontrolnego (wild-type T_{reg}). Nasiloną funkcją supresyjną limfocyty T_{reg} *PTPN22* -/- w powyższym eksperymencie warunkowana były zwiększoną produkcją IL-10, wykazującej silne działanie immunosupresyjne, jak również wzmożonymi zdolnościami adhezyjnymi T_{reg} *PTPN22* -/- za pośrednictwem cząsteczki LFA-1, która odgrywa istotną rolę podczas interakcji pomiędzy różnymi subpopulacjami limfocytów T. (Brownlie et al., 2012) Beneficjentami powyższej terapii mogliby być pacjenci posiadający genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC, u których, w świetle badań zespołu Schmidt et al. (Schmidt et al., 2011), próby stosowania limfocytów T_{reg} mogą nie przynosić spodziewanych efektów, ze względu na istniejącą genetycznie uwarunkowaną oporność receptora TCR, a szczególnie zaburzenie procesów przekazywania sygnału do wnętrza limfocyty T związanych z aktywacją LAT. Zespół Schmidt et al. wykazał, iż główne zdolności supresyjne limfocytów T_{reg} ($CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$) związane są z hamowaniem uwalniania jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych, a tym samym zmniejszeniem aktywności czynnika transkrypcyjnego $NF_{\kappa}B$ odpowiedzialnego za ekspresję genów dla niektórych cytokin, szczególnie IL-2. Natomiast szlaki aktywacji limfocytów T_{eff} niezależne od uwalniania jonów wapniowych, w tym warunkowane aktywacją LAT, nie ulegają inhibicji pod wpływem interakcji z limfocytami T_{reg} . (Schmidt et al., 2011) (→ *Wstęp* ryc.1.3 str.33) Natomiast potencjalnie większa skuteczność terapii limfocytami T_{reg} *PTPN22* -/- u pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT oraz *PTPN22* c.1858TC może wynikać ze zwiększonych zdolności adhezyjnych tych limfocytów, co z kolei może doprowadzać do „przełamania” genetycznie uwarunkowanej oporności receptora TCR limfocytów T_{eff} w wyniku przedłużonej i bardziej efektywnej interakcji z limfocytami T_{reg} .

Jednocześnie wyniki prezentowanego badania wskazują na konieczność holistycznego rozstrzygnięcia zagadnień dotyczących postępowania terapeutycznego u pacjentów z T1DM pochodzących z terenów województwa pomorskiego.

Wykazany sposób dystrybucji genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w grupie kontrolnej pochodzącej z terenów województwa pomorskiego uwidocznili szczególną odrębność populacji ogólnej zamieszkującej te tereny wobec rasy kaukaskiej, jak również populacji pochodzących z innych regionów Polski. Wykazane również istotne różnice w dystrybucji genotypów pomiędzy populacją badaną a grupą kontrolną, z tendencją do przesunięcia w kierunku genotypów związanych z wysokim ryzykiem wystąpienia T1DM potwierdziły znamienne wiązanie tego polimorfizmu z rozwojem T1DM u obserwowanych pacjentów. Uwzględniając powyższe odmienności w dystrybucji genotypów analizowanego polimorfizmu na terenie województwa pomorskiego, niezwykle istotne pozostaje stwierdzenie Gregersena (Gregersen et al., 2006) wskazujące na konieczność szczególnie uważnego dobierania grup kontrolnych, w przypadku wykazanych w danej populacji odrębności w alokacji pacjentów ze względu na posiadany genotyp. Obserwacje dokonane w prezentowanym badaniu, jak również w badaniach zespołów Piekutowska-Abramczuk et al. (Piekutowska-Abramczuk et al., 2010) oraz Nelis et al. (Nelis et al., 2009) (→ *Dyskusja* str.180), a wskazujące na szczególną odmienną genetyczną populacji województwa pomorskiego, nakazują w przypadku prowadzonych na tym terenie badań, a zwłaszcza badań interwencyjnych, dokonywanie porównań do grup kontrolnych wywodzących się też z rejonu

województwa pomorskiego, a dopiero w kolejnym etapie odnoszenie ich do wyników badań pochodzących z innych regionów Polski.

Opisany udział polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w patomechanizmach prowadzących do rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej, jak również obserwowany w populacji badanej modulujący wpływ obu układów strukturalnych, będących przypuszczalnie ekwiwalentem oddziaływania izoformy Lyp2, wskazują na prawdopodobne istnienie poważnego zaburzenia na poziomie molekularnym, doprowadzającego do dysfunkcji trzech najważniejszych subpopulacji limfocytów, w przypadku obecności u pacjenta allelu *PTPN22* c.1858T. Jednocześnie w całej badanej populacji, niezależnie od genotypu analizowanego polimorfizmu mogą istnieć zaburzenia równowagi stosunku ilościowego Lyp1:Lyp2, opisane przez Ronningera wśród chorych z RZS oraz SM (Ronninger et al., 2012). Powyższe hipotezy wymagają przeprowadzenia kolejnych badań w ocenianej populacji, ale jednocześnie sygnalizują potrzebę holistycznego podejścia do postępowania terapeutycznego, w tym szczególnie ewentualnych działań interwencyjnych, z uwagi na prawdopodobnie ograniczoną w czasie efektywność procedur skupiających się wyłącznie na wybranej subpopulacji limfocytów.

Rozwój innych chorób autoimmunologicznych w populacji badanej w pierwszym roku trwania choroby – próba oceny w odniesieniu do danych prezentowanych w piśmiennictwie

W badanej populacji częstość występowania podwyższonego miana swoistych autooprzeciwciał związanych z AIT u dzieci ze świeżo rozpoznaną T1DM wynosiła 13,6% i pozostawała nieco niższa w porównaniu z częstościami raportowanymi z innych regionów Polski (od 14,8% – województwo kieleckie do 21,7% – województwo mazowieckie) (Czerniawska et al., 2003, Szypowska et al., 2010). Natomiast we wcześniej przeprowadzonych badaniach na terenie województwa pomorskiego odsetek pacjentów z rozpoznaną AIT w okresie ujawniania się T1DM pozostawał jeszcze niższy i wynosił 10% (Myśliwiec et al., 2006).

W pierwszym roku choroby w grupie badanej obserwowano wzrost częstości występowania AIT (łącznie postać jawna klinicznie i subkliniczna) o 4,92%. Ocena powyższej obserwacji w odniesieniu do danych z piśmiennictwa pozostaje utrudniona, ponieważ w piśmiennictwie dominują prace o odmiennej metodycy, dokonujące porównania wyników jednorazowego badania przesiewowego w kierunku AIT w dwóch grupach pacjentów: ze świeżo rozpoznaną T1DM oraz z postacią przewlekłą choroby, o różnym okresie jej trwania. (Piatkowska and Szalecki, 2011, Myśliwiec et al., 2006)

W badanej populacji oprócz narastania liczby rozpoznań AIT w pierwszym roku trwania T1DM, wykazano również pewną dynamikę zmian proporcji pomiędzy częstością występowania poszczególnych postaci AIT podczas obserwacji pacjentów. W momencie ujawnienia się T1DM wzrost rozpoznań AIT pozostawał uwarunkowany głównie zwiększeniem się odsetka chorych z postacią subkliniczną AIT, natomiast przy powtórnym badaniu przesiewowym, po roku trwania T1DM, stwierdzono przede wszystkim wzrost odsetka rozpoznań postaci jawnej klinicznej AIT. Powyższa obserwacja może wskazywać na wzrastające ryzyko wystąpienia klinicznych objawów AIT w dalszym przebiegu T1DM, z uwagi na opisane „zjawisko szerzenia się epitopów” i narastającą w czasie aktywność procesu autoimmunologicznego. (Newman et al., 2006) Przedstawioną hipotezę wydaje się potwierdzać obserwowane w populacji badanej utrzymywanie się znamienne wyższych mian autooprzeciwciał GAD w pierwszym roku trwania T1DM u chorych z dodatnim mianem autooprzeciwciał TPO lub TG. Podobną istotną korelację pomiędzy występowaniem autooprzeciwciał GAD oraz autooprzeciwciał swoistych dla AIT wykazano w wielu dotychczasowych badaniach dotyczących współwystępowania innych schorzeń o podłożu autoimmunologicznym u chorych z rozpoznaną T1DM. Także kolejna obserwacja dotycząca znamienne częstszego występowania AIT u dziewcząt, jak również wśród pacjentów należących do starszych kategorii wiekowych, pozostaje zgodna z aktualnymi doniesieniami. (Kordonouri et al., 2011, Jin et al., 2011, Piatkowska and Szalecki, 2011)

Ze względu na znaczne różnice w metodyce badań dotyczących współwystępowania celiakii (ChT) u osób z rozpoznaną T1DM ocena porównawcza wyników badań przesiewowych przeprowadzonych w obserwowanej populacji pozostaje niezwykle utrudniona. Dodatkowym aspektem przy ocenie badań podejmujących powyższy problem kliniczny jest również właściwa kwalifikacja pacjentów do badania, szczególnie w przypadku grup chorych ze świeżo rozpoznaną T1DM. Istotną kwestią w tej sytuacji pozostaje odpowiednia weryfikacja rozpoznania. Ważny element diagnostyki stanowią tu oznaczenia swoistych autooprzeciwciał. Występowanie hiperglikemii u pacjenta ze stwierdzoną ChT per se nie uprawomocnia rozpoznania T1DM, a w przypadku łagodnej hiperglikemii, przy ujemnych mianach autooprzeciwciał swoistych dla T1DM, konieczne jest kontynuowanie diagnostyki w kierunku innych postaci cukrzycy, głównie MODY. (Ingegnosi et al., 2008)

W badanej populacji nie wykazano znamiennych zależności pomiędzy dystrybucją poszczególnych genotypów analizowanych polimorfizmów a występowaniem dodatniego miana autooprzeciwciał TPO, TG lub TGA IgA, co prawdopodobnie wiąże się ze zbyt krótkim okresem obserwacji pacjentów. Z uwagi na istotne różnice w dystrybucji genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* względem rasy kaukaskiej, które stwierdzono w grupie badanej i kontrolnej, jak również znaczny odsetek schorzeń z kręgu autoimmunologicznych wykazany w rodzinach pacjentów, badania przesiewowe w kierunku AIT i ChT są kontynuowane wśród obserwowanych chorych w ramach kolejnego grantu Narodowego Centrum Nauki, z jednoczesnym rozszerzeniem panelu badań genetycznych.

Podsumowując, prezentowane badanie wpisuje się w nurt badań wskazujących na istnienie pewnej odrębności genetycznej populacji zamieszkującej tereny województwa pomorskiego. Stwierdzona w grupie kontrolnej częstość występowania allelu *PTPN22* c.1858T pozostaje jedną z najwyższych wśród dotychczas raportowanych oraz wskazuje na szczególną predyspozycję do rozwoju reakcji autoimmunologicznych wśród osób pochodzących z regionu Pomorza.

Jednocześnie stwierdzone znamienne różnice w dystrybucji genotypów analizowanych polimorfizmów genu *INS* oraz *PTPN22* pomiędzy grupą kontrolną i badaną uwidaczniają szczególny udział tych czynników genetycznych w patomechanizmie rozwoju reakcji autoimmunologicznej skierowanej przeciw komórkom β trzustki w populacji badanej. Natomiast obserwacje dotyczące modulującego oddziaływania układów strukturalnych, uwzględniających polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22*, na parametry związane z funkcją resztkową komórek β trzustki, aktywnością procesu autoimmunologicznego oraz wyrównaniem metabolicznym choroby wskazują na analizowany polimorfizm jako na istotny czynnik warunkujący nie tylko rozwój T1DM, ale również i jej przebieg kliniczny wśród obserwowanych chorych. Jednocześnie na podstawie najnowszych doniesień można postawić hipotezę o oddziaływaniu postaci splicingowych fosfatazy tyrozynowej kodowanej przez gen *PTPN22* jako czynników bezpośrednio warunkujących obserwowane zmiany w przebiegu klinicznym choroby. Powyższe założenie nie tylko zarysowuje kierunek dalszych badań, ale również sugeruje konieczność bardziej holistycznego spojrzenia na patogenezę reakcji autoimmunologicznej w przebiegu T1DM – jako na poważne zaburzenie na poziomie molekularnym, powodujące istotne zmiany w funkcjonowaniu trzech najważniejszych subpopulacji limfocytów. Implikuje to również zmiany w postępowaniu diagnostycznym i terapeutycznym u chorych ze świeżo rozpoznaną T1DM, szczególnie pochodzących z regionu województwa pomorskiego.

Wnioski

Stwierdzona w grupie kontrolnej częstość występowania allelu *PTPN22* c.1858T pozostaje jedną z najwyższych wśród dotychczas raportowanych. Powyższa obserwacja oraz wysoki odsetek schorzeń z kręgu autoimmunizacyjnych w rodzinach badanych pacjentów mogą wskazywać na wyjątkową predyspozycję do rozwoju reakcji autoimmunologicznych wśród osób pochodzących z regionu Pomorza.

