



Wydział Lekarski II

Katedra i Klinika Endokrynologii,
Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
W Poznaniu

lek. Katarzyna Piątek

**Wpływ suplementacji witaminą D
na immunokompetencję
układu odpornościowego u chorych
z przewlekłym autoimmunologicznym
zapaleniem tarczycy**

Promotorzy

Prof. dr hab. Katarzyna Ziemnicka

Prof. dr hab. Grzegorz Dworacki

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Poznań
2018

*Pragnę złożyć serdecznie podziękowania Promotorowi,
Pani prof. dr hab. n. med. Katarzynie Ziemnickiej,
za pomoc w rekrutacji pacjentek oraz wolontariuszek do badania,
za każdą cenną poradę, liczne wskazówki merytoryczne, ogrom poświęconego czasu
oraz życzliwość i zrozumienie, jakimi mnie obdarzyła.*

*Drugiemu Promotorowi, Panu prof. dr. hab. n. med. Grzegorzowi Dworackiemu,
dziękuję za możliwość nieodpłatnego przeprowadzenia badań cytometrii przepływowej
w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej UMP,
za naukę oceny i interpretacji wyników cytometrii przepływowej, wsparcie merytoryczne
oraz stoicki spokój i nieustanny optymizm.*

*Rozprawę doktorską dedykuję moim Rodzicom
– Grażynie i Jackowi Pachciarkom*

Spis treści

I.	Wstęp.....	1
1.	Witamina D.....	1
1.1.	Struktura i synteza.....	1
1.2.	Funkcje.....	3
1.3.	Niedobór witaminy D.....	6
1.4.	Zalecenia suplementacji.....	6
2.	Wpływ witaminy D na funkcjonowanie układu odpornościowego.....	7
2.1.	Wpływ witaminy D na komórki prezentujące antygen.....	7
2.2.	Wpływ witaminy D na limfocyty T.....	8
2.3.	Wpływ witaminy D na komórki NKT.....	11
2.4.	Wpływ witaminy D na komórki NK.....	12
2.5.	Wpływ witaminy D na limfocyty B.....	12
2.6.	Witamina D w chorobach autoimmunologicznych.....	13
2.7.	Witamina D w chorobach nowotworowych.....	15
3.	Choroby autoimmunologiczne tarczycy.....	15
3.1.	Informacje ogólne.....	15
3.2.	Przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy.....	16
4.	Dojrzewanie limfocytów T oraz charakterystyka wybranych komórek układu odpornościowego.....	21
II.	Uzasadnienie i cel pracy.....	28
III.	Materiał i metodyka.....	29
1.	Grupa badana.....	29
2.	Grupa kontrolna.....	30
3.	Badania biochemiczne.....	31
4.	Badania immunologiczne.....	33
5.	Witamina D.....	35
6.	Analiza statystyczna.....	35
7.	Zgoda komisji bioetycznej i finansowanie.....	36
IV.	Wyniki.....	37
1.	Wyniki badań biochemicznych.....	37
2.	Odpowiedź immunologiczna komórkowa wrodzona.....	40

3.	Odpowiedź immunologiczna humoralna wrodzona	53
4.	Odpowiedź immunologiczna komórkowa nabyta	56
5.	Odpowiedź immunologiczna humoralna nabyta	75
V.	Dyskusja	81
1.	Ocena parametrów biochemicznych	81
2.	Odpowiedź immunologiczna komórkowa wrodzona	82
3.	Odpowiedź immunologiczna humoralna wrodzona	83
4.	Odpowiedź immunologiczna komórkowa nabyta	84
5.	Odpowiedź immunologiczna humoralna nabyta	86
6.	Metody	88
7.	Potencjalne mechanizmy immunomodulującego działania witaminy D	88
8.	Podsumowanie	92
VI.	Wnioski	93
VII.	Streszczenie	94
VIII.	Summary	97
IX.	Bibliografia	99
X.	Spis tabel	116
XI.	Spis rycin	118
XII.	Suplement	122

Spis stosowanych skrótów

7DHC	7-dehydrocholesterol
AIT	przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy (ang. <i>autoimmune thyroiditis</i>)
AITD	choroba autoimmunologiczna tarczycy (ang. <i>autoimmune thyroid diseases</i>)
AMH	hormon antymüllerowski (ang. <i>anti-Müllerian hormone</i>)
AML	ostra białaczka szpikowa (ang. <i>acute myeloblastic leukemia</i>)
Anty-TG	przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie
Anty-TPO	przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej
APC	komórki prezentujące antygen (ang. <i>antigen presenting cells</i>)
APS	autoimmunologiczny zespół niedoczynności wielogruczołowej
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>Body Mass Index</i>)
Breg	limfocyt B regulatorowy
CaSR	receptor wrażliwy na wapń (ang. <i>calcium sensing receptor</i>)
CCR7	receptor dla chemokiny 7 (ang. <i>chemokine receptor 7</i>)
CLL	przewlekła białaczka limfocytowa (ang. <i>chronic lymphocytic leukemia</i>)
CRP	białko C – reaktywne (ang. <i>C-reactive protein</i>)
DC	komórki dendrytyczne (ang. <i>dendritic cells</i>)
EAE	eksperymentalne alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (ang. <i>experimental allergic encephalomyelitis</i>)
EBM	medycyna oparta na dowodach naukowych (ang. <i>Evidence Base Medicine</i>)
ECLIA	elektrochemiluminescencja (ang. <i>electro-chemiluminescence immunoassay</i>)
EDTA	Kwas etylenodiaminotetraoctowy
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme – linked immunosorbent assay</i>)
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA	układ zgodności tkankowej (ang. <i>Human Leucocyte Antigen</i>)
IBD	nieswoiste zapalenie jelit (ang. <i>inflammatory bowel disease</i>)
IL	interleukina
IL12B	podjednostka β interleukiny 12
iNKT	ang. <i>invariant natural killer T-cell</i>
LPS	lipopolisacharyd
MHC	główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>major histocompatibility complex</i>)

MS	stwardnienie rozsiane (ang. <i>multiple sclerosis</i>)
NF- κ B	jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B (ang. <i>nuclear factor κB</i>)
NIS	symporter sodowo-jodowy (ang. <i>sodium/iodide symporter</i>)
NK	limfocyty naturalni zabójcy (ang. <i>natural killers</i>)
NKT	limfocyty T naturalni zabójcy (ang. <i>natural killer T-cells</i>)
PTH	parathormon
RTE	wczesne emigranty grasicze (ang. <i>recent thymic emigrants</i>)
RZS	reumatoidalne zapalenie stawów
SLE	toczeń rumieniowaty układowy (ang. <i>systemic lupus erythematosus</i>)
T0	limfocyt T naiwny (ang. <i>T naïve cell</i>)
Tc	limfocyt T cytotoksyczny (ang. <i>T cytotoxic cell</i>)
TCR	receptor limfocytów T (ang. <i>T-cell receptor</i>)
TGF β 1	podjednostka β 1 transformującego czynnika wzrostu (ang. <i>transforming growth factor beta 1</i>)
Th	limfocyt pomocniczy (ang. <i>T helper cell</i>)
Th CM	limfocyt T pomocniczy pamięci centralnej (ang. <i>central memory T helper cell</i>)
Th EM	limfocyt T pomocniczy pamięci efektorowej (ang. <i>effector memory T helper cell</i>)
TNF α	podjednostka α czynnika martwicy nowotworów (ang. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
Treg	limfocyt T regulatorowy (ang. <i>T regulatory cell</i>)
TSH	tyreotropina (ang. <i>thyroid stimulating hormone</i>)
UVA	promieniowanie ultrafioletowe A
UVB	promieniowanie ultrafioletowe B
VDR	receptor witaminy D (ang. <i>vitamin D receptor</i>)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WT	typ dziki (ang. <i>wild type</i>)

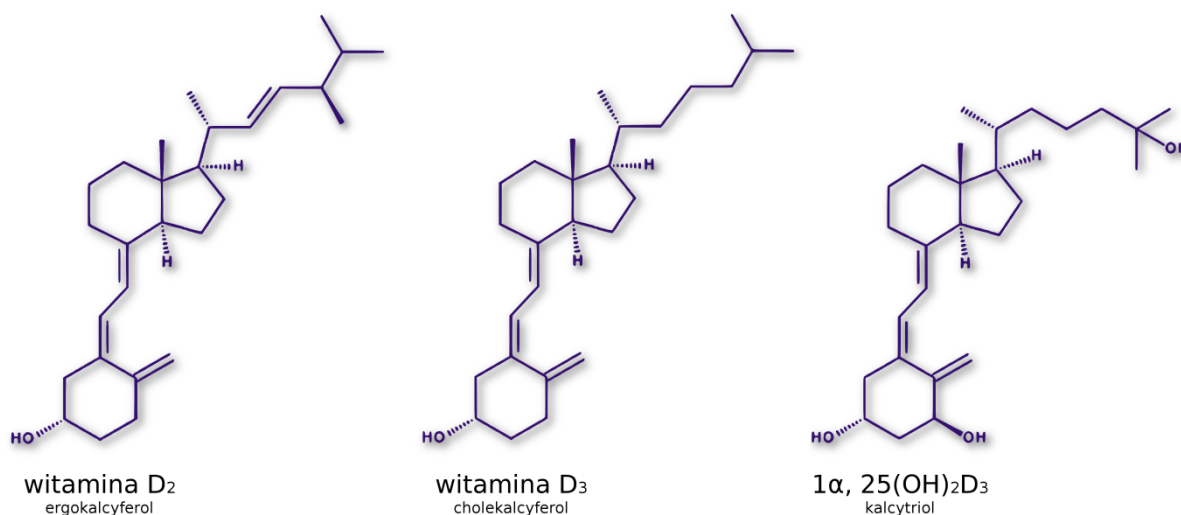
I. Wstęp

1. Witamina D

1.1. Struktura i synteza

Witaminę D jako czynnik przeciwkrzywicy zidentyfikował w 1922 roku Elmar McCollum (1). Kilka lat później Frederic Askev jako pierwszy wyizolował witaminę D₂ – ergokalcyferol, a w 1936 roku Adolf Windaus ze współpracownikami zbadał szlak metaboliczny, w którym ergokalcyferol jest przekształcany do cholekalcyferolu – witaminy D₃ (2). Cholekalcyferol jest postacią nieaktywną i podlega hydroksylacji w wątrobie do 25-hydroksyvitaminy D₃ (25(OH)D₃) – kalcydiolu. Kolejna hydroksylacja zachodzi w nerkach dzięki 1 α – hydroksylazie. Wówczas powstaje kalcytriol – aktywna metabolicznie postać witaminy D₃ (1 α , 25(OH)₂D₃). Ten etap aktywacji jest regulowany przez parathormon (PTH) (3).

Na **rycinie 1.** przedstawiono wzory strukturalne witaminy D₂, D₃ oraz aktywnej postaci witaminy D₃. Związki te mają budowę steroidową i należą do sekosteroidów – mają otwarty pierścień B steroidu. Budowa strukturalna witaminy D warunkuje jej właściwości hydrofobowe i lipofilne (4).



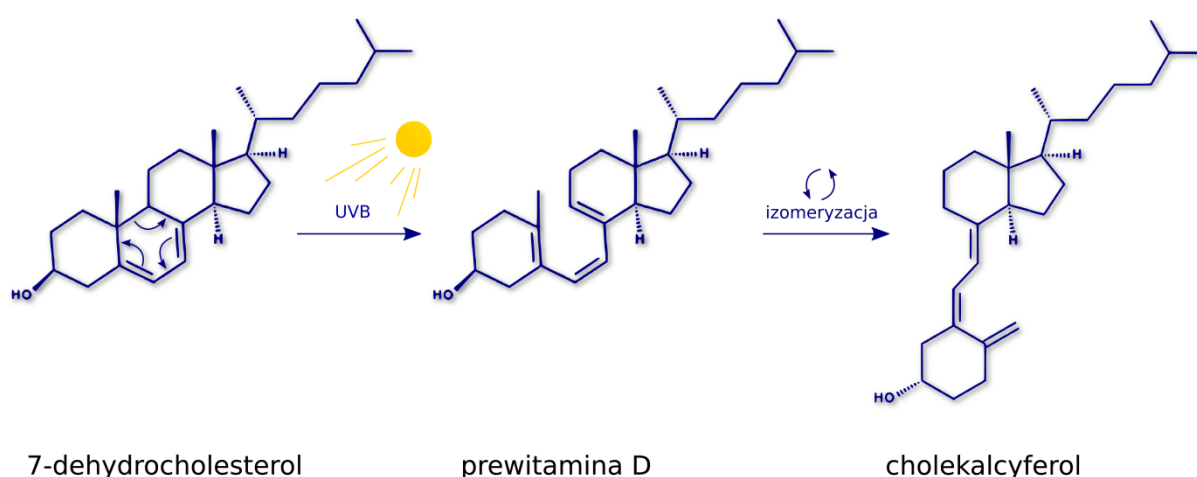
Rycina 1. Wzory strukturalne witaminy D₂, D₃ oraz 1 α , 25(OH)₂D₃ (5).

Dieta nie jest wystarczającym źródłem witaminy D dla organizmu. Dodatkowe źródło witaminy D to jej produkcja w skórze pod wpływem promieniowania ultrafioletowego B (UVB). Najprawdopodobniej większość witaminy D krążącej we krwi pochodzi z endogennej syntezy, a jedynie niewielka jej część jest dostarczana z pożywieniem (3). Stąd też witamina D nie jest witaminą w ścisłym tego słowa znaczeniu.

W toku ewolucji człowieka ekspozycja na światło słoneczne nie była powodem do niepokoju. Jednak wraz z wydłużeniem oczekiwanej długości życia, powiązano częstsze występowanie nowotworów skóry, w tym czerniaka złośliwego, u osób narażonych na promieniowanie UV (6). Dziś o wiele bezpieczniejsza jest możliwość doustnej suplementacji witaminą D niż przedłużona ekspozycja na światło słoneczne i ryzyko z tym związane (7).

Substratem do produkcji witaminy D w skórze jest 7-dehydrocholesterol (7DHC) – prowitamina D. Związek ten jest zgromadzony w dużej ilości w błonie komórkowej keratynocytów. Tam, pod wpływem energii promieniowania UVB (długość fal 290-315 nm), pęka pierścień B związku i powstaje prewitamina D₃. Następnie prewitamina D₃ ulega izomeryzacji do witaminy D₃ (**rycina 2.**) (8, 9).

Reakcja ta nie wymaga obecności katalizatora, a jej wydajność zależy wyłącznie od dostępności substratu – 7DHC i promieniowania UVB. Z uwagi na dużą zawartość 7DHC w skórze, czynnikiem ograniczającym staje się promieniowanie UVB, którego fotony muszą dotrzeć do warstwy podstawnej naskórka (3).



Rycina 2. Fotosynteza witaminy D₃ w skórze.

Nachylenie osi Ziemi wobec orbity sprawia, że dla obszarów położonych powyżej 40° szerokości geograficznej w miesiącach zimowych synteza witaminy zmniejsza się lub ustaje z powodu braku wystarczającej ilości promieniowania UVB (3, 10). Stąd zalecenia dla krajów Europy Centralnej, by suplementować witaminę D doustnie od września do kwietnia (7). W pozostałych miesiącach ekspozycja na światło słoneczne nieosłoniętych części ciała (twarz i dłonie) przez około 2 godziny tygodniowo pozwala zapewnić prawidłowe stężenie witaminy D w organizmie (3).

Podsumowując, na wydajność fotosyntezy prewitaminy D ma wpływ kolor skóry, szerokość geograficzna, pora roku oraz kulturowo uwarunkowany dobór stroju (11).

1.2. Funkcje

Witamina D i jej znaczenie są przedmiotem badań od wielu lat. Zanim poznano jej strukturę, już w 1822 roku polski lekarz Jędrzej Śniadecki zaobserwował, że u dzieci zamieszkujących centrum Warszawy krzywica występowała znacznie częściej niż u dzieci urodzonych na obszarach wiejskich. W związku z tym zalecał kąpiele słoneczne dla dzieci jako profilaktykę i leczenie krzywicy (10). Intensywne badania z ostatnich lat zakwalifikowały witaminę D do grupy hormonów steroidowych i dowiodły, że ma ona wpływ nie tylko na gospodarkę wapniowo-fosforanową, ale wykazuje szerokie spektrum działania na organizmy żywe, między innymi kontroluje ekspresję ponad 200 genów (12).

Witamina D (jej aktywna postać – $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) wykazuje działania genomowe i pozagenomowe. Działanie genomowe odbywa się poprzez połączenie aktywnej postaci witaminy ze swoistym receptorem (VDR – ang. *vitamin D receptor*), który znajduje się w jądrze komórkowym. Związanie $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ z VDR pozwala na regulację transkrypcji genów efektorowych. Wykazano również, że witamina D może kontrolować ekspresję genów poprzez wpływ na mikroRNA (miRNA). Z kolei pozagenomowe działanie ujawnia się dzięki błonowemu receptorowi $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Efekty mogą być bezpośrednie (na przykład otwieranie kanałów wapniowych) lub pośrednie, poprzez aktywację drugiego przekaźnika (kinazy C, szlaku Ras/Raf/ERK/MAPK) (3).

Poniżej opisano wpływ witaminy D na wiele ważnych aspektów funkcjonowania organizmów.

Homeostaza wapniowo-fosforanowa

Witamina D jest jednym z czynników koordynujących homeostazę wapniowo-fosforanową. Jej działanie na kości, jelito cienkie, nerki i przytarczycę jest rezultatem

złożonych interakcji, jakie zachodzą pomiędzy stężeniem wapnia, fosforanów, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, parathormonu (PTH) oraz fosfatonin (2).

PTH mobilizuje wapń z kości i wpływa na syntezę aktywnej postaci witaminy D, jednocześnie zwiększając wydalanie fosforanów z moczem. Sprzężenie zwrotne ujemne pomiędzy stężeniem $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i PTH powoduje zahamowanie wydzielania PTH przez przytarczycę pod wpływem rosnącego stężenia aktywnej postaci witaminy D. Z drugiej strony podwyższone stężenie $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hamuje 1α -hydroksylazę i stymuluje 24-hydroksylazę, co powoduje nasilenie katabolizmu $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Witamina D w jelicie cienkim prowadzi do wzrostu wchłaniania wapnia ze światła jelita. W nerkach z kolei zwiększa resorpcję wapnia i fosforanów z moczu pierwotnego. Kolejne sprzężenie zwrotne występuje między stężeniem fosforanów a produkcją $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Hipofosfatemia stymuluje, a hiperfosfatemia hamuje 1α -hydroksylazę. W nabłonku kanalików proksymalnych nerek następuje hydroksylacja kalcydiolu w pozycji 1α do kalcytriolu. Przewlekła choroba nerek prowadzi do zmniejszenia aktywności 1α -hydroksylazy i niedoboru $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (2, 3).

Witamina D w kościach z jednej strony promuje powstawanie osteoklastów i resorpcję kości (następuje uwalnianie wapnia do krwioobiegu), z drugiej strony wpływa na funkcję osteoblastów i stymuluje mineralizację macierzy kostnej. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kontroluje ekspresję większości genów zarówno osteoklastów, jak i osteoblastów. W związku z czym jest ona niezbędna do prawidłowej przebudowy kości. Dodatkowo brak witaminy D prowadzi do przerostu nieprawidłowej macierzy kostnej i hipertrofii chondroblastów w płytce nasadowej u dzieci, co wiąże się z występowaniem krzywicy. U dorosłych stwierdzana jest osteomalacja i osteoporoza z powodu zaburzeń mineralizacji kości (2, 3, 13).

Skóra

Skóra jest narządem, w którym zachodzi przemiana prowitaminy D w prewitaminę D. Dodatkowo w keratynocytach wykazano obecność VDR oraz ekspresję 25-hydroksylazy i 1α -hydroksylazy. Dowodzi to regulacji autokrynowej i możliwości autonomicznego zaopatrywania keratynocytów w witaminę D_3 . Stanowi ona ważny czynnik kontrolujący wzrost i dojrzewanie keratynocytów (14, 15). Co ciekawe u dzieci z mutacją VDR obserwuje się zanik owłosienia po pierwszej fazie katagenu tuż po narodzinach, natomiast niedobór witaminy D nie prowadzi do takich zaburzeń (16).

Układ sercowo – naczyniowy

U myszy z wyłączonym genem kodującym VDR zaobserwowano nadciśnienie tętnicze i przerost mięśnia sercowego zależne od nadmiernego stężenia reniny. Podobne

wyniki zanotowano u myszy z brakiem aktywności 1α -hydroksylazy (17). Natomiast u ludzi aktywna postać witaminy D zmniejsza produkcję reniny. Najprawdopodobniej dzieje się tak poprzez oddziaływanie na sekwencję promotorową reniny. Dalsze obserwacje pozwoliły stwierdzić, że istnieje odwrotna zależność między stężeniem $25(\text{OH})\text{D}_3$ a występowaniem nadciśnienia tętniczego (18).

Wcześniejsze badania sugerowały, że niedobór witaminy D jest związany z występowaniem licznych czynników ryzyka zespołu metabolicznego. Jednak te relacje mogą być bardziej złożone. Niedobór witaminy D może być również rozważany jako konsekwencja otyłości, starzenia się czy zmniejszonej aktywności fizycznej, które prowadzą często do zmniejszonej ekspozycji na światło słoneczne (19).

Mięśnie szkieletowe

VDR wykazuje ekspresję w mioblastach, lecz prawdopodobnie jest nieobecny w dojrzałych komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych (20). Badania obserwacyjne dowiodły, że u dzieci i osób starszych niedobór kalcytriolu zwiększa ryzyko występowania miopatii (21).

Metabolizm glukozy – cukrzyca typu 2

W patogenezie rozwoju cukrzycy typu 2 największą rolę odgrywają zaburzenia czynności sekrecyjnej komórek β wysp trzustki oraz wrażliwości komórek docelowych na insulinę. Gruber podsumował wpływ stężenia kalcydiolu na gospodarkę węglowodanową. Dotychczas udowodniono, że stężenie $25(\text{OH})\text{D}_3$ negatywnie koreluje z występowaniem cukrzycy typu 2 oraz z insulinoopornością mierzoną wskaźnikiem HOMA-IR. Wiele badań wykazało odwrotną korelację między stężeniem kalcydiolu a glikemią (22). Przytaczane są również badania sugerujące negatywny wpływ niedoboru kalcytriolu na funkcjonowanie komórek β trzustki. W warunkach prawidłowych $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oddziałuje na uwalnianie insuliny najprawdopodobniej poprzez kontrolę stężenia jonów wapniowych, które aktywują kanał rianodynowy w komórkach β trzustki oraz poprzez stymulację ekspresji genu insuliny (3, 23).

Układ rozrodczy

Zarówno VDR, jaki i enzymy metabolizujące witaminę D wykazują ekspresję w komórkach Sertoliego i Leydiga oraz w komórkach germinalnych, w tym, w plemnikach. Kolejnym obszarem zainteresowań naukowców stał się związek między zaburzeniami erekcji a witaminą D_3 . Wykazano, że jej stężenie pozytywnie koreluje ze stężeniem testosteronu

i jakością nasienia. Z kolei niedobór wiąże się z większym ryzykiem występowania hipogonadyzmu. Badanie obejmujące ponad 3 000 mężczyzn pozwoliło stwierdzić, że wzrost ryzyka zaburzeń erekcji występował, gdy stężenie 25(OH)D wynosiło $< 20\text{ng/ml}$. Z drugiej strony stężenie $> 35\text{ng/ml}$ wyraźnie zmniejszało to ryzyko. Dodatkowo witamina D stymuluje produkcję syntezy tlenku azotu (NO), który jest kluczowy dla rozszerzenia naczyń i uzyskania wzrodu (24).

Próbowano znaleźć powiązanie między witaminą D a płodnością kobiet, jednak dostępne dane literaturowe nie potwierdzają jednoznacznie występowania takiego związku. Nie wykazano też korelacji pomiędzy stężeniem witaminy D_3 a stężeniem hormonu antymüllerowskiego (AMH), który jest wykładnikiem rezerwy jajnikowej (25).

1.3. Niedobór witaminy D

Niedobór witaminy D to globalny problem zdrowotny. Szacuje się, że ponad miliard ludzi na świecie ma niewystarczające stężenie tej witaminy (10, 26). Przyczynami niezadowalającego stężenia witaminy 25(OH)D są: niedostateczna podaż w diecie, ograniczone wchłanianie czy nieprawidłowy metabolizm. Rzadko może występować również oporność na działanie witaminy D. Amerykańskie Towarzystwo Endokrynologiczne oraz aktualne wytyczne dla Europy Środkowej definiują: niedobór witaminy D, jej stężenie suboptymalne, optymalne oraz stężenie wysokie odpowiednio jako stężenie 25(OH)D $< 20\text{ng/ml}$, $20\text{--}30\text{ng/ml}$, $> 30\text{--}50\text{ng/ml}$ oraz $> 50\text{--}100\text{ng/ml}$ (7). W naszej szerokości geograficznej niedobór witaminy D jest szeroko rozpowszechniony. W 2014 roku Płudowski i współpracownicy przeprowadzili badania wśród mieszkańców polskich miast, z których wynika, że 90% populacji charakteryzowało się niedostatecznym stężeniem witaminy D (niedobór i stężenie suboptymalne – odpowiednio 67% i 23%). Jedynie 8,4% badanych miało optymalne stężenie witaminy D. Dodatkowo u osób z BMI $> 30\text{kg/m}^2$ zaobserwowano istotnie statystycznie niższe stężenia 25(OH)D w porównaniu do pozostałej populacji (27).

1.4. Zalecenia suplementacji

Współczesne zalecenia odnośnie wskazań do suplementacji witaminą D są precyzyjnie opisane, zatwierdzone przez grupę ekspertów i oparte na EBM (ang. *Evidence Base Medicine*). Do suplementacji stosuje się witaminę D_3 , która jest dwa razy bardziej skuteczna w uzupełnianiu niedoborów niż witamina D_2 (28). Aktualnie obowiązujące wytyczne wyrównywania niedoborów witaminy D dla Europy Środkowej pochodzą z 2013 roku. Dla dorosłych osób z BMI $< 30\text{kg/m}^2$ zaleca się suplementację w dawce 800 – 2000 IU na dobę

zależnie od masy ciała, w miesiącach wrzesień – kwiecień. Jednak u osób, u których nie jest zapewniona efektywna synteza w miesiącach letnich, zaleca się suplementację przez cały rok (7).

2. Wpływ witaminy D na funkcjonowanie układu odpornościowego

W ostatnich latach podjęto intensywne badania na wpływem witaminy D na układ odpornościowy. Do tej pory zauważono zależność między jej stężeniem a wieloma chorobami autoimmunologicznymi. Wykazano, że niedobór witaminy D zwiększa ryzyko zachorowania między innymi na stwardnienie rozsiane, nieswoiste zapalenia jelit, toczeń rumieniowaty układowy, cukrzycę typu 1 czy reumatoidalne zapalenie stawów (29-32). Dodatkowo prawidłowe stężenie witaminy D korzystnie wpływa na przebieg leczenia niektórych typów nowotworów i zwiększa przeżywalność (33).

Efekty niedoboru witaminy D obserwowane w skali makro są konsekwencją procesów patofizjologicznych zachodzących na poziomie komórkowym. W opublikowanych pracach dowiedziono obecność receptora witaminy D na licznych obwodowych komórkach immunokompetentnych (między innymi na komórkach prezentujących antygen, aktywowanych limfocytach T i B, limfocytach naturalnych zabójcach czy neutrofilach) (34-36). Ponadto monocyty, makrofagi oraz limfocyty T cytotoksyczne i limfocyty B wykazują ekspresję 1α -hydroksylazy, która przekształca witaminę D do postaci aktywnej (34, 37-39).

Poniżej zostanie przedstawione, w jaki sposób witamina D wpływa na funkcjonowanie obwodowego układu odpornościowego, chorób autoimmunologicznych oraz nowotworów.

2.1. Wpływ witaminy D na komórki prezentujące antygen

Komórki prezentujące antygen (APC – ang. *antigen presenting cells*) wykazują zdolność aktywacji naiwnych limfocytów T oraz limfocytów T pamięci immunologicznej. Do APC należą między innymi makrofagi oraz komórki dendrytyczne (DC – ang. *dendritic cells*). Zarówno makrofagi, jak i DC mogą indukować tolerancję immunologiczną, a także stymulować przewlekłą reakcję zapalną poprzez wpływ na różnicowanie limfocytów T (40).

Obecność wewnątrzcytoplazmatycznego VDR wykryto między innymi w spoczynkowych monocytach oraz w DC. Dodatkowo monocyty oraz makrofagi, dzięki ekspresji 25-hydroksylazy oraz 1α -hydroksylazy, mają możliwość przekształcania nieaktywnej witaminy D do kalcytriolu, który z kolei wiąże się z VDR. Produkcja

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ odbywa się lokalnie w tkankach i miejscu reakcji zapalnej, a choć stanowi niewielki procent w porównaniu z aktywowaną witaminą D_3 przez nerki, odgrywa kluczową rolę w regulacji dostępności tej witaminy dla monocytów i DC (34, 39).

Wykazano, że witamina D wpływa na wymienione powyżej APC i decyduje o promowaniu przez nie reakcji tolerancji na antygeny (40). Monocyty inkubowane z aktywną witaminą D wykazują zmniejszenie ekspresji białek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC – ang. *major histocompatibility complex*) a także cząstek kostymulujących: CD40, CD80 i CD86 (41, 42). Wszystkie te białka tworzą synapsę immunologiczną, a tym samym biorą bezpośredni udział w rozpoznaniu antygeny. Dodatkowo, monocyty inkubowane z $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zmniejszają wydzielanie cytokin prozapalnych takich jak $\text{IL}1\alpha$, $\text{IL}6$, $\text{IL}12$ i $\text{TNF}\alpha$. *In vivo* suplementacja $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ powodowała zmniejszenie wydzielania $\text{IL}6$ przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, a dalej $\text{IL}6$ między innymi zapobiegała różnicowaniu się limfocytów T w kierunku Treg zależnego od $\text{TGF}\beta$. Witamina D poprzez zmniejszenie produkcji $\text{IL}6$ oraz zwiększenie wydzielania $\text{IL}10$ moduluje nie tylko odpowiedź limfocytów T, ale również decyduje o kierunku ich różnicowania (34). Promuje konwersję w kierunku komórek Treg a jednocześnie zmniejsza wrażliwość limfocytów T efektorowych do wzbudzania odpowiedzi immunologicznej (40).

Witamina $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hamuje powstawanie niedojrzałych DC z makrofagów. Poza tym zmienia profil wydzielanych cytokin dojrzałych DC. Zmniejsza wydzielanie $\text{IL}12$ i $\text{IL}23$, które promują dojrzewanie limfocytów T w kierunku $\text{Th}1$ i $\text{Th}17$. Zwiększa natomiast produkcję $\text{IL}10$ oraz $\text{CCL}22$, które są zaangażowane w odpowiedź immunologiczną zależną od Treg i $\text{Th}2$ (34). Co ciekawe DC wyciszają parakrynowe działanie kalcytriolu. Niedojrzałe DC (posiadają wysoką ekspresję VDR) reagują na $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, która jest produkowana z kalcydiolu przez dojrzałe DC z niewielką ekspresją VDR (35).

2.2. Wpływ witaminy D na limfocyty T

Wskazuje się na cztery potencjalne mechanizmy oddziaływania witaminy D na limfocyty T (43):

- bezpośredni, endokrynnny efekt kalcytriolu na komórki T;
- bezpośrednie intakrynnne działanie dzięki konwersji $25(\text{OH})\text{D}_3$ do $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ przez limfocyty T;
- bezpośrednie parakrynnne działanie kalcytriolu na komórki T dzięki konwersji witaminy D_3 do postaci aktywnej przez komórki dendrytyczne i monocyty;

- pośrednie działanie poprzez APC będące pod wpływem $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

W limfocytach T również wykazano obecność VDR. Jednak w przeciwieństwie do makrofagów i DC obecność VDR jest spotykana nie w spoczynkowych, a w aktywowanych limfocytach T (44). Witamina $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jest potencjalnym inhibitorem proliferacji komórek T. W jej obecności następuje zatrzymanie cyklu komórkowego pomiędzy wczesną fazą G1 a późną fazą G1 (45, 46). Poniżej przedstawiony zostanie wpływ witaminy D na poszczególne klasy limfocytów T.

Limfocyty T naiwne

Witamina D oddziałuje na limfocyty T naiwne (T0 – ang. *T naïve cell*) bezpośrednio oraz pośrednio poprzez DC. Boonstra i współpracownicy jako pierwsi zwrócili uwagę na bezpośrednie działanie kalcytriolu na tę subpopulację limfocytów. Udowodnili oni w badaniach *in vitro* na komórkach mysich, że $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w obecności IL4 powoduje różnicowanie naiwnych limfocytów T pomocniczych (Th0) w kierunku komórek Th2. Ponadto stymulacja komórek Th0 przeciwciałami anty-CD3 oraz anty-CD28 w obecności witaminy D również powodowała silną polaryzację w kierunku Th2 (47).

Pośrednie działanie tolerogenne witaminy D zostało potwierdzone w hodowli mieloidalnych DC inkubowanych w obecności $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, co wpływało na blokowanie tworzenia synapsy immunologicznej z komórkami Th0. Wobec zaburzonej prezentacji antygenów dochodziło do braku pobudzenia komórek T0, co prowadziło do rozwoju tolerancji na dany antygen (48).

Limfocyty T pomocnicze

W większości badań *in vitro* na komórkach ludzkich, kalcytriol powodował zwiększenie produkcji i sekrecji IL10 przez limfocyty T pomocnicze (Th – ang. *T helper cell*), jak również wzrost liczby tych komórek w grupie osób zdrowych. Obecność w hodowli monocytołów powodowała brak wzrostu liczby komórek T CD4^+ IL10⁺ (34). W innych badaniach proliferacja ludzkich limfocytów T CD4^+ była zahamowana przez aktywną postać witaminy D_3 . Jednak w obecności silnego bodźca takiego jak inkubacja z przeciwciałami anty-CD3 oraz anty-CD28 efekt ten był znoszony. Dodatkowo zauważono, że w populacjach o zmniejszonej aktywności proliferacyjnej pod wpływem $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ następuje zmniejszenie produkcji IL2 (49). Badano również czy podobna zależność dotyczy IL6, jednak wnioski są sprzeczne.

Witamina D wpływa również na interakcje limfocytów T CD4⁺ z limfocytami B. Lemire wraz z zespołem dostrzegł, że limfocyty T CD4⁺ preinkubowane z 1 α ,25(OH)₂D₃ w obecności mitogenu szkarłatki amerykańskiej słabiej pobudzają komórki B. Skutkowało to zahamowaniem produkcji przeciwciał IgG i IgM (50).

Limfocyty Th1

Limfocyty Th1 wykazują niewielką ekspresję VDR w porównaniu z pozostałymi subpopulacjami limfocytów T. Większość badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* sugeruje zahamowanie różnicowania limfocytów w kierunku Th1 oraz zmniejszenie stężenia produkowanego przez tę subpopulację interferonu γ (INF γ) oraz IL2 w obecności aktywnej postaci witaminy D₃. Badania *in vivo* potwierdzają te doniesienia (34, 48, 51-53).

Limfocyty Th2

Wpływ witaminy D na limfocyty Th2 nie jest jednoznaczny. Badania przeprowadzane *in vitro* na liniach komórkowych mysich i ludzkich sugerują jednak, że 1 α ,25(OH)₂D₃ hamuje różnicowanie limfocytów w kierunku Th2, lecz nasila sekrecję IL4 przez już dojrzałe limfocyty Th2 (34, 47).

Limfocyty Th17, Th22

Witamina D w warunkach *in vitro* zmniejsza sekrecję IL17 oraz IL22 produkowanych przez limfocyty pomocnicze odpowiednio typu odpowiedzi pomocniczej Th17 i Th22. Wyniki badań *in vivo* nie są jednak jednoznaczne (52-54).

Limfocyty T regulatorowe

W związku z tym, że limfocyty T regulatorowe (Treg – ang. *T regulatory cell*) stanowią bardzo heterogenną grupę komórek, trudno jednoznacznie stwierdzić, jaki wpływ na ich funkcjonowanie ma witamina D. Początkowo zakładano, że witamina D działa na subpopulację komórek Treg pośrednio poprzez wpływ na prezentowanie antygenów przez DC. Później Jeffery i współpracownicy potwierdzili bezpośredni wzrost odsetka Treg wykazujących ekspresję CCL4 pod wpływem 1 α ,25(OH)₂D₃ (49).