Obserwowane znamienne różnice w dystrybucji genotypów polimorfizmów 5'VNTR genu *INS* oraz c.1858T>C genu *PTPN22* pomiędzy grupą kontrolną i badaną uwiadcniają szczególny udział tych czynników genetycznych w rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw komórkom β trzustki w populacji badanej.

W świetle najnowszych danych z piśmiennictwa, istotne zależności pomiędzy zmiennymi tworzącymi układy strukturalne /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ oraz /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/, w połączeniu ze stwierdzonym ich modulującym oddziaływaniem na przebieg kliniczny choroby, pozwalają wskazać splicingowe postaci fosfatazy tyrozynowej *PTPN22* (Lyp) jako czynniki bezpośrednio warunkujące obserwowane zmiany. Powyższa hipoteza wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań.

Jednocześnie z uwagi na sposób dystrybucji genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w grupie badanej i kontrolnej oraz modulujące oddziaływanie powyżej wskazanych układów strukturalnych na dalszy przebieg choroby, uzasadnionym wydaje się wprowadzenie oznaczeń analizowanego polimorfizmu do panelu badań diagnostycznych u pacjentów ze świeżo rozpoznaną autoimmunologiczną postacią T1DM, pochodzących z terenów województwa pomorskiego.

Wyniki badań przesiewowych w kierunku innych chorób autoimmunologicznych w populacji badanej, szczególnie przy uwzględnieniu rezultatów przeprowadzonej oceny dystrybucji genotypów polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* w grupie badanej i kontrolnej, wskazują na potrzebę kontynuacji obserwacji pacjentów, jak również poszerzenia panelu badań genetycznych.

Streszczenie

Cukrzyca typu 1 (T1DM) stanowi szczególną postać schorzenia o podłożu autoimmunologicznym, w którym dochodzi do selektywnego uszkodzenia przez autoreaktywne limfocyty T CD4⁺ oraz T CD8⁺ tylko komórek β trzustki wydzielających insulinę. Reakcja autoimmunologiczna przeciw komórkom β trzustki rozwija się w wyniku szeroko pojętych zaburzeń funkcji regulatorowej układu immunologicznego, która to pozostaje pod ścisłą kontrolą określonych loci genowych, a czynniki środowiskowe egzo- i endogenne modulują powyższą interakcję. Głównymi loci zaangażowanymi w rozwój reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM są geny regionu HLA. Istnieje jednak szereg loci, zlokalizowanych poza regionem HLA, które pozostają silnie związane z predyspozycją do rozwoju T1DM i jednocześnie odgrywają istotną rolę w patomechanizmach prowadzących do rozwoju reakcji autoimmunologicznej skierowanej przeciw komórkom β trzustki. Należą do nich geny *INS*, *CTLA-4* oraz *PTPN22*, a szczególnie ich określone odmiany polimorficzne: 5'VNTR genu *INS*, c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22*. Patomechanizmy powyższych polimorfizmów w rozwoju reakcji autoimmunologicznej w patogenezie T1DM pozostają ściśle powiązane, prowadząc głównie do zaburzeń selekcji negatywnej tymocytów, jak i prawdopodobnie prekursorów limfocytów B (c.1858T>C genu *PTPN22*) w obrębie grasicy, zaburzeń procesu hamowania aktywacji limfocytów T (c.49A>G genu *CTLA-4*), zaburzeń funkcji limfocytów T regulatorowych (c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22*), a także prawdopodobnie do nadmiernej aktywacji i proliferacji limfocytów B (c.1858T>C genu *PTPN22*).

W związku z powyższym sposobem oddziaływania wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* niezwykle interesującym oraz stosunkowo mało zbadanym zagadnieniem pozostaje samodzielne, jak i łączne oddziaływanie tych czynników genetycznych na funkcję resztkową komórek β trzustki oraz aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej u dzieci ze świeżo rozpoznaną T1DM, zarówno w momencie diagnozy, jak i w dalszym przebiegu choroby. Istotnym wydaje się wykazanie ewentualnych związków poszczególnych polimorfizmów z pierwotną manifestacją T1DM w postaci cukrzycowej kwasicy ketonowej (DKA), która uznawana jest za potencjalny ekwiwalent szczególnie gwałtownego i nasilonego procesu destrukcji komórek β trzustki. Ocena oddziaływania wybranych polimorfizmów genów *CTLA-4*, *PTPN22* oraz *INS* na dynamikę zmian aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej, w czasowej korelacji z trendem zmian resztkowej insulinosekrecji w pierwszym roku trwania T1DM, pozostaje szczególnie istotnym zagadnieniem z uwagi na bezpośrednie przełożenie obserwowanych fluktuacji obu parametrów na przebieg kontroli metabolicznej choroby oraz fazy remisji T1DM. Ważnym aspektem w kontekście „fenomenu rozprzestrzeniania się epitopów” staje się również dokonanie oceny wpływu badanych polimorfizmów na rozwój innych chorób autoimmunologicznych u pacjentów ze świeżo rozpoznaną T1DM w dalszym jej przebiegu.

Prospektywnym badaniem longitudinalnym objęto 147 dzieci (73 chłopców i 74 dziewczynki) ze świeżo rozpoznaną postacią autoimmunologiczną T1DM (dodatnie miano autoprzeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego GAD i/lub przeciwiinsulinowych IAA i/lub przeciw wyspom trzustkowym ICA), stale zamieszkujących na terenie województwa pomorskiego. Średnia wieku w badanej populacji wynosiła 8,91 ± 4,52 lat.

U wszystkich pacjentów przeprowadzono oznaczenia polimorfizmu c.49A>G genu *CTLA-4*, c.1858T>C genu *PTPN22* oraz 5'VNTR genu *INS* (analiza za pomocą polimorfizmu markerowego –23HphIA>T) z wykorzystaniem metody PCR – RFLP oraz sekwencjonowania DNA (próby kontrolne oraz co 10 próba badana – celem weryfikacji wyników metody PCR – RFLP). Ze względu na ograniczenia prawne i etyczne, grupę kontrolną do analizy porównawczej badań genetycznych stanowiło 326 losowo wybranych anonimowych próbek (wysuszonych plam krwi, które pozostały po rutynowych badaniach przesiewowych noworodków), pochodzących z 19 miejscowości województwa pomorskiego. Wyniki powyższych oznaczeń

w grupie badanej i kontrolnej odniesiono również do danych dotyczących częstości występowania analizowanych polimorfizmów w obrębie rasy kaukaskiej, dostępnych w bazie National Center for Biotechnology Information (NCBI). Estymację występowania genotypów przeprowadzono w oparciu o model Hardy'ego – Weinberga.

W grupie pacjentów zakwalifikowanych do badania, w momencie diagnozy T1DM przeprowadzano ocenę stanu klinicznego pacjentów zgodnie z wytycznymi ISPAD dotyczącymi rozpoznania DKA. Oceniano również funkcję resztkową komórek β trzustki (oznaczenia stężenia C-peptydu), aktywność humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej (miano autoprzeciwciał GAD oraz IAA) oraz poziom hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}). Przeprowadzano również badania przesiewowe w kierunku autoimmunologicznego zapalenia tarczycy (AIT) (miano autoprzeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej TPO oraz przeciw tyreoglobulinie TG) i celiakii (ChT) (miano autoprzeciwciał przeciw transglutaminazie tkankowej w klasie IgA). Oceniano również stopień edukacji pacjenta i jego opiekunów na temat choroby za pomocą autorskiego badania ankietowego, po zakończonym cyklu szkoleń, prowadzonych przez edukatorów diabetologicznych.

Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do badania podlegali 12-miesięcznej obserwacji. W ramach wizyt kontrolnych co 3 miesiące przeprowadzano oznaczenia C-peptydu oraz poziomu HbA_{1c} , co 6 miesięcy dodatkowo oznaczenia miana autoprzeciwciał GAD oraz IAA, a także ocenę stopnia edukacji pacjenta i jego opiekunów na temat choroby (autorskie badanie ankietowe). Po 12 miesiącach choroby dodatkowo powtarzano badania przesiewowe w kierunku AIT oraz ChT. Powyższe wyniki badań analizowano w połączeniu z danymi antropometrycznymi, danymi dotyczącymi rodzaju stosowanej insulinoaterapii oraz dobowego zapotrzebowania na insulinę, które aktualizowano podczas każdej wizyty kontrolnej.

W prezentowanym badaniu wykazano znamienne częstsze występowanie genotypów *PTPN22* c.1858TT ($p=0,037$) oraz *INS* 5'VNTR klasy I/I ($p=0,002$) w grupie badanej w odniesieniu do populacji kontrolnej. Jednocześnie w przypadku polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* stwierdzono istotne różnice w dystrybucji poszczególnych genotypów pomiędzy grupą kontrolną pochodzącą z terenów województwa pomorskiego a populacją kaukaską ($p=0,01$), z przesunięciem dystrybucji w kierunku genotypów związanych z podwyższonym ryzykiem rozwoju T1DM (allel *PTPN22* c.1858T grupa kontrolna 21,12% vs populacja kaukaska 12,0%). Ze względu na liczebność próby nie wykazano istotnej predylekcji do współwystępowania określonych par genotypów analizowanych polimorfizmów w grupie badanej w porównaniu z populacją kontrolną.

U pacjentów będących homozygotami *PTPN22* c.1858CC (genotyp związany z niskim ryzykiem rozwoju T1DM) w pierwszym roku trwania choroby obserwowano szczególnie korzystną dynamikę zmian funkcji resztkowej komórek β trzustki, z występowaniem przedłużonego okresu maksymalnej resztkowej insulinosekrecji do 6 miesiąca trwania T1DM. Z kolei analiza aktywności humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw natywnej insulinie (IAA), stanowiącej niekorzystny czynnik prognostyczny, wykazała utrzymywanie się istotnie wyższych mian autoprzeciwciał IAA u pacjentów posiadających genotyp *PTPN22* c.1858TT przez okres rocznej obserwacji.

W badanej populacji odsetek DKA w momencie rozpoznania T1DM wynosił 35,37% i utrzymywał się na dotychczas raportowanym poziomie (lata 1999-2005). Wiek pacjentów z rozpoznaną DKA pozostawał dyskretnie, ale znamienne statystycznie niższy ($p=0,04$; średnia wieku: chorzy bez DKA $9,45 \pm 4,29$ lat vs. pacjenci z DKA $8,1 \pm 4,76$ lat), a DKA istotnie częściej występowała u chłopców ($p=0,044$). Jednocześnie w badanej populacji płeć i wiek pacjenta pełniły funkcję istotnego moderatora zależności pomiędzy dystrybucją genotypów analizowanych polimorfizmów a występowaniem DKA w okresie ujawniania się T1DM. U dziewcząt posiadających genotypy o podwyższonym ryzyku rozwoju T1DM – *CTLA-4* c.49GG+AG lub *INS* 5'VNTR klasy I/I+I/III, DKA występowała istotnie rzadziej niż u chłopców ($p=0,027$). Podobną sytuację obserwowano w przypadku genotypu *PTPN22* c.1858CC związanego z niskim ryzykiem rozwoju T1DM ($p=0,08$). Natomiast genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC pozostawały związane z istotnie częstszym

występowaniem DKA w młodszych kategoriach wiekowych (wiek wczesnodziecięcy + przedszkolny $p=0,034$).

Jednocześnie w przypadku dwóch układów strukturalnych /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ oraz /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/wykazano ich istotne modulujące oddziaływanie na dynamikę przebiegu klinicznego choroby w pierwszym roku jej trwania.

Wśród pacjentów ze stwierdzoną DKA w momencie diagnozy T1DM, u dziewcząt o genotypach *PTPN22* c.1858TT+TC obserwowano mniej dekompensujące oddziaływanie DKA na dynamikę zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki, jak również wyrównanie metaboliczne T1DM i przebieg fazy remisji w porównaniu z chłopcami o tym samym układzie genetycznym. Z kolei u dziewcząt będących homozygotami CC istotnie rzadziej dochodziło do rozwoju DKA w okresie ujawniania się T1DM, a dynamika zaniku funkcji resztkowej komórek β trzustki, nawet w przypadku wystąpienia DKA na początku choroby, pozostawała szczególnie korzystna, przy jednocześnie wysokim odsetku prawidłowej kontroli metabolicznej choroby w pierwszym półroczu choroby i stabilnym przebiegu fazy remisji.