W niektórych badaniach *in vitro* inkubacja z 1 α ,25(OH)₂D₃ powodowała zahamowanie proliferacji limfocytów T FoxP3⁺, w innych nie zaobserwowano zmian w porównaniu z hodowlą kontrolną (52). Komórki Treg FoxP3⁺ indukowane przez analog witaminy D₃ powodowały zahamowanie odpowiedzi immunologicznej *in vitro*. Dodatkowo komórki T CD4⁺ CD25⁻ aktywowane przez 1 α ,25(OH)₂D₃ były zdolne zahamować proliferację świeżo wyizolowanych komórek CD4⁺ CD25⁻ (55).

Eksperyment, w którym suplementowano witaminę D u myszy, nie pozwolił wyciągnąć jednoznacznych wniosków odnośnie jej wpływu na komórki T CD4⁺ FoxP3⁺ (56, 57). U ludzi zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem 25(OH)D₃ a ilością komórek Treg FoxP3⁺ u pacjentów z SLE (58). Smolders i współpracownicy zauważyli pozytywną korelację między stężeniem 25(OH)D₃ a funkcją Treg. Co prawda liczba komórek Treg się nie zwiększała, jednak wraz ze wzrostem stężenia witaminy D₃ wyraźnie narastał ich potencjał do hamowania proliferacji efektorowych limfocytów T (59).

Limfocyty T cytotoksyczne

Wyniki badań oceniające wpływ 1 α ,25(OH)₂D₃ na komórki Tc nie są jednoznaczne. Do wniosków płynących z przeprowadzonych eksperymentów należały: zmniejszenie, zwiększenie lub brak wpływu na proliferację komórek Tc. Najprawdopodobniej te odmienne wyniki uzyskano z powodu zastosowania różnych metod aktywacji (34). Zaobserwowano jednak zredukowanie sekrecji IL2 oraz ograniczenie cytotoksyczności limfocytów Tc (60-62). Przeprowadzone badania oceny wpływu witaminy D na ludzkie limfocyty Tc nie uwzględniały ich podziału na subpopulacje Tc1 i Tc2 (34). Niedawno Ooi i współpracownicy udowodnili ekspresję 1 α -hydroksylazy w limfocytach Tc (38).

2.3. Wpływ witaminy D na komórki NKT

U myszy z wyłączonym genem VDR zaobserwowano trudności w prawidłowym rozwoju tej subpopulacji komórek. Z drugiej strony myszy z zablokowanym szlakiem metabolicznym prowadzącym do hydroksylacji 25(OH)D₃ miały komórki NKT z zachowaną funkcją, jednak nasilona apoptoza prekursorów tych komórek prowadziła do zmniejszenia ich ilości. Suplementacja 1 α ,25(OH)₂D₃ nie prowadziła u badanych zwierząt do wzrostu liczby dojrzałych komórek, jednak u myszy dzikich (WT – ang. *wild type*) z niedoborem witaminy D w diecie, powodowała przywrócenie prawidłowej liczby komórek NKT. Dodatkowo suplementacja u myszy WT powodowała wzrost wydzielania INF γ i IL4 przez limfocyty NKT (63). Prawidłowy rozwój tak zwanych iNKT (ang. *invariant* NKT) wymaga ekspresji VDR (64).

U ludzi komórki iNKT również pozostają pod kontrolą witaminy D. Zarówno ich rozwój, jak i funkcja zależą od obecności VDR i kalcytriolu. Izolowane z obwodowych komórek jednojądrzastych iNKT wykazywały optymalną ekspresję VDR dopiero po kilku dniach stymulacji, w przeciwieństwie do iNKT wyizolowanych z tkanek mysich. Z drugiej

strony działanie $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na iNKT zarówno ludzkie, jaki i mysie powodowało zwiększenie ekspresji IL4 (65).

2.4. Wpływ witaminy D na komórki NK

U ludzi zaobserwowano wpływ witaminy D na regulację funkcji komórek NK. U pacjentów dializowanych z zaburzoną syntezą $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, podobnie jak u pacjentów chorych na krzywicę hipofosfatemiczną, stwierdzono upośledzoną odpowiedź układu immunologicznego, w tym zaburzenia aktywności komórek NK. Poprawa funkcji następowała po suplementacji $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ albo $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$. Ponadto u pacjentów w podeszłym wieku aktywność komórek NK koreluje ze stężeniem $25(\text{OH})\text{D}_3$ (66, 67). W badaniach *in vitro* potwierdzono zależny od dawki wzrost aktywności badanych komórek, jednak bez wpływu na ich proliferację (68, 69). Podobnie jak w przypadku limfocytów T, dodanie monocytów do medium powodowało zmniejszenie aktywności komórek NK pod wpływem $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (69-71).

2.5. Wpływ witaminy D na limfocyty B

Witamina D nie ma wpływu na spoczynkowe limfocyty B. Obecność VDR stwierdzono w jedyne w aktywowanych komórkach (36). Co ciekawe aktywacja limfocytów B powoduje również wzrost ekspresji 1α -hydroksylazy, co prowadzi do aktywacji $25(\text{OH})\text{D}_3$ (37). W badaniach *in vitro* kalcytriol wpływa na zmniejszenie proliferacji aktywowanych limfocytów B oraz nasila ich apoptozę. Po stymulacji naiwnych komórek typu B w obecności aktywnej postaci witaminy D_3 następowało zahamowanie różnicowania limfocytów w kierunku komórek plazmatycznych oraz komórek pamięci. Skutkowało to zmniejszeniem syntezy immunoglobulin w klasach IgA, IgM oraz IgG (72). Wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wydzielanie IgE pozostaje niejasny. W badaniach *in vivo* potwierdzono zmniejszenie liczby komórek B pamięci oraz produkcję przeciwciał przeciwko ds-DNA u pacjentów z SLE (58).

Niedawno opisana nowa subpopulacja komórek B regulatorowych (Breg) produkuje IL10. Dodatek $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ do medium aktywowanych komórek Breg powoduje zwiększenie wydzielania IL10 (37).

2.6. Witamina D w chorobach autoimmunologicznych

Stwardnienie rozsiane

Istota choroby polega na autoimmunologicznym procesie demielinizacyjnym ośrodkowego układu nerwowego. Analiza epidemiologiczna wykazała, że częstość występowania stwardnienia rozsianego (MS – ang. *multiple sclerosis*) pozytywnie koreluje wraz ze wzrostem szerokości geograficznej. Im bliżej równika, tym ekspozycja skóry na słońce jest większa i tym mniejsza jest zachorowalność (52). W patogenezie choroby główną rolę odgrywają limfocyty Th1 i Th17, które pozostają pod negatywną kontrolą kalcytriolu (59).

W ludzi niedobór witaminy D jest jednym z czynników ryzyka wystąpienia MS. Odpowiada też za zwiększoną aktywność choroby w porównaniu z pacjentami z optymalnym jej stężeniem (73). Jednak w innym badaniu nie zauważono takiej zależności (59). Ponadto wykazano, że witamina D bierze udział w procesie mielinizacji i remielinizacji poprzez wpływ na komórki progenitorowe oligodendrocytów (74).

Nieswoiste zapalenia jelit

Nieswoiste zapalenia jelit (IBD – ang. *inflammatory bowel disease*) należą do grupy chorób autoimmunologicznych. Zauważono również, że częstość występowania choroby Leśniowskiego – Crohna zwiększa się wraz ze wzrostem odległości od równika (75). Ponadto większe nasilenie aktywności procesu zapalnego jest notowane w miesiącach zimowych i wczesnowiosennych, gdy stężenie witaminy D₃ jest najniższe (76). Obserwacje te kolejny raz podkreślają istotną rolę witaminy D₃ w patogenezie wyżej wymienionej choroby.

Toczeń rumieniowaty układowy

SLE jest chorobą z autoimmunizacji, w patogenezie której biorą udział limfocyty T i B oraz nadmiernie aktywne DC. Zwiększona ilość komórek Th17 a zmniejszona Treg jest potrzebna, by zainicjować oraz podtrzymać sekrecję autoprzeciwciał przez komórki B. W 2010 roku zwrócono uwagę na zależność między większą aktywnością SLE a niedoborem witaminy D (31, 77, 78). Jednak nie wszystkie badania prowadziły do takich wniosków (79).

Cukrzyca typu 1

Do rozwoju cukrzycy typu 1 dochodzi gdy autoreaktywne limfocyty Tc przenikną do wysp Langerhansa i zniszczą komórki β, prowadząc do niedostatecznej produkcji insuliny przez narząd. Proces aktywacji limfocytów Tc jest związany z wydzielaniem IL12 przez komórki Th1 (80).

Witamina D korzystnie oddziałuje na komórki β wysp trzustki w dwojaki sposób: bezpośredni oraz pośredni. Bezpośrednie działanie jest możliwe dzięki ekspresji VDR. Połączenie $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ z VDR stanowi stymulujący czynnik transkrypcyjny dla genu insuliny (23). Dodatkowo komórki β produkują 1α -hydroksylazę, co umożliwia autokrynną kontrolę przy prawidłowym stężeniu $25(\text{OH})\text{D}_3$ (81). Działanie pośrednie odbywa się poprzez wpływ witaminy D na równowagę pomiędzy wewnątrzkomórkowym a zewnątrzkomórkowym stężeniem wapnia oraz promowaniem dojrzewania limfocytów Th w kierunku Th2 (82).

Reumatoidalne zapalenie stawów

W patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) biorą udział między innymi nadmiernie aktywowane limfocyty B oraz limfocyty Th17, których liczba jest zwiększona. Zaburzenia układu immunologicznego prowadzą do przewlekłego zapalenia tkanki łącznej, w szczególności zapalenia błony maziowej oraz przerostu warstwy podściółkowej (83, 84).

W 1997 roku stwierdzono obecność VDR w chondrocytach i synowocytach (85). Do tej pory przeprowadzono szereg badań, w których dowiedziono korelację między nasileniem procesu chorobowego a niedoborem $25(\text{OH})\text{D}_3$ (86, 87). Wiadomo, że niedobór witaminy D u pacjentów z RZS jest częstszy i bardziej nasilony niż w populacji ogólnej (88). Jednak należy zwrócić uwagę, że nasilające się objawy RZS mogą powodować pogłębianie się niedoboru poprzez ograniczenie aktywności ruchowej pacjentów i zmniejszenie ekspozycji na światło słoneczne. Stąd też część autorów rozważa, czy niedobór witaminy D jest przyczyną, czy też skutkiem RZS (89, 90).

Łuszczyca

Przyspieszenie procesu keratynizacji z około 40 dni do zaledwie kilku jest mediowane między innymi poprzez IL22. Z kolei lokalne podrażnienie i zapalenie u osób predysponowanych genetycznie powoduje odpowiedź komórek Th17 (91). W związku z tym, że niedobór witaminy D_3 wiąże się ze wzrostem liczby limfocytów Th17 i Th22, zapobieganie hipowitaminozie w tej chorobie jest szczególnie ważne (90).

Twardzina

W rozwoju twardziny (akumulacji kolagenu w tkankach) główną rolę odgrywają fibroblasty. Jednak na wczesnym etapie choroby limfocyty Th1 i Th17 promują przewlekły proces zapalny, a następnie zaczynają przeważać komórki Th2 (90). Badania stężenia witaminy D u chorych z twardziną wykazały, że większość pacjentów miała niedostateczne

stężenie kalcydiolu. Dodatkowo hipowitaminoza D korelowała z nasileniem procesu chorobowego (92).

2.7. Witamina D w chorobach nowotworowych

Z uwagi na potencjalne działanie przeciwnowotworowe (zahamowanie proliferacji, angiogenezy, nasilenie apoptozy oraz zmniejszanie potencjału przerzutowania (93)), witamina D jest rozważana jako adiuwant terapii nowotworów z uwagi na dobrą tolerancję, dostępność oraz niską cenę (94). Dziś wydaje się, że największy związek występuje pomiędzy niedoborem witaminy D a rakiem jelita grubego, piersi, prostaty oraz czerniakiem (93, 95).

Wyższe stężenie witaminy D₃ wiązało się z a) obniżeniem śmiertelności u pacjentów z rakiem jelita grubego i piersi (33); b) zmniejszoną progresją nowotworu piersi i skóry (33); c) zmniejszonym potencjałem tworzenia przerzutów w raku piersi (96); d) lepszą prognozą przeżywalności w raku prostaty (97).

W patogenezie czerniaka od lat zwracano uwagę na niekorzystny wpływ oparzeń słonecznych. Tymczasem zaobserwowano wzrost częstości zachorowań wraz ze zwiększaniem szerokości geograficznej – co wiąże się ze zmniejszoną produkcją witaminy D₃ w skórze (98). Ponadto stwierdzono, że niedobór witaminy D w czasie rozpoznania czerniaka wiąże się z wyższym zaawansowaniem nowotworu w skali Breslowa (99).

Obecnie prowadzone są badania kliniczne z zastosowaniem analogów witaminy D – EB1089, inecalcitolem oraz paricalcitolem. Analogi te wiążą się z VDR i go pobudzają, ale mają zmniejszony potencjał hiperkalcemiczny (95).

3. Choroby autoimmunologiczne tarczycy

3.1. Informacje ogólne

Do chorób tarczycy z autoimmunizacji zalicza się najczęściej występujące, przewlekłe limfocytowe zapalenie tarczycy (choroba Hashimoto) oraz chorobę Gravesa – Basedowa (100). Rzadziej występujące niebolesne (ciche) zapalenie tarczycy i poporodowe zapalenie tarczycy są uważane za wariant choroby Hashimoto (101). Chorobę Riedla (zapalenie tarczycy z intensywnym włóknieniem gruczołu) część autorów uważa za wariant choroby Hashimoto, inni natomiast wliczają ją do grupy chorób tkanki łącznej (101-104). Etiologię autoimmunologiczną stwierdza się również w rzadko występującym, przewlekłym zapaleniu tarczycy wywołanym interferonem alfa, gdzie u predysponowanych genetycznie osób lek ten wywołuje produkcję przeciwciał przeciwtarczycowych (105, 106).

Poniżej zostanie przedstawiona charakterystyka przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy. Pozostałe postaci nie są przedmiotem badania, a ich dokładny opis wykracza poza ramy niniejszej rozprawy.

3.2. Przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy

Przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy (AIT – ang. *autoimmune thyroiditis*) nazywane jest również przewlekłym limfocytowym zapaleniem tarczycy lub, od nazwiska odkrywcy, chorobą Hashimoto. Japoński chirurg – Hakaru Hashimoto, w 1912 roku jako pierwszy opisał w gruczole tarczowym rozlane nacieki limfocytarne, atrofię mięszu, włóknienie oraz metaplastję komórek pęcherzykowych w komórki oksyfilne u osób, u których współwystępowało wole wraz z niedoczynnością tarczycy (107).

Epidemiologia

AIT jest najczęstszą przyczyną niedoczynności tarczycy na obszarach o wystarczającej podaży jodu w diecie (101). Stanowi również najczęstszy rodzaj zapalenia tarczycy. Zapadalność ocenia się na 0,3 – 1,5 przypadków na 1000 osób w skali roku (108, 109). W badaniach autopsyjnych morfologiczne zmiany charakterystyczne dla choroby stwierdza się u 14 – 17% badanych (110). Częstość występowania AIT rośnie z wiekiem. Występowanie choroby u obu płci nie jest równomierne. Wśród chorych dominują kobiety od 4:1 do 15:1 w stosunku do mężczyzn (108, 109, 111). Również rasa odgrywa znaczenie – częściej chorują osoby rasy białej, rzadziej osoby rasy czarnej czy żółtej (112).

Czynniki genetyczne

Już w 1963 roku udowodniono rodzinne występowanie AIT i podejrzewano predyspozycję genetyczną o nieznanym typie dziedziczenia (113). Mimo wielu lat intensywnych badań i bardziej zaawansowanych technologicznie możliwości diagnostycznych, tło genetyczne AIT nie zostało w pełni wyjaśnione. Pojawiają się natomiast liczne prace dokumentujące nowe polimorfizmy genowe, które wpływają na zwiększenie częstości występowania choroby.

Czynniki genetyczne można podzielić na dwie grupy. Zespoły chorobowe wywołane mutacją jednego genu, w których jedną ze składowych jest AIT oraz polimorfizmy różnych genów, które zwiększają częstość występowania omawianego typu zapalenia. Do pierwszej grupy należą mutacje genu *AIRE* (ang. *autoimmune regulator*) (114) i genu *FOXP3* (115) do drugiej między innymi sprzężenia z określonymi allelami antygenów zgodności tkankowej HLA (116, 117).

Charakterystykę czynników genetycznych zwiększających występowanie AIT przedstawiono w **tabeli 1**.

Tabela 1. Geny, których polimorfizmy zwiększają częstość występowania AIT.

Podział ze względu na funkcję	Gen	Funkcja
Geny głównego układu zgodności tkankowej (HLA)	<i>HLA klasy II</i>	HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5 prezentacja autoantygenów (HLA-DR3 największe ryzyko AIT) (116-118)
Geny związane z funkcją limfocytów T	<i>CLTA-4</i>	ang. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i> reguluje aktywację limfocytów T, wygasza odpowiedź immunologiczną, polimorfizmy prowadzą do wzrostu produkcji przeciwciał przeciwtarczycowych (117, 119)
	<i>PTPN22</i>	ang. <i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22</i> inhibitor aktywacji limfocytów T (116, 117)
	<i>FcRL3</i>	ang. <i>crystallizable fragment receptor homolog 3</i> aktywuje limfocyty T, polimorfizmy zwiększają produkcję autoprzeciwciał (117)
	<i>TGFβ1</i>	ang. <i>transforming growth factor β 1</i> wydzielany przez komórki T regulatorowe by wyciszyć odpowiedź zapalną (120)
	<i>CD40</i>	koduje koreceptor dla komórek prezentujących antygen, hamuje aktywację limfocytów T, wspomaga dojrzewanie i różnicowanie limfocytów B (117)
	<i>CD25=IL2RA</i>	koduje podjednostkę α receptora interleukiny 2 odgrywa rolę w obwodowej tolerancji na autoantygeny (118)
	<i>IL17F</i>	koduje interleukinę 17F ma działanie prozapalne (121)
Inne geny związane z odpowiedzią immunologiczną	<i>CD26</i>	koduje receptor aktywujący komórki NK (122)
	<i>IL12B</i>	koduje podjednostkę β interleukiny 12 aktywującą komórki NK (121)
	<i>TNFα</i>	ang. <i>tumor necrosis factor α</i> cytokina prozapalna produkowaną przez wiele typów komórek układu immunologicznego (123)
	<i>IL6</i>	koduje prozapalną interleukinę 6 (IL6) (123)
	<i>BCL2L15</i>	ang. <i>B-cell lymphoma 2-like protein 15</i> (116)
	<i>MAGI3</i>	ang. <i>membrane associated guanylate kinase WW and PDZ domain containing 3</i> (116)
	<i>PHTF1</i>	ang. <i>putative homeodomain transcription factor 1</i> (116)
Geny specyficzne dla tarczycy	<i>TG</i>	gen kodujący tyreoglobulinę (117, 124)
	<i>GPR103</i>	ang. <i>G protein-coupled receptor 103</i> modulacja odpowiedzi immunologicznej (116)

Nie tylko polimorfizmy poszczególnych genów mogą zwiększać częstość występowania AIT. Na patogenezę mogą mieć również wpływ cechy epigenetyczne, które skupiają coraz większą uwagę naukowców. U pacjentów z AIT wykazano niedostateczną metylację genów zaangażowanych w regulację odpowiedzi immunologicznej, między innymi genu *CTLA4* (125). Prowadzone są obecnie badania w zakresie oceny modyfikacji histonów

oraz wpływu niekodującego RNA na regulację funkcji układu odpornościowego. Udowodniono zmniejszenie stężenia kilku rodzajów miRNA w tarczycy osób z AIT. W patomechanizmie rozważa się również inaktywację chromosomu X, co może tłumaczyć większą częstość występowania chorób autoimmunologicznych u kobiet (125).

Stwierdzono też częstsze występowanie AIT z niektórymi aberracjami chromosomowymi takimi jak zespół Downa, zespół Turnera oraz zespół Klinefeltera. U pacjentów z trisomią 21. chromosomu dość często występuje hipotrofia grasicy. Wykazano ponadto zmniejszoną ekspresję genu *AIRE* (126).

Pozagenetyczne czynniki ryzyka zachorowania na autoimmunologiczne zapalenie tarczycy

Dotychczas poznano wiele czynników środowiskowych, które zwiększają częstość występowania AIT u osób na nie narażonych (**tabela 2**). Wydaje się, że odpowiadają one za coraz większą częstość AIT. Na Sycylii, przez ostatnie 30 lat zaobserwowano 10-krotny wzrost zachorowań (127). Podobnie w Austrii w tym samym czasie wystąpił 8-krotny wzrost rozpoznań AIT w preparatach pooperacyjnych (128).

Tabela 2. Pozagenetyczne czynniki ryzyka zachorowania na AIT.

Czynniki egzystencjonalne	Czynniki środowiskowe
wielorództwo warunki higieniczne wzrost zamożności	nadmiar jodu w diecie infekcje wirusowe i bakteryjne niedobór selenu promieniowanie jonizujące w niskich dawkach toksyny Leki: - interferon α - alemtuzumab, ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab - inhibitory kinazy tyrozynowej - lit - amiodaron

Niewątpliwie częstość występowania AIT rośnie z wiekiem oraz występuje częściej u płci żeńskiej. Wydaje się, że przebyta ciąża zwiększa ryzyko AITD (121). Kondrashova i współpracownicy potwierdzili też sprawdzenie się teorii higienicznej w tej chorobie (129). Wzrost zamożności społeczeństw i powiązane z tym lepsze warunki higieniczne życia oraz dieta również zwiększają zachorowalność (121).

Wśród pacjentów leczonych interferonem α ryzyko wystąpienia AIT było większe niż populacyjne. Zaobserwowana zależność w szczególności dotyczyła pacjentów z polimorfizmem genu CTLA-4 (105, 119). Z drugiej strony samo zakażenie niektórymi chorobami zakaźnymi (wirusy WZW typu C, CMV, HCV) lub bakterią *Yersinia enterocolica* (w wyniku tak zwanej mimikry antygenowej) powoduje podwyższenie ryzyka zachorowania na AIT (121, 130). Prawdopodobnie niektóre przeciwciała monoklonalne oraz inhibitory kinazy tyrozynowej także przyczyniają się do wzrostu zachorowań (121, 131), podobnie jak lit i amiodaron (101).

Przeprowadzono kilka badań odnośnie wpływu palenia tytoniu oraz spożywania alkoholu na przebieg AIT. Wydaje się, że wśród palaczy tytoniu niedoczynność tarczycy rozwija się rzadziej wśród osób z obecnymi przeciwciałami anti-TPO i anti-TG (132). Podobne wnioski dotyczą alkoholu wypijanych w małych dawkach (133).

O ile niedobór jodu w diecie prowadzi do wzrostu częstości występowania wola, o tyle nadmiar jodu sprzyja występowaniu AIT. Kolejnym mikroelementem, który budzi ostatnio duże zainteresowanie naukowców, jest selen. Niedobór selenu w diecie również sprzyja rozwojowi choroby. Istnieją przesłanki, że niedobór witaminy D może zwiększać ryzyko AIT (133). Z drugiej strony deficyt witaminy D może być objawem towarzyszącym chorobie (134, 135).

Zarówno narażenie na promieniowanie jonizujące w wywiadzie, jak i na toksyny zwiększają zachorowalność na AIT. Stwierdzono większą częstość występowania choroby u osób narażonych na pestycydy oraz mieszkańców okolic zakładów petrochemicznych (121).

Patogeneza

Patogeneza AIT nie została w pełni wyjaśniona. Uważa się, że czynniki środowiskowe mogą wywołać chorobę u osób predysponowanych genetycznie (122). W ich obecności może dojść do błędnego rozpoznania antygenów komórek tarczycy jako obcych (136). W proces przewlekłego zapalenia zaangażowana jest odpowiedź komórkowa i humoralna.

Uważa się, że powstanie choroby zależy od wystąpienia nieprawidłowości funkcji układu immunologicznego, w którym główną rolę odgrywają limfocyty Th1. Aktywują one limfocyty Tc oraz komórki NK, które odpowiadają za niszczenie komórek pęcherzykowych. Ponadto limfocyty Th1 wydzielają cytokiny prowadzące do apoptozy tyreocytów (101). W wyciszaniu odpowiedzi immunologicznej kluczową rolę odgrywają limfocyty Treg. Wydzielają one czynniki przeciwzapalne takie jak TGF β i IL10, jednak w AIT wykazują zmniejszoną aktywność (121).

Powstawanie przeciwciał przeciwarczycowych skierowanych przeciwko tyreoperoksydazie (anty-TPO) i przeciwko tyreoglobulinie (anty-TG), a w rzadkich przypadkach również przeciwciał przeciwko pendrynie, symporterowi sodowo-jodowemu (NIS – ang. *sodium/iodide symporter*) czy przeciwciał blokujących receptor TSH, wynika najprawdopodobniej z uwolnienia zawartości komórek tarczycy do przestrzeni międzykomórkowej i jest bardziej markerem AIT aniżeli przyczyną destrukcji mięszu. W patogenezie choroby mechanizmy odpowiedzi humoralnej mają dalece mniejsze znaczenie (101, 108).

Obraz kliniczny

AIT ma przebieg przewlekły i postępujący. Rozróżnia się dwie postaci kliniczne choroby: z wolem oraz postać zanikową. W początkowym okresie trwania choroby niewielki stopień zniszczenia mięszu gruczołu pozwala na zachowanie eutyreozy. W miarę postępu choroby u większości pacjentów rozwija się niedoczynność tarczycy. W wyjątkowych przypadkach gwałtownej destrukcji mięszu mogą ujawnić się objawy sugerujące nadczynność gruczołu. Nie są one skutkiem nadmiernej produkcji hormonów tarczycy, a jedynie ich niekontrolowanym uwolnieniem z uszkodzonej struktury gruczołu. Opisane zjawisko określa się terminem *hashitoxicosis* i jest przemijające (101, 108).

Diagnostyka

Do rozpoznania AIT konieczne jest stwierdzenie podwyższonego stężenia przeciwciał anty-TPO i/lub anty-TG oraz charakterystycznego obrazu ultrasonograficznego tarczycy. Przeciwciała anty-TPO występują u około 95% chorych i są najczulszym wskaźnikiem przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy. Przeciwciała anty-TG są stwierdzane w około 80% przypadków. Zazwyczaj występują jako pierwsze, a ich stężenie obniża się z czasem trwania choroby (101). Stężenia anty-TPO i anty-TG nie wpływają na nasilenie niedoczynności tarczycy, jednak najnowsze badania wykazały, że negatywnie korelują z jakością życia pacjentów (137). W badaniu ultrasonograficznym charakterystyczne jest obniżenie echogeniczności mięszu tarczycy oraz pojawienie się licznych pasm hiperechogenicznych, które odzwierciedlają zwłóknienie gruczołu. Opisywane cechy ultrasonograficzne nasilają się wraz z czasem trwania choroby. Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa może ujawnić obecność nacieku z komórek limfocytarnych. W badaniu morfologicznym powierzchnia przekroju gruczołu jest blada, koloru szarobrazowego i o wzmożonej spoistości. W obrazie mikroskopowym widoczne jest rozlane nacieczenie jednojądrzastymi komórkami zapalnymi. W tarczycy obecne są małe limfocyty, plazmocyty

oraz wtórne grudki chłonne z dużymi ośrodkami namnażania. Stwierdza się zwykle zanikowe pęcherzyki tarczycy otoczone komórkami nabłonkowymi z obfitą, kwasochłonną i ziarnistą (zawierającą liczne mitochondria) cytoplazmą. Komórki te nazywane są oksyfilnymi lub komórkami Hürthla. Są to prawidłowe, sześciennie komórki pęcherzykowe, które w odpowiedzi na bodziec uszkodzający zostały zmienione metaplastycznie. Obserwuje się również rozrost śródmiąższowej tkanki łącznej. W części przypadków tarczycy ma zmniejszoną objętość w wyniku przeważających procesów włóknienia gruczołu (110).

Leczenie i rokowanie

Nie ma skutecznego leczenia AIT. Stosuje się jedynie leczenie objawowe – substytucję L-tyroksyną (L-T4) w razie wystąpienia niedoczynności tarczycy zarówno objawowej, jak i subklinicznej (110).

Choroby współistniejące

Z uwagi na udział autoimmunizacji w rozwoju przewlekłego limfocytowego zapalenia tarczycy, chorobie tej mogą towarzyszyć inne schorzenia o podobnym podłożu. Obserwuje się współwystępowanie choroby Hashimoto z reumatoidalnym zapaleniem stawów, zespołem Sjögrena, toczeniem rumieniowatym układowym, łuszczycą, chorobą trzewną, anemią złośliwą czy innymi chorobami z autoimmunizacji (138). AIT jest składową autoimmunologicznego zespołu niedoczynności wielogruzołowej. W APS typu I w 5% przypadków obserwowane jest AIT, które towarzyszy pierwotnej niedoczynności przytarczyc i nadnerczy oraz kandydozie skóry i błon śluzowych (139, 140). APS typu II występuje między innymi pod postacią zespołu Schmidta, który charakteryzuje się współwystępowaniem pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy oraz AIT lub pod postacią zespołu Carpentera, gdy pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy i AIT towarzyszy cukrzyca typu I (141). W APS II AIT jest diagnozowana w 70% przypadków (139).

4. Dojrzewanie limfocytów T oraz charakterystyka wybranych komórek układu odpornościowego

Wszystkie komórki układu odpornościowego pochodzą z krwiotwórczej komórki macierzystej. W szpiku kostnym dochodzi do jej proliferacji i dojrzewania w kierunku komórek macierzystych mielopoety oraz komórek macierzystych limfopoety. Podczas procesu mielopoety powstają erytrocyty, trombocyty, monocyty, neutrofile, eozynofile, bazofile oraz mastocyty. Natomiast komórka macierzysta limfopoety daje początek

limfocytom B, T oraz komórkom NK. Komórki dendrytyczne powstają zarówno w przebiegu mielopoezy (typ I), jak i limfopoezy (typ II) (142).

Limfocyty B uwalniane ze szpiku kostnego są w pełni dojrzałe i gotowe do podjęcia swoich funkcji. Natomiast prekursorzy komórek T, które powstają bezpośrednio z komórki macierzystej limfopoezy, migrują do grasicy i tam ulegają dalszej proliferacji i różnicowaniu. Dojrzałe limfocyty B i T stają się komórkami immunokompetentnymi – zdolnymi do rozpoznawania swoistych antygenów (142, 143). W niniejszej pracy komórki te różnicowano w cytometrii przepływowej na podstawie obecności antygenów CD3 i CD19 – limfocyty T jako komórki CD3+ CD19-, natomiast limfocyty B jako komórki CD3- CD19+.

Grasica jest narządem limfopoetycznym zlokalizowanym w górnej części śródpiersia tuż za mostkiem. Jest zbudowana z dwóch płatów, które w swojej strukturze posiadają korę oraz rdzeń. Największą aktywność oraz wielkość grasicy stwierdza się w okresie noworodkowym oraz przedpokwitaniowym. Później następuje involucja narządu (144).

Grasicę zasiedlają migrujące ze szpiku prekursorzy komórek T. W fazie wczesnej rozwoju w namnażających się komórkach dochodzi do rearanzacji genów receptora komórki T (TCR – ang. *T-cell receptor*). Dzięki temu powstają komórki zawierające TCR wrażliwy na dużą liczbę różnych antygenów. Kolejnym etapem jest ekspresja antygenów różnicujących CD4 oraz CD8 (CD – ang. *cluster differentiation*). Wówczas komórki stają się podwójnie pozytywnymi (DP – ang. *double positive*) limfocytami T (145).

Późna faza dojrzewania limfocytów T obejmuje selekcję pozytywną i negatywną. Przez selekcję pozytywną przechodzą komórki, zdolne do rozpoznawania antygeny związane z MHC. Proces ten ma na celu wyłonić komórki z prawidłowo zbudowanym TCR. W czasie selekcji pozytywnej dochodzi również do restrykcji MHC – gdy dojrzewający DP limfocyt rozpozna antygen związany z MHC klasy I, wówczas zachowuje antygen powierzchniowy CD8, a traci CD4 i staje się prekursorem dojrzałej komórki cytotoksycznej. Przeciwnie dzieje się, gdy komórka reaguje z antygenem związanym z MHC klasy II, wówczas powstaje komórka CD4+ CD8-, która rozwija się w kierunku limfocyta T pomocniczego. Po zakończonym procesie restrykcji MHC większość komórek staje się pojedynczo pozytywna (SP – ang. *single positive*). Jedynie nieliczne zachowują zarówno CD4 i CD8. Następnie selekcja negatywna doprowadza do apoptozy komórek, które reagują na antygeny własne organizmu. Prawidłowy przebieg tego etapu jest szczególnie istotny dla zapobiegania występowania chorób z autoimmunizacji. Precyzyjnie regulowana selekcja pozytywna i negatywna sprawia, że około 95 – 99% tymocytów podlega apoptozie (145, 146).

U części limfocytów CD4+, które w czasie selekcji negatywnej wykazywały zbyt duże powinowactwo do reagowania na autoantygeny, dochodzi do ekspresji CD25 oraz czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Dają one początek limfocytom Treg (145).

Doniesienia naukowe ostatnich kilku lat potwierdzają, że dojrzewanie limfocytów to proces bardzo złożony, a limfocyty T opuszczają grasicę jako niedojrzałe komórki w postaci **wczesnych emigrantów grasiczych** (RTE – ang. *recent thymic emigrants*). Terminem tym określa się niedojrzałe limfocyty T CD4+ oraz T CD8+, które przebyły jedynie kilka podziałów komórkowych po opuszczeniu grasicy (147, 148). Komórki, które rezydują w grasicy, wykazują ekspresję CD127, ale nie CD132. Zatem limfocyty CD127+ CD132- znalezione w krwi obwodowej to RTE (149). Pomiar liczby RTE pozwala na ocenę wyrzutu grasiczego, który określa gotowość nabytej odpowiedzi immunologicznej do walki z patogenami. Uważa się, że stosunek liczby RTE do całkowitej liczby tymocytów jest stały przez całe życie. Jednakże wraz z involucją grasicy spada ich bezwzględna liczba (150). Z wiekiem spada również stosunek RTE do limfocytów T (146). Co ciekawe stwierdzono zwiększoną migrację RTE do tarczycy objętej zapaleniem w wyniku autoimmunizacji (151).

RTE, dojrzewając we krwi obwodowej oraz we wtórnych narządach limfatycznych, podlegają dojrzewaniu w limfocyty T0. Porównując obie subpopulacje komórek stwierdzono, że po pobudzeniu antygenem RTE mają mniejszą zdolność do proliferacji, produkują mniejsze ilości IL2, IL4 oraz IFN γ , a także wykazują niższą ekspresję CD25 (150).

Limfocyty Th0 są to komórki o wieloletnim czasie przeżycia, które nie zetknęły się ze swoistym dla nich antygenem. Podlegają stałej migracji pomiędzy krwią a obwodowymi narządami limfatycznymi w celu poszukiwania ewentualnego zagrożenia. Wykazują one na swojej powierzchni ekspresję między innymi CD45RA i CD27 (152).

Kontakt limfocyta Th0 z swoistym antygenem stymuluje aktywność mitotyczną pobudzonej komórki i powoduje klonalne namnażanie limfocytów zdolnych rozpoznać i odpowiedzieć na dany antygen (144). Z komórki Th0 różnicują się komórki efektorowe (153). Po opanowaniu zagrożenia – wyeliminowaniu antygeny, większość aktywowanych komórek ulega apoptozie. Jedynie nieliczne zostają przekształcone do komórek pamięci, co pozwala na szybszą i bardziej efektywną reakcję w razie ponownej infekcji (144).

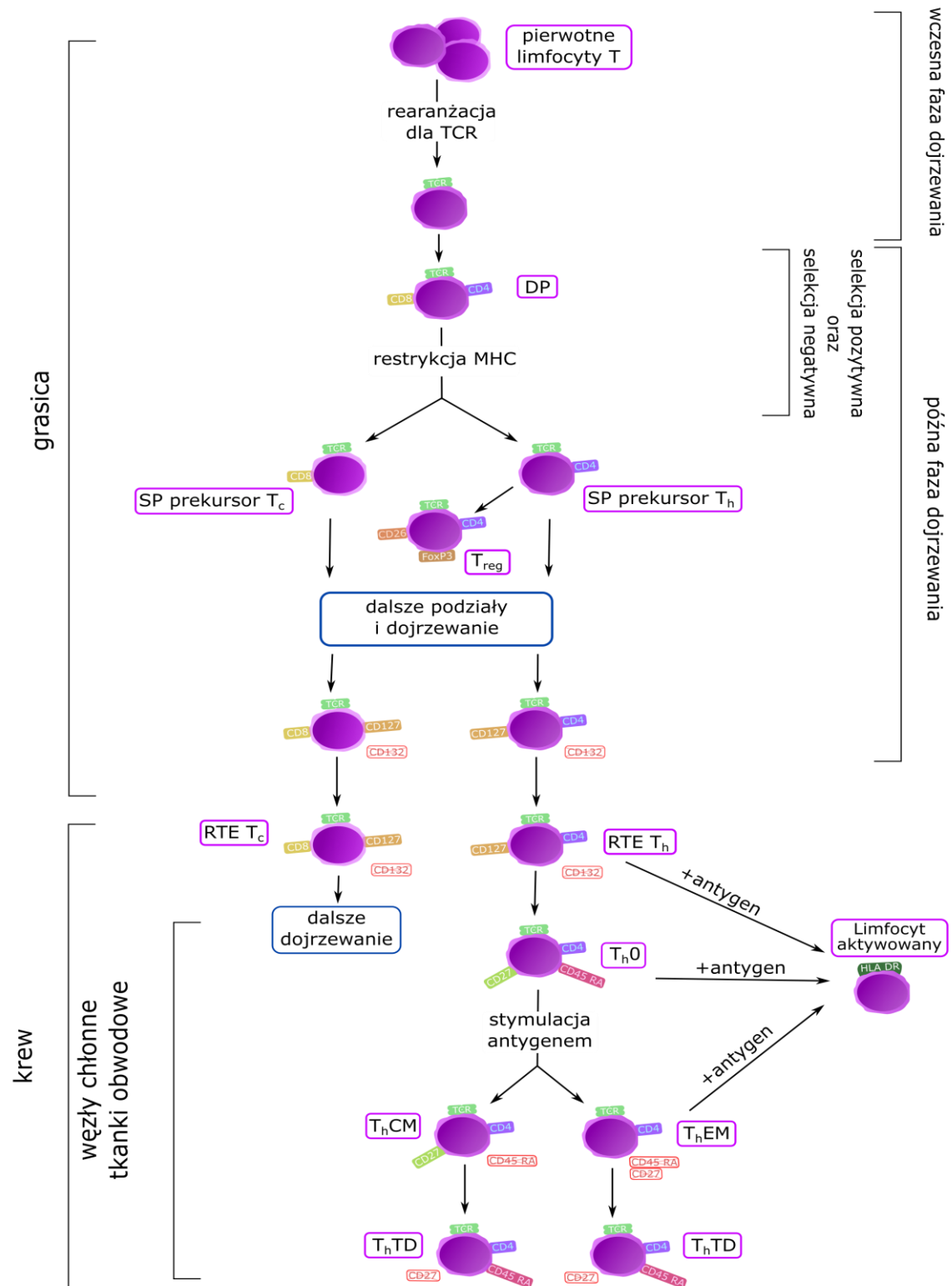
Komórki CD4+ efektorowe oraz komórki pamięci wykazują ekspresję CD45R0. Migrują one po całym organizmie. Szczególnie często można je znaleźć w tkankach obwodowych, gdzie istnieje duże ryzyko ponownego wniknięcia patogenu na przykład błony śluzowe (153). W celu rozróżnienia tych dwóch subpopulacji stosuje się przeciwciała przeciwko receptorowi chemokiny 7 (CCR7 – ang. *chemokine receptor 7*). Komórki

efektorowe CCR7- reagują szybko na kontakt z antygenem produkcją cytokin i produkcją perforyn. Komórki pamięci CCR7+ nie prezentują funkcji efektorowych, jednak po pobudzeniu swoistym antygenem mogą różnicować się w komórki efektorowe CCR7-. Komórki efektorowe zostały przez Sallusto i współpracowników nazwane **limfocytami Th pamięci efektorowymi** (Th EM – ang. *effector memory T helper cells*), a komórki pamięci **komórkami Th pamięci centralnej** (Th CM – ang. *central memory T helper cells*) (154). Komórki Th CM i Th EM można odróżnić również na podstawie obecności CD27. O ile Th CM wykazują ekspresję CD27, Th EM są CD27- (155).

Spośród opisywanych powyżej komórek, po kontakcie ze swoistym antygenem, RTE, limfocyty Th0 oraz Th EM i Th CM mogą stać się **aktywowanymi limfocytami Th**. Wówczas można je zidentyfikować na podstawie obecności antygeny HLA-DR, późnego markera aktywacji komórek T, na ich powierzchni (156). Limfocyty Th, które nie mają już możliwości odpowiedzi na swoisty antygen, są nazywane komórkami **Th terminalnie zróżnicowanymi** (Th TD – ang. *terminally differentiated T helper cells*) (157). Na **rycinie 3** przedstawiono schemat dojrzewania limfocytów Th.

Limfocyty B (CD3- CD19+) są zaangażowane w odpowiedź humoralną. Po poburzeniu swoistym antygenem namnażają się i różnicują się w plazmocyty oraz komórki pamięci. Plazmocyty produkują przeciwciała skierowane przeciwko obcym antygenom, lecz także mogą produkować przeciwciała skierowane przeciwko autoantygenom. Część komórek po aktywacji antygenem różnicuje się w kierunku komórek pamięci. Są one w stanie przetrwać w organizmie przez wiele lat, a w razie ponownej infekcji danym patogenem umożliwiają szybką produkcję swoistych przeciwciał. Wśród komórek B wyróżnia się kilka subpopulacji. Istnieje również subpopulacja komórek Breg. Oprócz produkcji przeciwciał ma ona zdolność do sekrecji TGF- β oraz IL10, co wpływa między innymi na indukcję Treg (158-160).

Limfocyty Th (CD3+ CD4+) wspomagają odpowiedź typu humoralnego i komórkowego zarówno poprzez oddziaływanie bezpośrednie, jak i poprzez produkowane cytokiny. Komórki Th ułatwiają aktywację, proliferację i różnicowanie limfocytów B oraz prekursorów komórek Tc, pobudzają również makrofagi. W zależności od profilu produkowanych cytokin dzielą się na różne subpopulacje. Limfocyty Th1 intensyfikują odpowiedź typu komórkowego, wydzielając IL12 co pobudza komórki Tc oraz produkując INF γ co pobudza makrofagi. Za wspomaganie odpowiedzi humoralnej odpowiadają limfocyty



Rycina 3. Dojrzewanie limfocytów T pomocniczych.

Legenda:

TRC – receptor limfocytów T
 DP – komórka podwójnie pozytywna
 SP – komórka pojedynczo pozytywna
 T_{reg} – limfocyt T regulatorowy

RTE – wczesny emigrant grasicy
 T_h – limfocyt T pomocniczy
 T_c – limfocyt T cytotoksyczny
 T_{h0} – limfocyt T pomocniczy naiwny

T_hCM – limfocyt T pomocniczy pamięci centralnej
 T_hEM – limfocyt T pomocniczy pamięci efektorowej
 T_hTD – limfocyt T pomocniczy terminalnie zróżnicowany

Th2. Produkują one czynniki wzrostu i różnicowania komórek B – IL4, IL5, IL10, IL13. Należy zaznaczyć, że produkcja $\text{INF}\gamma$ przez limfocyty Th1 wycisza reakcję komórek Th2, natomiast IL10 wytwarzana przez Th2 hamuje odpowiedź komórek Th1. Komórki Th17 i Th22 produkują odpowiednio IL17 oraz IL22 o działaniu prozapalnym (160). Prawidłowa liczba limfocytów CD4^+ wynosi $>500/\mu\text{l}$, a stosunek ilości komórek $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ wynosi około 2:1. Przy zmniejszonej liczbie mogą pojawiać się infekcje oportunistyczne (161).

Limfocyty Tc ($\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$) odgrywają kluczową rolę w zwalczaniu komórek nowotworowych oraz infekcji wewnątrzkomórkowymi patogenami. Komórki Tc mogą indukować apoptozę komórek w dwojaki sposób. Po połączeniu się z MHC komórki docelowej i rozpoznaniu obcego antygeny limfocyt Tc uwalnia enzymy proteolityczne, w tym perforyny i granzymy. Drugi szlak pobudzania jest zależny od reakcji cząsteczek nadrodziny TNF. Ponadto komórki Tc wydzielają cytokiny takie jak: $\text{INF}\gamma$, IL4, IL17. Limfocyty Tc mogą indukować apoptozę autoreaktywnych limfocytów T oraz B, a także eliminować nadmierną odpowiedź immunologiczną na obce antygeny (160).

Monocyty należą do grupy komórek żernych. Po opuszczeniu krwioobiegu stają się makrofagami (162). Do granulocytów zalicza się: **neutrofile**, które jako pierwsze komórki układu odpornościowego pojawiają się w miejscu infekcji i biorą udział w odpowiedzi immunologicznej komórkowej (163) oraz **eozyofile** i **bazofile**, które biorą udział w reakcji alergicznej na dany antygen (164, 165).

Komórki NK ($\text{CD3}^- \text{CD16/56}^+$) stanowią element odporności wrodzonej. Posiadają zdolność rozpoznawania nieprawidłowych antygenów prezentowanych przez komórki organizmu i eliminowania tych, które są zakażone wirusami, wewnątrzkomórkowymi bakteriami lub podległy przemianie nowotworowej. Ponadto komórki NK poprzez sekrecję cytokin i chemokin modulują odpowiedź nabytą. Na swojej powierzchni posiadają TLRs (ang. *Toll-like receptors*). Po pobudzeniu tego receptora komórki NK uwalniają duże ilości prozapalnego $\text{INF}\gamma$ oraz GM-CSF, co powoduje nasilenie reakcji zapalnej (166).

Komórki NKT ($\text{CD3}^+ \text{CD16/56}^+$) są elementem wrodzonej odporności. Są one silnym wczesnym źródłem cytokin takich jak IL4 oraz $\text{INF}\gamma$, w związku z tym posiadają wysoki potencjał w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej nabytej. Dodatkowo wykazują właściwości cytotoksyczne, w związku z czym biorą udział w zwalczaniu wewnątrzkomórkowych patogenów oraz komórek nowotworowych (167). U myszy z niedoborem komórek NKT zaobserwowano predyspozycję do częstszego występowania chorób z autoimmunizacji. Ponadto aktywacja opisywanych powyżej komórek w różnym

czasie od zadziałania bodźca wpływała pozytywnie lub negatywnie na przebieg choroby (168). Natomiast u ludzi z różnymi zaburzeniami autoimmunizacyjnymi obserwowano zmniejszenie aktywności oraz niedobór komórek NTK (34).

II. Uzasadnienie i cel pracy

Dostępne dane z piśmiennictwa sugerują wpływ stężenia witaminy D na różnicowanie i aktywność komórek obwodowego układu immunologicznego. Do tej pory nie opublikowano jednak zbyt wielu wyników badań dotyczących wpływu uzupełniania niedoborów tej witaminy na układ odpornościowy.

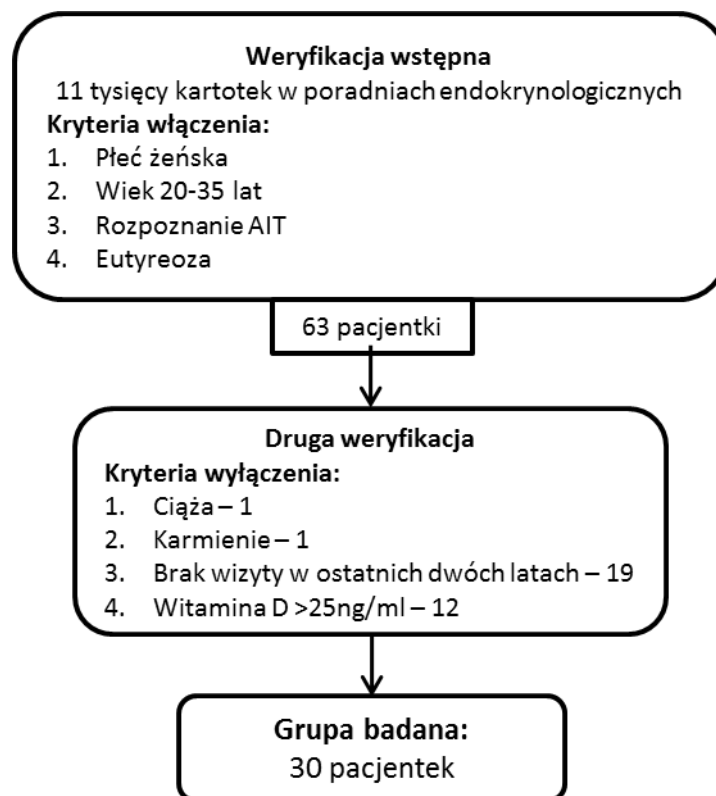
Celem pracy było:

1. Zbadanie, czy podawanie witaminy D wpływa na parametry odpowiedzi immunologicznej wrodzonej i nabytej u osób ze stwierdzonym niedoborem tej witaminy, zarówno zdrowych, jak i chorych z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy.
2. Wykazanie potencjalnych zmian parametrów odpowiedzi immunologicznej wrodzonej oraz nabytej w trakcie suplementacji witaminą D.
3. Ocena witaminy D jako czynnika regulującego odpowiedź immunologiczną.

III. Materiał i metodyka

1. Grupa badana

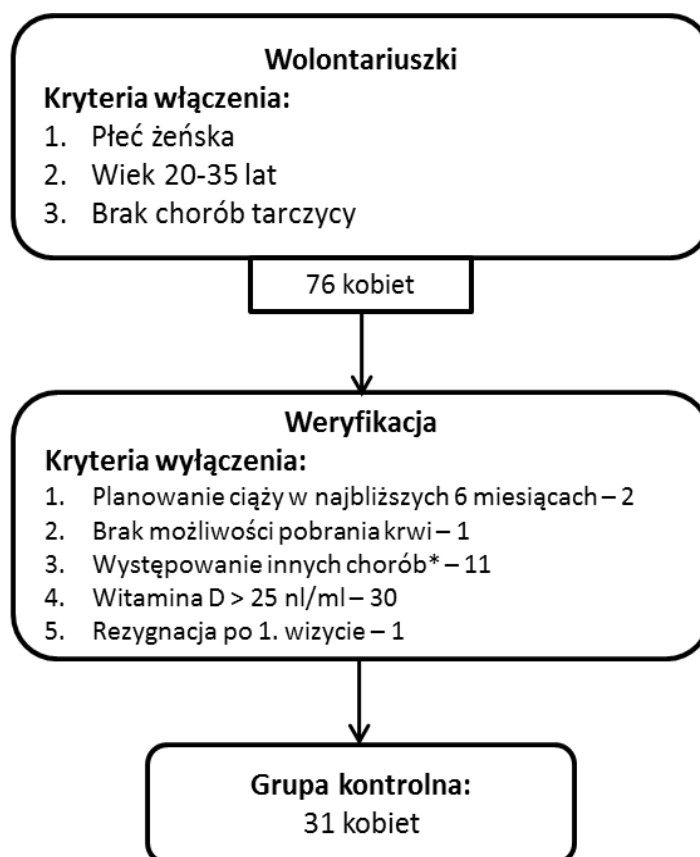
Do badania zakwalifikowano 30 chorych kobiet w wieku od 20. do 35. lat z rozpoznaniem autoimmunologicznego zapalenia tarczycy (AIT) postawionego na podstawie obecności podwyższonego stężenia przeciwciał przeciwciwotarczycowych (anty-TPO i/lub anty-TG) oraz charakterystycznego dla przewlekłego zapalenia tarczycy obrazu ultrasonograficznego (obniżona echogeniczność gruczołu). Wszystkie zakwalifikowane chore były w momencie kwalifikacji w stadium eutyreozy (stężenie tyreotropiny od 0,3 do 3,31 $\mu\text{U/ml}$). Większość z nich (23 = 76,7%) pobierała L-tyroksynę. Na **rycinie 4.** przedstawiony jest schemat kwalifikacji pacjentek do badania. Warunkiem kwalifikacji chorych z AIT do badania było stężenie witaminy 25(OH)D ≤ 25 ng/ml.



Rycina 4. Schemat kwalifikacji pacjentek do grupy AIT.

2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 31 zdrowych kobiet w wieku od 21. do 30. lat. Kwalifikację do badania przeprowadzono jak na **rycinie 5**. Warunkiem kwalifikacji do badania było stężenie witaminy 25(OH)D ≤ 25 ng/ml. Charakterystykę obu grup przedstawiono w **tabeli 3**.



*		
Atopowe zapalenie skóry – 1	Astma oskrzelowa – 2	Dysplazja włóknista szpiku – 1
Łuszczyca – 1	Alergia – leczenie – 1	Borelioza w trakcie antybiotykoterapii – 1
Zespół Sjögrena – 1	Zespół jelita drażliwego – 2	Trądzik w czasie antybiotykoterapii – 1

Rycina 5. Schemat kwalifikacji kobiet do grupy kontrolnej.

Tabela 3. Charakterystyka grupy z AIT i grupy kontrolnej.

Badany parametr	Grupa	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu U Manna-Whitneya
Wiek [lata]	AIT	27.53 +/- 4.14	27.50	20 - 35	*0.0073
	Kontrolna	24.74 +/- 2.85	25.00	21 - 30	
BMI [kg/m ²]	AIT	23.69 +/- 4.45	22.57	18.22 - 35.49	0.0523
	Kontrolna	21.89 +/- 3.86	20.82	16.85 - 32.37	
25(OH)D ₃ [ng/ml]	AIT	18.4 +/- 4.71	19.00	8-25	0.0810
	Kontrolna	20.55 +/- 3.35	21.00	14 - 25	
Wapń [mg/dl]	AIT	9.49 +/- 0.36	9.50	8.88 - 10.2	0.7400
	Kontrolna	9.51 +/- 0.31	9.54	8.9 - 10.04	
Fosfor [mg/dl]	AIT	3.54 +/- 0.41	3.58	2.66 - 4.3	*0.0029
	Kontrolna	3.88 +/- 0.77	3.93	1.27 - 5.32	
PTH [pg/ml]	AIT	58.5 +/- 31.32	56.00	16 - 179	0.2033
	Kontrolna	63.27 +/- 21.83	58.00	36 - 127	
TSH [μU/ml]	AIT	1.9 +/- 0.91	1.80	0.3 - 3.31	0.1335
	Kontrolna	2.27 +/- 0.83	2.09	0.88 - 3.99	
Legenda:					
SD – odchylenie standardowe			* – istotność statystyczna		

3. Badania biochemiczne

Badania biochemiczne przeprowadzono w Laboratorium Centralnym Szpitala Klinicznego im. Heliodora Święcickiego oraz w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Materiał biologiczny do badań stanowiła krew obwodowa (2,7 ml) pobierana do probówki z antykoagulantem (EDTA) – w celu badania morfologii krwi z rozmazem i stężenia parathormonu (PTH) oraz dodatkowo 2,7 ml do badań cytometrycznych. Pobierano także krew obwodową (4,9 ml) „na skrzep” do probówki bez antykoagulantu do pozostałych badań.

Badanie morfologii krwi z rozmazem wykonywano metodą automatyczną – aparat XN 1000 firmy SYSMEX. Stężenie tyreotropiny (TSH), przeciwciał przeciwko peroksydazie tarczycowej (anty-TPO) oraz przeciwciał przeciwko tyreoglobulinie (anty-TG) było badane metodą elektrochemiluminescencji (ECLIA) aparatem COBAS 6000 firmy ROCHE. W aparacie COBAS 6000 oznaczano również stężenie wapnia całkowitego oraz fosforanów we krwi.

Pozostałe badania: stężenie witaminy 25(OH)D, parathormonu oraz C – reaktywnego białka (CRP – ang. *C-reactive protein*) należącego do grupy białek ostrej fazy, wykonano

z wykorzystaniem metody ELISA w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych z użyciem komercyjnych zestawów opisanych w **tabeli 4**. Dolna granica czułości testu dla oznaczania PTH wynosiła 1,57 pg/ml a dla CRP 0,1 mg/l. Zestaw firmy EUROIMMUN Polska – Sp. z o. o. do oznaczania stężenia witaminy D pozwalał na równoległe oznaczenie 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃. Dolna granica czułości testu wynosiła 1,6 nl/ml.

Tabela 4. Wykaz zastosowanych zestawów do wykonywania badań metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
PTH Intact (human) ELISA Kit	DRG International	EIA-3645
CRP HS (C-reactive Protein) ELISA Kit	DRG International	EIA-3954
25-OH Vitamin D ELISA	EUROIMMUN Polska - Sp. z o. o.	EQ 6411-9601

U chorych z AIT i w grupie kontrolnej badania laboratoryjne przeprowadzono według harmonogramu zawartego w **tabeli 5**. Przedział czasowy pomiędzy rozpoczęciem suplementacji a trzecim miesiącem jest nazywany w pracy „pierwszym okresem badania”. Przedział czasowy pomiędzy trzecim a szóstym miesiącem suplementacji jest nazywany „drugim okresem badania”, natomiast przedział czasowy pomiędzy rozpoczęciem badania a szóstym miesiącem suplementacji „całym okresem badania”.

Tabela 5. Harmonogram wykonywania badań laboratoryjnych u chorych z AIT i w grupie kontrolnej.

Badania laboratoryjne	Miesiąc 0	Miesiąc 3	Miesiąc 6
Morfologia krwi z rozmazem met. automatyczną	1	1	1
25(OH)D	1	1	1
Wapń całkowity	1	1	1
Fosforany	1	-	-
PTH	1	-	-
TSH	1	-	1*
Przeciwciała anty-TPO	1	-	1*
Przeciwciała anty-TG	1	-	1*
CRP	1	-	1
Legenda:			
*tylko w grupie z AIT			

4. Badania immunologiczne

Do badań immunologicznych oceny subpopulacji leukocytów krwi obwodowej wykorzystano metodę cytometrii przepływowej krwi obwodowej. Metoda ta umożliwia ocenę składu procentowego leukocytów zawierających określone antygeny, przeciwko którym zostały użyte odpowiednie przeciwciała. Właściwy dobór przeciwciał pozwala różnicować leukocyty na subpopulacje, a różne rodzaje barwników, którymi są wyznakowane przeciwciała, umożliwiają ocenę występowania kilku antygenów podczas jednego badania. Równoległe wykonanie morfologii krwi z rozmazem umożliwiło przeliczenie składu procentowego na wartości liczbowe. Do analizy statystycznej wzięto pod uwagę wyniki badań przedstawione jako odsetek całkowitej liczby leukocytów oraz wartości liczbowe.

Celem oceny zmian odpowiedzi układu immunologicznego pod wpływem suplementacji witaminą D₃ badanie cytometrii przepływowej wykonywano u osób badanych trzykrotnie: w chwili włączenia do badania (potwierdzony niedobór witaminy D, rozpoczęcie suplementacji dnia następnego) oraz po trzech i sześciu miesiącach suplementacji.

Badania przeprowadzono w laboratorium Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Próbkę krwi dostarczano nie później niż cztery godziny od pobrania materiału.

Ocenę odsetka badanych populacji w krwi obwodowej wykonano metodą cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Charakterystykę użytych przeciwciał zestawiono w **tabeli 6**.

Tabela 6. *Charakterystyka przeciwciał użytych do analizy cytometrycznej.*

Antygen różnicowania	Fluorochrom	Klon	Numer katalogowy	Producent
CD45/CD14	FITC/Pe	2D1,MφP9	342408	Becton Dickinson
CD3/CD19	FITC/Pe	SK7,4G7	342404	Becton Dickinson
CD4/CD8/CD3	FITC/ Pe/ PerCP	SK3,SK1,SK7	342414	Becton Dickinson
CD3/HLA-DR	FITC/Pe	SK7,G46-6	337603	Becton Dickinson
CD3/CD16+CD56	FITC/Pe	SK7,B73.1,MY31	340042	Becton Dickinson
CD45RA	FITC	L48	335039	Becton Dickinson
CD27	Pe	L128	340425	Becton Dickinson
CD31	PE-Cy TM 7	WM59	563654	Becton Dickinson
CD197	PerCP-Cy TM 5.5	150503	561144	Becton Dickinson
CD4	APC	SK3	561841	Becton Dickinson

Reakcja antygen – przeciwciała

Na dno probówek cytometrycznych podawano po 5 μ l odpowiedniego przeciwciała i dodawano 100 μ l krwi obwodowej. Całość mieszano, a następnie inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, chroniąc przed dostępem światła. Po upływie tego czasu dodawano 2 ml buforu lizującego (FACS lysing solution, Becton Dickinson) i inkubowano przez 10 minut bez dostępu światła. Bufor lizujący poza lizą erytrocytów utrwala komórki oraz połączenie antygen-przeciwciała. Po zakończeniu inkubacji, komórki płukano i wirowano dwukrotnie w buforze PBS (Roche Diagnostics) przez 5 minut przy 1500 obrotach na minutę w 4°C (každorazowo usuwano supernatant). Charakterystykę zastosowanych odczynników przedstawiono w **tabeli 7**. Akwizycję komórek przeprowadzano przy pomocy cytometru FACSCanto (BD Biosciences). W celu analizy poszczególnych subpopulacji komórek akwizycji poddawano 10000 zdarzeń.

Tabela 7. *Charakterystyka odczynników użytych do analizy cytometrycznej.*

Odczynnik	Numer katalogowy	Producent
FACS lysing solution, 10X Concentrate	349202	Becton Dickinson
Premixed PBS Buffer, 10x	11666789001	ROCHE Diagnostic

Analiza danych

Do analizy danych wykorzystywano oprogramowanie FACSDiva (BD Biosciences). Subpopulacje limfocytów były „bramkowane” na podstawie parametrów: rozprożeń światła w układzie FSC/SSC (ang. *forward scatter/side scatter*) oraz w oparciu o ekspresję CD45 i brak ekspresji CD14.

W **tabeli 8**, przedstawiono badane populacje komórek oraz sposób ich identyfikacji za pomocą przeciwciał.

Tabela 8. *Populacje badanych komórek oraz sposób ich identyfikacji.*

Populacja	Markery komórek
Leukocyty	CD45+
Limfocyty T	CD3+ CD19-
Limfocyty B	CD3- CD19+
Aktywowane limfocyty T	CD3+ HLA/DR3+
Limfocyty Tc	CD3+ CD4- CD8+
Limfocyty Th	CD3+ CD4+ CD8-
Limfocyty podwójnie pozytywne (DP)	CD3+ CD4+ CD8+
Komórki NK	CD3- CD16/CD56+
Komórki NKT	CD3+ CD16/CD56+
Limfocyty Th pamięci centralnej (ThCM)	CD3+ CD4+ CD45RA- CD27+
Limfocyty Th naiwne (Th0)	CD3+ CD4+ CD45RA+ CD27+
Limfocyty Th pamięci efektorowe (ThEM)	CD3+ CD4+ CD45RA- CD27-
Limfocyty T terminalnie zróżnicowane (ThTD)	CD3+ CD4+ CD45RA+ CD27-
Wczesne emigranty grasicze (RTE)	CD3+ CD4+ CD45RA+ CD31+

5. Witamina D

Podczas badania podawano suplement diety firmy UNIPHARM VITRUM[®] D₃ Forte (Vitaminum D₃) 2000 j.m.. Dystrybutor UNIPHARM Sp. z o. o., ul. Puławska 428, 02-884 Warszawa przekazał nieodpłatnie 260 opakowań po 60 kapsułek VITRUM[®] D₃ Forte (numer partii produkcyjnej WE300) celem przeprowadzenia opisywanego badania.

Podczas pierwszej wizyty pacjentki i wolontariuszki otrzymywały 2 opakowania VITRUM[®] D₃ Forte (na 4 miesiące suplementacji) z zaleceniem zażywania doustnie jednej kapsułki dziennie podczas posiłku zawierającego tłuszcze. Po 3 miesiącach kobietom przekazywano kolejne opakowanie VITRUM[®] D₃ Forte na piąty i szósty miesiąc suplementacji.

6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem Pakietu Statystycznego R 343. Z uwagi na graniczną liczebność porównywanych grup zdecydowano o stosowaniu testów nieparametrycznych. Do oceny różnic parametrów pomiędzy dwiema grupami niepowiązanymi zastosowano test U Manna-Whitneya.

Analizę statystyczną pomiarów powtórzonych (próby powiązane) w obrębie danej grupy, wykonano stosując metodę ANOVA Friedmanna oraz test zgodności Kendalla. Dla parametrów, dla których przynajmniej jedna z powyższych ocen statystycznych wskazywała na różnice istotne statystycznie, jako analizę *post-hoc* przeprowadzano test

Wilcoxona. W testach *post-hoc* zastosowana została poprawka Bonferroniego, którą wykorzystuje się w przypadku porównań wielokrotnych. W związku z tym w przeprowadzonych analizach stosowano poziom istotności równy $\frac{\alpha}{3}$.

Do oceny występowania korelacji między zmiennymi wyznaczono współczynnik korelacji Spearmana, a następnie badano istotność statystyczną wyliczonego współczynnika.

Aby sprawdzić, czy zmiana danego parametru jest skorelowana ze zmianą stężenia witaminy D w kolejnych miesiącach zastosowano *Repeated Measures Correlation* (RMCorr) – wyznaczano współczynnik korelacji dwóch cech w pomiarach powtórzonych oraz jego poziom istotności statystycznej.

We wszystkich testach statystycznych przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$ (za wyjątkiem miejsc, w których zastosowano poprawkę Bonferroniego – wówczas $\alpha = 0,0167$).

7. Zgoda komisji bioetycznej i finansowanie

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – numer uchwały 544/15 oraz 989/15 (zmiana brzmienia tematu badania na tożsamy z tematem rozprawy doktorskiej). Skan uchwały nr 989/15 zamieszczono w suplemencie.

Każda z badanych kobiet przed rozpoczęciem badania została poinformowana o jego celu i proponowanym przebiegu. Następnie podpisała świadomą zgodę na udział w badaniu. Wzór formularza informacyjnego dla pacjentki oraz zgody na badanie został zamieszczony w suplemencie.

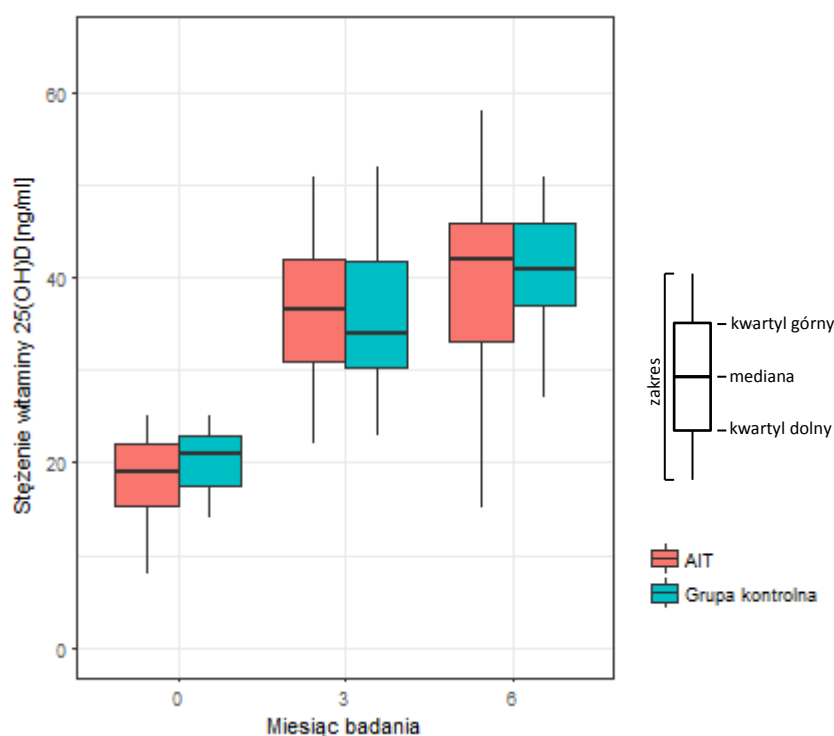
Badanie było współfinansowane ze środków przyznanych przez Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w ramach konkursu „Grant dla Młodych Naukowców”. Numer grantu: 502-14-02221355-41176.

IV. Wyniki

1. Wyniki badań biochemicznych

Zmiany parametrów biochemicznych w czasie badania

W czasie trwania badania zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia 25(OH)D zarówno w pierwszym okresie badania (pomiędzy włączeniem do badania a trzecim miesiącem suplementacji), jak i drugim okresie badania (pomiędzy trzecim a szóstym miesiącem suplementacji) w grupie chorych z AIT jak i w grupie kontrolnej. Ponadto analiza przeprowadzona dla obu grup łącznie wykazała istotny statystycznie przyrost stężenia badanej witaminy we wszystkich przedziałach czasowych prowadzonej obserwacji. Na **rycinie 6.** przedstawiono rozkład stężenia 25(OH)D w poszczególnych punktach czasowych badania. Największy przyrost stężenia był obserwowany w pierwszym okresie badania.



Rycina 6. Rozkład stężenia 25(OH)D w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 9.**).

W trakcie obserwacji stwierdzono istotny statystycznie wzrost stężenia TSH we krwi u osób z AIT pomiędzy momentem rozpoczęcia i zakończenia badania. Mediana stężenia

TSH wzrosła z 1,8 do 2,77 $\mu\text{U/ml}$. Nie obserwowano istotnych statystycznie zmian stężenia wapnia całkowitego we krwi. Analiza istotności statystycznej zmian stężenia badanych parametrów biochemicznych w czasie została przedstawiona w **tabeli 9**.

Tabela 9. Ocena istotności statystycznej zmian stężenia badanych parametrów biochemicznych w czasie badania.

Badany parametr	AIT			Grupa kontrolna			Razem		
	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6
25(OH)D	<0.00001	0.04724	<0.00001	<0.00001	0.00096	<0.00001	<0.00001	0.00016	<0.00001
Wapń całkowity	0.55768	0.70510	0.82872	0.65756	0.41648	0.27103	0.92782	0.38328	0.36908
TSH	NA	NA	0.00351	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Legenda:									
kolor zielony – istotnie statystyczny wzrost w czasie NA – brak pomiaru danych									

Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów biochemicznych w poszczególnych miesiącach badania

W **tabeli 10.** przedstawiono korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów biochemicznych w poszczególnych miesiącach obserwacji. Stwierdzono statystycznie istotną dodatnią korelację stężenia 25(OH)D i fosforanów we krwi w grupie kontrolnej na początku badania. Nie zaobserwowano istotnie statystycznych korelacji dotyczących stężenia wapnia całkowitego, PTH czy TSH.

Tabela 10. Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów biochemicznych w poszczególnych miesiącach badania.

Badany parametr	Rodzaj	Miesiąc 0			Miesiąc 3			Miesiąc 6		
		AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem
Wapń całkowity	wsp. korelacji	-0.1260	-0.2268	-0.1280	-0.0526	0.2311	0.0626	0.1938	-0.0473	0.0951
	p wartość	0.5071	0.2198	0.3257	0.7826	0.2277	0.6377	0.3137	0.8007	0.4700
Fosforany	wsp. korelacji	0.0146	0.3988	0.2231	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	p wartość	0.9388	0.0380	0.0839	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTH	wsp. korelacji	-0.3189	0.1415	-0.0770	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	p wartość	0.0858	0.4556	0.5586	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TSH	wsp. korelacji	-0.1033	0,3321	0,14+7	NA	NA	NA	-0.0666	NA	NA
	p wartość	0.5870	0,0680	0,2494	NA	NA	NA	0.7313	NA	NA
Legenda: wsp. korelacji – współczynnik korelacji NA – brak pomiaru danych										
						kolor zielony – istotnie statystyczna dodatnia korelacja				

Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów biochemicznych w czasie badania

W przedstawionym badaniu obserwowano zmiany badanych parametrów podczas podawania witaminy D₃. Przeprowadzono dodatkową analizę, która pozwala stwierdzić, czy obserwowane zmiany są skorelowane ze wzrostem stężenia 25(OH)D. W **tabeli 11.** przedstawiono korelacje stężenia witaminy D i badanych parametrów biochemicznych, które były mierzone przynajmniej dwukrotnie w czasie trwania badania. Analiza wykazała statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem 25(OH)D a zmianą stężenia TSH we krwi u chorych z AIT.