Wśród pacjentów posiadających genotypy *PTPN22* c.1858TT+TC oraz należących do starszej grupy wiekowej istotnie rzadziej odnotowywano występowanie DKA, a jej dekompensujące działanie na kliniczny przebieg choroby było słabsze w porównaniu z młodszymi dziećmi o tym samym układzie genetycznym. Jednocześnie w starszej grupie wiekowej, pomimo rozwoju DKA i znacznych fluktuacji poziomu C-peptydu, obserwowano znaczny odsetek chorych z prawidłowym wyrównaniem metabolicznym T1DM oraz dość stabilnym przebiegiem fazy remisji. W młodszej grupie wiekowej, niezależnie od genotypu polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22*, stwierdzono szczególnie dekompensujące oddziaływanie DKA na dalszy przebieg kliniczny choroby.

W badanej populacji nie wykazano istotnych zależności pomiędzy dystrybucją poszczególnych genotypów analizowanych polimorfizmów a występowaniem dodatniego miana autoprzeciwciał TPO, TG lub TGA IgA.

Podsumowując, stwierdzona w grupie kontrolnej szczególnie wysoka częstość występowania allelu *PTPN22* c.1858T, jak również znaczący odsetek schorzeń z kręgu autoimmunizacyjnych w rodzinach badanych pacjentów mogą wskazywać na wyjątkową predyspozycję do rozwoju reakcji autoimmunologicznych wśród osób pochodzących z regionu Pomorza. W świetle najnowszych danych z piśmiennictwa, istotne zależności pomiędzy zmiennymi tworzącymi układy strukturalne /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – płeć pacjenta/ oraz /polimorfizm c.1858T>C genu *PTPN22* – DKA w momencie rozpoznania T1DM – wiek pacjenta/, w połączeniu ze stwierdzonym ich modulującym oddziaływaniem na przebieg kliniczny choroby, pozwalają wskazać splicingowe postaci fosfatazy tyrozynowej *PTPN22* (Lyp) jako czynniki bezpośrednio warunkujące obserwowane zmiany. Powyższa hipoteza wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań. Jednocześnie uzasadnionym wydaje się wprowadzenie oznaczeń polimorfizmu c.1858T>C genu *PTPN22* do panelu badań diagnostycznych u pacjentów ze świeżo rozpoznaną autoimmunologiczną postacią T1DM, pochodzących z terenów województwa pomorskiego.

Abstract

Type 1 diabetes (T1DM) is a specific type of autoimmune disorder, where autoreactive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes cause selective destruction of pancreatic β -cells producing insulin. The autoimmune reaction against β cells develops as the result of broadly-defined disturbances in the adaptive and regulatory function of the immune system, strictly controlled by particular genes and modulated by exo- and endogenous environmental influences. The major genes responsible for individual susceptibility to autoimmune reactions development are HLA linked genes. There are several non-HLA loci associated with T1DM susceptibility, which also play a substantial role in the pathomechanisms leading to autoimmune reaction towards pancreatic β -cells. From these loci particularly T1DM-predisposing genes are: *INS*, *CTLA-4*, *PTPN22* and their polymorphisms 5'VNTR of *INS* gene, c.49A>G of *CTLA-4* gene and c.1858T>C of *PTPN22* gene. The pathomechanisms of the above-mentioned polymorphisms leading to autoimmune reaction development in T1DM pathogenesis are closed interrelated and may cause abnormalities in thymic negative selection of T and B lymphocytes precursors (polymorphism c.1858T>C *PTPN22*), defects in suppressing of T-cells activation (polymorphism c.49A>G *CTLA-4*) or in T_{reg} functions (polymorphisms c.49A>G *CTLA-4* and c.1858T>C *PTPN22*), and presumably lead to altered B cells homeostasis (polymorphism c.1858T>C *PTPN22*).

Because of the above-mentioned pathomechanisms of selected polymorphisms of *CTLA-4*, *PTPN22* and *INS* genes, their independent and joint effects on residual β -cells function and activity of humoral autoimmunity in children with the new T1DM onset, especially in the first year of disease, remain interesting and not fully elucidated. Establishing possible association between selected polymorphisms and DKA development as the first manifestation of T1DM, regarded to be an equivalent of particularly violent and intensive β -cells destruction, would be also important. The evaluation of independent and joint effects of selected polymorphisms on the dynamics of humoral autoimmunity activity in time correlation with trends of residual β -cells function during the first year of T1DM would be significant because of their direct transmission to changes in metabolic control of disease and also T1DM remission phase course. Estimation of the association between effects of selected polymorphisms and other autoimmune disorders development in children with newly diagnosed T1DM during further clinical course of disease remains an important aspect, especially in the context of "the shared epitope hypothesis".

The prospective, longitudinal study included 147 children (73 boys and 74 girls) with T1DM - autoimmune subtype (positive titre of GAD and/or IAA and/or ICA autoantibodies), residing in the Pomeranian region of Poland. Mean age in the study population was 8.91 \pm 4.52 yr.

In all patients the following gene polymorphisms were analysed: c.49A>G *CTLA-4*, c.1858T>C *PTPN22* and 5'VNTR *INS* (genotyping with the use of marker polymorphism -23HphIA>T *INS*), using PCR-RFLP method and DNA sequencing (controls and each 10th sample for countercheck of PCR-RFLP method results). The control group for comparison analyses of genetic results was established from 326 random anonymous samples (Guthrie cards, which remain after metabolic screening test of newborns), from 19 towns of the Pomeranian region of Poland, because of ethical limitations of establishing control groups with children participation in case of genetic analyses. Results of genotyping from both, study and control groups were compared with the data on the polymorphisms frequencies in Caucasian from the NCBI database. Distribution of genotypes in study and control groups was consistent with Hardy – Weinberg equilibrium.

In all classified children the following procedures were conducted during hospitalization in the time of T1DM diagnosis: classification of the severity of DKA according to ISPAD guidelines, examination of residual β -cells function (c-peptide level), activity of humoral autoimmunity (titre of GAD and/or IAA and/or ICA autoantibodies), level of glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), screening tests towards autoimmune

thyroid disease (titre of TPO and TG autoantibodies) and celiac disease (titre of TGA IgA autoantibodies). Patient and parent/guardian education on T1DM were evaluated by means of an authorial questionnaire, after special training conducted by diabetic educators. Selected patients underwent a 12-month clinical observation. Level of c-peptide and HbA_{1c} were tested every 3 months, additionally titres of GAD and IAA and patient education level on the disease were evaluated every 6 months. To complete the clinical observation, after 12 months, screening tests towards autoimmune thyroid disease and celiac disease were repeated. Results of all investigations were analysed in connection with anthropometric and treatment data.

The statistical analyses were performed using R program version 2.15.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Austria).

In the study group the frequency of genotype *PTPN22* c.1858CC and *INS* 5'VNTR class I/I was significantly higher compared to control group ($p=0.037$ and $p=0.002$ respectively). In case of c.1858T>C *PTPN22* polymorphism significant differences between control group from the Pomeranian region of Poland and Caucasian population (NCBI data), with the shift in genotypes towards T1DM-predisposing, were found ($p=0.01$, frequency of the *PTPN22* c.1858T-allele: control group 21.12% vs. Caucasian population 12.0%). Because of patients number in both groups it was impossible to show some predilection for concomitance of specific genotype pairs of selected polymorphisms between study and control group.

In patients with *PTPN22* c.1858CC genotype (genotype associated with low risk of T1DM development) particularly favourable dynamics of residual β -cells function during the first year of disease was observed, with prolonged time of maximum residual insulin secretion (up to 6th month of T1DM). On the other hand, significantly higher titres of IAA among homozygotes *PTPN22* c.1858CC during the whole observation period were indicated. This is a poor prognostic factor in the clinical course of T1DM

The frequency of DKA at T1DM diagnosis amounted to 35.37% and was stable in comparison with the previous reported period (years 1999 – 2005). Patients with DKA were slightly, but statistically significantly younger ($p=0.04$; mean age: group without DKA 9.45 ± 4.29 yr. vs. patients with DKA 8.1 ± 4.76 yr.). DKA occurred more frequent in boys ($p=0.044$). Simultaneously in the study group such factors as gender and age were important and significant moderators of associations between genotypes of selected polymorphisms distribution and DKA occurrence at T1DM diagnosis. DKA occurred less frequently in girls with T1DM-predisposing genotypes like *CTLA-4* c.49GG+AG or *INS* 5'VNTR class I/I+I/III ($p=0.027$). The same situation was observed in the case of genotype *PTPN22* c.1858CC, which is associated with lower T1DM susceptibility ($p=0.08$). On the other hand, T1DM-predisposing genotypes *PTPN22* c.1858TT+TC were related to significantly frequent occurrence of DKA in younger age group (infants and preschool children) ($p=0.034$).

In the study group, in case of two structural models /c.1858T>C *PTPN22* polymorphism – DKA at T1DM diagnosis – patient gender/ and /c.1858T>C *PTPN22* polymorphism – DKA at T1DM diagnosis – patient age/, their significant regulatory effects on dynamics of T1DM course in the first year of disease were observed.

In patients with DKA at T1DM diagnosis, in girls with T1DM-predisposing genotypes *PTPN22* c.1858TT+TC, fewer worsening effects of DKA on dynamics of residual β -cells function, metabolic disease control and course of T1DM remission phase were found. In case of girls carrying genotype *PTPN22* c.1858CC, DKA at the onset of the disease developed significantly less frequently. The dynamics of residual β -cells function, even despite DKA presence at the beginning of disease, were particularly favourable, with simultaneously observed high percentage of proper metabolic T1DM control during first 6 months of disease and stable remission phase.

In patients from older age groups, with T1DM-predisposing genotypes *PTPN22* c.1858TT+TC, DKA was also significantly less frequently observed and had fewer worsening effects on the clinical course of

disease, than in the younger children with the same genotypes. In the older group, in spite of DKA development and considerable fluctuation of c-peptide level, the percentage of patients with good metabolic control was quite high and the course of remission phase remained quite stable. In children from the younger age group the worsening effects of DKA were very strong and caused serious deterioration of the clinical course of the disease, independent from the genotype of c.1858T>C *PTPN22* polymorphism.

In the study group, despite high frequency of allele *PTPN22* c.1858T and very high percentage of family members, no significant association between distribution of analysed polymorphisms genotypes and results of screening towards other autoimmune disorders was found.

In summary, the presented research demonstrated the genetic specificity of the Pomeranian region population, with unusually high frequency of allele *PTPN22* c.1858T in the control and also T1DM group. It could indicate a specific predisposition of this population to autoimmune diseases development, especially when high percentage of positive family anamnesis towards autoimmune disorders is considered. The significant associations between factors forming two structural models and their important regulatory influences on the course of disease could be explained by the impact of one of the splice forms of tyrosine phosphatase *PTPN22* – Lyp2, when the newest reports on pathomechanisms of c.1858T>C *PTPN22* polymorphism are considered. The Lyp2 function could be impaired in case of allele *PTPN22* c.1858T occurrence and cause severe disturbances in main lymphocytes subpopulations homeostasis. This hypothesis needs to be confirmed in further studies. In the Pomeranian region of Poland the c.1858T>C *PTPN22* polymorphism indications among patients with new T1DM onset should be considered as a genetic screening for worse clinical course of disease.

Bibliografia

(bibliografia zawiera łącznie 152 pozycje piśmiennictwa)

- ABE, T., TAKINO, H., YAMASAKI, H., OZAKI, M., SERA, Y., KONDO, H., SAKAMAKI, H., KAWASAKI, E., AWATA, T., YAMAGUCHI, Y. & EGUCHI, K. 1999. CTLA4 gene polymorphism correlates with the mode of onset and presence of ICA512 Ab in Japanese Type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 46, 169-175.
- ALHONEN, S., KORHONEN, S., TAPANAINEN, P., KNIP, M. & VEIJOLA, R. 2011. Extended family history of diabetes and autoimmune diseases in children with and without type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 34, 115-117.
- ALTMAN, D. G. 2001. *Practical statistics for medical research*, Floryda, Boca Raton.
- ANDRADE LIMA GABBAY, M., SATO, M. N., DUARTE, A. J. S. & DIB, S. A. 2012. Serum titres of anti-glutamic acid decarboxylase-65 and anti-IA-2 autoantibodies are associated with different immunoregulatory milieu in newly diagnosed type 1 diabetes patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 168, 60-67.
- AWATA, T., KURIHARA, S., IITAKA, M., TAKEI, S., INOUE, I., ISHII, C., NEGISHI, K., IZUMIDA, T., YOSHIDA, Y., HAGURA, R., KUZUYA, N., KANAZAWA, Y. & KATAYAMA, S. 1998. Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. *Diabetes*, 47, 128-129.
- BAGDURE, D., REWERS, A., CAMPAGNA, E. & SILLS, M. R. 2013. Epidemiology of hyperglycemic hyperosmolar syndrome in children hospitalized in USA. *Pediatr Diabetes*, 14, 18-24.
- BARANZINI, S. E. 2009. The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective. *CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY*, 21, 596-605.
- BARRATT, B. J., PAYNE, F., LOWE, C. E., HERMANN, R., HEALY, B. C., HAROLD, D., CONCANNON, P., GHARANI, N., MCCARTHY, M. I., OLAVESSEN, M. G., MCCORMACK, R., GUJA, C., IONESCU-TIRGOVISTE, C., UNDLIEN, D. E., RONNINGEN, K. S., GILLESPIE, K. M., TUOMILEHTO-WOLF, E., TUOMILEHTO, J., BENNETT, S. T., CLAYTON, D. G., CORDELL, H. J. & TODD, J. A. 2004. Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. *Diabetes*, 53, 1884-1889.
- BASCHAL, E. E. & EISENBARTH, G. S. 2008. Extreme genetic risk for type 1A diabetes in the post-genome era. *Journal Of Autoimmunity*, 31, 1-6.
- BIZZARRI, C., PATERA, I. P., ARNALDI, C., PETRUCCI, S., BITTI, M. L., SCROCCA, R., MANFRINI, S., POTUESI, R., BUZZETTI, R., CAPPÀ, M. & POZZILLI, P. 2010. Incidence of type 1 diabetes has doubled in Rome and the Lazio Region in the 0- to 14-year age-group: a 6-year prospective study (2004-2009). *Diabetes Care*, 33, e140.
- BJORNVOLD, M., UNDLIEN, D. E., JONER, G., DAHL-JORGENSEN, K., NJOLSTAD, P. R., AKSELSEN, H. E., GERVIN, K., RONNINGEN, K. S. & STENE, L. C. 2008. Joint effects of HLA, INS, PTPN22 and CTLA-4 genes on the risk of type 1 diabetes. *Diabetologia*, 51, 589-596.
- BLANC, N., LUCIDARME, N. & TUBIANA-RUFI, N. 2003. Factors associated to ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes in children. *Arch. Pediatr.*, 10, 320-325.
- BLUESTONE, J. A., HEROLD, K. & EISENBARTH, G. 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464, 1293-1300.
- BOTTINI, N., VANG, T., CUCCA, F. & MUSTELIN, T. 2006. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Seminars in Immunology*, 18, 207-213.
- BROWNLIE, R. J., MIOSGE, L. A., VASSILAKOS, D., SVENSSON, L. M., COPE, A. & ZAMOYSKA, R. 2012. Lack of the Phosphatase PTPN22 Increases Adhesion of Murine Regulatory T Cells to Improve Their Immunosuppressive Function. *Science Signaling*, 5.
- BURN, G. L., SVENSSON, L., SANCHEZ-BLANCHO, C., SAINI, M. & COPE, A. P. 2011. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Letters*, 585, 3689-3698.
- CHELALA, C., DUCHATELET, S., JOFFRET, M.-L., BERGHOLDT, R., DUBOIS-LAFORGUE, D., GHANDIL, P., POCIOT, F., CAILLAT-ZUCMAN, S., TIMSIT, J. & JULIER, C. 2007. PTPN22 R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. *Diabetes*, 56, 522-526.
- CHENTOUFI, A. A., BINDER, N. R., BERKA, N., ABUNADI, T. & POLYCHRONAKOS, C. 2008. Advances in Type 1 Diabetes Associated Tolerance Mechanisms. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68, 1-11.

- CHENTOUFI, A. A. & POLYCHRONAKOS, C. 2002. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance - The mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *DIABETES*, 51, 1383-1390.
- CRAIG, M. E., HATTERSLEY, A. & DONAGHUE, K. C. 2009. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, 10, 3-12.
- CZERNIAWSKA, E., SZALECKI, M., PIATKOWSKA, E., MLYNARSKI, W., BODALSKI, J. & LEWINSKI, A. 2003. Prevalence of thyroid antibodies (TPO and ATG) at the onset of type 1 diabetes mellitus in children treated in two diabetes centres in Lodz and Kielce. *Medycyna wieku rozwojowego*, 7, 223-8.
- DORMAN, J. S. & BUNKER, C. H. 2000. HLA-DQ locus of the human leukocyte antigen complex and type 1 diabetes mellitus: A HuGE review. *Epidemiologic Reviews*, 22, 218-227.
- DUNGER, D. B., SPELING, M. A., ACERINI, C. L., BOHN, D. J., DANEMAN, D., DANNE, T. P. A., GLASER, N. S., HANAS, R., HINTZ, R. L., LEVITSKY, L. L., SAVAGE, M. O., TASKER, R. C. & WOLFSDORF, J. I. 2004. ESPE/LWPES consensus statement on diabetic ketoacidosis in children and adolescents. *Archives of Disease in Childhood*, 89, 188-194.
- FEDETZ, M., MATESANZ, F., CARO-MALDONADO, A., ALCINA, A., SMIRNOV, I. I., CHVOROSTINKA, V. N. & MOISEENKO, T. A. 2006. The 1858T PTPN22 gene variant contributes to a genetic risk of type 1 diabetes in a Ukrainian population. *Tissue Antigens*, 67, 430-433.
- FELNER, E. I., HAM, M., WHITE, P. C., KLITZ, W., LAZARO, A. M., STASTNY, P. & DUPONT, B. 2005. Genetic interaction among three genomic regions creates distinct contributions to early-and late-onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes*, 6, 213-220.
- FENDLER, W., KLICH, I., CIEŚLIK-HEINRICH, A., WYKA, K., SZADKOWSKA, A. & MLYNARSKI, W. 2011. Increased risk of type 1 diabetes in Polish children - Association with INS-IGF2 5' VNTR and lack of association with HLA haplotype. *Endokrynologia Polska*, 62, 436-442.
- FICHNA, M., ŻURAWEK, M., JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA, D., FICHNA, P. & NOWAK, J. 2010. PTPN22, PDCD1 and CYP27B1 polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Polish patients. *Int. J. Immunogenet.*, 37, 367-372.
- GARCZARCZYK, D. 2002. Wybrane metody rozdzielania, charakterystyki i detekcji kwasów nukleinowych. In: RYBCZYŃSKA, M. (ed.) *Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej*. Poznań: Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
- GAUDERMAN, W. J. 2002. Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am. J. Epidemiol.*, 155, 478-484.
- GOLDBLOOM, R. B., DOBRZAŃSKA, A. & KULIKOWSKA-MATŁOSZ, J. 2012. *Wywiad i badanie w pediatrii / [red.] Richard B. Goldbloom ; [tł. z jęz. ang. Justyna Kulikowska-Matłosz et al.]*, Wrocław : Elsevier Urban & Partner, cop. 2012. Wyd. 1 pol. / red. Anna Dobrzańska.
- GOUGH, S. C. L., WALKER, L. S. K. & SANSOM, D. M. 2005. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *IMMUNOLOGICAL REVIEWS*, 204, 102-115.
- GOŁĄB, J., JAKÓBISIAK, M., LASEK, W. & GACIONG, Z. 2002. *Immunologia / red. nauk. Jakub Gołąb, Marek Jakóbisiak, Witold Lasek ; [aut. Zbigniew Gaciong i in.]*, Warszawa : Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002. Wyd. nowe (4 zm.).
- GRAHAM, J., HAGOPIAN, W. A., KOCKUM, I., LI, L. S., SANJEEVI, C. B., LOWE, R. M., SCHAEFER, J. B., ZARGHAMI, M., DAY, H. L., LANDIN-OLSSON, M., PALMER, J. P., JANER-VILLANUEVA, M., HOOD, L., SUNDKVIST, G., LERNMARK, A., BRESLOW, N., DAHLQUIST, G. & BLOHME, G. 2002. Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *DIABETES*, 51, 1346-1355.
- GREENBAUM, C. J. & HARRISON, L. C. 2003. Guidelines for intervention trials in subjects with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes*, 52, 1059-1065.
- GREGERSEN, P. K. & BEHRENS, T. W. 2006. Genetics of autoimmune diseases — disorders of immune homeostasis. *Nature Reviews Genetics*, 7, 917-928.
- GREGERSEN, P. K., LEE, H. S., BATLIWALLA, F. & BEGOVICH, A. B. 2006. PTPN22: Setting thresholds for autoimmunity. *SEMINARS IN IMMUNOLOGY*, 18, 214-223.
- GUS 1995-2013. Krajowy Rejestr Urzędowy Podziału Terytorialnego Kraju TERYT Główny Urząd Statystyczny.

- HABIB, T., FUNK, A., RIECK, M., BRAHMANDAM, A., DAI, X. Z., PANIGRAHI, A. K., PRAK, E. T. L., MEYER-BAHLBURG, A., SANDA, S., GREENBAUM, C., RAWLINGS, D. J. & BUCKNER, J. H. 2012. Altered B Cell Homeostasis Is Associated with Type 1 Diabetes and Carriers of the PTPN22 Allelic Variant. *Journal of Immunology*, 188, 487-496.
- HANAS, R. 2003. *Cukrzyca typu 1 u dzieci, młodzieży i dorosłych. Jak stać się znawcą swojej cukrzycy*, Bydgoszcz, Dial-Pol Spółka z o.o.
- HANAS, R. & JOHN, G. 2010. 2010 Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin HbA1c measurement. *Pediatric Diabetes*, 209-211.
- HARJUTSALO, V., SJOBERG, L. & TUOMILEHTO, J. 2008. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*, 371, 1777-1782.
- HARRISON, L. C., HONEYMAN, M. C., DEAZPURUA, H. J., SCHMIDL, R. S., COLMAN, P. G., TAIT, B. D. & CRAM, D. S. 1993. INVERSE RELATION BETWEEN HUMORAL AND CELLULAR-IMMUNITY TO GLUTAMIC-ACID DECARBOXYLASE IN SUBJECTS AT RISK OF INSULIN-DEPENDENT DIABETES. *Lancet*, 341, 1365-1369.
- HARUN, F. 2005. Misdagnoses of diabetic ketoacidosis in childhood [abstract]. *Pediatr. Diabetes*, 6, 40.
- HEMMINKI, K., SUNDQUIST, X. L. & SUNDQUIST, K. 2009. Familial association between type 1 diabetes and other autoimmune and related diseases. *Diabetologia*, 52, 1820-1828.
- HERMANN, R., LAINE, A. P., VEIJOLA, R., VAHLBERG, T., SIMELL, S., LAHDE, J., SIMELL, O., KNIP, M. & IILONEN, J. 2005. The effect of HLA class II, insulin and CTLA4 gene regions on the development of humoral beta cell autoimmunity. *DIABETOLOGIA*, 48, 1766-1775.
- HERMANN, R., LIPPONEN, K., KIVINIEMI, M., KAKKO, T., VEIJOLA, R., SIMELL, O., KNIP, M. & IILONEN, J. 2006. Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes. *Diabetologia*, 49, 1198-1208.
- HOWSON, J. M. M., COOPER, J. D., SMYTH, D. J., WALKER, N. M., STEVENS, H., TODD, J. A., SHE, J. X., EISENBARTH, G. S., REWERS, M., AKOLKAR, B., CONCANNON, P., RICH, S. S., ERLICH, H. A., JULIER, C., MORAHAN, G., NERUP, J., NIERRAS, C. & POCIOT, F. 2012. Evidence of gene-gene interaction and age-at-diagnosis effects in type 1 diabetes. *Diabetes*, 61, 3012-3017.
- HOWSON, J. M. M., DUNGER, D. B., NUTLAND, S., STEVENS, H., WICKER, L. S. & TODD, J. A. 2007. A type 1 diabetes subgroup with a female bias is characterised by failure in tolerance to thyroid peroxidase at an early age and a strong association with the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene. *DIABETOLOGIA*, 50, 741-746.
- IDF/ISPAD 2011. Global IDF/ISPAD guideline for diabetes in childhood and adolescence. Bruksela: International Diabetes Federation.
- INGEGNOSI, C., CARUSO-NICOLETTI, M., D'AMATO, E., D'ANNUNZIO, G. & LORINI, R. 2008. Hyperglycemia in celiac disease: not always pretype 1 diabetes? *Pediatric Diabetes*, 9, 335-337.
- JACOBSON, D. L., GANGE, S. J., ROSE, N. R. & GRAHAM, N. M. H. 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY*, 84, 223-243.
- JAROSZ-CHOBOT, P. & OTTO-BUCZKOWSKA, E. 2010. Epidemiologia cukrzycy typu 1. *Standardy Medyczne*, 7, 392-398.
- JIN, P., HUANG, G., LIN, J., YANG, L., XIANG, B., ZHOU, W. & ZHOU, Z. 2011. High titre of antiglutamic acid decarboxylase autoantibody is a strong predictor of the development of thyroid autoimmunity in patients with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Clinical Endocrinology*, 74, 587-592.
- KAHLES, H., RAMOS-LOPEZ, E., LANGE, B., ZWERMANN, O., REINCKE, M. & BADENHOOP, K. 2005. Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. *EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY*, 153, 895-899.
- KAVVOURA, F. K. & IOANNIDIS, J. P. A. 2005. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: A HuGE review and meta-analysis. *AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY*, 162, 3-16.
- KING, B. R., HOWARD, N. J., VERGE, C. F., JACK, M. M., GOVIND, N., JAMESON, K., MIDDLEHURST, A., JACKSON, L., MORRISON, M. & BANDARA, D. M. W. S. 2012. A diabetes awareness campaign