Tabela 11. Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D i zmian badanych parametrów biochemicznych w czasie badania.

Badany parametr	AIT		Grupa kontrolna		Razem	
	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość
Wapń całkowity	0.0846429	0.52022	0.1686982	0.19372	0.1279430	0.16374
TSH	0.4534713	0.01184	NA	NA	NA	NA
Legenda: wsp. korelacji – współczynnik korelacji NA – brak pomiaru danych						
				kolor zielony – istotnie statystyczna dodatnia korelacja		

2. Odpowiedź immunologiczna komórkowa wrodzona

Zmiany parametrów immunologicznych w czasie badania

Analizę istotności zmian parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej w czasie przedstawiono w **tabeli 12.** Ocena ta obejmowała liczbę leukocytów, limfocytów, monocytów, eozynofili, bazofili i neutrofilii oraz liczby i odsetka komórek NK i NKT względem całkowitej liczby leukocytów.

W zakresie odpowiedzi immunologicznej komórkowej zaobserwowano statystycznie istotny przyrost liczby leukocytów mierzonych w rozmazie metodą automatyczną oraz metodą cytometrii przepływową w grupie AIT w pierwszych trzech miesiącach suplementacji. Biorąc pod uwagę cały okres badania (pomiędzy włączeniem do badania a szóstym miesiącem), wykazano również istotny statystycznie wzrost liczby leukocytów zmierzonych metodą cytometrii przepływową w tej grupie. W grupie kobiet zdrowych zaobserwowano przyrost liczby leukocytów badanych metodą cytometrii przepływową po sześciu miesiącach trwania badania.

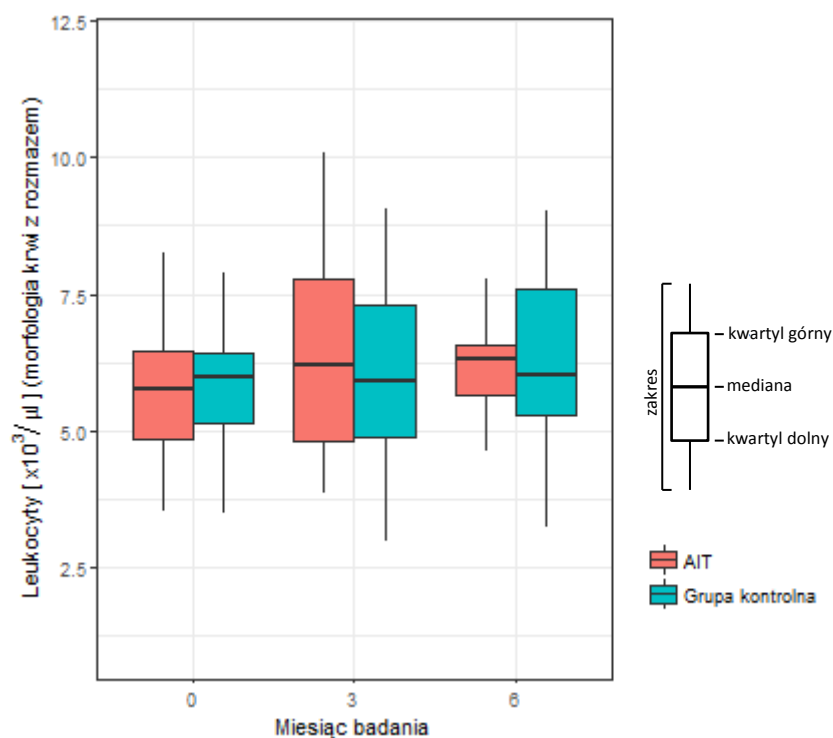
Analizując populację leukocytów, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby bazofili w grupie kontrolnej, biorąc pod uwagę cały okres badania, szczególnie w obu grupach poddanych łącznej analizie. Znamienneму zwiększeniu uległa również liczba neutrofile w pierwszych trzech miesiącach badania u kobiet z AIT.

Istotny statystycznie spadek zarówno odsetka, jak i liczby komórek NKT zaobserwowano w pierwszym oraz drugim okresie badania. Dotyczyło to zarówno grupy AIT, jak i grupy kontrolnej.

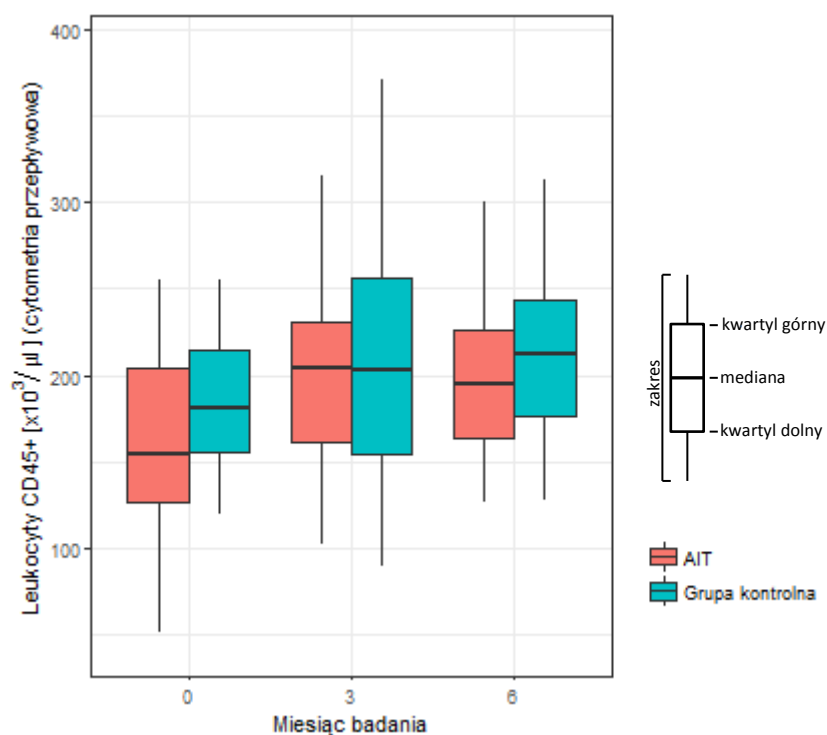
Tabela 12. Analiza statystyczna zmian parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej w czasie badania.

Badany parametr	AIT			Grupa kontrolna			Razem		
	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6
Leukocyty*	0.00549	0.40513	0.02190	-	-	-	-	-	-
Leukocyty CD 45+	0.00003	0.89132	0.00089	0.08962	0.38855	0.00165	0.00004	0.41497	<0.00001
Monocyty*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eozynofile*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazofile*	-	-	-	0.01945	0.07407	0.00169	0.08168	0.01579	0.00058
Neutrofile*	0.00642	0.21374	0.23009	-	-	-	0.00153	0.79099	0.02451
Komórki NK %	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Komórki NK	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Komórki NKT %	0.00014	0.61632	0.00012	0.00008	0.56463	0.00006	<0.00001	0.47865	<0.00001
Komórki NKT	0.00927	0.80221	0.00883	0.00025	0.50523	0.00154	0.00001	0.49217	0.00005
Legenda:									
* – metoda oznaczania: morfologia krwi z rozmazem automatycznym									
Leukocyty – CD45+									
Komórki NK – CD3- CD16/CD56+									
Komórki NKT – CD3+ CD16/CD56+									
kolor czerwony – istotnie statystyczny spadek w czasie									
kolor zielony – istotnie statystyczny wzrost w czasie									
- wartości testu ANOVA Friedmana i współczynnika Kendala nieistotne statystycznie									

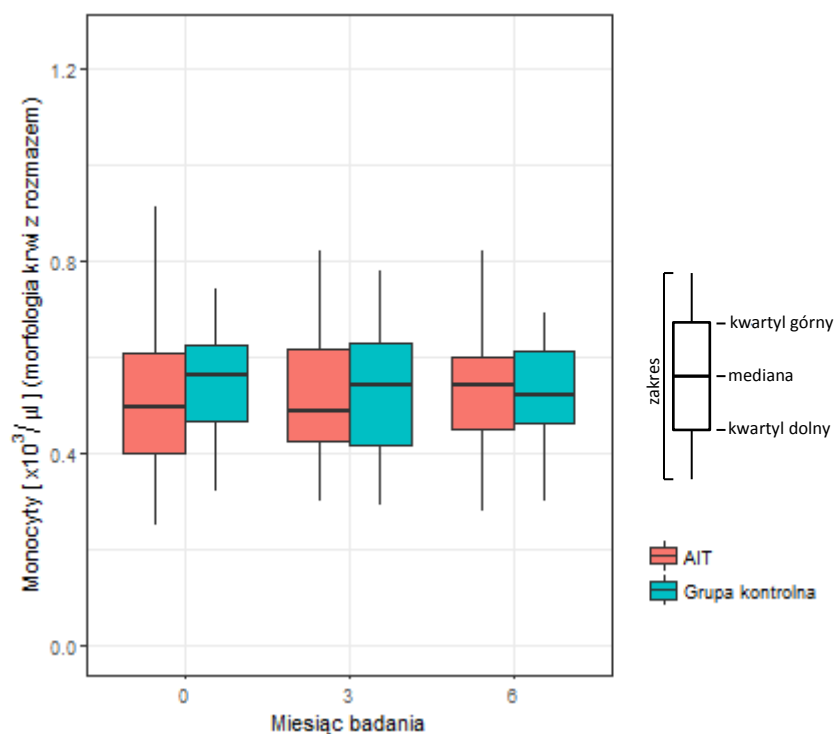
Na **rycinach 7 – 16** przedstawiono rozkłady liczb oraz odsetków względem całkowitej liczby leukocytów, badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej.



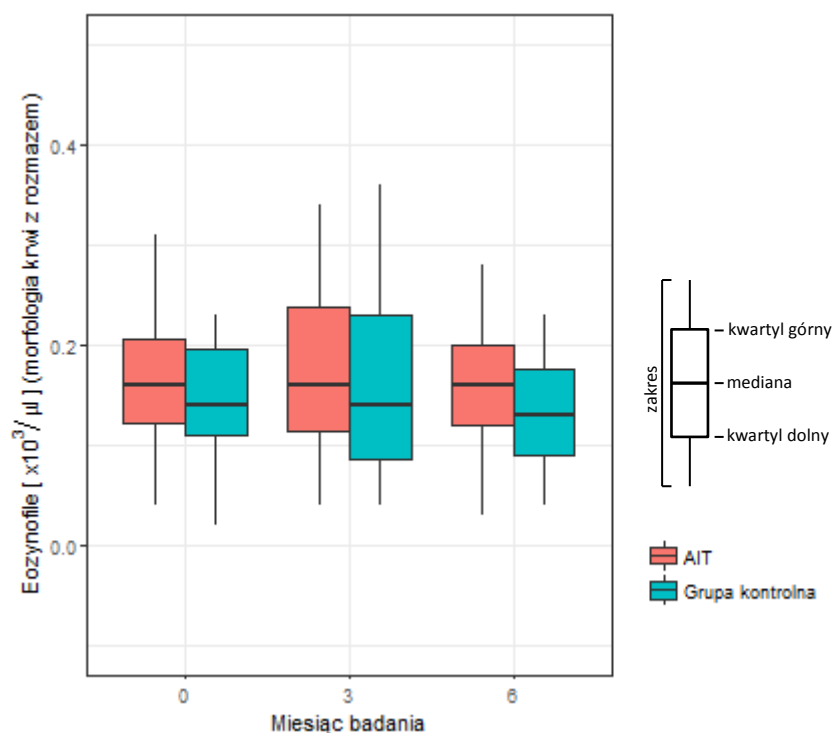
Rycina 7. Rozkład liczby leukocytów (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 12.**).



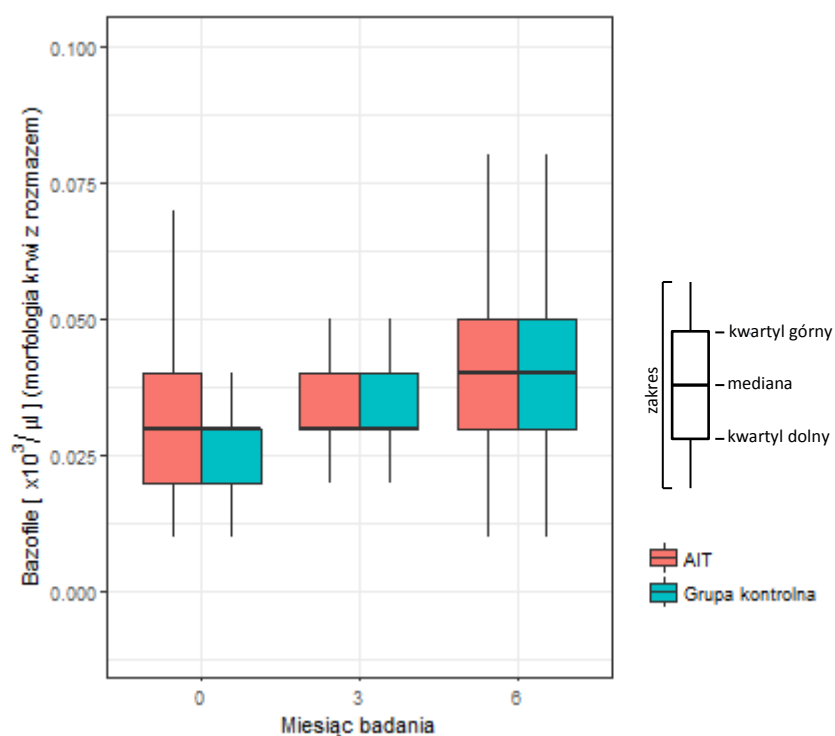
Rycina 8. Rozkład liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 12.**).



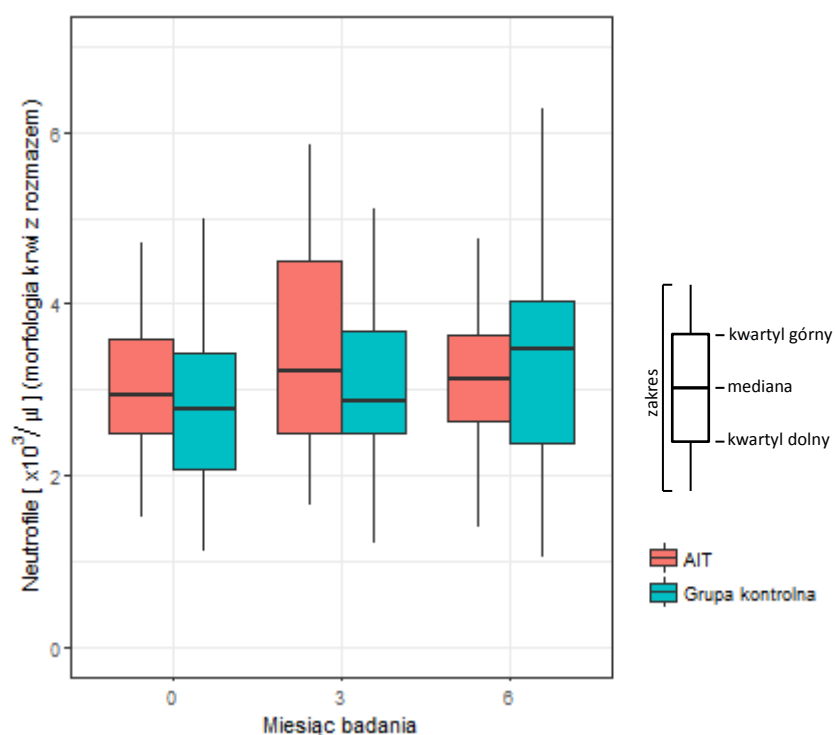
Rycina 9. Rozkład liczby monocytów (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 12.**).



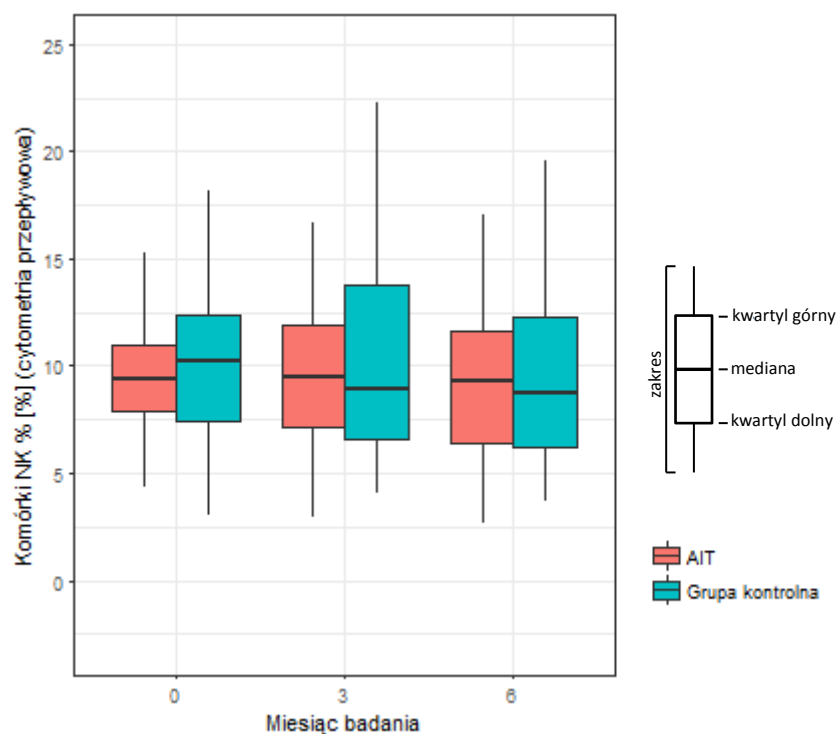
Rycina 10. Rozkład liczby eozynofili (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 12.**).



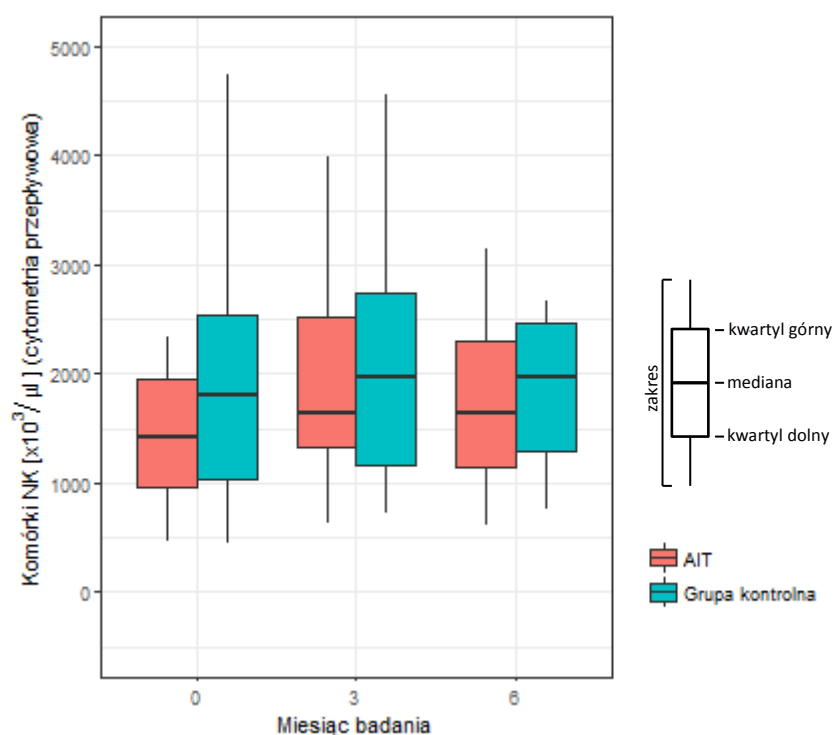
Rycina 11. Rozkład liczby bazofili (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 12.**).



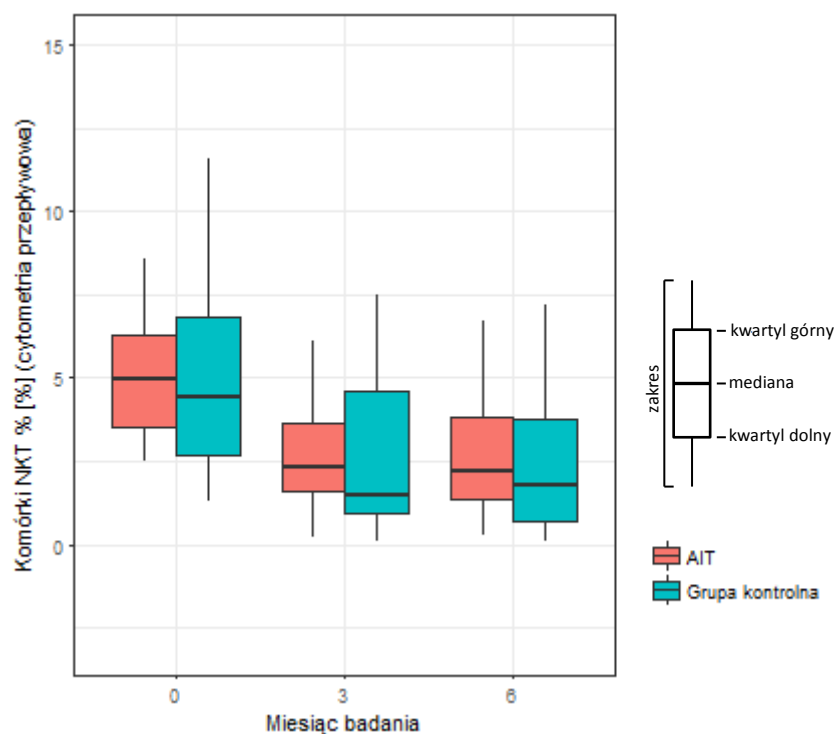
Rycina 12. Rozkład liczby neutrofili (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 12.**).



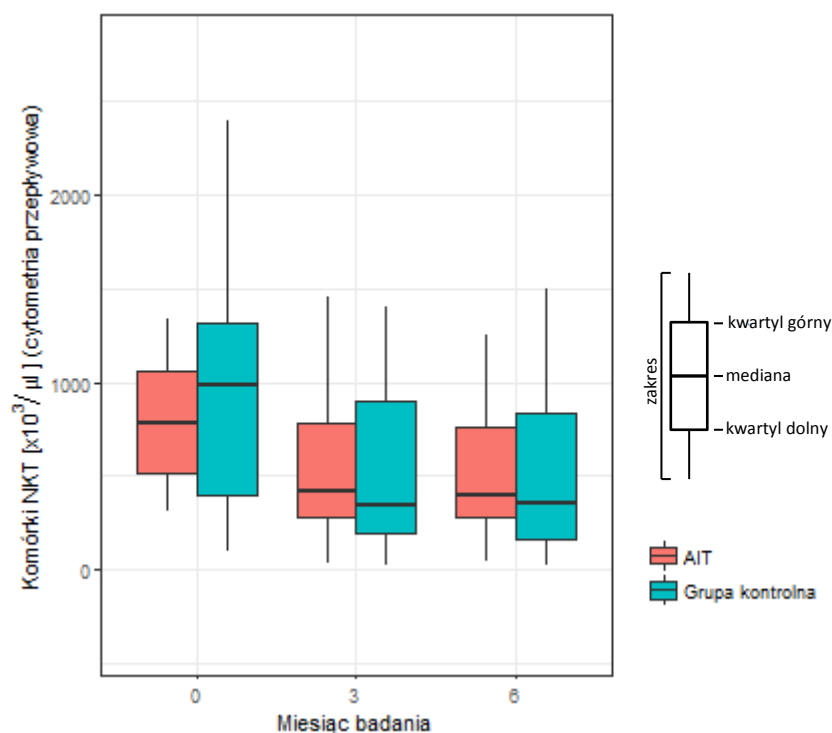
Rycina 13. Rozkład odsetka komórek NK względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 12.**).



Rycina 14. Rozkład liczby komórek NK (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 12.**).



Rycina 15. Rozkład odsetka komórek NKT względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w tabeli 12.).



Rycina 16. Rozkład liczby komórek NKT (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w tabeli 12.).

Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej w poszczególnych miesiącach badania

W **tabeli 13.** przedstawiono korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej w poszczególnych miesiącach badania. Stwierdzono kilka istotnie statystycznych korelacji pomiędzy badanymi parametrami a stężeniem witaminy D. Znamienne statystycznie ujemne korelacje stwierdzono w przypadku:

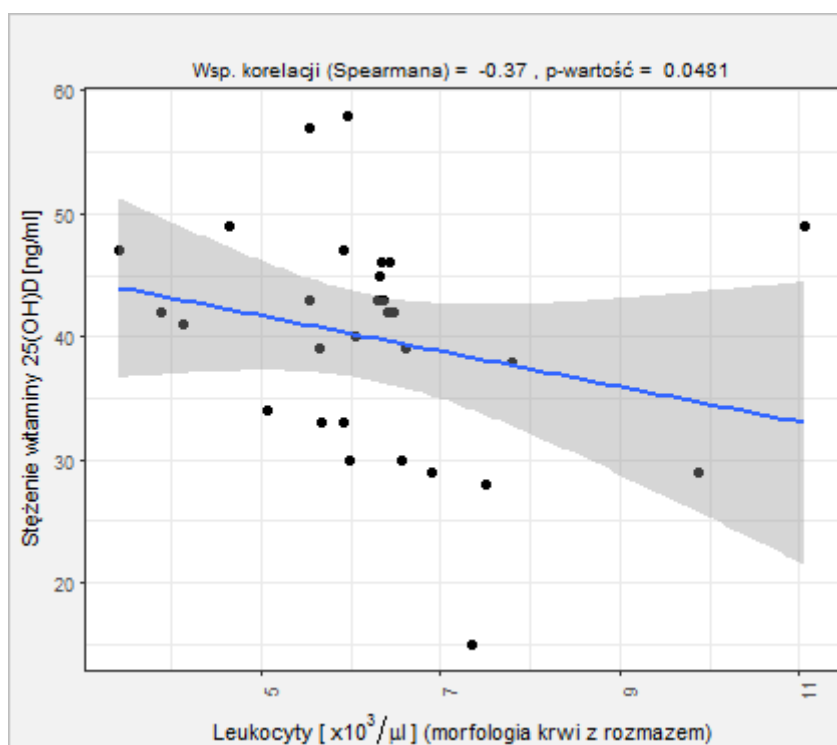
- a. leukocytów oznaczanych w morfologii krwi z rozmazem metodą automatyczną w szóstym miesiącu badania u pacjentek z AIT oraz w grupie AIT i kontrolnej łącznie;
- b. monocytów w szóstym miesiącu suplementacji w łącznej analizie obu badanych grup;
- c. bazofili w grupie kontrolnej na początku badania;
- d. neutrofilii w szóstym miesiącu suplementacji w grupie AIT oraz w grupie AIT i kontrolnej łącznie;
- e. odsetka komórek NK względem całkowitej liczby leukocytów wśród pacjentek z grupy AIT w pierwszym okresie badania.

Nie stwierdzono istotne statystycznych dodatnich korelacji stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej.

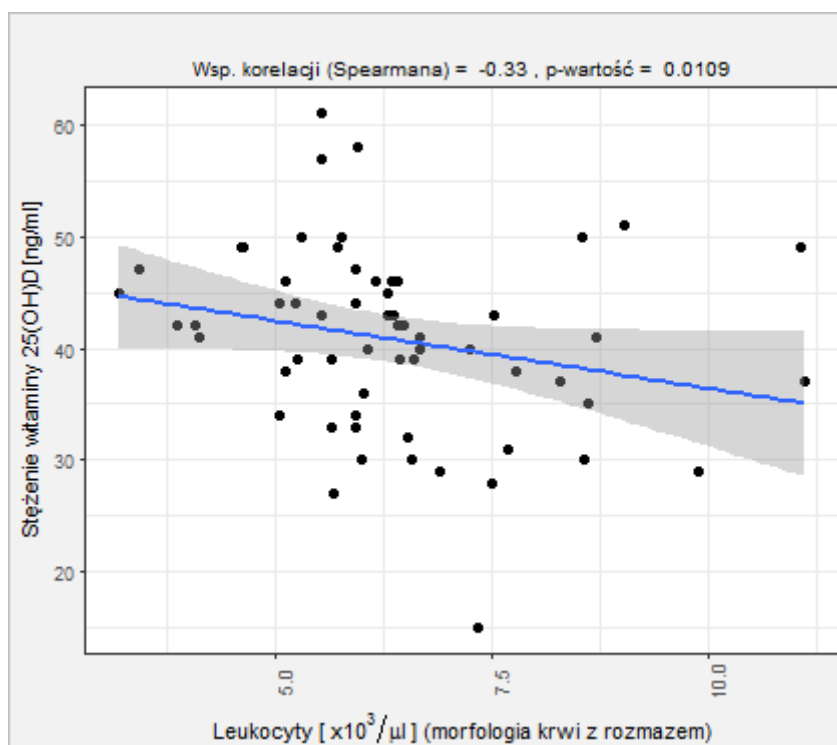
Na **rycinach 17 – 23** przedstawiono wykresy rozrzutu stężenia 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej, dla których występuje istotność statystyczna.

Tabela 13. Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej w poszczególnych miesiącach badania.

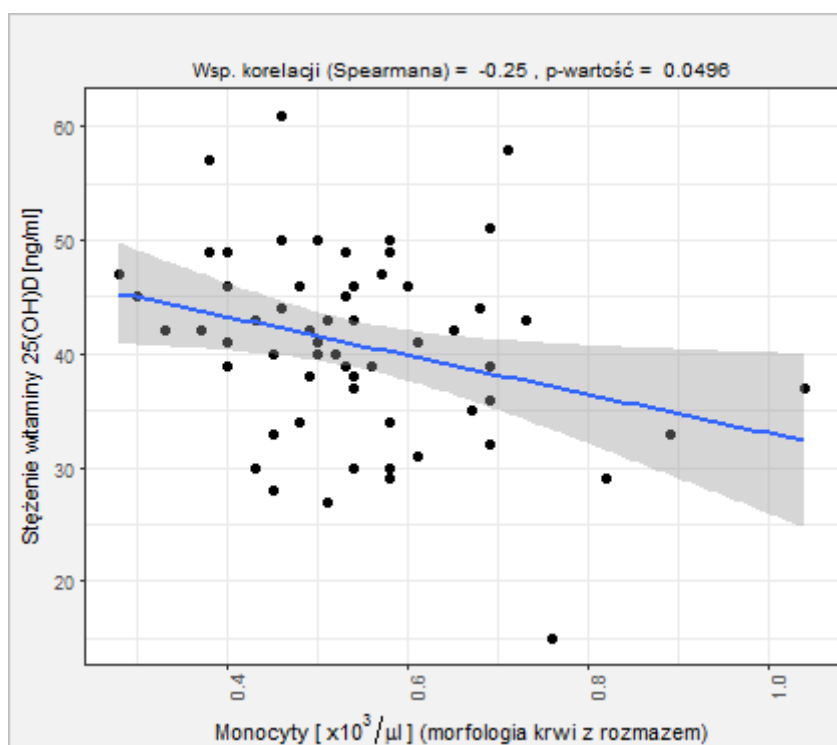
Badany parametr	Rodzaj	Miesiąc 0			Miesiąc 3			Miesiąc 6		
		AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem
Leukocyty*	wsp. korelacji	0.0869	0.0810	0.1135	-0.2489	-0.1811	-0.2035	-0.3702	-0.3072	-0.3263
	p wartość	0.6481	0.6648	0.3838	0.1848	0.3382	0.1188	0.0481	0.0927	0.0109
Leukocyty CD45+	wsp. korelacji	0.0697	0.0288	0.0658	0.0274	-0.0660	-0.0098	-0.1623	0.0339	-0.0329
	p wartość	0.7145	0.8822	0.6205	0.8858	0.7289	0.9410	0.4091	0.8563	0.8044
Monocyty*	wsp. korelacji	0.0174	0.0425	0.0420	-0.1128	-0.2252	-0.1732	-0.2329	-0.3191	-0.2546
	p wartość	0.9272	0.8205	0.7478	0.5527	0.2316	0.1857	0.2241	0.0802	0.0496
Eozynofile*	wsp. korelacji	0.2756	-0.1927	0.0516	0.0967	-0.1340	-0.0042	0.0809	0.0507	0.0704
	p wartość	0.1404	0.2991	0.6928	0.6113	0.4802	0.9749	0.6765	0.7866	0.5930
Bazofile*	wsp. korelacji	0.1863	-0.3697	-0.1016	-0.3056	-0.1403	-0.2258	0.1377	-0.1094	0.0237
	p wartość	0.3243	0.0407	0.4360	0.1006	0.4595	0.0828	0.4762	0.5579	0.8572
Neutrofile*	wsp. korelacji	0.0183	-0.0232	-0.0198	-0.1719	-0.2114	-0.1835	-0.4000	-0.3450	-0.3646
	p wartość	0.9235	0.9016	0.8798	0.3637	0.2621	0.1606	0.0316	0.0573	0.0042
Komórki NK %	wsp. korelacji	-0.0761	-0.0221	-0.0105	-0.3627	0.1541	-0.0674	0.0538	-0.1982	-0.0680
	p wartość	0.6896	0.9094	0.9373	0.0489	0.4161	0.6088	0.7858	0.2852	0.6088
Komórki NK	wsp. korelacji	0.0078	-0.0784	0.0088	-0.2759	0.1298	-0.0745	0.0417	-0.1512	-0.0630
	p wartość	0.9673	0.6860	0.9473	0.1400	0.4943	0.5718	0.8332	0.4168	0.6357
Komórki NKT %	wsp. korelacji	0.2505	-0.1988	-0.0028	-0.1226	0.3800	0.1690	0.0133	0.2032	0.1038
	p wartość	0.1818	0.3011	0.9835	0.5187	0.0697	0.1969	0.9464	0.2729	0.4339
Komórki NKT	wsp. korelacji	0.2735	-0.2017	0.0651	-0.1381	0.3421	0.1376	-0.0398	0.2102	0.0849
	p wartość	0.1436	0.2940	0.6241	0.4669	0.0696	0.2945	0.8408	0.2564	0.5225
Legenda: * – metoda oznaczania: morfologia krwi z rozmazem automatycznym Komórki NK – CD3- CD16/CD56+ Komórki NKT – CD3+ CD16/CD56+										
					wsp. korelacji – współczynnik korelacji					
					kolor czerwony – istotnie statystyczna ujemna korelacja					



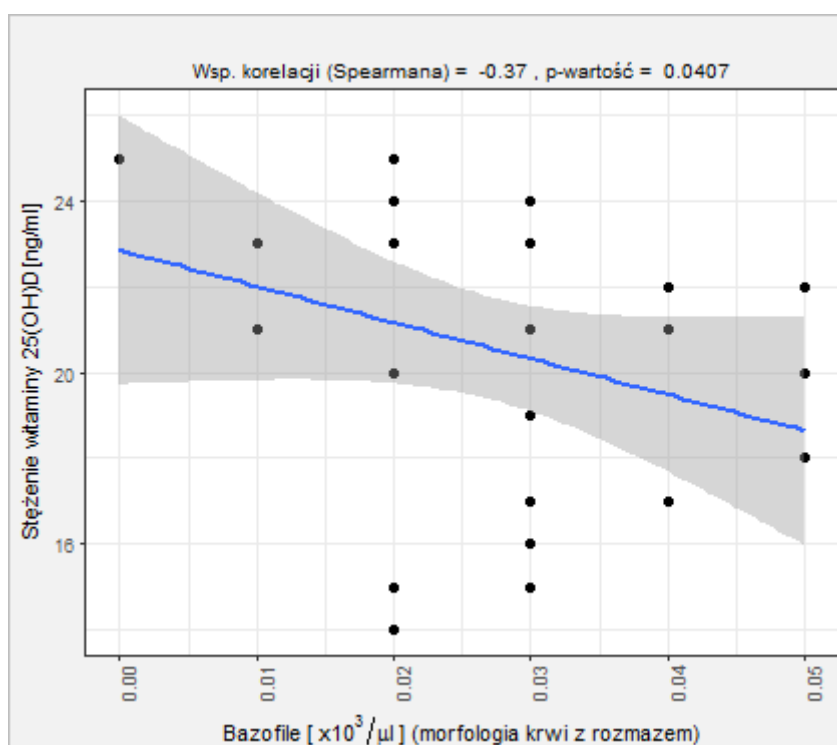
Rycina 17. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby leukocytów (morfologia krwi z rozmazem) pacjentek z AIT w szóstym miesiącu badania.



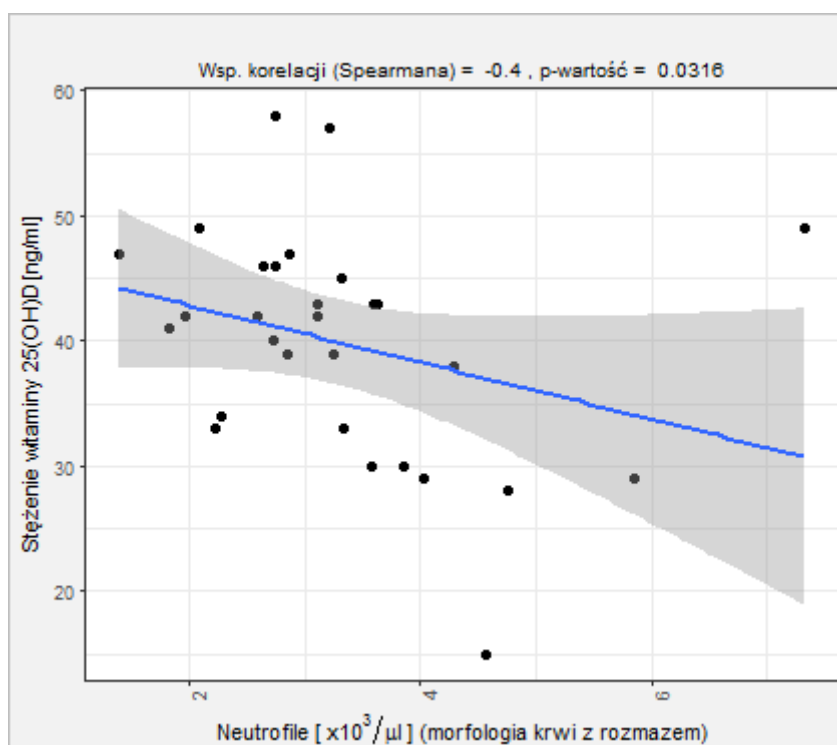
Rycina 18. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby leukocytów (morfologia krwi z rozmazem) kobiet z obu grup w szóstym miesiącu badania.



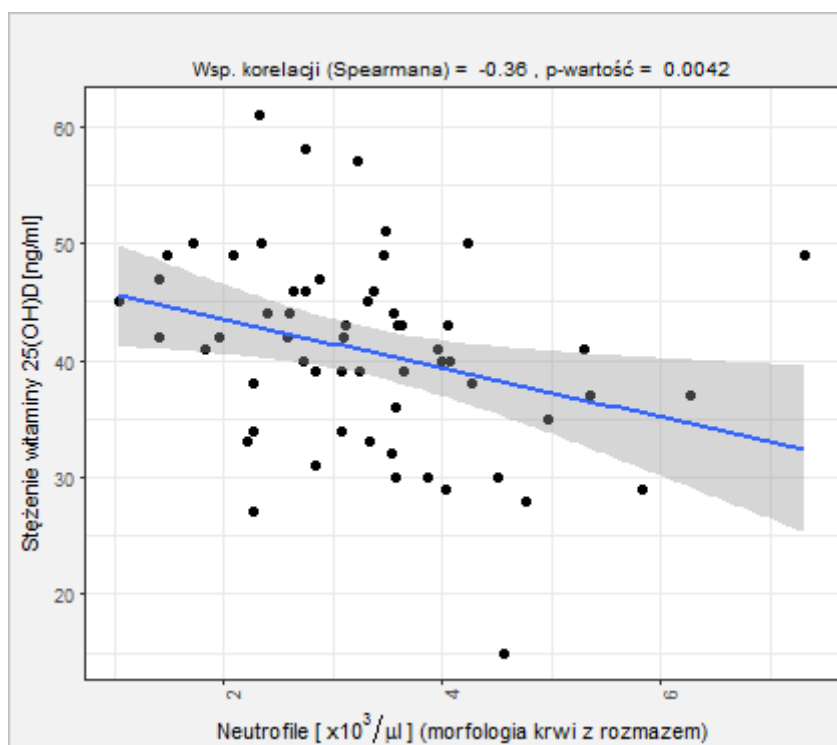
Rycina 19. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby monocytów (morfologia krwi z rozmazem) kobiet z obu grup w szóstym miesiącu badania.



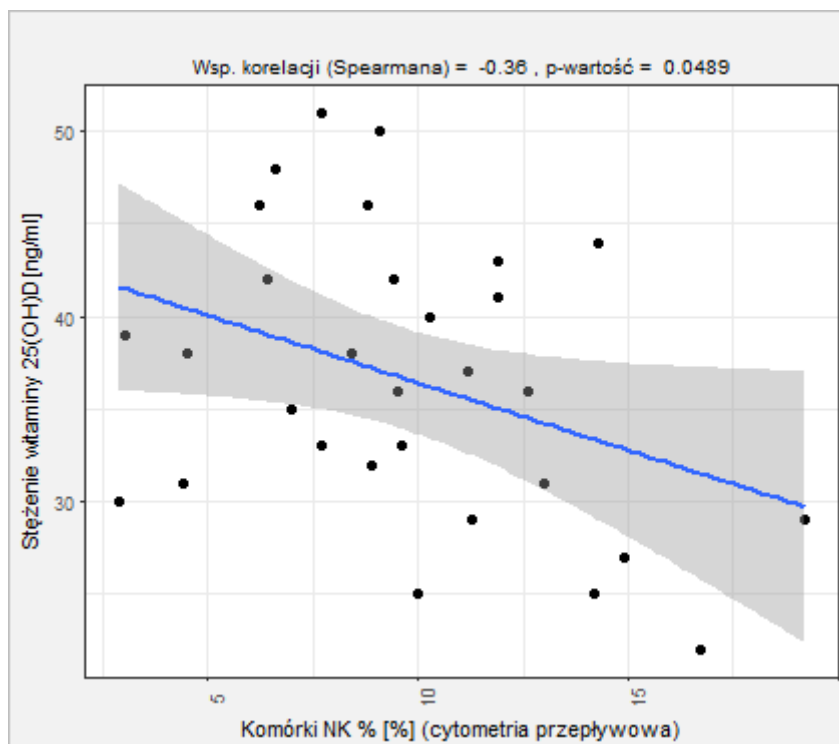
Rycina 20. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby bazofili (morfologia krwi z rozmazem) kobiet z grupy kontrolnej w momencie włączenia do badania.



Rycina 21. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby neutrofili (morfologia krwi z rozmazem) pacjentek z AIT w szóstym miesiącu badania.



Rycina 22. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby neutrofili (morfologia krwi z rozmazem) kobiet z obu grup w szóstym miesiącu badania.



Rycina 23. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i odsetka komórek NK względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) pacjentek z AIT w trzecim miesiącu badania.

Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej wrodzonej w czasie badania

Analizując otrzymane wyniki badań, stwierdzono pozytywne istotne statystycznie korelacje pomiędzy zmianą stężenia witaminy D i zmianami w czasie następujących parametrów (test statystyczny: *Repeated Measures Correlation*):

- a. leukocytami zmierzonymi w badaniu morfologii krwi z rozmazem automatycznym w grupie AIT i łącznej analizie grupy AIT i kontrolnej;
- b. leukocytami zmierzonymi metodą cytometrii przepływowej w grupie AIT, kontrolnej oraz obu grupach łącznie;
- c. bazofilami w grupie kontrolnej oraz obu grupach łącznie;
- d. neutrofilami w grupie AIT oraz obu grupach łącznie.

Istotne statystycznie negatywne korelacje występowały pomiędzy wzrostem stężenia witaminy D a zmianą odsetka komórek NKT względem całkowitej liczby leukocytów w grupie AIT, grupie kontrolnej oraz obu grupach łącznie. Dodatkowo korelacja ta występowała również pomiędzy zmianą stężenia 25(OH)D a liczbą komórek NKT w grupie

kontrolnej i łącznej analizie obu grup. Analizę statystyczną tych parametrów przedstawiono w **tabeli 14**.

Tabela 14. Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej wrodzonej w czasie badania.

Badany parametr	AIT		Grupa kontrolna		Razem	
	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość
Leukocyty*	0.3827570	0.00254	0.2144937	0.09411	0.2622140	0.00367
Leukocyty CD45+	0.5380528	0.00001	0.2987603	0.02041	0.4012272	0.00001
Monocyty*	0.0219485	0.86780	-0.0975119	0.45086	-0.0486970	0.59582
Eozynofile*	-0.1197343	0.36217	-0.1984252	0.12210	-0.1607629	0.07815
Bazofile*	0.1761401	0.17823	0.3543394	0.00472	0.2640280	0.00343
Neutrofile*	0.3074692	0.01686	0.2246356	0.07921	0.2339196	0.00981
Komórki NK %	0.0088594	0.94690	-0.1015350	0.44015	-0.0528036	0.57011
Komórki NK	0.3016271	0.02025	0.1097355	0.40391	0.1767022	0.05560
Komórki NKT %	-0.3155217	0.01492	-0.4622567	0.00020	-0.3299816	0.00026
Komórki NKT	-0.2441260	0.06241	-0.4022203	0.00144	-0.2520708	0.00589
Legenda:						
* – metoda oznaczania: morfologia krwi z rozmazem automatycznym			wsp. korelacji – współczynnik korelacji			
Komórki NK – CD3- CD16/CD56+			kolor czerwony – istotnie statystyczna ujemna korelacja			
Komórki NKT – CD3+ CD16/CD56+			kolor zielony – istotnie statystyczna dodatnia korelacja			

3. Odpowiedź immunologiczna humoralna wrodzona

Zmiany stężenia CRP w czasie badania

Po sześciu miesiącach suplementacji witaminą D₃ CRP uległo istotnemu statystycznie wzrostowi u kobiet z grupy kontrolnej oraz w łącznym podsumowaniu obu badanych grup, co przedstawia **tabela 15**. W grupie kontrolnej mediana wynosiła początkowo 0,5 mg/dl i wzrosła do 1,1 mg/dl. Mediana dla obu grup łącznie uległa zwiększeniu z 0,4 mg/l do 0,6 mg/l.

Tabela 15. Analiza statystyczna zmian stężenia CRP w czasie badania.

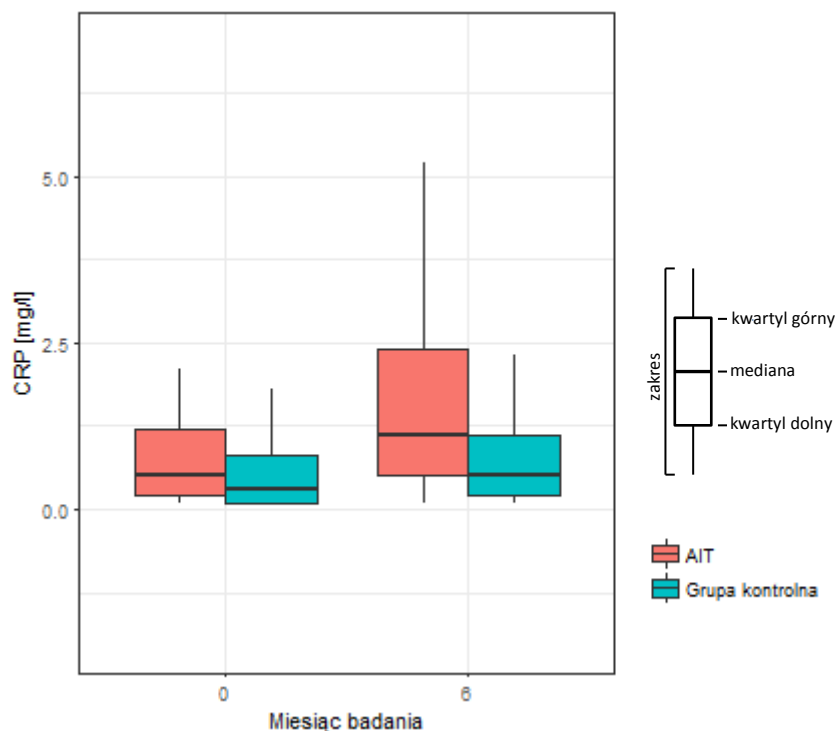
Badany parametr	AIT			Grupa kontrolna			Razem		
	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6
CRP	NA	NA	0.01681	NA	NA	0.00453	NA	NA	0.00033
Legenda:									
NA – brak pomiaru danych						kolor zielony – istotnie statystyczny wzrost w czasie			

Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i CRP w poszczególnych miesiącach badania

Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem witaminy D a stężeniem CRP w czasie trwania badania, co przedstawiono w **tabeli 16**. Rozkład stężenia CRP w poszczególnych miesiącach podczas suplementacji przedstawia **rycina 24**.

Tabela 16. Korelacja stężenia witaminy 25(OH)D i stężenia CRP w poszczególnych miesiącach badania.

Badany parametr	Rodzaj	Miesiąc 0			Miesiąc 3			Miesiąc 6		
		AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem
CRP	wsp. korelacji	-0.1644	-0.0054	-0.1174	NA	NA	NA	-0.1982	-0.1992	-0.2243
	p wartość	0.3853	0.9770	0.3675	NA	NA	NA	0.3027	0.2828	0.0849
Legenda: wsp. korelacji – współczynnik korelacji NA – brak pomiaru danych										



Rycina 24. Rozkład stężenia CRP na początku oraz po sześciu miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 15.**).

Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz CRP w czasie

Zmiany stężenia CRP w czasie badania były dodatnio skorelowane ze wzrostem stężenia witaminy D u pacjentek z grupy AIT oraz kobiet z obu grup łącznie, co przedstawiono w **tabeli 17.**

Tabela 17. Korelacja zmian stężenia 25(OH)D i CRP w czasie badania.

Badany parametr	AIT		Grupa kontrolna		Razem	
	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość
CRP	0.3920671	0.03213	0.1311456	0.47433	0.2710784	0.03459
Legenda:						
wsp. korelacji – współczynnik korelacji			kolor zielony – istotnie statystyczna dodatnia korelacja			

4. Odpowiedź immunologiczna komórkowa nabyta

Zmiany parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej w czasie badania

Wśród badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej większość uległa zmianom w czasie suplementacji witaminą D₃. Istotny statystycznie wzrost w grupie AIT zaobserwowano dla liczby limfocytów oznaczanych w morfologii krwi z rozmazem metodą automatyczną w pierwszych trzech miesiącach suplementacji oraz w całym okresie badania. Podobnie zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby limfocytów T, limfocytów Th, Tc, Th0 oraz Th CM. O ile wzrost liczby limfocytów Tc stwierdzono w pierwszych trzech miesiącach suplementacji i w całym okresie badania, to wzrost odsetka tych limfocytów względem całkowitej liczby leukocytów występował w drugim okresie badania. Istotnemu statystycznie zwiększeniu uległa także liczba RTE w pierwszej części badania, a odsetek względem całkowitej liczby leukocytów i liczba limfocytów Th TD zwiększyły się w drugim okresie badania. W grupie chorych z AIT stwierdzono znamienne statystycznie spadek odsetka aktywowanych limfocytów T w całym okresie badania.

W grupie kontrolnej istotny statystycznie wzrost stwierdzono głównie pomiędzy początkiem a szóstym miesiącem badania. Dotyczyło to liczby limfocytów T, Th, Tc i Th0. Liczba limfocytów Th CM znamienne statystycznie wzrosła w pierwszym okresie badania oraz w całym okresie obserwacji, natomiast zarówno odsetek względem całkowitej liczby leukocytów, jak i liczba limfocytów Th TD wzrosła jedynie w drugim okresie badania. W grupie kontrolnej istotnemu statystycznie zmniejszeniu uległ odsetek limfocytów Th TD względem całkowitej liczby leukocytów w pierwszym okresie badania oraz odsetek limfocytów Th CM względem całkowitej liczby leukocytów w drugim okresie badania. Ponadto zmniejszył się odsetek aktywowanych limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów zarówno w pierwszej części badania, jak i w całym okresie obserwacji. Dodatkowo zmniejszeniu uległa liczba aktywowanych limfocytów T w czasie sześciu miesięcy suplementacji.

W łącznej analizie obu grup zaobserwowano statystycznie istotny wzrost w pierwszym i drugim okresie badania w zakresie liczby limfocytów T, Th, Tc, Th0, Th EM, Th CM oraz RTE. Dodatkowo liczba limfocytów Th EM znamienne statystycznie wzrosła pomiędzy trzecim a szóstym miesiącem suplementacji. Choć w drugim okresie badania nie

uległa zwiększeniu liczba limfocytów Tc, to istotnie statystycznie zwiększył się ich odsetek względem całkowitej liczby leukocytów. Ciekawe zmiany istotne statystycznie zaobserwowano w zakresie limfocytów Th TD, ich odsetek względem całkowitej liczby leukocytów w pierwszym okresie badania spadł, by w drugim okresie wzrosnąć. W drugim okresie badania zwiększyła się także liczba tych komórek. Odsetek aktywowanych limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów zmniejszył się istotnie statystycznie w pierwszym okresie badania i po sześciu miesiącach obserwacji. Ocenę statystyczną zmian opisywanych parametrów przedstawiono w **tabeli 18.**, a na **rycinach 25 – 45** rozkłady liczb oraz odsetków względem całkowitej liczby leukocytów, badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej.

Tabela 18. Analiza statystyczna zmian parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej w czasie badania.

Badany parametr	AIT			Grupa kontrolna			Razem		
	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6
Limfocyty*	0.00847	0.48894	0.00461	-	-	-	-	-	-
Limfocyty T %	-	-	-	-	-	-	0.11204	0.03037	0.00163
Limfocyty T	0.00002	0.66526	0.00007	0.06850	0.28021	0.00090	0.00003	0.25025	<0.00001
Limfocyty Th %	0.05067	0.44914	0.69022	-	-	-	-	-	-
Limfocyty Th	0.00003	0.89132	0.00122	0.13289	0.25571	0.00105	0.00005	0.38127	<0.00001
Limfocyty Tc %	0.27936	0.00552	0.00913	-	-	-	0.16316	0.01426	0.04048
Limfocyty Tc	0.00062	0.17185	0.00014	0.06143	0.26399	0.00165	0.00019	0.06122	<0.00001
Limfocyty T DP %	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Limfocyty T DP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RTE %	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RTE	0.00026	0.56631	0.07587	-	-	-	0.00051	0.19281	0.00689
Limfocyty Th0 %	-	-	-	0.67295	0.10173	0.96116	-	-	-
Limfocyty Th0	0.00003	0.76721	0.01013	0.03085	0.15256	0.00896	0.00002	0.39790	0.00032
Limfocyty ThEM %	-	-	-	0.27880	0.08349	0.61405	0.20604	0.07397	0.96741
Limfocyty ThEM	-	-	-	-	-	-	0.00918	0.01145	0.00124
Limfocyty ThCM %	-	-	-	0.09135	0.00539	0.85828	-	-	-
Limfocyty ThCM	0.00040	0.94554	0.00788	0.01301	0.89089	0.00608	0.00002	0.90388	0.00014
Limfocyty ThTD %	0.02538	0.00306	0.61424	0.00337	0.01433	0.06887	0.00038	0.00009	0.09676
Limfocyty ThTD	0.53378	0.00196	0.11608	0.05753	0.00608	0.17788	0.09058	0.00004	0.85694
Aktywowane limfocyty T %	0.10678	0.17836	0.00321	0.00137	0.25613	0.00161	0.00065	0.05894	0.00001
Aktywowane limfocyty T	-	-	-	0.04270	0.37786	0.01579	-	-	-

Legenda:

* – metoda oznaczania: morfologia krwi z rozmazem automatycznym

Limfocyty T – CD3+ CD19-

Limfocyty Th – CD3+ CD4+ CD8-

Limfocyty Tc – CD3+ CD4- CD8+

Limfocyty DP (podwójnie pozytywne) – CD3+ CD4+ CD8+

RTE (wczesne emigranty grasicze) – CD3+ CD4+ CD45RA+ CD31+

Limfocyty Th0 – CD3+ CD4+ CD45RA+ CD27+

Limfocyty ThEM (pamięci efektorowej) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27-

Limfocyty ThCM (pamięci centralnej) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27+

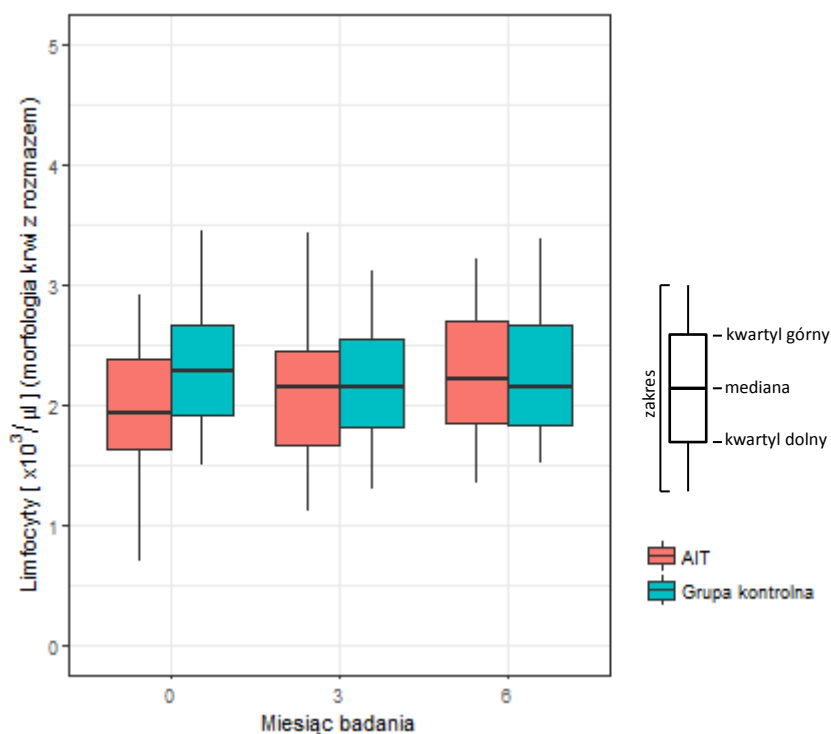
Limfocyty ThTD (terminalnie zróżnicowane) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27-

Aktywowane limfocyty T – CD3+ HLA/DR3+

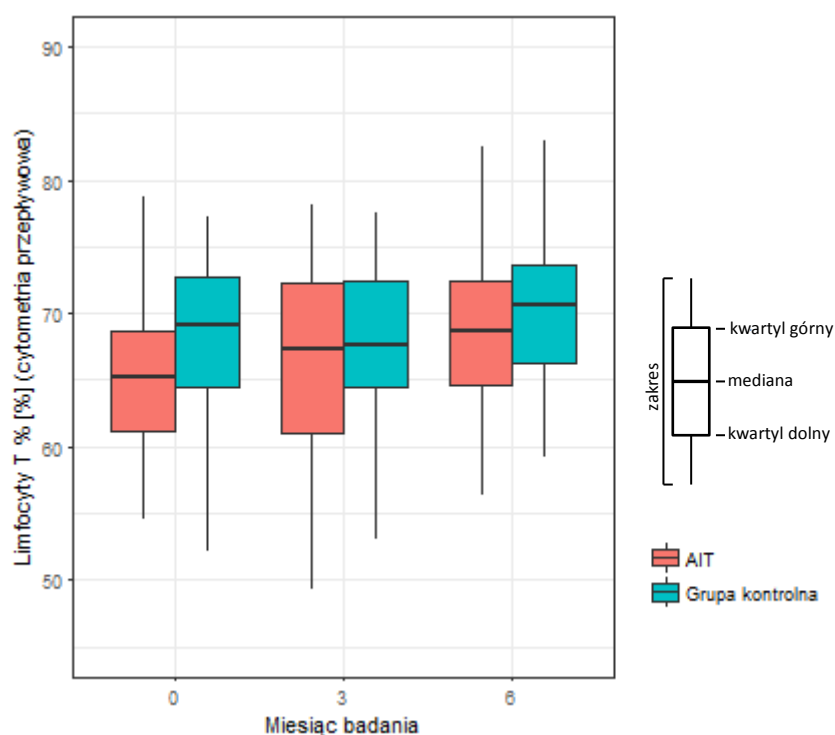
kolor czerwony – istotnie statystyczny spadek w czasie

kolor zielony – istotnie statystyczny wzrost w czasie

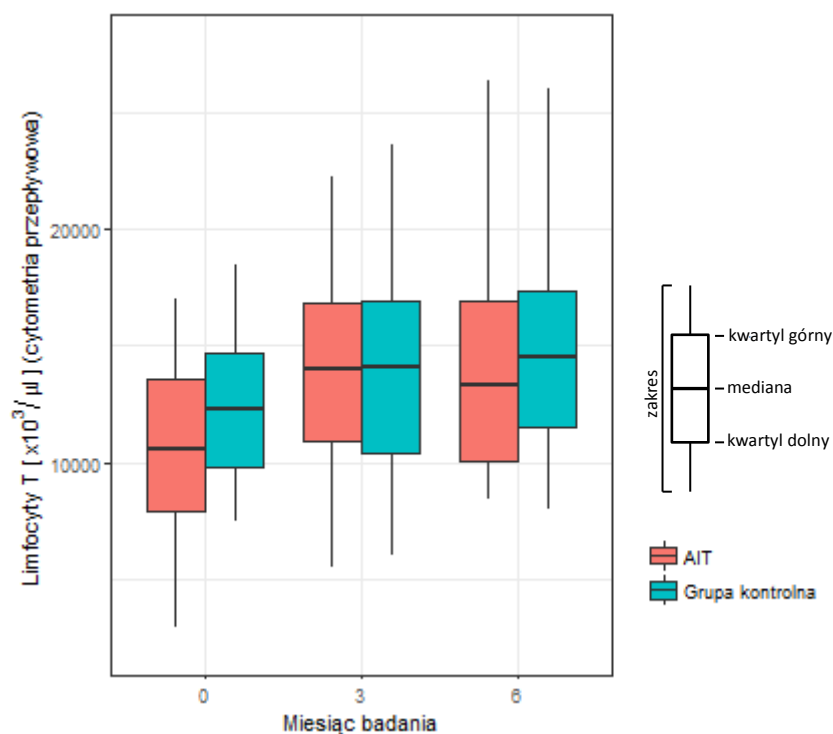
- wartości testu ANOVA Friedmana i współczynnika Kendala nieistotne statystycznie



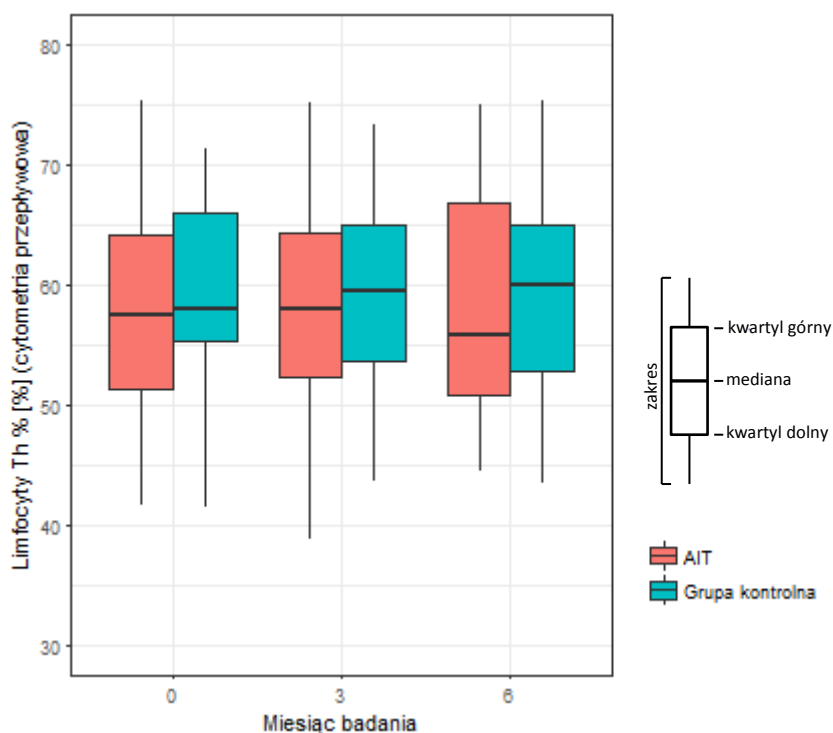
Rycina 25. Rozkład liczby limfocytów (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



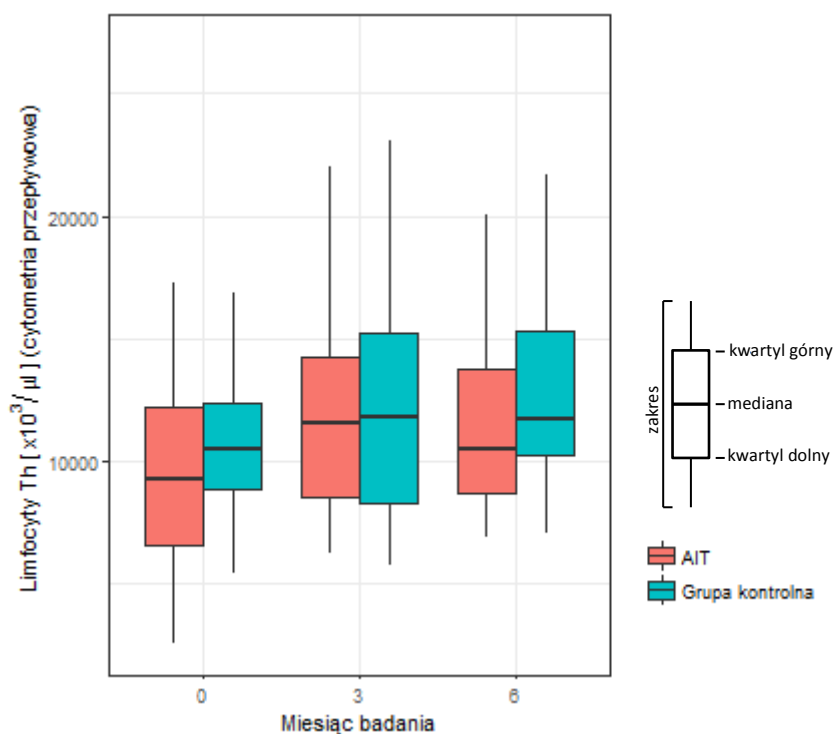
Rycina 26. Rozkład odsetka limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



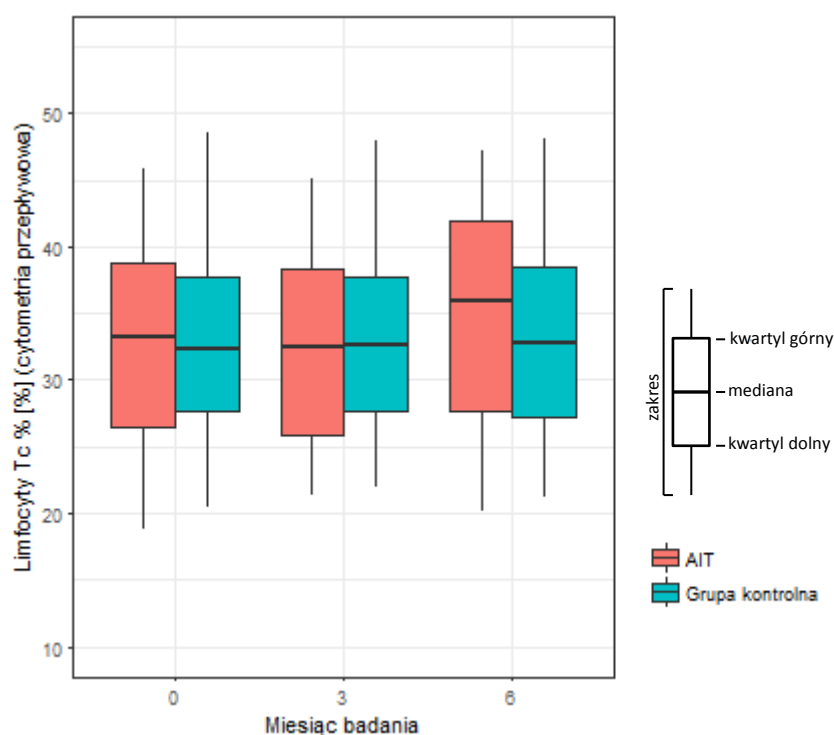
Rycina 27. Rozkład liczby limfocytów T (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



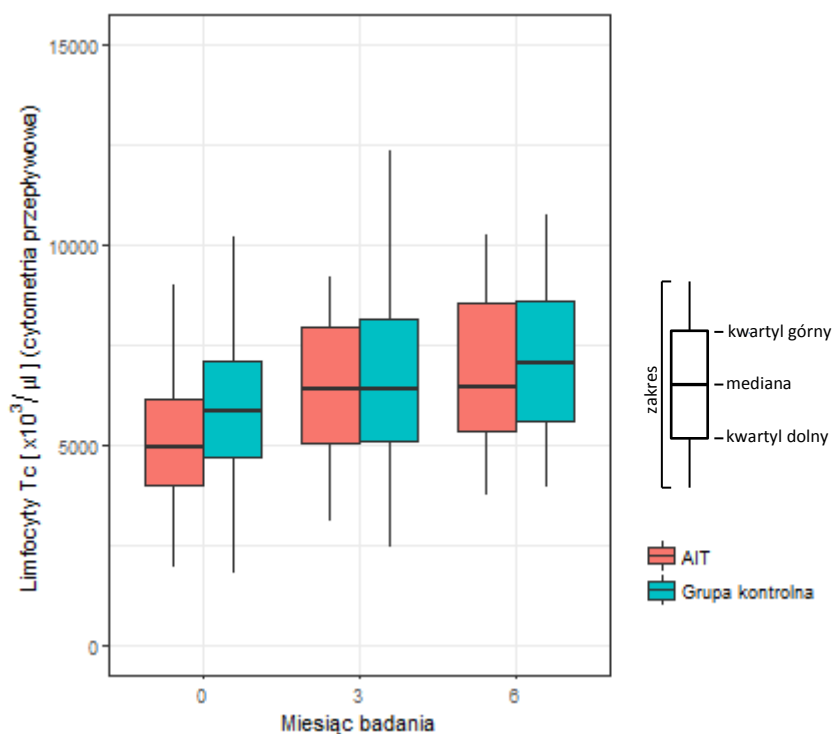
Rycina 28. Rozkład odsetka limfocytów Th względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



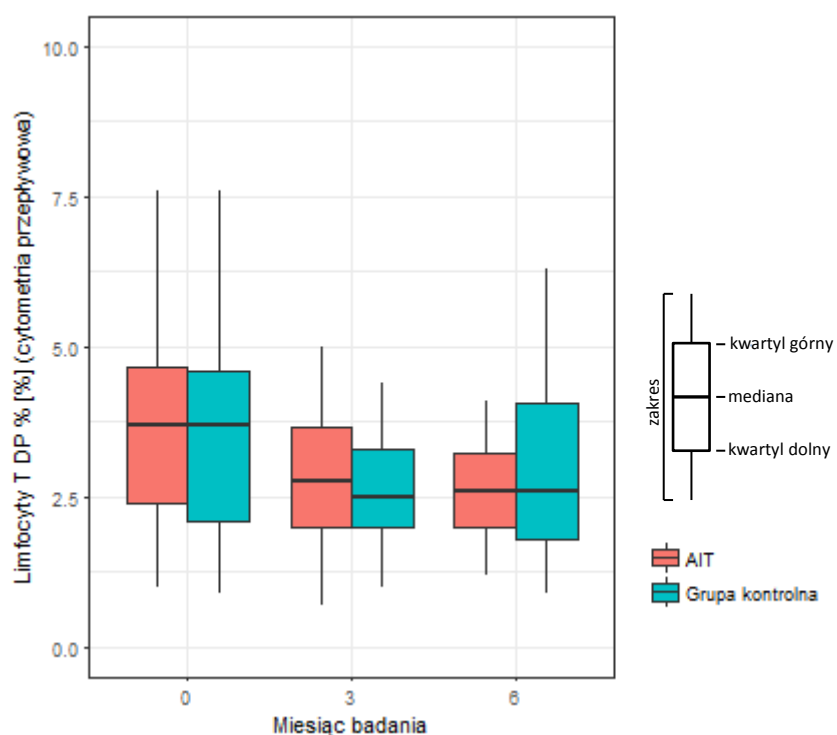
Rycina 29. Rozkład liczby limfocytów Th (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



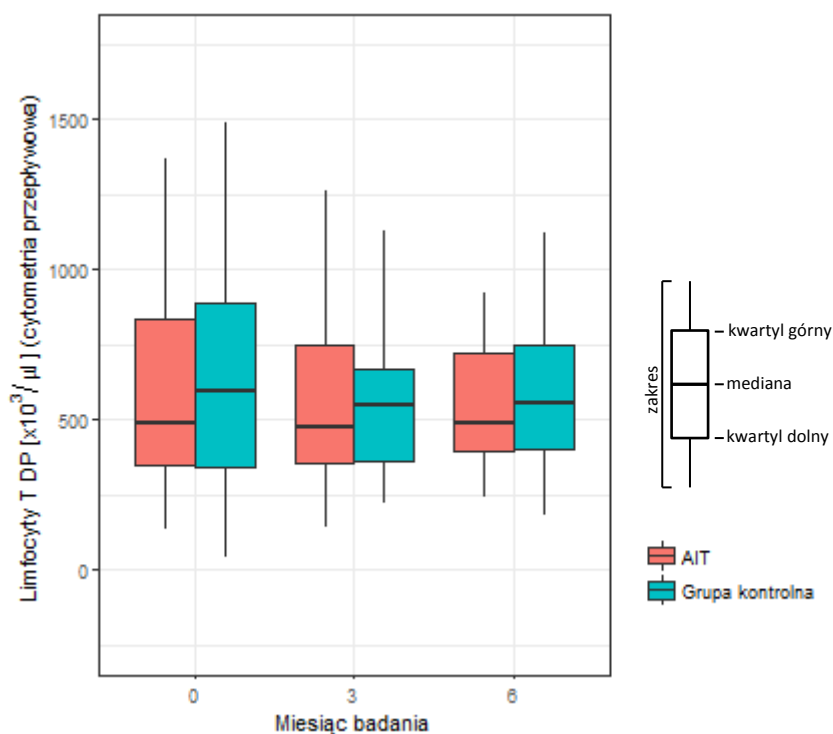
Rycina 30. Rozkład odsetka limfocytów Tc względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



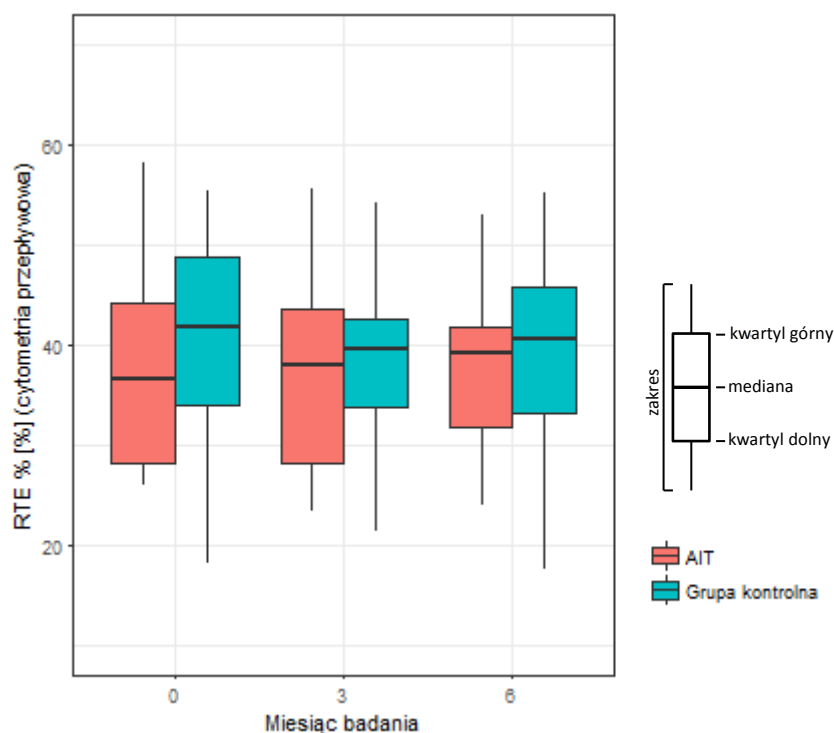
Rycina 31. Rozkład liczby limfocytów Tc (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w tabeli 18.).