- prevents diabetic ketoacidosis in children at their initial presentation with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*, 13, 647-651.
- KITABCHI, A. E., STENTZ, F. B. & UMPIERREZ, G. E. 2004. Diabetic ketoacidosis induces in vivo activation of human T-lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 404-407.
- KLEIN, K. O., BARON, J., COLLI, M. J., MCDONNELL, D. P. & CUTLER, G. B., JR. 1994. Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *The Journal of clinical investigation*, 94, 2475-80.
- KORDONOURI, O., CHARPENTIER, N. & HARTMANN, R. 2011. GADA positivity at onset of type 1 diabetes is a risk factor for the development of autoimmune thyroiditis. *Pediatric Diabetes*, 12, 31-33.
- KRAWCZUK-RYBAK, M., GRYGORCZUK, S. & URBAN, M. 1999. The prevalence of autoimmunological diseases in families of children with type I diabetes. *Endokrynol Diabetol Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojow*, 5, 21-27.
- KRETOWSKI, A. & KINALSKA, I. 1999. [DQA1 and DQB1 HLA genes as markers of insulin-dependent diabetes mellitus in the Polish population]. *Pol Arch Med Wewn*, 101, 205-11.
- KRISTIANSEN, O. P., LARSEN, Z. M. & POCIOT, F. 2000. CTLA-4 in autoimmune diseases - a general susceptibility gene to autoimmunity? *GENES AND IMMUNITY*, 1, 170-184.
- KROKOWSKI, M. 1998. *Cukrzyca typu 1 : analiza genetycznej predyspozycji do zachorowania oraz jej związku z humoralną reakcją immunologiczną przeciwko wyspom Langerhansa / Marcin Krokowski*, Łódź : Akademia Medyczna, 1998.
- KROKOWSKI, M., BODALSKI, J., BRATEK, A., MACHEJKO, P. & CAILLAT-ZUCMAN, S. 1998. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to IDDM in a population from Central Poland. *Diab. Metab.*, 24, 241-243.
- KRĘTOWSKI, A. 2007. Etiopatogeneza cukrzycy typu 1. In: SIERADZKI, J. (ed.) *Cukrzyca. T. 1 / pod red. Jacka Sieradzkiego*. Gdańsk : Via Medica, 2007.
- KUCHARSKA, A. M., ROGOZIŃSKA, I., PYRŻAK, B., MISZKURKA, G. & WIŚNIEWSKA, A. 2009. Polimorfizm A/G w pozycji 49 eksonu 1 genu CTLA-4 u dzieci z cukrzycą typu 1 - doniesienie wstępne. *Endokrynol. Pediatr.*, 8, 27-32.
- KUŁAGA, Z., LITWIN, M., TKACZYK, M., PALCZEWSKA, I., ZAJĄCZKOWSKA, M., ZWOLIŃSKA, D., KRYNICKI, T., WASILEWSKA, A., MOCZULSKA, A., MORAWIEC-KNYSAK, A., BARWICKA, K., GRAJDA, A., GURZKOWSKA, B., NAPIERALSKA, E. & PAN, H. 2011. Polish 2010 growth references for school-aged children and adolescents. *European Journal Of Pediatrics*, 170, 599-609.
- LAMBERT, A. P., GILLESPIE, K. M., THOMSON, G., CORDELL, H. J., TODD, J. A., GALE, E. A. M. & BINGLEY, P. J. 2004. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: A population-based study in the United Kingdom. *JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM*, 89, 4037-4043.
- LIGERS, A., TELESHOVA, N., MASTERMAN, T., HUANG, W. X. & HILLERT, J. 2001. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *GENES AND IMMUNITY*, 2, 145-152.
- LINDLEY, S., DAYAN, C. M., BISHOP, A., ROEP, B. O., PEAKMAN, M. & TREE, T. I. M. 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *DIABETES*, 54, 92-99.
- LOCKSHIN, M. D. 2006. Sex differences in autoimmune disease. *lupus*, 15, 753-756.
- LOHMUELLER, K. E., PEARCE, C. L., PIKE, M., LANDER, E. S. & HIRSCHHORN, J. N. 2003. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nature Genetics*, 33, 177-182.
- MAINE, C. J., HAMILTON-WILLIAMS, E. E., CHEUNG, J., STANFORD, S. M., BOTTINI, N., WICKER, L. S. & SHERMAN, L. A. 2012. PTPN22 Alters the Development of Regulatory T Cells in the Thymus. *Journal of Immunology*, 188, 5267-5275.
- MALLARE, J. T., CORDICE, C. C., RYAN, B. A., CAREY, D. E., KREITZER, P. M. & FRANK, G. R. 2003. Identifying risk factors for the development of diabetic ketoacidosis in new onset type 1 diabetes mellitus. *Clin. Pediatr. (Phila)*, 42, 591-597.
- MAREK-TRZONKOWSKA, N., MYSLIWIEC, M., DOBYSZUK, A., GRABOWSKA, M., TECHMANSKA, I., JUSCINSKA, J., WUJTEWICZ, M. A., WITKOWSKI, P., MLYNARSKI, W., BALCERSKA, A., MYSLINWSKA, J. & TRZONKOWSKI, P. 2012. Administration of CD4(+)CD25(high)CD127(-)

- Regulatory T Cells Preserves beta-Cell Function in Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes Care*, 35, 1817-1820.
- MARRON, M. P., LUO, D. F., MACLAREN, N. K., SHE, J. X., RAFFEL, L. J., GOLDSTEIN, D. R., ROTTER, J. I., GARCHON, H. J., BEAURAIN, G., BACH, J. F., JACOB, C. O., TAO, Y. W., ZEIDLER, A., MODILEVSKY, T., SERRANO-RIOS, M., MARTINEZ LARRAD, M. T., TENG, W. P., PARK, Y., ZHANG, Z. X., HUANG, H. S. & YANG, M. C. K. 1997. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Human Molecular Genetics*, 6, 1275-1282.
- MARSON, A., KRETSCHMER, K., FRAMPTON, G. M., JACOBSEN, E. S., POLANSKY, J. K., MACISAAC, K. D., LEVINE, S. S., FRAENKEL, E., VON BOEHMER, H. & YOUNG, R. A. 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*, 445, 931-935.
- MARTIN, S., PAWLOWSKI, B., GREULICH, B., ZIEGLER, A. G., MANDRUPOULSEN, T. & MAHON, J. 1992. NATURAL COURSE OF REMISSION IN IDDM DURING 1ST YR AFTER DIAGNOSIS. *Diabetes Care*, 15, 66-74.
- MCDONNELL, C. M., PEDREIRA, C. C., VADAMALAYAN, B., CAMERON, F. J. & WERTHER, G. A. 2005. Diabetic ketoacidosis, hyperosmolarity and hyponatremia: are high-carbohydrate drinks worsening initial presentation? *Pediatric Diabetes*, 6, 90-94.
- MCGILLIVRAY, B. 2002. Problemy etyczne genetyki medycznej. In: FRIEDMAN, J. M., DILL, F. J., HAYDEN, M. R. & MCGILLIVRAY, B. C. (eds.) *Genetyka*. Wrocław: Urban&Partner.
- MCISSAAC, R., LEE, L., KJ, M., TSALAMANDRIS, C. & JERUMS, G. 2002. Influence of age on the presentation and outcome of acidotic and hyperosmolar diabetic emergencies. *Internal Medicine Journal*, 32, 379-385.
- MENARD, L., SAADOUN, D., ISNARDI, I., NG, Y. S., MEYERS, G., MASSAD, C., PRICE, C., ABRAHAM, C., MOTAGHEDI, R., BUCKNER, J. H., GREGERSEN, P. K. & MEFFRE, E. 2011. The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 3635-3644.
- MILLER, F. W., ALFREDSSON, L., COSTENBADER, K. H., KAMEN, D. L., NELSON, L. M., NORRIS, J. M. & DE ROOS, A. J. 2012. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *JOURNAL OF AUTOIMMUNITY*, 39, 259-271.
- MYŚLIWIEC, M., BALCERSKA, A., JDRZEJCZYK, A., BAUTEMBACH-MINKOWSKA, J., SZTANGIERSKA, B., STPIŃSKI, J., BĄKOWSKA, A., BANACH, P. & WIŚNIEWSKI, P. 2006. Prognostic factors of celiac disease occurrence in type 1 diabetes mellitus children. *Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego*, 12, 281-285.
- MŁYNARSKI, W. 2004. *Uwarunkowanie genetyczne przebiegu klinicznego cukrzycy typu 1 / Wojciech Młynarski*, Łódź : Uniwersytet Medyczny, 2004.
- MŁYNARSKI, W., ZMYŚŁOWSKA, A., KUBRYN, I., PERENC, M. & BODALSKI, J. 2003. [Factors involved in ketoacidosis at the onset of type 1 diabetes in childhood]. *Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego: Organ Polskiego Towarzystwa Endokrynologów Dziecięcych*, 9, 23-28.
- NAKANISHI, K. & INOKO, H. 2006. Combination of HLA-A24, -DQA1*03, and -DR9 contributes to acute-onset and early complete beta-cell destruction in type 1 diabetes: longitudinal study of residual beta-cell function. *Diabetes*, 55, 1862-8.
- NEEDLMAN, R. D. 2000. Growth and Development. In: BEHRMAN, R. E., KLIEGMAN, R. M. & JENSON, H. B. (eds.) *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- NELIS, M., ESKO, T., MÄGI, R., REMM, M., METSPALU, A., ZIMPRICH, F., TONCHEVA, D., KARACHANAK, S., PISKÁČKOVÁ, T., MACEK, M., BALAŠČÁK, I., PELTONEN, L., JAKKULA, E., REHNSTRÖM, K., LATHROP, M., HEATH, S., GALAN, P., SCHREIBER, S., KRAWCZAK, M., MEITINGER, T., PFEUFER, A., WICHMANN, H. E., MELEGH, B., POLGÁR, N., TONIOLO, D., GASPARINI, P., D'ADAMO, P., KLOVINS, J., NIKITINA-ZAKE, L., KUČINSKAS, V., KASNAUSKIENE, J., LUBINSKI, J., DEBNIAK, T., LIMBORSKA, S., KHRUNIN, A., ESTIVILL, X., RABIONET, R., MARSAL, S., JULIÁ, A., ANTONARAKIS, S. E., DEUTSCH, S., BOREL, C., ATTAR, H. & GAGNEBIN, M. 2009. Genetic structure of europeans: A view from the north-east. *PLoS ONE*, 4.
- NEWMAN, W. G., ZHANG, Q., LIU, X., WALKER, E., TERNAN, H., OWEN, J., JOHNSON, B., GREER, W., MOSHER, D. P., MAKSYMOWYCH, W. P., BYKERK, V. P., KEYSTONE, E. C., AMOS, C. I. &