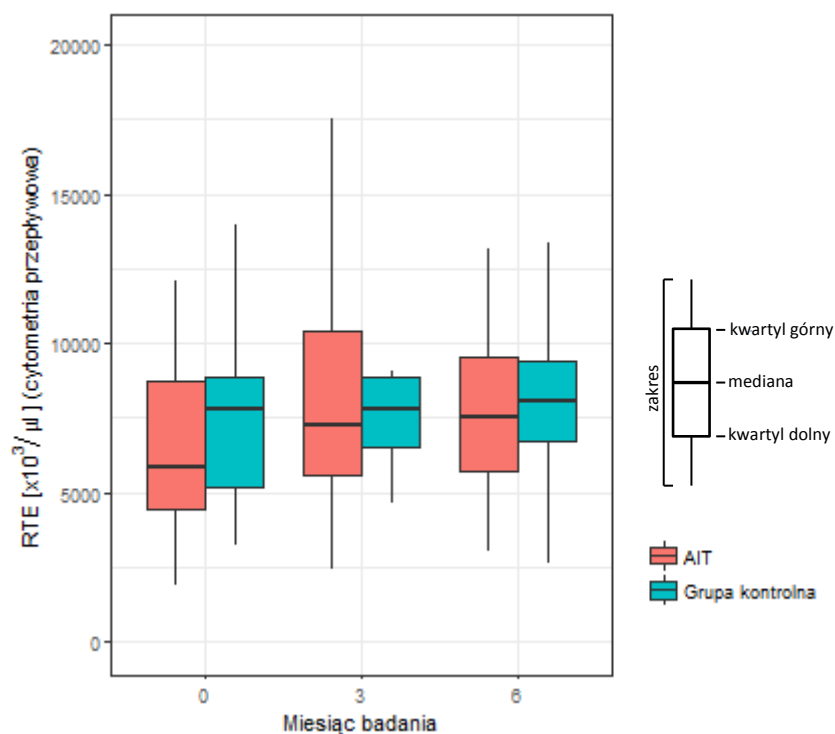
Rycina 32. Rozkład odsetka limfocytów T DP względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w tabeli 18.).



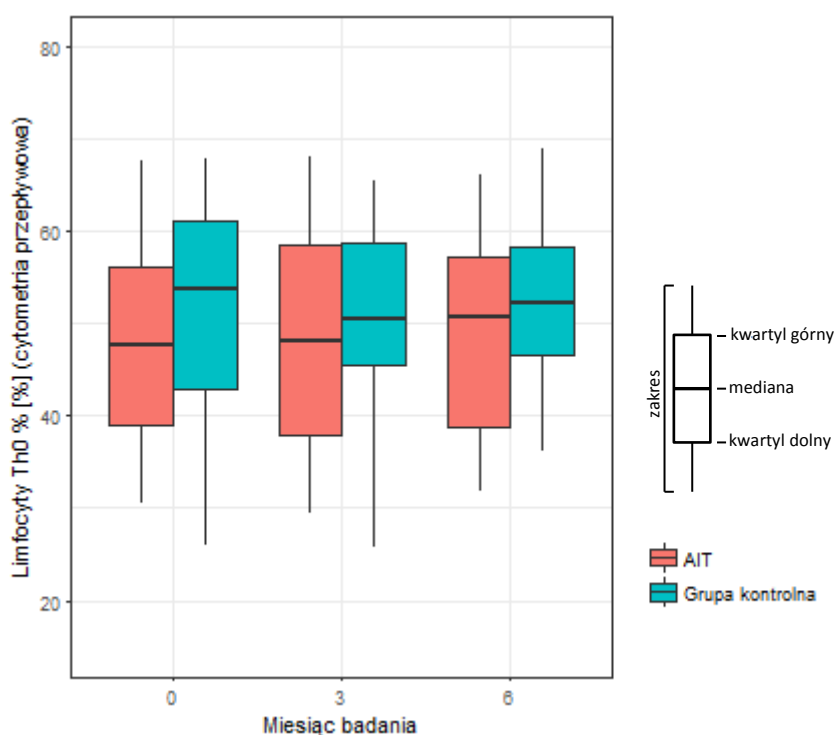
Rycina 33. Rozkład liczby limfocytów T DP (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



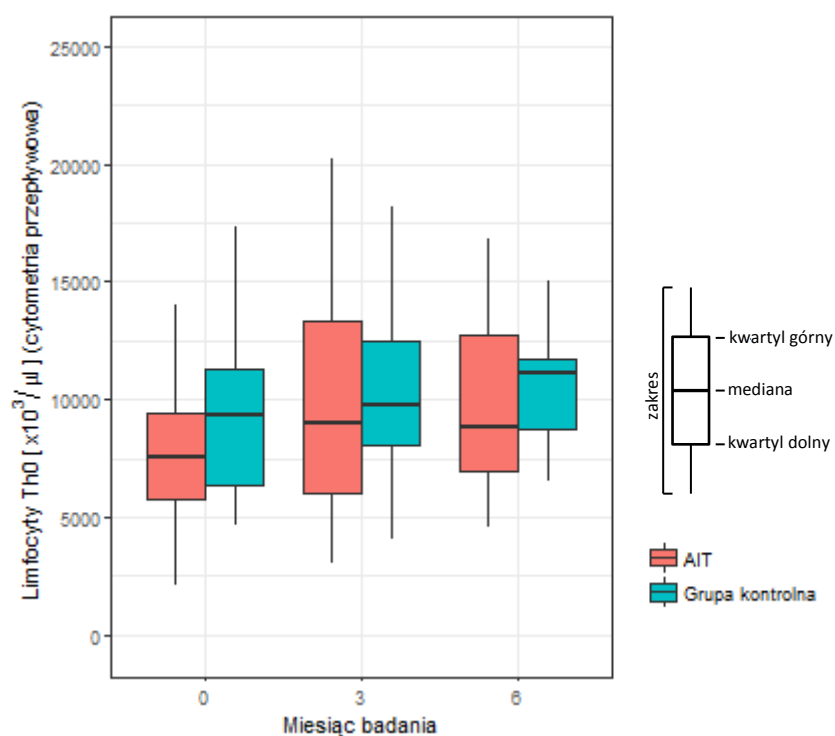
Rycina 34. Rozkład odsetka RTE względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



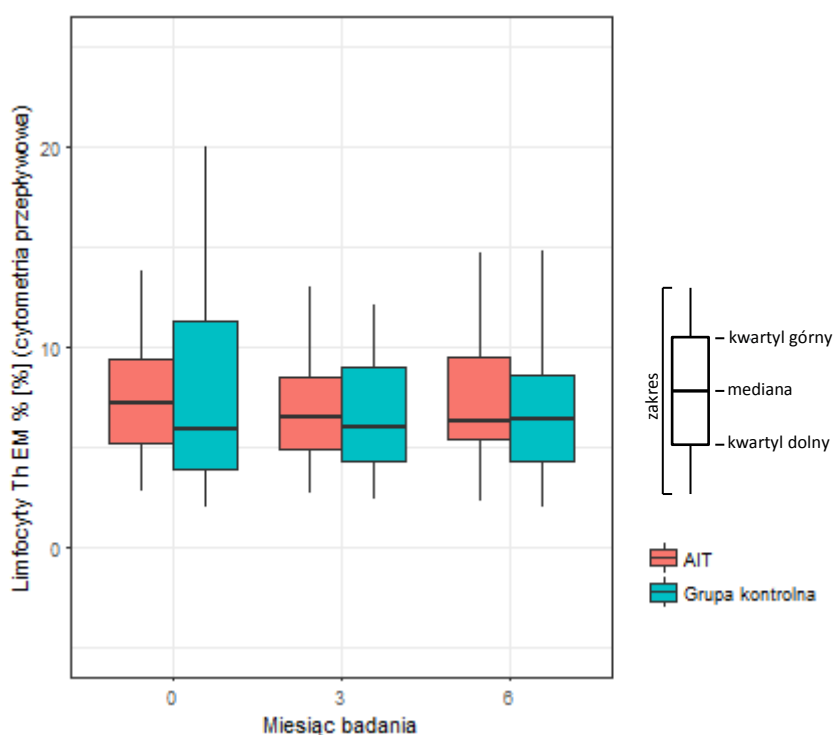
Rycina 35. Rozkład liczby RTE (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w tabeli 18.).



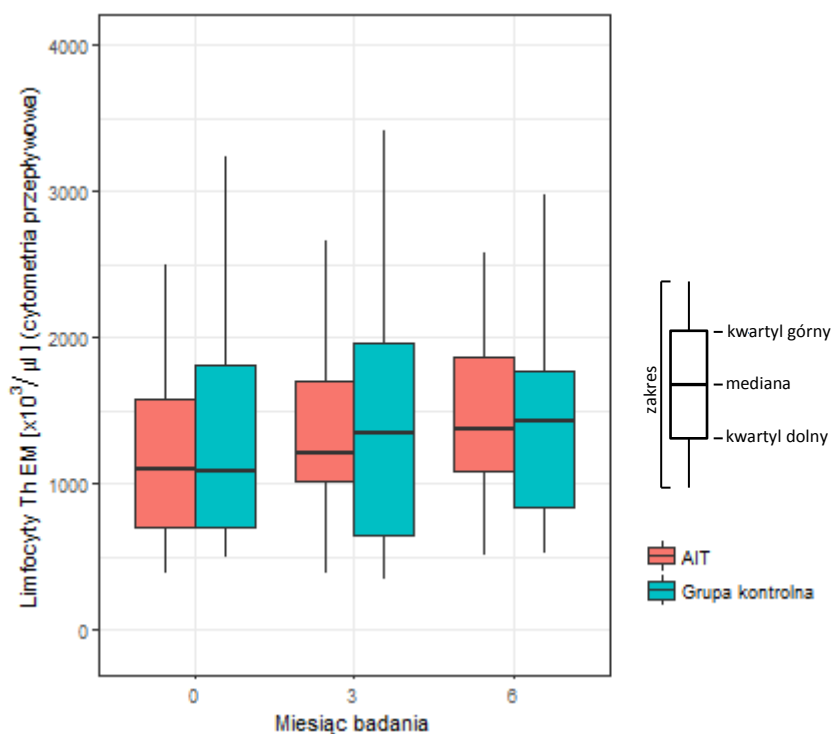
Rycina 36. Rozkład odsetka limfocytów Th0 względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w tabeli 18.).



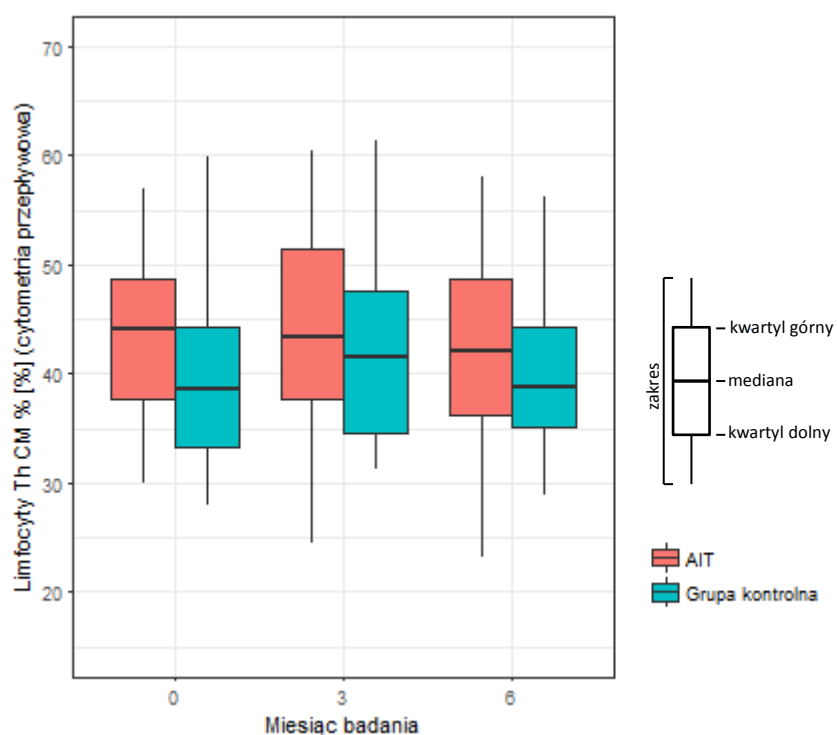
Rycina 37. Rozkład liczby limfocytów Th0 (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



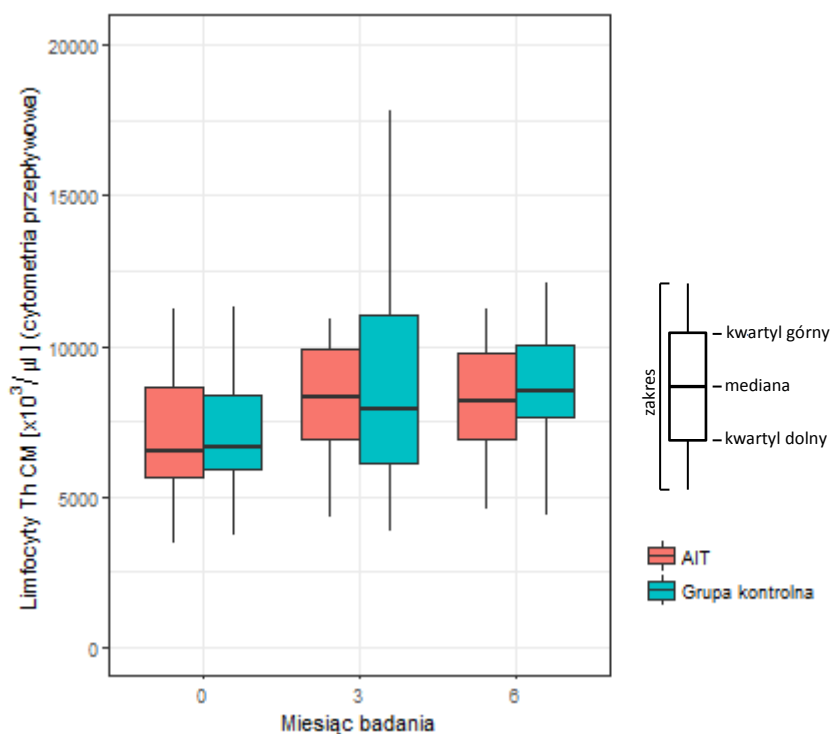
Rycina 38. Rozkład odsetka limfocytów Th EM względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



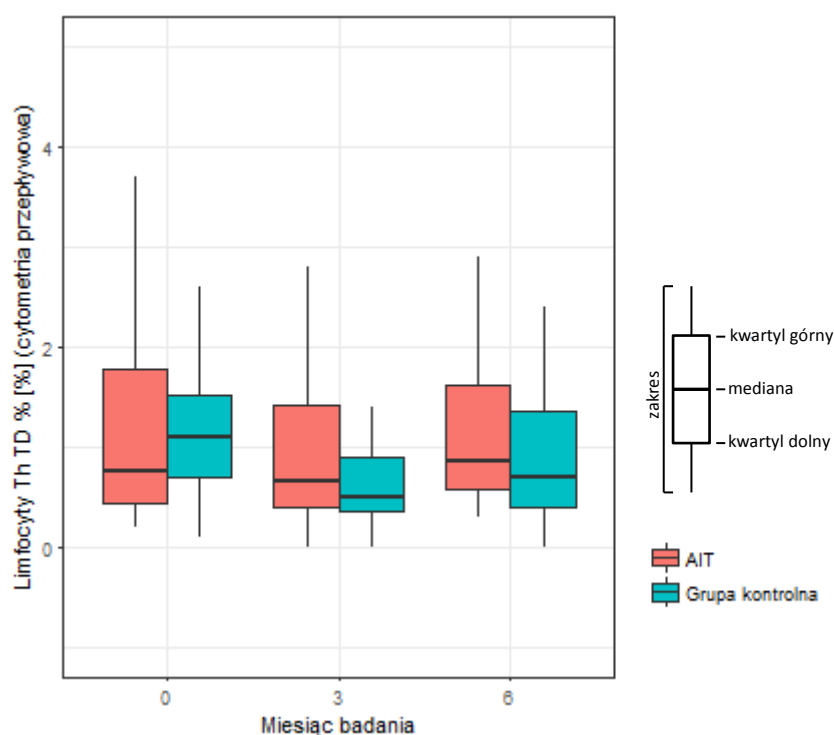
Rycina 39. Rozkład liczby limfocytów Th EM (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



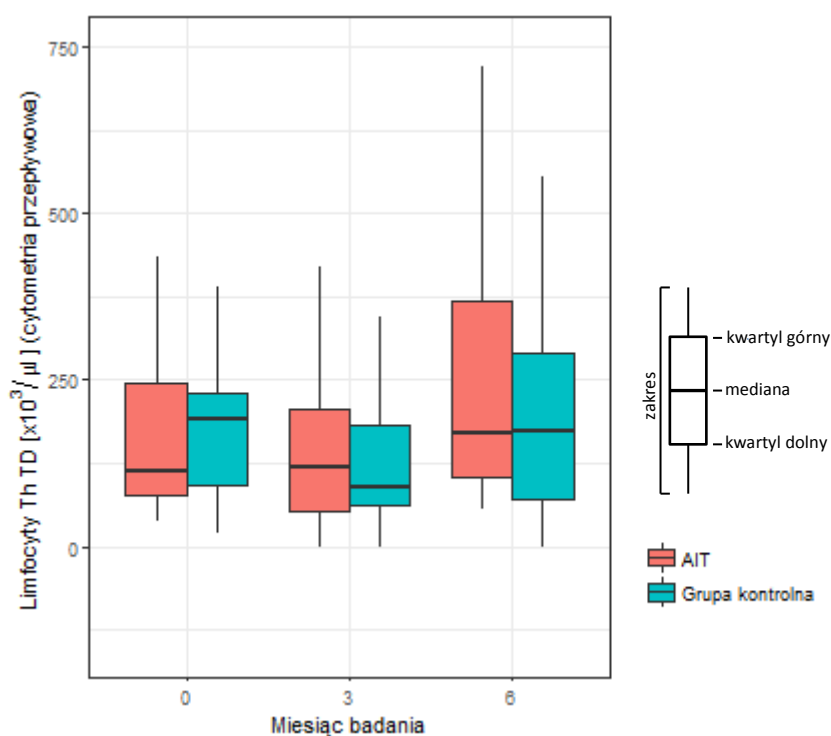
Rycina 40. Rozkład odsetka limfocytów Th CM względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



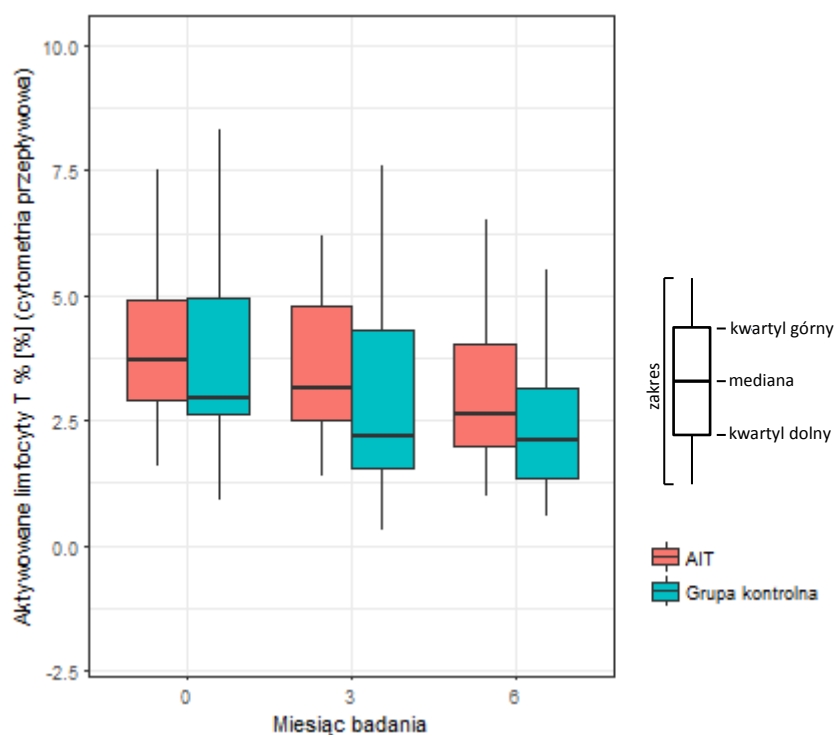
Rycina 41. Rozkład liczby limfocytów Th CM (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



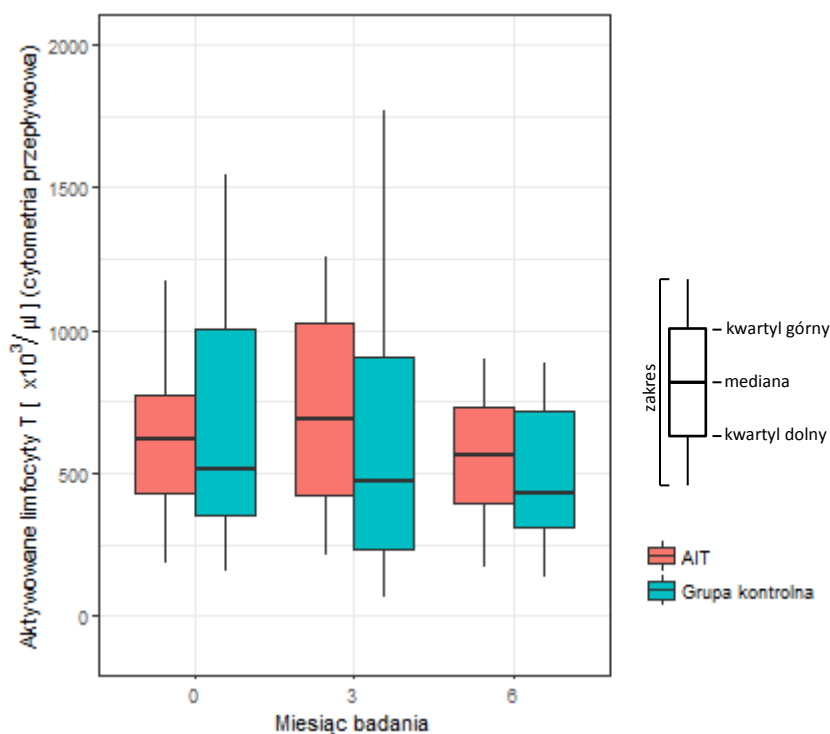
Rycina 42. Rozkład odsetka limfocytów Th TD względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



Rycina 43. Rozkład liczby limfocytów Th TD (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



Rycina 44. Rozkład odsetka aktywowanych limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).



Rycina 45. Rozkład liczby aktywowanych limfocytów T (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 18.**).

Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej w poszczególnych miesiącach badania

Analizując występujące zależności stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów, stwierdzono trzy istotne statystycznie korelacje (**tabela 19**). Wszystkie dotyczyły grupy kontrolnej na początku badania. Dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy stężeniem witaminy D a odsetkiem RTE i odsetkiem limfocytów Th0 względem całkowitej liczby leukocytów, natomiast ujemna dotyczyła odsetka limfocytów Th CM względem całkowitej liczby leukocytów.

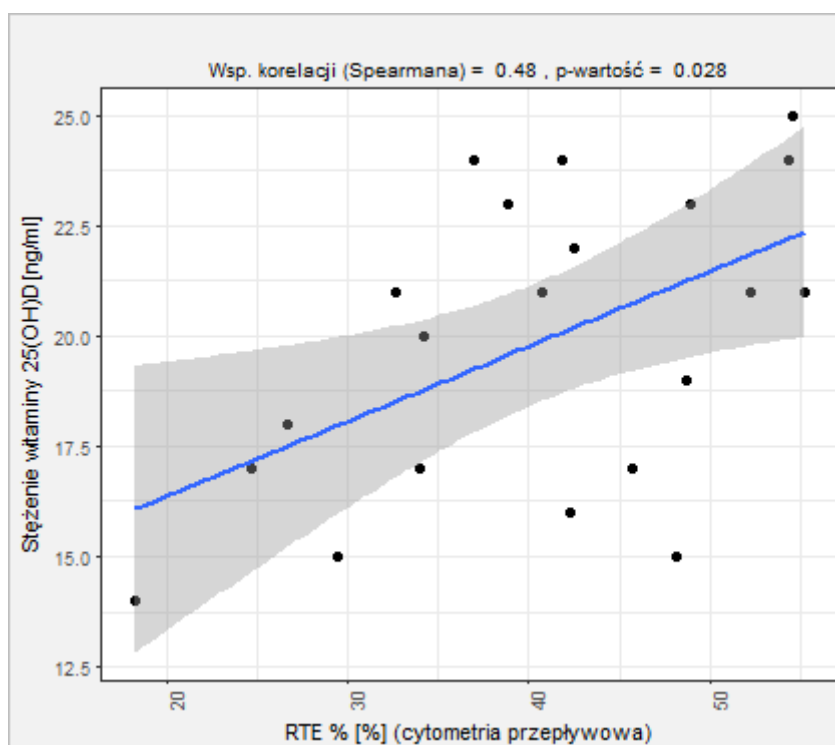
Na **rycinach 46 – 48** przedstawiono wykresy rozrzutu stężenia 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej, dla których występuje istotność statystyczna.

Tabela 19. Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej w poszczególnych miesiącach badania. Część I/II.

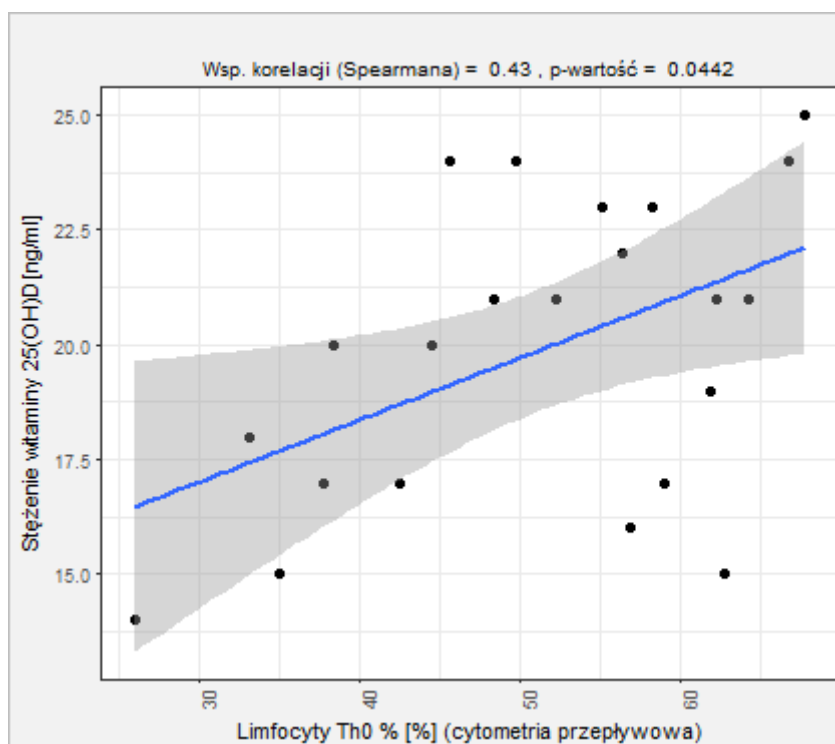
Badany parametr	Rodzaj	Miesiąc 0			Miesiąc 3			Miesiąc 6		
		AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem
Limfocyty*	wsp. korelacji	0.0736	0.0731	0.0942	-0.1063	-0.1937	-0.1336	0.1459	-0.1816	-0.0039
	p wartość	0.6992	0.6959	0.4701	0.5760	0.3050	0.3088	0.4503	0.3282	0.9764
Limfocyty T %	wsp. korelacji	0.0159	0.0730	0.0663	0.2496	-0.0094	0.1312	-0.0998	0.2026	0.0466
	p wartość	0.9337	0.7067	0.6177	0.1834	0.9615	0.3218	0.6132	0.2743	0.7258
Limfocyty T	wsp. korelacji	0.0038	0.0675	0.0705	0.1138	-0.0032	0.0466	-0.1985	0.1066	-0.0350
	p wartość	0.9841	0.7279	0.5955	0.5494	0.9868	0.7259	0.3111	0.5682	0.7923
Limfocyty Th %	wsp. korelacji	-0.1073	-0.0274	-0.0272	-0.0468	0.0417	-0.0262	-0.2134	-0.1939	-0.1839
	p wartość	0.5725	0.8877	0.8383	0.8061	0.8268	0.8423	0.2757	0.2960	0.1632
Limfocyty Th	wsp. korelacji	-0.0319	0.0551	0.0339	0.0470	-0.0283	0.0011	-0.2720	-0.0371	-0.1079
	p wartość	0.8670	0.7765	0.7986	0.8053	0.8819	0.9933	0.1614	0.8427	0.4161
Limfocyty Tc %	wsp. korelacji	-0.0616	0.1002	-0.0155	0.0004	-0.0604	-0.0119	0.1385	0.1716	0.1466
	p wartość	0.7463	0.6052	0.9070	0.9981	0.7510	0.9283	0.4822	0.3559	0.2680
Limfocyty Tc	wsp. korelacji	-0.0556	0.0223	0.0036	-0.0131	-0.1238	-0.0369	0.0189	0.1125	0.0658
	p wartość	0.7704	0.9085	0.9782	0.9451	0.5147	0.7794	0.9239	0.5470	0.6207
Limfocyty T DP %	wsp. korelacji	0.1117	-0.2583	-0.0698	-0.0499	0.1260	0.0252	0.2241	-0.1137	0.0245
	p wartość	0.5568	0.1761	0.5992	0.7933	0.5071	0.8486	0.2517	0.5426	0.8541
Limfocyty T DP	wsp. korelacji	0.2179	-0.2228	0.0060	-0.0984	0.1507	0.0018	0.0724	-0.0941	-0.0081
	p wartość	0.2473	0.2453	0.9643	0.6049	0.4265	0.9891	0.7143	0.6147	0.9514
RTE %	wsp. korelacji	0.0590	0.4791	0.2248	0.0577	0.1860	0.0631	-0.1144	0.1786	0.0794
	p wartość	0.7841	0.0280	0.1377	0.7662	0.4194	0.6631	0.6124	0.3539	0.5798
RTE	wsp. korelacji	-0.0717	0.3183	0.1218	-0.0192	0.0809	0.0216	-0.0758	0.1894	0.0675
	p wartość	0.7393	0.1597	0.4254	0.9211	0.7273	0.8814	0.7373	0.3250	0.6377
Limfocyty Th0 %	wsp. korelacji	-0.0309	0.4300	0.1703	0.0494	0.1470	0.0660	-0.1920	0.0091	-0.0449
	p wartość	0.8808	0.0442	0.2473	0.7953	0.4384	0.6161	0.3278	0.9613	0.7355

Tabela 19. Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej w poszczególnych miesiącach badania. Część II/II.

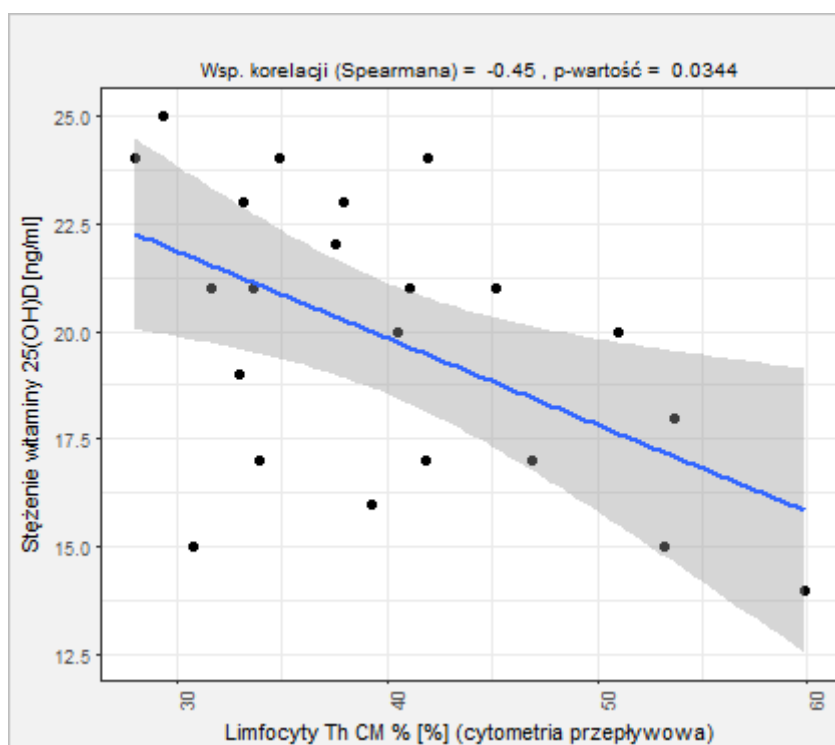
Badany parametr	Rodzaj	Miesiąc 0			Miesiąc 3			Miesiąc 6		
		AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem
Limfocyty Th0	wsp. korelacji	-0.0313	0.3317	0.1474	0.0129	0.0169	0.0154	-0.1108	0.0600	-0.0167
	p wartość	0.8795	0.1315	0.3173	0.9460	0.9292	0.9069	0.5746	0.7486	0.9001
Limfocyty Th EM %	wsp. korelacji	0.0926	-0.1895	-0.0412	0.0268	-0.2378	-0.0795	0.2789	-0.2137	-0.0562
	p wartość	0.6527	0.3982	0.7812	0.8880	0.2058	0.5458	0.1507	0.2483	0.6726
Limfocyty Th EM	wsp. korelacji	0.0752	-0.2533	-0.0481	0.0488	-0.1197	-0.0498	0.1374	-0.1845	-0.0359
	p wartość	0.7149	0.2553	0.7452	0.7980	0.5285	0.7053	0.4857	0.3203	0.7872
Limfocyty Th CM %	wsp. korelacji	-0.0830	-0.4500	-0.2062	-0.1036	-0.2062	-0.1000	-0.0291	0.0853	0.0257
	p wartość	0.6869	0.0344	0.1598	0.5861	0.2744	0.4470	0.8833	0.6481	0.8466
Limfocyty Th CM	wsp. korelacji	0.0086	-0.3385	-0.1279	0.0143	-0.0992	-0.0606	-0.2032	0.0981	-0.0263
	p wartość	0.9668	0.1233	0.3864	0.9404	0.6019	0.6456	0.2997	0.5995	0.8434
Limfocyty Th TD %	wsp. korelacji	0.0610	-0.0359	0.0375	0.1170	-0.1435	-0.0058	0.1451	-0.2177	-0.0826
	p wartość	0.7673	0.8741	0.8001	0.5382	0.4492	0.9651	0.4613	0.2395	0.5337
Limfocyty Th TD	wsp. korelacji	0.0491	0.0023	0.0759	0.1009	-0.1144	0.0096	0.0908	-0.2316	-0.0677
	p wartość	0.8116	0.9920	0.6080	0.5959	0.5472	0.9422	0.6460	0.2100	0.6104
Aktywowane limfocyty T %	wsp. korelacji	0.2842	-0.0528	0.0755	0.1849	-0.1063	0.0251	0.2130	0.0036	0.0578
	p wartość	0.1351	0.7896	0.5768	0.3280	0.5761	0.8493	0.2764	0.9845	0.6639
Aktywowane limfocyty T	wsp. korelacji	0.2558	-0.0764	0.1047	0.1833	-0.0818	0.0433	0.1185	0.0135	0.0331
	p wartość	0.1805	0.6992	0.4382	0.3324	0.6673	0.7424	0.5482	0.9424	0.8032
Legenda: * – metoda oznaczania: morfologia krwi z rozmazem automatycznym Limfocyty T – CD3+ CD19- Limfocyty Th – CD3+ CD4+ CD8- Limfocyty Tc – CD3+ CD4- CD8+ Limfocyty DP (podwójnie pozytywne) – CD3+ CD4+ CD8+ RTE (wczesne emigranty grasicze) – CD3+ CD4+ CD45RA+ CD31+ Limfocyty Th0 – CD3+ CD4+ CD45RA+ CD27+										
					Limfocyty ThEM (pamięci efektorowej) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27- Limfocyty ThCM (pamięci centralnej) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27+ Limfocyty ThTD (terminalnie zróżnicowane) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27- Aktywowane limfocyty T – CD3+ HLA/DR3+ wsp. korelacji – współczynnik korelacji kolor czerwony – istotnie statystyczna ujemna korelacja kolor zielony – istotnie statystyczna dodatnia korelacja					



Rycina 46. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby wczesnych emigrantów grasiczych (cytometria przepływowa) kobiet z grupy kontrolnej w momencie rozpoczęcia badania.



Rycina 47. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i odsetka limfocytów Th naiwnych względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) kobiet z grupy kontrolnej w momencie rozpoczęcia badania.



Rycina 48. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i odsetka limfocytów Th pamięci centralnej względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) kobiet z grupy kontrolnej w momencie rozpoczęcia badania.

Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej nabytej w czasie badania

Zaobserwowano istotne statystycznie korelacje pomiędzy wzrostem stężenia witaminy D a zmianą badanych parametrów odpowiedzi komórkowej nabytej. Dla sześciu spośród badanych parametrów (limfocyty T, Th, Tc, Th0, Th CM oraz RTE) stwierdzono dodatnią korelację w grupie AIT, grupie kontrolnej oraz dla obu grup łącznie. Wzrost odsetka limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów i liczby limfocytów Th EM był dodatnio skorelowany ze wzrostem stężenia witaminy D w grupie AIT oraz w łącznym podsumowaniu obu grup. Pozytywna korelacja zmiany odsetka limfocytów Tc względem całkowitej liczby leukocytów i zmian stężenia badanej witaminy była obecna jedynie w grupie AIT.

Negatywną korelację stwierdzono między zmianą stężenia witaminy D a odsetkiem limfocytów Th DP względem całkowitej liczby leukocytów w grupie AIT i obu grupach łącznie, odsetkiem limfocytów Th TD względem całkowitej liczby leukocytów w obu

grupach łącznie oraz odsetkiem aktywowanych limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów w grupie kontrolnej i obu grupach łącznie. Dane przedstawiono w **tabeli 20**.

Tabela 20. Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej nabytej w czasie badania.

Badany parametr	AIT		Grupa kontrolna		Razem	
	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość
Limfocyty*	0.1865082	0.15362	-0.1122245	0.38516	0.0115787	0.89969
Limfocyty T %	0.4665485	0.00020	0.0863372	0.51557	0.2779223	0.00241
Limfocyty T	0.6168728	<0.00001	0.3129572	0.01580	0.4516506	<0.00001
Limfocyty Th %	0.0473831	0.72156	0.1482095	0.25842	0.0915806	0.32398
Limfocyty Th	0.5002400	0.00005	0.3114588	0.01542	0.3906250	0.00001
Limfocyty Tc %	0.2825759	0.03012	-0.0317819	0.80951	0.1555391	0.09260
Limfocyty Tc	0.5544288	0.00001	0.2952700	0.02200	0.4231800	<0.00001
Limfocyty T DP %	-0.3370609	0.00904	-0.1379640	0.29316	-0.2525165	0.00580
Limfocyty T DP	-0.1342488	0.31072	-0.0281990	0.83064	-0.0828053	0.37269
RTE %	-0.1125783	0.45633	-0.1328018	0.40783	-0.1189865	0.27520
RTE	0.3788267	0.00943	0.3625148	0.01984	0.3709801	0.00044
Limfocyty Th0 %	0.0187103	0.89215	-0.0337533	0.81038	-0.0005944	0.99515
Limfocyty Th0	0.4132758	0.00171	0.2989417	0.02967	0.3553209	0.00017
Limfocyty Th EM %	0.1098270	0.42475	-0.0296683	0.83298	0.0627381	0.52089
Limfocyty Th EM	0.3800779	0.00421	0.2404045	0.08292	0.3171536	0.00087
Limfocyty Th CM %	-0.0580066	0.67400	0.0937595	0.50428	0.0058580	0.95225
Limfocyty Th CM	0.4589426	0.00042	0.3026166	0.02763	0.3580112	0.00015
Limfocyty Th TD %	-0.2169513	0.11161	-0.2142877	0.12337	-0.2141919	0.02673
Limfocyty Th TD	-0.0034146	0.98026	-0.1438501	0.30412	-0.0465356	0.63409
Aktywowane limfocyty T %	-0.1497403	0.26190	-0.4386784	0.00051	-0.2622207	0.00446
Aktywowane limfocyty T	0.0759280	0.57107	-0.2355114	0.07255	-0.0691045	0.46106
Legenda: * – metoda oznaczania: morfologia krwi z rozmazem automatycznym Limfocyty T – CD3+ CD19- Limfocyty Th – CD3+ CD4+ CD8- Limfocyty Tc – CD3+ CD4- CD8+ Limfocyty DP (podwójnie pozytywne) – CD3+ CD4+ CD8+ RTE (wczesne emigranty grasicze) – CD3+ CD4+ CD45RA+ CD31+ Limfocyty Th0 – CD3+ CD4+ CD45RA+ CD27+ Limfocyty ThEM (pamięci efektorowej) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27- Limfocyty ThCM (pamięci centralnej) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27+ Limfocyty ThTD (terminalnie zróżnicowane) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27- Aktywowane limfocyty T – CD3+ HLA/DR3+ kolor czerwony – istotnie statystyczna ujemna korelacja kolor zielony – istotnie statystyczna dodatnia korelacja						

5. Odpowiedź immunologiczna humoralna nabyta

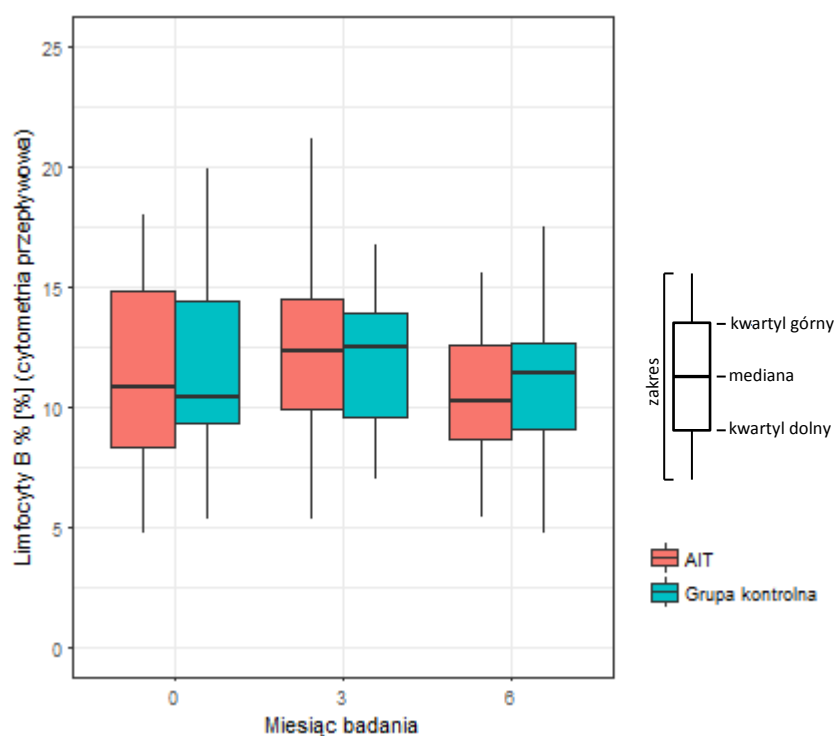
Zmiany parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w czasie badania

Stwierdzono istotny statystycznie wzrost liczby limfocytów B w grupie AIT oraz obu grupach łącznie w pierwszym okresie badania oraz po sześciu miesiącach suplementacji witaminą D. Dodatkowo w grupie AIT obserwowano początkowo istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów B względem całkowitej liczby leukocytów w pierwszym okresie badania, a następnie spadek w drugim okresie badania. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian stężenia przeciwciał anty-TPO czy anty-TG. Analizę statystyczną opisywanych parametrów przedstawiono w **tabeli 21**.

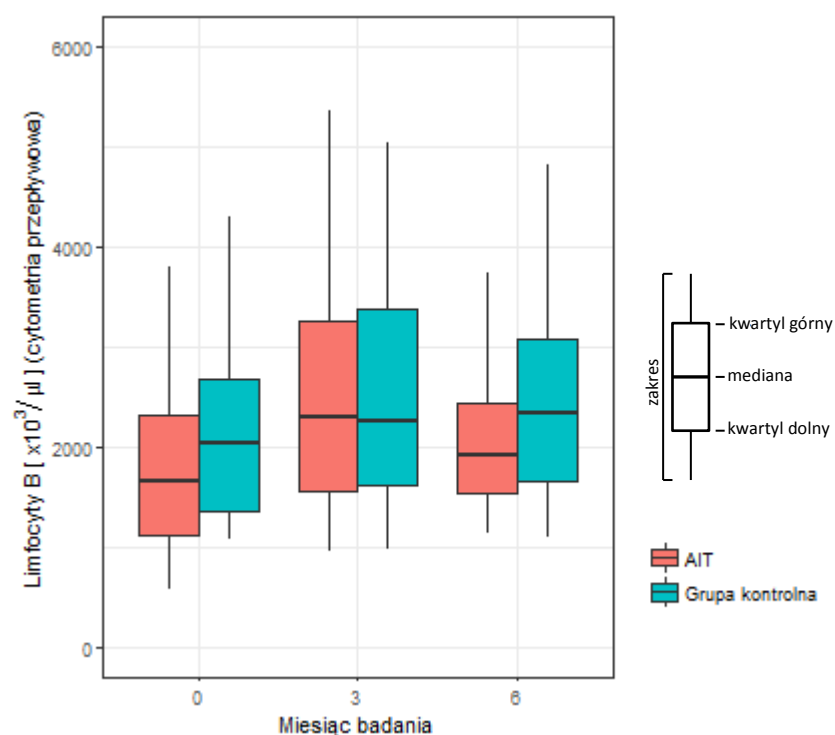
Tabela 21. Analiza statystyczna zmian parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w czasie badania.

Badany parametr	AIT			Grupa kontrolna			Razem		
	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6	Miesiąc 0 - 3	Miesiąc 3 - 6	Miesiąc 0 - 6
Limfocyty B %	0.00602	0.00164	0.63072	-	-	-	-	-	-
Limfocyty B	0.00002	0.08352	0.00331	-	-	-	0.00002	0.20007	0.00059
Anty-TPO	NA	NA	0.69168	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Anty-TG	NA	NA	0.73749	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Legenda: Limfocyty B – CD3- CD19+ Anty-TPO – przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie tarczycowej Anty-TG – przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie NA – brak pomiaru danych									
					kolor czerwony – istotnie statystyczny spadek w czasie				
					kolor zielony – istotnie statystyczny wzrost w czasie				
					- wartości testu ANOVA Friedmana i współczynnika Kendala nieistotne statystycznie				

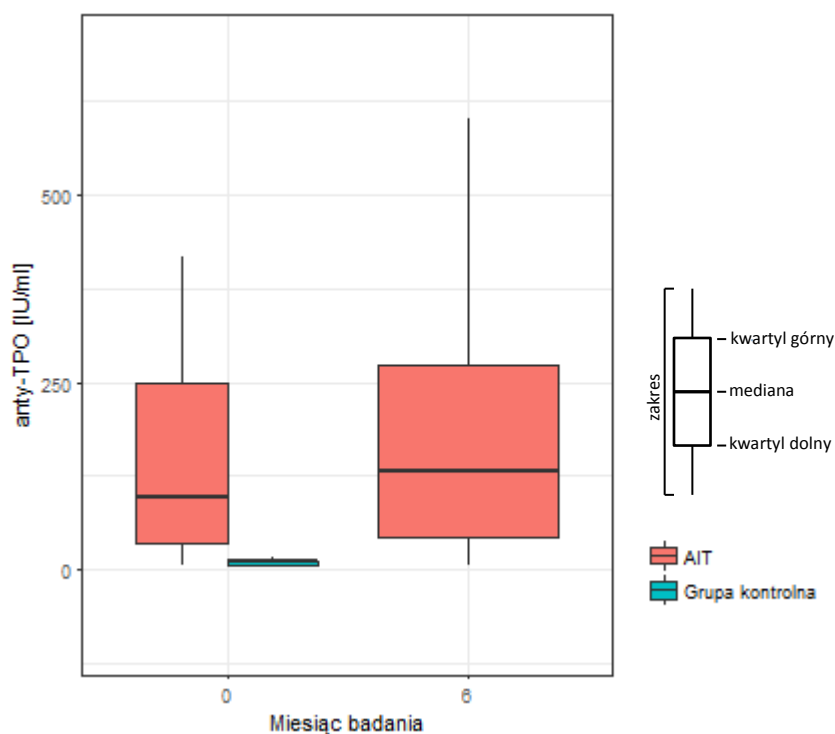
Na **rycinach 49 – 52** przedstawiono rozkłady liczb oraz odsetków względem całkowitej liczby leukocytów, badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej.



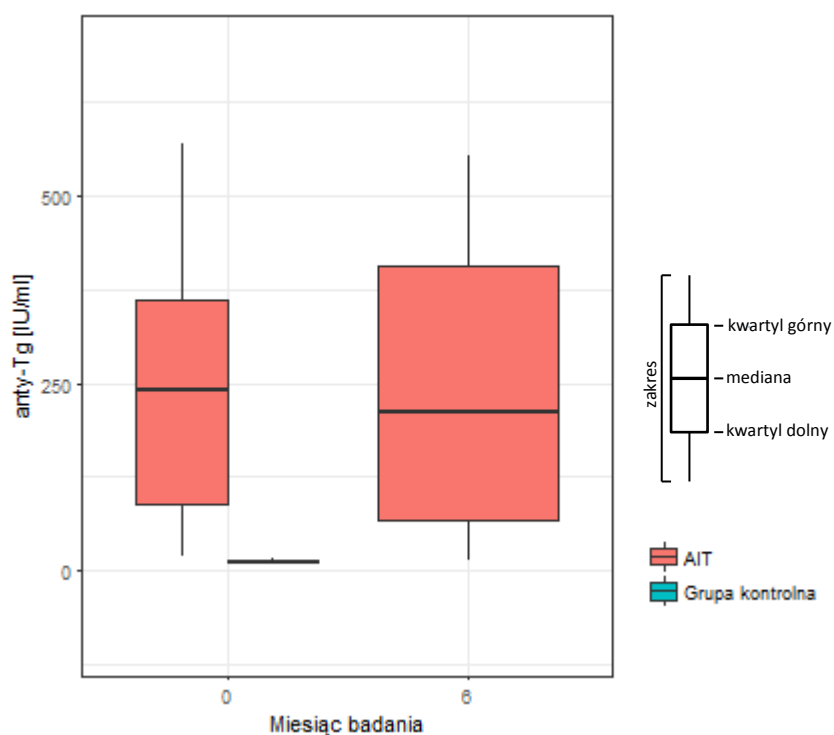
Rycina 49. Rozkład odsetka limfocytów B względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w tabeli 21.).



Rycina 50. Rozkład liczby limfocytów B (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w tabeli 21.).



Rycina 51. Rozkład stężenia przeciwciał anty-TPO na początku oraz po sześciu miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 21.**).



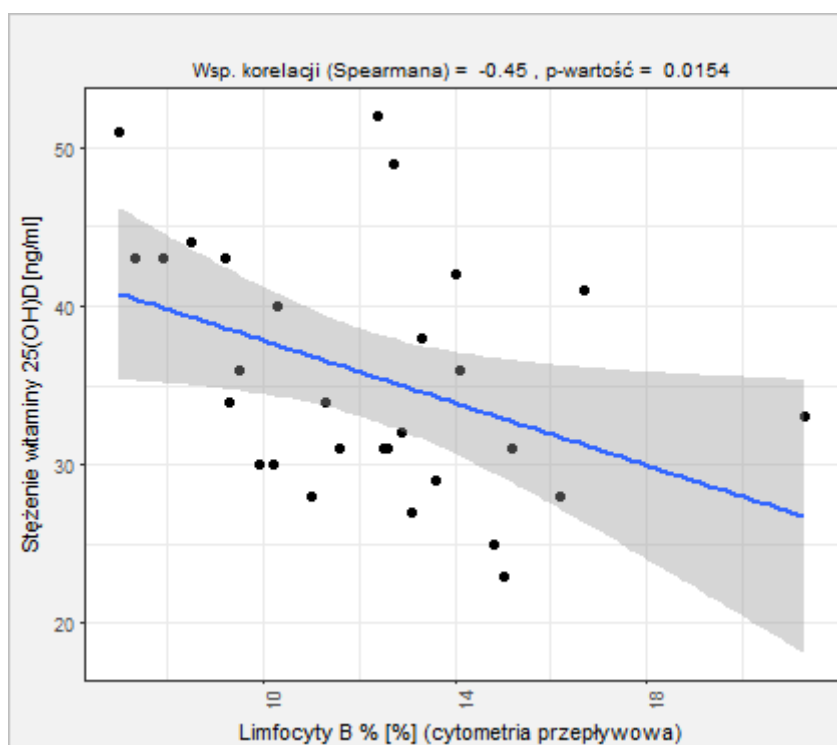
Rycina 52. Rozkład stężenia przeciwciał anty-TG na początku oraz po sześciu miesiącach badania (informacje o istotności statystycznej zamieszczono w **tabeli 21.**).

Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w poszczególnych miesiącach badania.

Stwierdzono istotnie statystyczną ujemną korelację między stężeniem witaminy D a odsetkiem limfocytów B względem całkowitej liczby leukocytów w trzecim miesiącu badania w grupie kontrolnej. Dla pozostałych analizowanych parametrów nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji. Dane przedstawiono w **tabeli 22**. Na **rycinie 53** przedstawiono wykresy rozrzutu stężenia 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej, dla których występuje istotność statystyczna.

Tabela 22. Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w poszczególnych miesiącach badania.

Badany parametr	Rodzaj	Miesiąc 0			Miesiąc 3			Miesiąc 6		
		AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem	AIT	Grupa kontrolna	Razem
Limfocyty B %	wsp. korelacji	-0.0479	-0.1327	-0.0741	0.0776	-0.4456	-0.1685	0.3369	-0.0922	0.0970
	p wartość	0.8015	0.4926	0.5772	0.6835	0.0154	0.2021	0.0796	0.6218	0.4646
Limfocyty B	wsp. korelacji	-0.0107	-0.2310	-0.0662	0.0223	-0.2535	-0.1166	0.1569	-0.0426	0.0592
	p wartość	0.9552	0.2279	0.6185	0.9070	0.1845	0.3793	0.4254	0.8200	0.6560
Anty-TPO	wsp. korelacji	0.1262	0,0118	-0,0806	NA	NA	NA	-0.1965	NA	NA
	p wartość	0.5064	0,9498	0,5369	NA	NA	NA	0.3068	NA	NA
Anty-TG	wsp. korelacji	-0.1378	-0,1839	-0,2694	NA	NA	NA	-0.1352	NA	NA
	p wartość	0.4678	0,3218	0,0869	NA	NA	NA	0.4842	NA	NA
Legenda: Limfocyty B – CD3- CD19+ Anty-TPO – przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie tarczycowej Anty-TG – przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie										
					wsp. korelacji – współczynnik korelacji					
					NA – brak pomiaru danych					
					kolor czerwony – istotnie statystyczna ujemna korelacja					



Rycina 53. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i odsetka limfocytów B względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) u kobiet z grupy kontrolnej w trzecim miesiącu badania.

Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w czasie badania

Analizując zmiany stężenia witaminy D i zmiany w czasie badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej, stwierdzono istotne statystycznie dodatnie korelacje w zakresie liczby limfocytów B w grupie pacjentek z AIT oraz w obu grupach łącznie (tabela 23).

Tabela 23. Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w czasie badania.

Badany parametr	AIT		Grupa kontrolna		Razem	
	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość	wsp. korelacji	p wartość
Limfocyty B %	0.1054370	0.42675	-0.0795785	0.54909	-0.0031275	0.97330
Limfocyty B	0.4277609	0.00073	0.2229578	0.08963	0.3195735	0.00044
Anty-TPO	0.1727834	0.36121	NA	NA	NA	NA
Anty-TG	-0.0239421	0.90006	NA	NA	NA	NA
Legenda: Limfocyty B – CD3- CD19+ Anty-TPO – przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie tarczycowej Anty-TG – przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie						
			NA – brak pomiaru danych			
			kolor zielony – istotnie statystyczna dodatnia korelacja			

V. Dyskusja

Szereg badań wskazuje, że witamina D ma istotny wpływ na funkcję układu immunologicznego. Większość badań została jednak przeprowadzona w warunkach *in vitro*, zarówno na liniach komórkowych mysich, jak i ludzkich. Natomiast niewiele jest badań *in vivo* u ludzi oceniających wpływ suplementacji witaminą D na układ odpornościowy. Wielu autorów wskazuje na modulujące właściwości wspomnianej witaminy w AIT, lecz badano jedynie jej wpływ na stężenie autoprzeciwciał, w tym przeciwciał przeciwtarczycowych, bez wyjaśnienia tła komórkowego tych obserwacji i bez wchodzenia w komórkowe mechanizmy interakcji komórek immunologicznych. W prezentowanej pracy podjęto się zbadania wpływu suplementacji witaminą D₃ na immunokompetencję układu odpornościowego u chorych z AIT. Przedstawione wyniki dotyczą prospektywnego badania, przeprowadzonego w warunkach *in vivo* u pacjentów z AIT oraz w grupie osób zdrowych.

W prezentowanym badaniu nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie zakresie badanych komórek układu odpornościowego pomiędzy grupą AIT a grupą kontrolną w chwili włączenia do badania. Trudno porównać przedstawione wyniki z danymi z piśmiennictwa, ponieważ do tej pory nie przeprowadzano takich badań. W tym zakresie badania są pionierskie.

1. Ocena parametrów biochemicznych

W badaniu Kim i współpracowników stwierdzono, że pacjenci z AIT, którzy mają niedobór witaminy D mają też wyższe stężenia TSH i wykazują wyższe ryzyko niedoczynności tarczycy (169). Ujemną korelację pomiędzy stężeniem witaminy D i TSH wykazał zespół Zhanga. Stwierdzona korelacja występowała niezależnie od stężenia hormonów tarczycy (170). Podobne wyniki badań opublikował Mackay ze współpracownikami (153). Natomiast Bouillon ze współpracownikami stwierdzili, że stężenie witaminy D nie różni się pomiędzy grupami pacjentów z AIT w hipotyreozie czy eutyreozie, a także w grupie kontrolnej. Podobne wnioski przedstawił zespół Effraimidis u pacjentów ze świeżo rozpoznanym AIT w porównaniu z grupą kontrolną (132). Brak korelacji między stężeniem witaminy D a stężeniem TSH stwierdzili także inni badacze (171). W randomizowanym badaniu Anarakiego stwierdzono brak wpływu suplementacji witaminą D na stężenie TSH po trzech miesiącach podawania witaminy D (172). W obecnym

badaniu podczas sześciomiesięcznego okresu obserwacji stwierdzono istotny statystycznie wzrost stężenia TSH u pacjentek z AIT. Mimo, że stężenie TSH pozostawało w granicach normy przez cały okres badania, to tendencja była wyraźna.

2. Odpowiedź immunologiczna komórkowa wrodzona

Leukocyty, monocyty i granulocyty

W dostępnych danych z piśmiennictwa brak jest informacji co do selektywnej oceny poziomu subpopulacji leukocytów, monocytów czy granulocytów we krwi obwodowej u pacjentów z AIT w odniesieniu do stężenia witaminy D. W przeprowadzonym w niniejszej pracy badaniu wykazano istotne statystycznie zwiększenie liczby leukocytów w badanych grupach, a tendencje zmian były zależne od zmian stężenia witaminy D. Obserwowane zmiany leukocytów w czasie były selektywne i nie dotyczyły wszystkich subpopulacji. Nie zauważono natomiast zmian liczby monocytów w czasie trwania badania.

Niewiele jest danych oceniających liczbę eozynofili we krwi obwodowej u pacjentów z AIT. Ekambaram wskazuje na istotność oceny liczby eozynofili w materiale cytologicznym uzyskanym z BACC. Nie odnosi się jednak do liczby eozynofili we krwi obwodowej, co jest jednak zupełnie odrębnym przedziałem komórkowym (173). W przeprowadzonym obecnie badaniu nie wykazano związku pomiędzy liczbą eozynofili a suplementacją witaminą D. Zauważono natomiast wzrost liczby bazofili w czasie całego okresu suplementacji w grupie kontrolnej oraz w łącznym podsumowaniu obu grup pomiędzy rozpoczęciem a zakończeniem badania oraz w drugim okresie suplementacji. W prezentowanym badaniu zaobserwowano wzrost liczby neutrofilii u pacjentów z AIT oraz w łącznym podsumowaniu obu grup. Wzrost ten był skorelowany ze wzrostem stężenia witaminy D.

Komórki NT i NKT

Do tej pory komórki NK i NKT w AIT badano jedynie w pracach Liu oraz Guo. Liu wraz ze współpracownikami przeprowadził analizę cytometryczną, w której stwierdzono większy odsetek komórek NK u pacjentów z ciężkim AIT w porównaniu z AIT o umiarkowanym przebiegu. Nie występowała natomiast różnica istotna statystycznie pomiędzy chorymi z AIT a grupą kontrolną w zakresie badanych komórek (174). Zespół Guo odkrył, że u pacjentów ze świeżo zdiagnozowanym AIT w eutyreozy odsetek komórek NKT był większy niż u osób w grupie kontrolnej (175).

Pozostałe dostępne badania pośrednio wskazują na udział komórek NT w patogenezie AIT. Rizzo ze współpracownikami zauważył zwiększoną aktywność komórek NK przeciwko

tyreocytom zainfekowanym HHV-6 u pacjentów z AIT. Stąd też autorzy uważają, że infekcja HHV-6 jest jednym z czynników ryzyka prowadzącym do rozwoju AIT poprzez zwiększenie sekrecji cytokin prozapalnych przez komórki NK, co z kolei może podtrzymywać przetrwały stan zapalny tarczycy u pacjentów z AIT (176). Z drugiej strony upośledzona aktywność komórek NK jest związana z defektem produkcji lub też aktywności perforyn, co może prowadzić do rozwoju chorób autoimmunologicznych (177). Pośrednie badanie aktywności komórek NK przeprowadził zespół Wu, który stwierdził zmniejszoną ekspresję perforyn w populacji komórek NK u dzieci z AIT (178). Ashouri ze współpracownikami zauważył, że z AIT związane jest występowanie wariantów genu KIR, które bardziej aktywnie pobudzają efektorowe funkcje komórek NK (179).

W niniejszym badaniu nie stwierdzono różnic pomiędzy stężeniem i odsetkiem komórek NK względem całkowitej liczby leukocytów u pacjentów z AIT i w grupie kontrolnej, nie wykazano również zmiany badanych parametrów w czasie pod wpływem suplementacji witaminą D. W odniesieniu do komórek NKT zaobserwowano istotnie statystyczny spadek zarówno odsetka względem całkowitej liczby leukocytów, jak i liczby bezwzględnej w grupie osób z AIT oraz grupie kontrolnej. Należy zauważyć, że AIT jest procesem antygenowo swoistym dla miększu tarczycy, a badanie cytometryczne ocenia komórki obecne we krwi obwodowej. Obserwowane zmiany mogą być związane nie z całkowitą liczbą a z redystrybucją komórek. Na poziom oraz aktywność opisywanych komórek może również wpływać czas trwania AIT. Uważa się, że udział komórek NK jest istotny w początkowej fazie autoimmunizacji (180). Lee przeprowadził badanie na myszach w którym stwierdził, że suplementacja witaminą D może modulować odporność wrodzoną poprzez zwiększenie aktywności komórek NK (ekspresja cytokin, receptorów oraz efekt cytotoksyczny). Jednak efekt obserwowano jedynie u myszy szczupłych w przeciwieństwie do myszy otyłych (181).

3. Odpowiedź immunologiczna humoralna wrodzona

Dotychczas w niewielu badaniach doszukiwano się powiązań pomiędzy niedoborem witaminy D a stężeniem CRP u pacjentów z AIT. Vonda ze współpracownikami stwierdził brak zmian stężenia CRP po trzech miesiącach suplementacji witaminą D w dawce 4300 IU dziennie. Zaobserwował natomiast istotny statystycznie wzrost stężenia wapnia. Przy czym stężenia wapnia zarówno na początku, jak i po trzech miesiącach badania pozostawało w granicach normy (182). We wspomnianym wcześniej randomizowanym badaniu zespołu Anarakiego zaobserwowano brak zmian stężenia CRP po trzech miesiącach suplementacji

(172). W wykonanym w niniejszej pracy badaniu zaobserwowano wzrost stężenia CRP po sześciu miesiącach suplementacji (stężenie CRP podczas kwalifikacji do badania, jak i na zakończenie pozostawało w granicach normy). Dotychczasowe badania z tego zakresu trwały krócej niż przedstawione w niniejszej pracy, stąd też można wysnuć wniosek, że efekt suplementacji witaminy D ujawnia się w późniejszym czasie.

4. Odpowiedź immunologiczna komórkowa nabyta

Limfocyty

Patogeneza AIT jest złożona, uczestniczy w niej wiele różnych populacji komórek układu odpornościowego. W piśmiennictwie najczęściej opisuje się oddzielnie rolę limfocytów T i B w AIT (183-185). W obecnym badaniu, w związku z zastosowaniem metod takich jak rozmaz krwi obwodowej metodą automatyczną oraz odpowiedniego zestawu przeciwciał w cytometrii przepływowej, oceniono również całkowitą liczbę limfocytów. Co ciekawe, w trakcie obserwacji nastąpił wzrost liczby badanych komórek, a ich przyrost był skorelowany ze wzrostem stężenia witaminy D. Nie oceniano dotychczas tego parametru układu immunologicznego u pacjentów z AIT w czasie wyrównywania niedoboru witaminy D. Istotnym przy tym pytaniem pozostaje, czy wzrost ten bardziej dotyczy mobilizacji komórek ze szpiku i co się z tym łączy, zwiększenia repertuaru swoistości antygenowej, czy też jedynie proliferacji istniejącej puli komórek o ustalonej już swoistości antygenowej.

Limfocyty T

Analizując populację komórek T, zaobserwowano wzrost ich liczby wraz ze wzrostem stężenia witaminy D. Podobna korelacja występowała dla zmiany odsetka limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów, jednak nie dotyczyła grupy kontrolnej. Oceniając subpopulacje limfocytów Th i Tc, również zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy zmianą stężenia witaminy D a zmianą liczby wspomnianych komórek w grupie kobiet z AIT, kontrolnej oraz podsumowując obie grupy łącznie. Ponadto odsetek limfocytów Tc względem całkowitej liczby leukocytów zwiększył się w drugim okresie badania u pacjentek z AIT oraz w obu grupach łącznie.

Dojrzewanie limfocytów Th

Dowodzono, że zmniejszona różnorodność subpopulacji komórek T, związana z dysfunkcją grasicy i zmniejszonym wyrzutem grasiczym, jest często obserwowana u osób

starszych, co prowadzi do zwiększonej podatności na infekcje, choroby autoimmunologiczne oraz nowotworowe (9). Przedmiotem mojego zainteresowania były także poszczególne etapy dojrzewania limfocytów Th, które opuszczają grasnicę. W prezentowanym badaniu, jako pierwsza oceniłam wpływ suplementacji witaminą D na dojrzewanie komórek Th.