- SIMINOVITCH, K. A. 2006. Rheumatoid arthritis association with the FCRL3-169C polymorphism is restricted to PTPN22 1858T-homozygous individuals in a Canadian population. *Arthritis and Rheumatism*, 54, 3820-3827.
- NIELSEN, C., BARINGTON, T., HUSBY, S. & LILLEVANG, S. T. 2007a. Expression of human PTPN22 alleles. *Genes & Immunity*, 8, 131-137.
- NIELSEN, C., LILLEVANG, S. T., HANSEN, D. & HUSBY, S. 2007b. Sex-specific association of the human PTPN22 1858T-allele with type 1 diabetes. *International Journal of Immunogenetics*, 34, 469-473.
- NIELSEN, L. B., MORTENSEN, H. B., CHIARELLI, F., HOLL, R., SWIFT, P., DE BEAUFORT, C., POCIOT, F., HOUGAARD, P., GAMMELTOFT, S., KNIP, M. & HANSEN, L. 2006. Impact of IDDM2 on disease pathogenesis and progression in children with newly diagnosed type 1 diabetes: Reduced insulin antibody titres and preserved beta cell function. *Diabetologia*, 49, 71-74.
- NIELSEN, L. B., PORKSEN, S., ANDERSEN, M. L. M., FREDHEIM, S., SVENSSON, J., HOUGAARD, P., VANELLI, M., AMAN, J., MORTENSEN, H. B., HANSEN, L. & HVIDOERE STUDY GRP, C. 2011. The PTPN22 C1858T gene variant is associated with proinsulin in new-onset type 1 diabetes. *Bmc Medical Genetics*, 12.
- OLAK-BIAŁOŃ, B., DEJA, G., JAROSZ-CHOBOT, P. & OTTO-BUCZKOWSKA, E. 2007. Ocena występowania i analiza wybranych czynników ryzyka kwasicy ketonowej w momencie ujawnienia się cukrzycy typu 1. *Endokryinol. Diabetol. Chor. Przemiany Wieków Rozw.*, 13, 85-90.
- OUNISSI-BENKALHA, H. & POLYCHRONAKOS, C. 2008. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends In Molecular Medicine*, 14, 268-275.
- PALCZEWSKA, I. & NIEDŹWIECKA, Z. 2001. *Wskaźniki rozwoju somatycznego dzieci i młodzieży warszawskiej / Iwona Palczewska, Zofia Niedźwiecka*, Warszawa : Instytut Matki i Dziecka, 2001.
- PALMER, J. P., FLEMING, G. A., GREENBAUM, C. J., HEROLD, K. C., JANSÁ, L. D., KOLB, H., LACHIN, J. M., POLONSKY, K. S., POZZILLI, P., SKYLER, J. S. & STEFFES, M. W. 2004. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop (vol 53, pg 250, 2004). *DIABETES*, 53, 1934-1934.
- PARIS, F., BALAGUER, P., SULTAN, C., SERVANT, N., NICOLAS, J. C. & TÉROUANNE, B. 2002. A new recombinant cell bioassay for ultrasensitive determination of serum estrogenic bioactivity in children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87, 791-797.
- PATTERSON, C. C., GYÜRÜS, E., ROSENBAUER, J., CINEK, O., NEU, A., SCHÖBER, E., PARSLÖW, R. C., JONER, G., SVENSSON, J., CASTELL, C., BINGLEY, P. J., SCHOENLE, E., JAROSZ-CHOBOT, P., URBONAITÉ, B., ROTHE, U., KRZISNIK, C., IONESCU-TIRGOVISTE, C., WEETS, I., KOCOVA, M., STIPANCIC, G., SAMARDZIC, M., DE BEAUFORT, C. E., GREEN, A., DAHLQUIST, G. G. & SOLTÉSZ, G. 2012. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*, 55, 2142-2147.
- PAWŁOWICZ, M., BIRKHOLZ, D. & NIEDŹWIECKI, M. 2007. Częstość występowania cukrzycy typu 1 wśród dzieci w województwie pomorskim - czy nadciąga wielka fala? *Endokryinol. Pol.*, 6, 70.
- PAWŁOWICZ, M., BIRKHOLZ, D., NIEDŹWIECKI, M. & BALCERSKA, A. 2009. Difficulties or mistakes in diagnosing type 1 diabetes in children?--demographic factors influencing delayed diagnosis. *Pediatric Diabetes*, 10, 542-549.
- PAWŁOWICZ, M., BIRKHOLZ, D., NIEDŹWIECKI, M. & BALCERSKA, A. 2008. Difficulties or mistakes in diagnosing type 1 diabetes mellitus in children? The consequences of delayed diagnosis. *Endokryinol. Diabetol. Chor. Przemiany Wieków Rozw.*, 14, 7-12.
- PENG, H. & HAGOPIAN, W. 2006. Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *REVIEWS IN ENDOCRINE & METABOLIC DISORDERS*, 7, 149-162.
- PETRONE, A., SPOLETINI, M., ZAMPETTI, S., CAPIZZI, M., ZAVARELLA, A., OSBORN, J., POZZILLI, P., BUZZETTI, R. & GRP, I. 2008. The PTPN22 1858T gene variant in type 1 diabetes is associated with reduced residual beta-cell function and worse metabolic control. *Diabetes Care*, 31, 1214-1218.
- PIATKOWSKA, E. & SZALECKI, M. 2011. Autoimmune thyroiditis in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism*, 17, 173-7.
- PIEKUTOWSKA-ABRAMCZUK, D., POPOWSKA, E., JURKIEWICZ, D., CIARA, E., KRAJEWSKA-WALASEK, M., OLSEN, R. K. J., GREGERSEN, N., WIERZBA, J., OŁTARZEWSKI, M., GRADOWSKA, W., SYKUT-CEGIELSKA, J., PRONICKA, E. & ANDRESEN, B. S. 2010. A comprehensive HADHA c.1528G>C

- frequency study reveals high prevalence of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in Poland. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1-5.
- PLAGNOL, V., HOWSON, J. M. M., SMYTH, D. J., WALKER, N., HAFNER, J. P., WALLACE, C., STEVENS, H., JACKSON, L., SIMMONDS, M. J., BINGLEY, P. J., GOUGH, S. C. & TODD, J. A. 2011. Genome-Wide Association Analysis of Autoantibody Positivity in Type 1 Diabetes Cases. *PLOS GENETICS*, 7.
- POLANCZYK, M. J., HOPKE, C., VANDENBARK, A. A. & OFFNER, H. 2007. Treg suppressive activity involves estrogen-dependent expression of programmed death-1 (PD-1). *International Immunology*, 19, 337-343.
- PTD 2012. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2012. *Diabetologia Kliniczna*, 1, A5-A6, A38-A41.
- R FOUNDATION, T. R. P. 2013. *The R Project for Statistical Computing* [Online]. Available: <http://www.r-project.org/>.
- RIoux, J. D., GOYETTE, P., VYSE, T. J., HAMMARSTRÖM, L., FERNANDO, M. M. A., GREEN, T., DE JAGER, P. L., FOISY, S., WANG, J., DE BAKKER, P. I. W., LESLIE, S., MCVEAN, G., PADYUKOV, L., ALFREDSSON, L., ANNESE, V., HAFNER, D. A., PAN-HAMMARSTRÄM, Q., MATELL, R., SAWCER, S. J. & COMPSTON, A. D. 2009. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18680-18685.
- ROMER, T. E. 2006. Zaburzenia wzrastania. Postępowanie diagnostyczne w niedoborze wzrostu. In: DOBRZAŃSKA, A. & RYŻKO, J. (eds.) *Pediatrics. Podręcznik do Państwowego Egzaminu Lekarskiego i egzaminu specjalizacyjnego*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner.
- RONNINGER, M., GUO, Y. J., SHCHETYNSKY, K., HILL, A., KHADEMI, M., OLSSON, T., REDDY, P. S., SEDDIGHZADEH, M., CLARK, J. D., LIN, L. L., O'TOOLE, M. & PADYUKOV, L. 2012. The balance of expression of PTPN22 splice forms is significantly different in rheumatoid arthritis patients compared with controls. *Genome Medicine*, 4.
- SANSOM, D. M. & WALKER, L. S. K. 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunological Reviews*, 212, 131-148.
- SCHMIDT, A., OBERLE, N., WEISS, E. M., VOBIS, D., FRISCHBUTTER, S., BAUMGRASS, R., FALK, C. S., HAAG, M., BRUGGER, B., LIN, H. Y., MAYR, G. W., REICHARDT, P., GUNZER, M., SURI-PAYER, E. & KRAMMER, P. H. 2011. Human Regulatory T Cells Rapidly Suppress T Cell Receptor-Induced Ca²⁺, NF-kappa B, and NFAT Signaling in Conventional T Cells. *Science Signaling*, 4.
- SKÓRKA, A., BEDNARCZUK, T., BAR-ANDZIAK, E., NAUMAN, J. & PŁOSKI, R. 2005. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dose dependent correlation with age of onset. *Clin. Endocrinol.*, 62, 679-682.
- SMYTH, D. J., COOPER, J. D., HOWSON, J. M. M., WALKER, N. M., PLAGNOL, V., STEVENS, H., CLAYTON, D. G. & TODD, J. A. 2008. PTPN22 Trp620 explains the association of chromosome 1p13 with type 1 diabetes and shows a statistical interaction with HLA class II genotypes. *Diabetes*, 57, 1730-1737.
- SPOLETINI, M., ZAMPETTI, S., CAMPAGNA, G., MARANDOLA, L., CAPIZZI, M. & BUZZETTI, R. 2013. Temporal trends of HLA, CTLA-4 and PTPN22 genotype frequencies among type 1 diabetes in continental Italy. *PLoS ONE*, 8, e61331.
- STEFFES, M. W., SIBLEY, S., JACKSON, M. & THOMAS, W. 2003. beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*, 26, 832-836.
- STENTZ, F. B. & KITABCHI, A. E. 2005. Hyperglycemia-induced activation of human T-lymphocytes with de novo emergence of insulin receptors and generation of reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335, 491-495.
- SZADKOWSKA, A., PIETRZAK, I., BODALSKA-LIPIŃSKA, J., CZERNIAWSKA, E., MIANOWSKA, B. & BODALSKI, J. 2006. Wskaźnik masy ciała (BMI) a zapadalność na cukrzycę typu 1 u dzieci w regionie łódzkim. *Przegl. Pediatr.*, 36, 187-192.
- SZYPOWSKA, A., RAMOTOWSKA, A., LIPKA, M., PROCNER-CZAPLIŃSKA, M. & TRIPPENBACH-DULSKA, H. 2010. The prevalence of autoimmune thyroid disease and celiac disease in children and adolescents with newly recognized type 1 diabetes mellitus - individual results. *Przegląd Pediatryczny*, 40, 142-145.

- SZYPOWSKA, A. & SKÓRKA, A. 2011. The risk factors of ketoacidosis in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatr. Diabetes*, 12, 302-306.
- TANG, S.-T., TANG, H.-Q., ZHANG, Q., WANG, C.-J., WANG, Y.-M. & PENG, W.-J. 2012. Association of cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Gene*, 508, 165-187.
- TODD, J. A. 2010. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*, 32, 457-467.
- TODD, J. A., WALKER, N. M., COOPER, J. D., SMYTH, D. J., DOWNES, K., PLAGNOL, V., BAILEY, R., NEJENTSEV, S., FIELD, S. F., PAYNE, F., LOWE, C. E., SZESZKO, J. S., HAFNER, J. P., ZEITELS, L., YANG, J. H. M., VELLA, A., NUTLAND, S., STEVENS, H. E., SCHUILENBURG, H., COLEMAN, G., MAISURIA, M., MEADOWS, W., SMINK, L. J., HEALY, B., BURREN, O. S., LAM, A. A. C., OVINGTON, N. R., ALLEN, J., ADLEM, E., LEUNG, H. T., HOWSON, J. M. M., WICKER, L. S., CLAYTON, D. G., WALLACE, C., GUJA, C., IONESCU-TÎRGOVIȘTE, C., SIMMONDS, M. J., HEWARD, J. M., GOUGH, S. C. L. & DUNGER, D. B. 2007. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 39, 857-864.
- UEDA, H., HOWSON, J. M. M., ESPOSITO, L., HEWARD, J., SNOOK, H., CHAMBERLAIN, G., RAINBOW, D. B., HUNTER, K. M. D., SMITH, A. N., DI GENOVA, G., HERR, M. H., DAHLMAN, I., PAYNE, F., SMYTH, D., LOWE, C., TWELLS, R. C. J., HOWLETT, S., HEALY, B. & NUTLAND, S. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423, 506.
- USHER-SMITH, J. A., THOMPSON, M., ERCOLE, A. & WALTER, F. M. 2012. Variation between countries in the frequency of diabetic ketoacidosis at first presentation of type 1 diabetes in children: a systematic review. *Diabetologia*, 55, 2878-2894.
- USHER-SMITH, J. A., WALTER, F. M., THOMPSON, M. J. & SHARP, S. J. 2011. Factors associated with the presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes in children and young adults: A systematic review. *BMJ*, 343.
- VAIDYA, B. & PEARCE, S. 2004. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY*, 150, 619-626.
- VANDERAUWERA, B. J., VANDEWALLE, C. L., SCHUIT, F. C., WINNOCK, F., DELEEUW, I. H., VANIMSCHOOT, S., LAMBERIGTS, G., GORUS, F. K., BALASSE, E., BECQ, H., BEIRINCKX, J., CLAEYS, L., COECKELBERGHS, M., COOLENS, J. L., COUCKE, W., COUTURIER, E., CRAEN, R., DAUBRESSE, J. C., DESCHEPPER, J., DELVIGNE, C., DORCHY, H., DUCAJU, M., FERY, F., GAHAM, M., GERARD, J., GILLET, C., GUIOT, J., HERBAUT, C., KEYMEULEN, B., KRZENTOWSKI, G., LETIEXHE, M., MONBALLYU, J., MOORKENS, G., NICOLAÏ, D., NOBELS, F., PELCKMANS, M. C., PURNODE, A., ROOMAN, R., ROTTIERS, R., SCHEEN, A., SCHUTYSER, J., SODOYEZ, J. C., SOMERS, G., TERRIERE, L., TEUWEN, J., TITS, J., VANACKER, K., VANCROMBRUGGE, P., VANGAAL, L., VANDENBUSSCHE, E., VANNESTE, S., VERCAMMEN, C. & VERTOMMEN, J. 1997. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) independently from age and from other genetic or immune disease markers. *Clinical and Experimental Immunology*, 110, 98-103.
- VANELLI, M., CHIARI, G., GHIZZONI, L., COSTI, C., GIACALONE, T. & CHIARELLI, F. 1999. Effectiveness of prevention program for diabetic ketoacidosis in children. *Diabetes Care*, 22, 7-9.
- VANELLI, M., CHIARI, G., LACAVALA, S. & IOVANE, B. 2007. Campaign for diabetic ketoacidosis prevention still effective 8 years later. *Diabetes Care*, 30, e12.
- VANG, T., MILETIC, A. V., MUSTELIN, T. & BOTTINI, N. 2007. Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. *Autoimmunity*, 40, 453-461.
- VANG, T., MUSUMECI, L., NIKA, K., TAUTZ, L., MUSTELIN, T., BOTTINI, N., CONGIA, M., MACIS, M. D., ORRÚ, V., ZAVATTARI, P., CUCCA, F. & TASKÉN, K. 2005. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature Genetics*, 37, 1317-1319.
- VEHIK, K. & DABELEA, D. 2011. The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof? *DIABETES-METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS*, 27, 3-13.
- VERHAGEN, J., GABRYSOVAA, L., MINAEE, S., SABATOS, C. A., ANDERSON, G., SHARPE, A. H. & WRAITH, D. C. 2009. Enhanced selection of FoxP3(+) T-regulatory cells protects CTLA-4-deficient mice from CNS autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 3306-3311.
- VERHAGEN, J., GENOLET, R., BRITTON, G. J., STEVENSON, B. J., SABATOS-PEYTON, C. A., DYSON, J., LUESCHER, I. F. & WRAITH, D. C. 2013. CTLA-4 controls the thymic development of both

- conventional and regulatory T cells through modulation of the TCR repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E221-E230.
- WALLACH, J. B., FRANEK, E., KOKOT, F., PIETRUCZUK, M. J. & ANDRZEJCZAK, J. 2011. *Interpretacja badań laboratoryjnych / Jacques Wallach ; zespół tł. Justyna Andrzejczak [et al.]*, Warszawa : Medipage, cop. 2011. Wyd. pol. / red. nauk. Edward Franek, Franciszek Kokot, Mirosława Pietruczuk.
- WATAŁA, C. 2011. Planowanie eksperymentu naukowego. In: WATAŁA, C., RÓŻAŁSKI, M., BONCLER, M. & KAŻMIERCZAK, P. (eds.) *Badania i publikacje w naukach biomedycznych. Tom 1. Planowanie i prowadzenie badań*. Łódź: Alfa-medica press.
- WGO. 2012. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines - Celiac disease. Available: http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012_Celiac%20Disease_long_FINAL.pdf [Accessed April].
- WHO 1999. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Report of a WHO Consultation*. Geneva: World Health Organization.
- WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R. & KING, H. 2004. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053.
- WITAS, H. W., JĘDRYCHOWSKA-DAŃSKA, K. & ZAWICKI, P. 2010. Changes in frequency of IDDM-associated HLA DQB, CTLA-4 and INS alleles. *Int. J. Immunogenet.*, 37, 155-158.
- WOLFSDORF, J., CRAIG, M. E., DANEMAN, D., EDGE, J., WARREN, L., ROSENBLOOM, A., SPERLING, M. & HANAS, R. 2009. Diabetic ketoacidosis in children and adolescents with diabetes. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2009 Compendium. *Pediatric Diabetes*, 10, 118-133.
- WOLFSDORF, J., GLASER, N. & SPERLING, M. A. 2006. Diabetic ketoacidosis in infants, children and adolescents. A consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 29, 1150-1159.
- WOYNAROWSKA, B. 2008. Test przesiewowy do wykrywania zaburzeń w rozwoju fizycznym. In: WOYNAROWSKA, B. (ed.) *Profilaktyka w pediatrii*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- XUAN, C., LUN, L. M., ZHAO, J. X., WANG, H. W., ZHU, B. Z., HE, G. W., YU, S. & LIU, Z. 2013. PTPN22 Gene Polymorphism (C1858T) Is Associated with Susceptibility to Type 1 Diabetes: A Meta-Analysis of 19,495 Cases and 25,341 Controls. *Annals of Human Genetics*, 77, 191-203.
- ZEMBALA, M. & GÓRSKI, A. 2001. *Zarys immunologii klinicznej*, Warszawa, wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- ZENEWICZ, L. A., FLAVELL, R. A., ABRAHAM, C. & CHO, J. H. 2010. Unraveling the Genetics of Autoimmunity. *Cell*, 140, 791-797.
- ZHENG, P. L. & KISSLER, S. 2013. PTPN22 Silencing in the NOD Model Indicates the Type 1 Diabetes-Associated Allele Is Not a Loss-of-Function Variant. *Diabetes*, 62, 896-904.

Aneksy

Aneks 1 Arkusz badania ankietowego oceniającego poziom edukacji pacjenta (chorzy >14 roku życia)/opiekunów chorego na temat T1DM *)

OCENA STOPNIA EDUKACJI NA TEMAT CHOROBY U PACJENTÓW (OPIEKUNÓW PACJENTA) ZE ŚWIEŻO ROZPOZNANĄ CUKRZYCĄ TYPU 1

(ankieta przeznaczona dla rodziców dzieci chorych na cukrzycę typu 1 oraz dla pacjentów powyżej 14 r.ż. chorujących na cukrzycę typu 1)

Imię i nazwisko chorego

Data urodzenia chorego

Proszę o udzielenie odpowiedzi na wszystkie poniższe pytania. Możliwe jest udzielenie kilku odpowiedzi na jedno pytanie. Proszę zaznaczyć te odpowiedzi, które uważają Państwo za prawidłowe.

Pytanie 1

Cukrzyca typu 1:

- to choroba przewlekła zwykle ujawniająca się w młodym wieku (do 35. roku życia)
- to choroba wymagająca podawania insuliny
- na początku choroby można zastosować wyłącznie dietę i wysiłek fizyczny
- przyczyną choroby jest uszkodzenie komórek trzustki wytwarzających insulinę, a tym samym całkowity zanik jej produkcji
- przyczyną choroby jest nadwaga i związana z nią oporność tkanek na insulinę

Pytanie 2

Do objawów nie leczonej cukrzycy typu 1 zaliczamy:

- utratę wagi
- częstomocz
- zimne poty
- pragnienie
- suchość ust
- zmęczenie i narastającą senność
- drżenie

Pytanie 3

Faza remisji cukrzycy typu 1 to:

- to podjęcie przez trzustkę ponownie produkcji insuliny, następujące po wyrównaniu zaburzeń towarzyszących okresowi ujawnienia się cukrzycy
- zwykle trwa do 5 lat od momentu rozpoznania choroby
- zwykle trwa do 3-6 miesięcy od momentu rozpoznania choroby
- to okres zwiększonego zapotrzebowania na insulinę
- to okres zmniejszonego zapotrzebowania na insulinę

*) Znakiem „X” w arkuszu badania ankietowego oznaczono prawidłowe odpowiedzi.

Pytanie 4

Do przewlekłych powikłań cukrzycy należą:

- choroby sercowo - naczyniowe
- choroby nerek
- choroby oczu
- choroby nowotworowe
- uszkodzenia nerwów
- stopa cukrzycowa

Pytanie 5

Do chorób często towarzyszących cukrzycy typu 1 należą:

- choroby skóry
- infekcje, zwłaszcza infekcje grzybicze
- choroby tarczycy
- choroby nowotworowe
- celiakia (nietolerancja glutenu)
- choroby płuc

Pytanie 6

Dieta a cukrzyca:

- należy spożywać 4 – 6 małych posiłków i przekąsek dziennie
- nie ma konieczności przestrzegania harmonogramu posiłków
- wymiennik węglowodanowy (1 WW) określa taką ilość produktu spożywczego, która zawiera 20 g węglowodanów
- wymiennik węglowodanowy (1 WW) określa taką ilość produktu spożywczego, która zawiera 10 g węglowodanów
- dla osób chorych na cukrzycę bezpieczniejsze jest spożywanie produktów zawierających cukry złożone (wolno wchłaniane węglowodany) np. ziemniaki, warzywa, ryż
- w diecie osób chorych na cukrzycę powinny dominować produkty zawierające cukry proste (szybko wchłaniane węglowodany) np. dżem, słodycze, soki owocowe

Pytanie 7

Wysiłek fizyczny w cukrzycy:

- powinien być planowany po 1-2 godzinach od ostatniej przedposiłkowej dawki insuliny i posiłku
- powoduje zmniejszone zużycie glukozy bez zmian w zapotrzebowaniu na insulinę
- powoduje zwiększone zużycie glukozy bez zwiększania zapotrzebowania na insulinę
- ćwiczenia fizyczne bez wystarczającej ilości insuliny w organizmie powodują wzrost stężenia glukozy we krwi
- powoduje konieczność zwiększenia dawek insuliny przyjmowanych po wysiłku

Pytanie 8

Ćwiczenia fizyczne można podejmować gdy:

- poziom glikemii jest niższy niż 90 – 110 mg/dl
- poziom glikemii jest wyższy niż 90 – 110 mg/dl
- poziom glikemii jest niższy niż 270 – 290 mg/dl
- poziom glikemii jest wyższy niż 270 – 290 mg/dl
- poziom glikemii nie ma znaczenia

Pytanie 9

Insulina:

- jest niezbędnym do życia hormonem wytwarzanym przez wątrobę
- jest niezbędnym do życia hormonem wytwarzanym przez trzustkę
- obniża stężenie glukozy we krwi
- podwyższa stężenie glukozy w moczu
- pobudza wytwarzanie tłuszczu z nadmiaru węglowodanów pochodzących z pożywienia

Pytanie 10

Przy podawaniu insuliny należy pamiętać:

- o wbiciu igły pod odpowiednim kątem, aby uniknąć podania insuliny domięśniowo, co może zaburzyć czas wchłaniania i działania insuliny
- o szybszym działaniu insuliny wstrzykniętej w tkankę podskórną brzucha w porównaniu z iniekcjami w udo, pośladek czy ramię
- o szybszym działaniu insuliny wstrzykniętej w tkankę podskórną ud, pośladków czy ramion w porównaniu z iniekcjami w brzuch
- o natychmiastowym wyciągnięciu igły po podaniu insuliny

Pytanie 11

Insulinę należy przechowywać:

- w lodówce w temperaturze 4-8°C, a aktualnie używany pojemniczek w temperaturze pokojowej
- zawsze w lodówce w temperaturze poniżej 2°C
- w lodówce w temperaturze 4-8°C, a aktualnie używany pojemniczek w temperaturze powyżej 25°C
- w miejscu zacienionym, z dala od światła słonecznego

Pytanie 12

Kwasica ketonowa:

- spowodowana jest niedoborem insuliny, co powoduje utrzymywanie się we krwi wysokich stężeń glukozy oraz produkcję związków ketonowych, które pojawiają się w moczu
- spowodowana jest nadmiarem insuliny, a tym samym utrzymywaniem się we krwi niskich poziomów cukru oraz zahamowaniem produkcji związków ketonowych
- do jej objawów należą: uczucie głodu, błądź, drżenia, zimne poty
- do jej objawów należą: nudności, wymioty, bóle brzucha, ciężki oddech

Pytanie 13

Kwasica ketonowa może rozwinąć się:

- w czasie chorób o ostrym przebiegu, zwłaszcza z towarzyszącą gorączką
- w przypadku podania za dużej dawki insuliny
- w przypadku pominięcia dawek insuliny
- w okresie gwałtownego wzrostu, w okresie dojrzewania
- w przypadku pominięcia należnego posiłku

Pytanie 14

Obecność związków ketonowych za pomocą testów paskowych należy zbadać:

- podczas ostrego stanu chorobowego np. przeziębienie z gorączką
- gdy stężenie glukozy we krwi jest wyższe niż 230 – 250 mg/dl przez kilka godzin
- gdy stężenie glukozy we krwi w pojedynczym pomiarze jest wyższe niż 230 – 250 mg/dl
- gdy stężenie glukozy we krwi w pojedynczym pomiarze jest niższe niż 300 mg/dl
- gdy występują takie objawy jak: nudności, wymioty, bóle brzucha

Pytanie 15

Przy wysokim stężeniu glukozy we krwi i rosnącej ilości związków ketonowych w moczu należy:

- podać dodatkową dawkę insuliny
- zmniejszyć kolejną dawkę insuliny
- ograniczyć spożycie płynów
- pić więcej płynów
- skontaktować się ze szpitalem
- przy wymiotach podać leki przeciwwymiotne

Pytanie 16

Choroba a zapotrzebowanie na insulinę:

- gorączka zmniejsza zapotrzebowanie na insulinę
- gorączka zwiększa zapotrzebowanie na insulinę
- gorszy apetyt i mniejsza ilość spożywanego pokarmu w czasie infekcji obniża zapotrzebowanie na insulinę
- niezżyt żołądkowo-jelitowy z wymiotami i biegunką zwiększa zapotrzebowanie na insulinę
- niezżyt żołądkowo-jelitowy z wymiotami i biegunką zmniejsza zapotrzebowanie na insulinę

Pytanie 17

Czynniki powodujące hipoglikemię to:

- za niska dawka insuliny
- zbyt wysoka dawka insuliny
- pominięcie należnego posiłku
- spożycie mniejszej ilości wymienników
- spożycie większej ilości wymienników
- za mała aktywność fizyczna
- intensywny wysiłek fizyczny
- spożycie alkoholu

Pytanie 18

Do objawów hipoglikemii należą:

- uczucie zimna
- uczucie ciepła
- pocenie się
- bladość
- drżenie
- wysypka
- cierpięcie ust, palców, języka
- uczucie głodu
- niepokój, pobudzenie
- zmęczenie
- kołatanie serca
- zwiększone pragnienie

Pytanie 19

Szybkie przeciwdziałanie hipoglikemii polega na spożyciu:

- czekoladowego batonika
- ciastka
- soku
- lodów
- tabletki glukozy (kostki cukru)

Pytanie 20

Glukagon stosujemy:

- zawsze w przypadku hipoglikemii
- w przypadku ciężkiej hipoglikemii (drgawki, utrata przytomności)
- w przypadku hipoglikemii, gdy chory nie jest w stanie przyjąć pokarmów lub napojów wyłącznie domięśniowo
- domięśniowo lub podskórnie
- jeśli stan chorego po zastrzyku nie poprawi się w ciągu 10 – 15 minut, należy podać kolejny zastrzyk glukagonu
- jeśli stan chorego po zastrzyku nie poprawi się w ciągu 10 – 15 minut, należy wezwać pogotowie

Pytanie 21

Do objawów hipoglikemii nocnej zaliczamy:

- uczucie gorąca
- koszmarne sny
- pocenie się (mokre prześcieradło)
- częste oddawanie moczu w nocy
- poranny ból głowy
- poranne zmęczenie

Pytanie 22

Nocna hipoglikemia występuje gdy:

- dawka insuliny krótkodziałającej przed wieczornym posiłkiem była za wysoka (hipoglikemia we wczesnych godzinach nocnych)
- dawka insuliny podana przed snem była za wysoka (hipoglikemia około 2:00 w nocy)
- posiłek wieczorny był zbyt mały
- posiłek wieczorny zawierał głównie szybko wchłaniające się składniki
- posiłek wieczorny zawierał głównie wolno wchłaniające się składniki
- po południu lub wieczorem nie było żadnego intensywniejszego wysiłku fizycznego
- po południu lub wieczorem miał miejsce intensywny wysiłek fizyczny i nie zmniejszono wieczornej dawki insuliny

Pytanie 23

Kontrola poziomów glikemii:

- idealny poziom glikemii przed posiłkiem powinien wynosić 70 – 110 mg/dl, a 1,5 godziny po posiłku 90 – 140 mg
- do zaakceptowania jest poziom glikemii przed posiłkiem w granicach 150 – 200 mg/dl, a 1,5 godziny po posiłku 200 – 300 mg/dl
- do zaakceptowania jest poziom glikemii przed posiłkiem w granicach 110 – 145 mg/dl, a 1,5 godziny po posiłku 145 – 180 mg/dl
- poziom hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) odzwierciedla średni poziom glukozy we krwi w okresie ostatnich 2 – 3 tygodni
- poziom hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) odzwierciedla średni poziom glukozy we krwi w okresie ostatnich 2 – 3 miesięcy
- poziom hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) odzwierciedla średni poziom glukozy we krwi w okresie ostatnich 6 miesięcy

Pytanie 24

Pielęgnacja stóp u chorego na cukrzycę polega na:

- unikaniu chodzenia boso
- oglądaniu stóp raz lub dwa razy dziennie
- codziennym myciu wodą z mydłem i dokładnym wycieraniu
- obcinaniu paznokci prosto i niezbyt krótko
- noszeniu wygodnego obuwia oraz przewiewnych skarpet/rajstop wykonanych z włókien naturalnych
- smarowaniu maścią natłuszczającą jakichkolwiek zmian na stopach (pęcherz, modzel, wrastający paznokieć, infekcja)
- zgłoszeniu pojawienia się jakichkolwiek zmian na stopach (pęcherz, modzel, wrastający paznokieć, infekcja) lekarzowi
- szczególnej pielęgnacji nie jest wymagana

Aneks 2 Skala Tannera rozwoju płciowego u dziewcząt i chłopców (Goldbloom et al., 2012)

Rozwój piersi u dziewcząt (*Thelarche*)

<i>Stadium zaawansowania rozwoju piersi</i>	<i>Opis</i>
I	nieznaczne uwypuklenie tylko brodawek sutkowych
II	stadium pączka; niewielkie uwypuklenie piersi i brodawki; powiększenie otoczki brodawek sutkowych
III	dalsze powiększanie się brodawek sutkowych i otoczki, bez oddzielenia ich konturów
IV	otoczki oraz brodawki sutkowe tworzą dodatkowe uwypuklenie (tzw. wzniesienie wtórne) powyżej poziomu piersi
V	stadium dojrzałe; brodawki sutkowe cofają się, dopasowując się do kształtu piersi

Rozwój owłosienia łonowego u dziewcząt (*Pubarche*)

<i>Stadium zaawansowania rozwoju owłosienia łonowego</i>	<i>Opis</i>
I	brak owłosienia łonowego
II	nieznaczny wzrost długich, słabo zabarwionych, puszystych włosów, prostych lub tylko nieco kręjących się, początkowo wzdłuż warg sromowych
III	włosy są znacznie ciemniejsze, grubsze i bardziej się kręją; zaczynają się rozrastać na wzniesieniu łonowym
IV	dojrzałe owłosienie, nieco ograniczone w stosunku do dorosłego; włosy nie rozprzestrzeniają się na uda
V	w pełni rozwinięte dojrzałe owłosienie, rozprzestrzenia się na uda

Rozwój narządów płciowych u chłopców (*Genitalia*)

<i>Stadium zaawansowania rozwoju męskich narządów płciowych</i>	<i>Opis</i>
I	prącie, jądra i moszna wielkości dziecięcej
II	rozpoczyna się powiększenie moszny i jąder, prącie zazwyczaj nie powiększa się; skóra moszny ciemnieje
III	dalsze powiększanie się jąder i moszny oraz powiększanie się prącia, przede wszystkim jego długości
IV	dalsze powiększanie się jąder i moszny oraz prącia, przede wszystkim jego szerokości
V	dojrzały wygląd i kształt męskich narządów płciowych

Rozwój owłosienia łonowego u chłopców (*Pubarche*)

<i>Stadium zaawansowania rozwoju owłosienia łonowego</i>	<i>Opis</i>
I	brak owłosienia łonowego
II	nieznaczny wzrost długich, słabo zabarwionych, puszystych włosów, prostych lub tylko nieco kręjących się, początkowo u podstawy prącia
III	włosy są znacznie ciemniejsze, grubsze i bardziej się kręją; zaczynają się rozrastać na wzniesieniu łonowym
IV	dojrzałe owłosienie, nieco ograniczone w stosunku do dorosłego; włosy nie rozprzestrzeniają się na uda
V	w pełni rozwinięte dojrzałe owłosienie, rozprzestrzenia się na uda

Aneks 3 Protokół izolacji genomowego DNA z wykorzystaniem gotowych zestawów Genomic Midi AX (A&A Biotechnology, Polska) (źródło: protokół załączany do zestawów przez producenta)

Przygotowanie materiału – liza komórek i denaturacja białek
<ol style="list-style-type: none">1. 2 ml krwi przenieść do probówki o pojemności 50 ml i dodać 2 ml Buforu Lizującego L 1.4 oraz 50 µl Proteazy.2. Całość wymieszać i inkubować 20 minut w temperaturze 50°C.3. Po inkubacji intensywnie worteksować (wytrząsać) próbkę przez 20 sekund.
Izolacja DNA – usuwanie zanieczyszczeń i wymywanie DNA z membran jonowymiennych
<ol style="list-style-type: none">1. Przenieść mieszaninę do kolumny (zawierającej membrany jonowymiennie) umieszczonej w probówce 15 ml i całość wirować w rotorze uchylnym przez 2 minuty przy 3 000 RPM (około 1 500 x g).2. Po przejściu mieszaniny przez kolumnę przenieść ją do nowej probówki 15 ml i dodać 2,5 ml Buforu Płuczającego K2 i wirować jak w punkcie powyżej.3. Powtórnie płukać przez dodanie do kolumny 2,5 ml Buforu Płuczającego K2 i wirować jak w punkcie 1.4. Przenieść kolumnę do nowej probówki 15 ml i wymywać oczyszczone DNA przez dodanie 0,55 ml Buforu Elucyjnego K3. Inkubować próbkę 2 minuty w temperaturze pokojowej a następnie wirować 1 minutę przy 3 000 RPM (około 1 500 x g).5. Powtórnie dodać 0,55 ml Buforu Elucyjnego K3 i wirować jak w punkcie powyżej.
Precypitacja alkoholowa – odsalanie i zagęszczanie DNA
<ol style="list-style-type: none">1. Przenieść eluat do probówki eppendorfa o pojemności 2 ml i dodać 0,8 ml izopropanolu i całość wymieszać przez kilkukrotne odwracanie probówki. <p><u>Przy widocznym wyraźnym precypitacie DNA:</u></p> <ol style="list-style-type: none">2. Wirować probówkę 2 minuty przy maksymalnych obrotach (14 000 RPM czyli około 15 000 x g).3. Ostrożnie usunąć supernatant a osad płukać przez dodanie 0,5 ml 70% etanolu.4. Wirować probówkę 2 minuty przy maksymalnych obrotach (14 000 RPM czyli około 15 000 x g).5. Ostrożnie usunąć supernatant a osad suszyć w temperaturze pokojowej przez odwrócenie probówki. <p><u>Przy braku wyraźnie widocznego precypitatu DNA:</u></p> <ol style="list-style-type: none">2. Przenieść mieszaninę do odpowiedniej probówki wirówkowej wytrzymałej wirowanie przy 14 000 RPM (około 15 000 x g) i wirować próbkę 15 minut przy obrotach 12 000 – 14 000 RPM (około 11 000 – 15 000 x g).3. Ostrożnie usunąć supernatant a osad płukać przez dodanie 0,5 ml 70% etanolu.4. Wirować probówkę 5 minut przy maksymalnych obrotach (14 000 RPM czyli około 15 000 x g).5. Ostrożnie usunąć supernatant a osad suszyć w temperaturze pokojowej przez odwrócenie probówki.
Rozpuszczanie osadu DNA
<ol style="list-style-type: none">1. Osad rozpuścić poprzez dodanie odpowiedniej ilości (100 µl) podwójnie destylowanej wody (ddH₂O)
Wykorzystywany sprzęt laboratoryjny i odczynniki
<ul style="list-style-type: none">• zestawy do izolacji genomowego DNA Genomic Midi AX• pipety Eppendorf Research• probówki 50 ml• ciepłarka Heraeus• worteks IKA typ TTS2• wirówka Eppendorf Centrifuge 5810R• probówki eppendorf 2 ml z dnem stożkowym• alkohol etylowy 96% CZDA

Aneks 4 Klasyfikacja zmian w obrębie błony śluzowej jelita cienkiego w przebiegu celiakii według Marsha (WGO, 2012)

<i>Stadium zaawansowania zmian w obrębie błony śluzowej jelita cienkiego</i>	<i>Opis</i>
Typ 0	przednaciekowy – prawidłowa budowa mikroskopowa błony śluzowej, liczba limfocytów śród nabłonkowych < 40/100 komórek nabłonkowych
Typ 1	zmiany naciekowe – zachowana prawidłowa struktura kosmków i wielkość krypt, obecny naciek śród nabłonkowy złożony z limfocytów (> 40 limfocytów śród nabłonkowych/100 komórek nabłonkowych)
Typ 2	hyperplastyczny – do zmian naciekowych dołączają się hipertrofia krypt
Typ 3a	destrukcyjny – łagodne skrócenie kosmków i wydłużenie krypt
Typ 3b	destrukcyjny – znaczący zanik kosmków i wzrost wysokości krypt
Typ 3c	destrukcyjny – płaska błona śluzowa (bez kosmków) i wzrost wysokości krypt
Typ 4	hypoplastyczno – zanikowy – płaska błona śluzowa z normalną wysokością krypt oraz prawidłową liczbą limfocytów