W badanych populacjach, zarówno pacjentek z AIT, kobiet z grupy kontrolnej, jak i w łącznym podsumowaniu obu grup, wzrost liczby RTE oraz limfocytów Th naiwnych był pozytywnie skorelowany ze wzrostem stężenia witaminy D. Podobnie zwiększenie liczby limfocytów Th CM. Natomiast wzrost liczby limfocytów Th EM był skorelowany ze wzrostem stężenia witaminy D w grupie pacjentek z AIT oraz w łącznym podsumowaniu obu grup. Podczas gdy istotny statystycznie wzrost zaobserwowano jedynie w łącznym podsumowaniu obu grup.

Większość obserwowanych zmian następowała w pierwszym okresie badania – wraz z największym przyrostem stężenia witaminy D. Następnie, mimo dalszej suplementacji, dynamika wzrostu stężenia witaminy D spadała. Część badanych parametrów na przykład liczba i odsetek limfocytów Th TD względem całkowitej liczby leukocytów wzrastały dopiero w drugim okresie badania. Przy czym odsetek względem całkowitej liczby leukocytów, ale nie liczba tych limfocytów, zmniejszyły się w pierwszym okresie badania w grupie kontrolnej oraz w łącznym podsumowaniu obu grup. Mimo że zaobserwowano początkowo spadek, a następnie wzrost odsetka limfocytów Th TD względem całkowitej liczby leukocytów, ujawniła się istotna statystycznie ujemna korelacja pomiędzy zmianą stężenia witaminy D a zmianą odsetka badanych komórek względem całkowitej liczby leukocytów w łącznym podsumowaniu obu grup.

Wydaje się, że w związku z obserwowanymi tendencjami, zwiększenie liczebności badanych populacji pozwoliłoby zaobserwować zmiany zarówno u kobiet z AIT, jak i w grupie kontrolnej. Zwraca uwagę fakt, że suplementacja witaminą D nie jest komórkowo wybiórcza i wpływa w taki sam sposób na limfocyty Th0, Th CM oraz RTE u osób zdrowych, jak i tych z autoimmunizacją.

Aktywowane limfocyty Th

Za udziałem witaminy D w przeciwdziałaniu autoimmunizacji przemawia fakt zmniejszenia w czasie jej suplementacji liczby aktywowanych limfocytów T. Efekt taki był obserwowany w obu badanych grupach niezależnie od występowania AIT. Podczas rozmowy z kobietami podczas kwalifikacji do badania oraz podczas wizyty po sześciu miesiącach nie zaobserwowano zmian w częstości występowania infekcji. Możliwe, że komórki

aktywowane, przechodząc do tkanek, zubażają populację aktywowanych limfocytów we krwi obwodowej. Zjawisko zmniejszenia liczby i odsetka tych komórek względem całkowitej liczby leukocytów obserwowane w niniejszej pracy może być efektem przesunięcia komórek do przedziału tkankowego. Niestety potwierdzenie tej hipotezy wymagałoby wykonywania badań biopsyjnych u pacjentów z AIT oraz ze zdrową tarczycą, co przekracza zakres zaplanowanego badania i zgody komisji bioetycznej.

5. Odpowiedź immunologiczna humoralna nabyta

Przeciwciała anti-TPO i anti-TG

Dotychczas przeprowadzono kilka badań nad wpływem suplementacji witaminą D na stężenie przeciwciał przeciwtarczycowych. Mimo że jest to najczęściej badany obszar zagadnień związanych z wpływem witaminy D na układ immunologiczny osób z AIT, wnioski płynące z badań nadal nie są jednoznaczne. Mazokopakis w swoim badaniu oceniał stężenia przeciwciał anti-TPO u pacjentów po czterech miesiącach suplementacji witaminą D₃ w dawkach od 1200 do 4000 IU dziennie. W porównaniu z wartościami wyjściowymi obserwowano spadek stężenia przeciwciał anti-TPO o 20%. Ponadto stwierdzono ujemną korelację pomiędzy stężeniem 25(OH)D a stężeniem anti-TPO (186). W 2017 roku ukazała się publikacja polskich autorów, którzy kobiety z AIT oraz z niedoborem witaminy D poddawali suplementacji w ilości 2000 IU cholekalcyferolu dziennie przez sześć miesięcy. W wynikach zwrócono uwagę na zmniejszenie stężenia anti-TPO oraz potencjalizację działania witaminy D poprzez równoczesne podawanie statyny (187). Chaudhary ze współpracownikami przeprowadził badanie, w którym podawano 60000 IU witaminy D, raz w tygodniu przez osiem tygodni, pacjentom z jej niedoborem oraz współistniejącym AIT. Autorzy również uzyskali spadek stężenia anti-TPO (188). Spadek zarówno anti-TPO jak i anti-TG stwierdzono w badaniu Simseka, w którym przez miesiąc pacjenci z niedoborem witaminy D oraz z AIT zażywali 1000 IU cholekalcyferolu dziennie (189). Podobne obserwacje poczynił Ucan u pacjentów poddanych suplementacji 50000 IU witaminy D tygodniowo przez osiem tygodni (190) oraz zespół Wanga u pacjentów po półrocznym leczeniu niedoboru witaminy D (170).

Kilku autorów przeprowadziło badanie stężenia witaminy D oraz przeciwciał przeciwtarczycowych u pacjentów z AIT. Jako pierwsze powiązanie między stężeniem witaminy D a AIT stwierdziła Kivity, która zauważyła, że u pacjentów z AIT częściej

występuje niedobór opisywanej witaminy niż w populacji kontrolnej. Ponadto stwierdziła ona występowanie zależności pomiędzy obniżonym stężeniem witaminy D a podwyższonym stężeniem anty-TPO (191). Bozkurt postawił tezę, że nasilenie niedoboru witaminy D jest zależne od czasu trwania AIT oraz stężenia przeciwciał anty-TPO oraz anty-TG (192). Nalbant i współpracownicy stwierdzili wyższe stężenia anty-TPO i anty-TG u pacjentów z niedoborem oraz nieoptymalnym stężeniem 25(OH)D₃ (193). Negatywną korelację pomiędzy stężeniem witaminy D a anty-TPO oraz anty-TG opublikowały zespoły Shin i Unal (194, 195). Natomiast u dzieci stwierdzono jedynie ujemną korelację pomiędzy stężeniem witaminy D i anty-TPO (196).

Oprócz przytoczonych analiz istnieją takie, w których, podobnie jak w obecnym badaniu, stwierdzono brak korelacji pomiędzy stężeniem witaminy D a stężeniem przeciwciał przeciwtarczycowych (171, 197, 198). Yasmeh z zespołem stwierdzili, że AIT nie jest związane z większą częstotliwością występowania niedoboru witaminy D w porównaniu z grupą kontrolną. W obrębie badanej grupy nie udowodniono występowania korelacji pomiędzy stężeniem witaminy D a stężeniem przeciwciał anty-TPO czy anty-TG. Natomiast analiza wyłącznie mężczyzn pozwoliła stwierdzić występowanie korelacji pomiędzy stężeniem witaminy D a stężeniem anty-TG (199).

W wykonanym w niniejszej pracy badaniu nie stwierdzono występowania zależności pomiędzy stężeniem witaminy D a stężeniem badanych przeciwciał przeciwtarczycowych zarówno na początku badania, jak i po wyrównaniu niedoboru witaminy D. Nie stwierdzono również zmian w stężeniu anty-TPO oraz anty-TG w czasie trwania badania. Trudno oceniać tak rozbieżne wyniki otrzymywane przez autorów wspomnianych badań. Najprawdopodobniej mają na to wpływ różne warunki prowadzenia badań, w tym przede wszystkim: czas trwania i intensywność suplementacji, okres obserwacji, wiek i płeć badanej populacji a także szerokość geograficzna, co łączy się z intensywnością nasłonecznienia. W jedynym opublikowanym dotąd randomizowanym badaniu przedstawiono wyniki zbliżone do prezentowanych w niniejszym badaniu. Ananaki ze współpracownikami przeprowadził trwające 12 tygodni randomizowane badanie, w którym podawano 50000 IU witaminy D tygodniowo pacjentom z jej niedoborem oraz chorującym na AIT. Po 12. tygodniach nie stwierdzono zmian stężenia przeciwciał przeciwtarczycowych w grupie pacjentów leczonych witaminą D oraz w grupie otrzymującej placebo (172).

Limfocyty B

W obecnym badaniu stwierdzono wzrost wartości bezwzględnych i odsetka limfocytów B względem całkowitej liczby limfocytów w grupie pacjentów z AIT w pierwszym okresie badania, natomiast spadek ich odsetka względem całkowitej liczby limfocytów między trzecim a szóstym miesiącem suplementacji. W badaniu przeprowadzonym na zdrowych myszach Lee ze współpracownikami stwierdził, że suplementacja witaminą D przez 12 tygodni nie wpływa na zmianę liczby limfocytów B (181). Wydaje się, że wpływ witaminy D jest odleglejszy w czasie. Być może wydłużenie czasu trwania badania pozwoliłoby zaobserwować spadek stężenia przeciwciał w późniejszym okresie jako efekt zmniejszenia się liczby limfocytów B.

6. Metody

W przedstawionym w niniejszej pracy badaniu uzyskano niewielkie różnice w pomiarach populacji leukocytów w morfologii krwi z rozmazem metodą automatyczną oraz oceną w badaniu cytometrią przepływową. Dokładne dane zostały przedstawione w **tabeli I w suplemencie**. W obu populacjach odnotowano istotnie statystycznie przyrosty liczby badanych komórek, jednak w grupie z AIT dzięki ocenie cytometrycznej wykazano dodatkowo istotny statystycznie wzrost różnych populacji komórkowych w trakcie trwania badania. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z różnych metod pomiaru.

W cytowanych pracach badania były prowadzone w różnych porach roku. Niektóre oceniały pacjentów w miesiącach zimowych inne całorocznie. Wyniki, które przedstawiono w niniejszej pracy, uzyskano z badania, które przeprowadzone było w latach 2015 – 2017. Warunkiem kwalifikacji do badania było stwierdzenie stężenia 25(OH)D ≤ 25 ng/ml niezależnie od trwającej pory roku. Należy podkreślić, że badanie trwało sześć miesięcy, a analizę wyników przeprowadzono w oparciu o stężenie witaminy D, której źródłem mogła być zarówno suplementacja jak i ekspozycja na światło słoneczne.

7. Potencjalne mechanizmy immunomodulującego działania witaminy D

Obserwowany jest związek pomiędzy niedoborem witaminy D a częstszym występowaniem niektórych chorób autoimmunologicznych, co widać na przykład z rozmieszczenia ich częstości występowania względem szerokości geograficznej. Biorąc pod uwagę obecność komórek pamięci zdolnych do reakcji z autoantygenami, suplementacja

witaminą D może nie skorygować działania już istniejących komórek pamięci, a wpłynąć jedynie na te, które dopiero dojrzewają. Z drugiej strony w obecności witaminy D następuje mniej skuteczna indukcja limfocytów T przez komórki prezentujące antygen (48). W przeprowadzonym badaniu stwierdzono negatywną korelację pomiędzy zmianą stężenia komórek DP a zmianą stężenia witaminy D, co może świadczyć o dojrzewaniu limfocytów T w grasicy, bądź też redystrybucji tkankowej. Grasicę powinny opuszczać jedynie te komórki, które po selekcji negatywnej nie będą reagowały z autoantygenami. Można przypuszczać, że działanie witaminy D polega również na regulacji dojrzewania limfocytów w grasicy, co ma wpływ na podłoże autoimmunizacji i częstości występowania chorób autoimmunologicznych. W **tabeli 24.** podsumowano wyniki prezentowanych w tej pracy badań na tle dostępnych danych piśmiennictwa.

Tabela 24. Wpływ witaminy D na komórki układu odpornościowego. Część I/II.

Komórki	Wyniki własne		Dostępne piśmiennictwo	Bibliografia
	AIT	Grupa kontrolna		
KOMÓRKI ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ WRODZONEJ				
Leukocyty	↑	↑	=	(200)
Monocyty	-	-	↓ MHC-II* ↓ CD40* ↓ CD80* ↓ CD86* ↑ CCL22*	↓ IL12* =IL6 ^h ↓ IL6* ↓ IL12* ↓ TNFγ ^h *
DC	NA	NA	↓ pobudzenia limfocytów T* ↓ IL12* ↓ IL23 ↑ IL10* ↑ CCL22*	↓ MHC II* ↓ CD40* ↓ CD80* ↓ CD86*
Eozynofile	-	-	↓ potencjał prozapalny eozynofilii ↓ uwalnianie peroksydazy	↓ liczby ^h
Bazofile	-	↑	↓ ^M	(204)
Neutrofile	↑	-	↓ potencjał prozapalny neutrofili ^h ↓ odpowiedź zapalną w tkankach ^h	(205, 206)
Komórki NK	↓	↓	poprawa funkcji* ↑ ziarnistości*	↑ szybkość sekrecji granzymu A*
Limfocyty NKT	↓	↓	↑ liczby komórek NKT* ↑ IL4*	↑ INFγ*
KOMÓRKI ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ NABYTEJ				
Limfocyty	↑	-		
Limfocyty T	↑	↑	↓ proliferacja ^H	(45, 46, 53)
Limfocyty Th	↑	↑	↑ IL10* ↓ IL2* ↓ IL6*	↓ liczby komórek T CD4+* ↓ INFγ* ↑ IL4*
Limfocyty Th DP	-	-	↑ ^M	(208)
RTE	↑	-	=	(209)

Tabela 24. Wpływ witaminy D na komórki układu odpornościowego. Część II/II.

Komórki	Wyniki własne		Dostępne piśmiennictwo	Bibliografia
	AIT	Grupa kontrolna		
Limfocyty Th0	↑	↑	↑ liczby komórek Th0* ↑ różnicowania w kierunku Th2* ↓ różnicowania w kierunku Th1*	(47, 58, 210)
Limfocyty Th1	NA	NA	↓ liczby komórek Th1 ^M = ^H ↓ INFγ* ↓ IL2* ↑ IL4*	(48, 51, 52, 58)
Limfocyty Th2	NA	NA	↑ IL4* ↓ liczby Th1 ^H	(47, 53)
Limfocyty Th17	NA	NA	↓ IL17* = liczby Th17 ^H	(53, 54)
Limfocyty Th22	NA	NA	↓ IL22**	(53, 54)
Limfocyty Th EM	-	-	↑ u dzieci	(211)
Limfocyty Th CM	-	↓	= u dzieci	(211)
Limfocyty Th TD	↑	początkowo ↓, następnie ↑	= ^H	(58)
Aktywowane limfocyty T	↓	↓	wygaszanie przewlekłe aktywowanych limfocytów T w chorobach autoimmunologicznych	(212)
Limfocyty Tc	↑	↑	↑, ↓, = liczby komórek Tc* ↓ IL4* ↓ cytotoksyczności* ↓ INFγ *	(60-62)
Limfocyty Treg	NA	NA	↑ liczby Treg CCL4+ ^H ↑ ekspresji FoxP3* ↑ IL10* ↑ CD4+ FoxP3+ ^H * ↓, = liczby Treg* ↑*	(32, 49, 52, 58, 59, 210)
Limfocyty B	↑	-	↓ różnicowania w kierunku plazmocytów* = ^H ↓ różnicowania w kierunku komórek pamięci* = ^H ↓ proliferacja* ↑ apoptozy* ↓ IgA* ↓ IgM ^h * ↓ IgG ^h *	(72, 213, 214)
Limfocyty Breg	NA	NA	↑ IL10*	(37)
Legenda: * – human in vitro ^h – human ex vitro ^H – human in vivo * – mouse in vitro ^M – mouse in vivo ↑ – wzrost ↓ – spadek = – brak wpływu NA – brak danych				

8. Podsumowanie

Dzisiaj trudno jednoznacznie stwierdzić, czy niedobór witaminy D jest czynnikiem predysponującym do wystąpienia AIT. Wyniki dostępnych badań nie dają jednoznacznej odpowiedzi. Część autorów wręcz zastanawia się, czy niedobór witaminy D jest przyczyną czy może skutkiem AIT (135, 186). Istnieją doniesienia, że optymalne stężenie witaminy D zmniejsza presję na procesy autoimmunizacyjne i normalizuje interakcje komórek immunokompetentnych.

Zakłada się, że immunomodulacyjny wpływ witaminy D na układ odpornościowy jest generowany poprzez zwiększony potencjał do odpowiedzi na różne nowe antygeny (zwiększenie liczby komórek RTE i Th0). Wydaje się też, że obserwacja kilkuletnia pacjentek ocenianych w badaniu byłaby szczególnie cenna w ocenie, czy ten zwiększony potencjał przełoży się na przykład na zmniejszoną częstość występowania infekcji.

VI. Wnioski

1. Uzupełnienie niedoboru witaminy D wpływa na parametry odpowiedzi immunologicznej wrodzonej i nabytej u osób zdrowych, jak i chorych z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy.
2. Wpływ witaminy D na badane parametry układu immunologicznego jest najbardziej widoczny po trzech miesiącach od momentu rozpoczęcia suplementacji.
3. Podawanie witaminy D powoduje zmiany zarówno w zakresie odpowiedzi immunologicznej wrodzonej (dotyczące granulocytów i komórek NKT), jak i w zakresie odpowiedzi immunologicznej nabytej (dotyczące wyrzutu wczesnych emigrantów grasiczych i limfocytów T).
4. Wyniki badań sugerują, że suplementacja witaminą D wpływa na poprawę parametrów immunologicznych, nie jest ona jednak jedynym czynnikiem regulującym odpowiedź immunologiczną.

VII. Streszczenie

Znaczenie witaminy D poznano już w XVII wieku, kiedy to odkryto, że brak ekspozycji na światło słoneczne jest przyczyną krzywicy u dzieci. Dalsze badania nad tym związkiem zaowocowały zakwalifikowaniem witaminy D do grupy hormonów steroidowych i wykazały jej szerokie spektrum działania na organizmy żywe. Dzisiaj wiadomo, że wpływa ona na wiele aspektów funkcjonowania organizmów żywych, w tym na układ immunologiczny.

Wcześniejsze badania wykazały, że niedobór stężenia witaminy D sprzyja występowaniu chorób autoimmunologicznych. Do grupy chorób o podłożu autoimmunizacyjnym należy autoimmunologiczne zapalenie tarczycy (AIT). Dotychczasowy obszar zainteresowań naukowców dotyczył głównie wpływu witaminy D na stężenie przeciwciał przeciwtarczycowych – jednak wnioski płynące z przeprowadzonych badań pozostają niejednoznaczne.

Dostępne dane piśmiennictwa sugerują wpływ stężenia witaminy D na różnicowanie i aktywność komórek obwodowego układu immunologicznego. Dotychczas jednak nie przeprowadzono badania *in vivo* u ludzi oceniającego długotrwały efekt suplementacji witaminą D na układ immunologiczny u osób z AIT. Celem pracy było stwierdzenie, w jaki sposób suplementacja witaminą D wpływa na immunokompetencję układu odpornościowego u chorych z AIT oraz u kobiet z grupy kontrolnej.

Przeprowadzono prospektywne interwencyjne badanie, do którego zakwalifikowano 30 pacjentek z AIT w eutyreozy, bez chorób towarzyszących oraz 31 ochotniczek z wykluczoną chorobą gruczołu tarczowego. U wszystkich kobiet stężenie witaminy 25(OH)D wynosiło ≤ 25 ng/ml. Pacjentkom przekazano preparat VITRUM® D₃ Forte, który zażywały raz dziennie (2000 IU/dobę) przez sześć miesięcy. W chwili włączenia do badania oraz po trzech i sześciu miesiącach suplementacji witaminą D₃ pobierano do badań krew żyłą. Każdorazowo wykonywano badania stężenia witaminy 25(OH)D i wapnia całkowitego, morfologię krwi obwodowej z rozmazem oraz cytometrię przepływową. Podczas pierwszej wizyty oznaczano również stężenie tyreotropiny, przeciwciał przeciwko tyreoperoksydazie (anty-TPO) i tyreoglobulinie (anty-TG), stężenia białka C – reaktywnego (CRP) a także fosforanów i parathormonu. U wszystkich kobiet w szóstym miesiącu suplementacji ponownie oznaczano CRP a u pacjentek zakwalifikowanych do grupy z AIT wykonywano dodatkowo badania stężenia TSH, anty-TPO oraz anty-TG.

W cytometrii przepływowej oceniano we krwi obwodowej następujące populacje limfocytów (liczbę oraz odsetek z leukocytów): T, T pomocniczych (Th), T cytotoksycznych (Tc), T podwójnie pozytywnych (T DP), Th naiwnych (Th0), Th pamięci efektorowej (Th EM), Th pamięci centralnej (Th CM), Th terminalnie zróżnicowanych (Th TD) i aktywowanych limfocytów T, a także limfocytów B. Oceniano także populacje komórek NK, NKT i wczesnych emigrantów grasicznych (RTE).

Wszystkie osoby przed włączeniem do badania zostały poinformowane o celu, proponowanym przebiegu badania oraz wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniu, a na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej.

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono, że nastąpił statystycznie istotny wzrost stężenia 25(OH)D w obu badanych grupach, bardziej wyrażony w pierwszym okresie badania (pomiędzy początkiem badania a trzecim miesiącem suplementacji) niż w drugim okresie badania (pomiędzy trzecim a szóstym miesiącem suplementacji).

Zaobserwowano zmiany wielu badanych parametrów zarówno odpowiedzi immunologicznej wrodzonej, jak i nabytej w trakcie trwania badania. W grupie chorych z AIT stwierdzono istotny statystycznie wzrost ilości leukocytów, neutrofili, liczby limfocytów T, Th, Tc oraz odsetka Tc względem całkowitej liczby leukocytów, Th0, Th EM, Th CM, RTE oraz liczby i odsetka limfocytów B, natomiast spadek liczby i odsetka komórek NKT oraz odsetka aktywowanych limfocytów T. W grupie kontrolnej zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ilości bazofili, leukocytów, limfocytów T, Th, liczby i odsetka Tc, Th, liczby i odsetka Th CM, liczby i odsetka limfocytów B oraz CRP, natomiast spadek ilości i odsetka komórek NKT oraz liczby i odsetka aktywowanych limfocytów T. Wzrost stężenia witaminy D był pozytywnie skorelowany w obu badanych grupach z różnymi populacjami limfocytów T, natomiast ujemnie skorelowany z odsetkiem komórek NKT oraz aktywowanych limfocytów T. W prezentowanym badaniu suplementacja witaminą D nie miała wpływu na stężenie przeciwciał anty-TPO oraz anty-TG.

Otrzymane wyniki pozwoliły na wysnucie następujących wniosków:

1. Uzupełnienie niedoboru witaminy D wpływa na parametry odpowiedzi immunologicznej wrodzonej i nabytej u osób zdrowych, jak i chorych z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy.
2. Wpływ witaminy D na badane parametry układu immunologicznego jest najbardziej widoczny po trzech miesiącach od momentu rozpoczęcia suplementacji.

3. Podawanie witaminy D powoduje zmiany zarówno w zakresie odpowiedzi immunologicznej wrodzonej (dotyczące granulocytów i komórek NKT), jak i w zakresie odpowiedzi immunologicznej nabytej (dotyczące wyrzutu wczesnych emigrantów grasiczych i limfocytów T).
4. Wyniki badań sugerują, że suplementacja witaminą D wpływa na poprawę parametrów immunologicznych, nie jest ona jednak jedynym czynnikiem regulującym odpowiedź immunologiczną.

VIII. Summary

The importance of vitamin D has been known from 17th century, when the lack of sunlight was linked with rickets in children. Further studies brought information that vitamin D belongs to the steroid hormones and showed its wide effects on the living organisms. Today we know that vitamin D influences many aspects of health, especially function of immune system.

Previous studies revealed that vitamin D deficiency facilitates *incidence* and prevalence of autoimmune diseases. The autoimmune thyroiditis (AIT) belongs to the group of disorders caused by autoimmune process. Most of studies were related to the effect of vitamin D on the concentration of the antithyroid antibodies, but drawn conclusions still remain elusive.

Data from publications suggest the influence of vitamin D on differentiation and activity of peripheral immune system cells. Up to now there are no studies conducted *in vivo* in humans evaluating the long-term effect of vitamin D supplementation on immune system in patient with AIT. The aim of the study was survey of the effect of Vitamin D supplementation on the immunocompetence of immune system in female patients with AIT and in control group.

The prospective intervention study was conducted, where 30 females with euthyrotic AIT without associates disorders and 31 woman from control group without thyroid disorders were qualified. In all women the concentration of 25(OH)D was below ≤ 25 ng/ml. All participants were treated with 2000 units per day of VITRUM[®] D₃ Forte for six months. At the moment of enrollment to the study and after three and six months of supplementation, the blood samples were collected. Measurements of 25(OH)D and total calcium concentrations together with the CBC and flow cytometry were performed on every visit. During the first visit concentration of TSH, anty-TPO, anty-TG, CRP, phosphates and PTH were measured. In all patients in the sixth month of supplementation CRP and in patients with AIT – concentration of TSH, anty-TPO and anty-TG were evaluated.

The subsequent lymphocytes population were estimated using (number and percentage of WBC) flow cytometry: T lymphocytes, T helper (Th), T cytotoxic (Tc), T double positive (T DP), Th naïve (Th0), Th effector memory (Th EM), Th central memory (Th CM), Th terminally differentiated (Th TD), activated lymphocytes T and lymphocytes B.

Population of monocytes, basophils, eosinophils, neutrophils, NK, NKT and recent thymic emigrants (RTE) were also evaluated.

All participants prior to enrollment to the study signed informed conscious consent and the study was approved by local Bioethical Committee.

Conducted study revealed that concentrations of 25(OH)D significantly increased in both studied groups. The rise in 25(OH)D concentrations was more evident in the first part of the study (between zero and third months of supplementation) then in the second part of the study (between third and six month of supplementation).

During supplementation, changes of many studied parameters concerning innate and adaptive immune response were observed. In patients with AIT the significant increase in WBC, neutrophils, number T lymphocytes, Th, number and percentage of Tc relative to WBC, Th0, Th EM, Th CM, RTE, B lymphocytes and percentage of B lymphocytes was observed, but the decrease of number and percentage of NKT and percentage of activated lymphocytes T was found. In the control group study revealed the significant increase in number of WBC, basophils, T lymphocytes, Th, number and percentage of Tc relative to WBC, number and percentage of Th CM, number and percentage of lymphocytes B, CRP and decrease in number and percentage of NKT cell, number and percentage of activated lymphocytes T was observed. The increase in vitamin D concentrations was positively correlated with different lymphocytes T populations, but negatively correlated with NKT and activated T lymphocytes in both studied groups. There was no influence of vitamin D supplementation on the anty-TPO and anty-TG blood concentrations.

Obtained results let to draw the following conclusions:

1. Vitamin D supplementation affects the innate and adaptive response both in healthy women and in patients with AIT.
2. The influence of vitamin D on studied immune system parameters is especially observed after three months of supplementation.
3. Vitamin D supplementation affects the innate immune response (regarding NKT cells and granulocytes) and adaptive immune response (RTE and T lymphocytes).
4. Results of the study suggested that vitamin D supplementation leads to the improvement of immune parameters but this is not the only factor regulating immune reactions.

IX. Bibliografia

1. Rosenblatt J, Bissonnette A, Ahmad R, Wu Z et al. Immunomodulatory effects of vitamin D: implications for GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(9):1463-8.
2. Misiorowski W. Osteomalacja i zaburzenia metabolizmu witaminy D. In: Zgliczyński W, editor. *Endokrynologia*. 1. Warszawa: Medical Tribune; 2011. p. 403-11.
3. Bouillon R, De Groot LJ, Jameson JL. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. In: L. JJ, De Groot LJ, editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric*; Elsevier; 2015.
4. Perez-Lopez FR. Vitamin D: the secosteroid hormone and human reproduction. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23(1):13-24.
5. Barbour GL, Coburn JW, Slatopolsky E, Norman AW et al. Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis: evidence for extrarenal generation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med*. 1981;305(8):440-3.
6. Gilcrest BA. Sun exposure and vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):570S-7S.
7. Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynol Pol*. 2013;64(4):319-27.
8. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA et al. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science*. 1980;210(4466):203-5.
9. Pelczynska K, Jaroszewicz I, Switalska M, Opolski A. [Biological activity of calcitriol and its new analogues -- potential therapeutic applications]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2005;59:129-39.
10. Rajakumar K, Greenspan SL, Thomas SB, Holick MF. SOLAR ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *Am J Public Health*. 2007;97(10):1746-54.
11. Norman AW. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr*. 1998;67(6):1108-10.

12. Yarwood A, Martin P, Bowes J, Lunt M et al. Enrichment of vitamin D response elements in RA-associated loci supports a role for vitamin D in the pathogenesis of RA. *Genes Immun.* 2013;14(5):325-9.
13. Bikle DD. Vitamin D and bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2012;10(2):151-9.
14. Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem.* 2004;92(3):436-44.
15. Bikle DD. Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012;13(1):3-19.
16. Bikle DD, Chang S, Crumrine D, Elalieh H et al. 25 Hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase is required for optimal epidermal differentiation and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* 2004;122(4):984-92.
17. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002;110(2):229-38.
18. Leu M, Giovannucci E. Vitamin D: epidemiology of cardiovascular risks and events. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):633-46.
19. Beveridge LA, Witham MD. Controversy in the link between vitamin D supplementation and hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2015;13(9):971-3.
20. Bouillon R, Verstuyf A. Vitamin D, mitochondria, and muscle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):961-3.
21. Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM et al. The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2012;33(3):456-92.
22. Gruber BM. [The phenomenon of vitamin D]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015;69:127-39.
23. Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA et al. Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology.* 1983;113(4):1511-8.
24. Talib RA, Khalafalla K, Canguven O. The role of vitamin D supplementation on erectile function. *Turk J Urol.* 2017;43(2):105-11.
25. Fabris AM, Cruz M, Iglesias C, Pacheco A et al. Impact of vitamin D levels on ovarian reserve and ovarian response to ovarian stimulation in oocyte donors. *Reprod Biomed Online.* 2017.
26. Pludowski P, Konstantynowicz J, Jaworski M, Abramowicz P et al. Assessment of vitamin D status in Polish adult population. *Standardy Medyczne Pediatria.* 2014;11:609-17.

27. Pludowski P, Ducki C, Konstantynowicz J, Jaworski M. Vitamin D status in Poland. *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126(7-8):530-9.
28. Davenport L. Vitamin D3, not D2, is the key to tackling vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr.* 2017.
29. Altieri B, Muscogiuri G, Barrea L, Mathieu C et al. Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. *Rev Endocr Metab Disord.* 2017;18(3):335-46.
30. Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ et al. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem.* 2010;285(4):2227-31.
31. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis.* 2010;69(6):1155-7.
32. Royal W, 3rd, Mia Y, Li H, Naunton K. Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009;213(1-2):135-41.
33. Vaughan-Shaw PG, O'Sullivan F, Farrington SM, Theodoratou E et al. The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2017;116(8):1092-110.
34. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M et al. Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmun Rev.* 2011;10(12):733-43.
35. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS et al. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol.* 2014;5:151.
36. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3-binding macromolecules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production. *J Immunol.* 1986;136(8):2734-40.
37. Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(8):2210-8.
38. Ooi JH, McDaniel KL, Weaver V, Cantorna MT. Murine CD8+ T cells but not macrophages express the vitamin D 1alpha-hydroxylase. *J Nutr Biochem.* 2014;25(1):58-65.

39. Koeffler HP, Reichel H, Bishop JE, Norman AW. gamma-Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by normal human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;127(2):596-603.
40. Bscheider M, Butcher EC. Vitamin D immunoregulation through dendritic cells. *Immunology*. 2016;148(3):227-36.
41. Rigby WF, Waugh M, Graziano RF. Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Blood*. 1990;76(1):189-97.
42. Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, Ciaprini C et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes. *Cytokine*. 2009;45(3):190-7.
43. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients*. 2013;5(7):2502-21.
44. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys*. 2000;374(2):334-8.
45. Bhalla AK, Amento EP, Serog B, Glimcher LH. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits antigen-induced T cell activation. *J Immunol*. 1984;133(4):1748-54.
46. Nunn JD, Katz DR, Barker S, Fraher LJ et al. Regulation of human tonsillar T-cell proliferation by the active metabolite of vitamin D₃. *Immunology*. 1986;59(4):479-84.
47. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol*. 2001;167(9):4974-80.
48. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178(1):145-53.
49. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol*. 2009;183(9):5458-67.
50. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol*. 1985;134(5):3032-5.
51. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr*. 1995;125(6 Suppl):1704S-8S.

52. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients*. 2015;7(10):8251-60.
53. Sheikh V, Kasapoglu P, Zamani A, Basiri Z et al. Vitamin D3 inhibits the proliferation of T helper cells, downregulate CD4(+) T cell cytokines and upregulate inhibitory markers. *Hum Immunol*. 2018.
54. Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Mus AM et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):132-42.
55. Morales-Tirado V, Wichlan DG, Leimig TE, Street SE et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) catalyzes suppressive activity on human natural regulatory T cells, uniquely modulates cell cycle progression, and augments FOXP3. *Clin Immunol*. 2011;138(2):212-21.
56. Chang JH, Cha HR, Lee DS, Seo KY et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2010;5(9):e12925.
57. Mayne CG, Spanier JA, Relland LM, Williams CB et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 2011;41(3):822-32.
58. Terrier B, Derian N, Schoindre Y, Chacara W et al. Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R221.
59. Smolders J, Thewissen M, Peelen E, Menheere P et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2009;4(8):e6635.
60. Thien R, Baier K, Pietschmann P, Peterlik M et al. Interactions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 with IL-12 and IL-4 on cytokine expression of human T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(3):683-9.
61. Willheim M, Thien R, Schrattbauer K, Bajna E et al. Regulatory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3739-44.
62. Meehan MA, Kerman RH, Lemire JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the generation of nonspecific suppressor cells while inhibiting the induction of cytotoxic cells in a human MLR. *Cell Immunol*. 1992;140(2):400-9.

63. Yu S, Cantorna MT. The vitamin D receptor is required for iNKT cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(13):5207-12.
64. Cantorna MT. Why do T cells express the vitamin D receptor? *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1217:77-82.
65. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients*. 2015;7(4):3011-21.
66. Mariani E, Ravaglia G, Forti P, Meneghetti A et al. Vitamin D, thyroid hormones and muscle mass influence natural killer (NK) innate immunity in healthy nonagenarians and centenarians. *Clin Exp Immunol*. 1999;116(1):19-27.
67. Mariani E, Ravaglia G, Meneghetti A, Tarozzi A et al. Natural immunity and bone and muscle remodelling hormones in the elderly. *Mech Ageing Dev*. 1998;102(2-3):279-92.
68. Balogh G, de Boland AR, Boland R, Barja P. Effect of 1,25(OH)₂-vitamin D₃ on the activation of natural killer cells: role of protein kinase C and extracellular calcium. *Exp Mol Pathol*. 1999;67(2):63-74.
69. Ravid A, Koren R, Maron L, Liberman UA. 1,25(OH)₂D₃ increases cytotoxicity and exocytosis in lymphokine-activated killer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1993;96(1-2):133-9.
70. Leung KH. Inhibition of human natural killer cell and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity and differentiation by vitamin D₃. *Scand J Immunol*. 1989;30(2):199-208.
71. Rebut-Bonneton C, Demignon J. Effect of calcitriol on peripheral blood lymphocyte cytotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 1991;45(8):369-72.
72. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007;179(3):1634-47.
73. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J et al. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008;14(9):1220-4.
74. de la Fuente AG, Errea O, van Wijngaarden P, Gonzalez GA et al. Vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimer signaling regulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J Cell Biol*. 2015;211(5):975-85.
75. Garg M, Lubel JS, Sparrow MP, Holt SG et al. Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease--established concepts and future directions. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36(4):324-44.

76. Watad A, Azrielant S, Bragazzi NL, Sharif K et al. Seasonality and autoimmune diseases: The contribution of the four seasons to the mosaic of autoimmunity. *J Autoimmun.* 2017;82:13-30.
77. Ben-Zvi I, Aranow C, Mackay M, Stanevsky A et al. The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2010;5(2):e9193.
78. Yap KS, Northcott M, Hoi AB, Morand EF et al. Association of low vitamin D with high disease activity in an Australian systemic lupus erythematosus cohort. *Lupus Sci Med.* 2015;2(1):e000064.
79. Souto M, Coelho A, Guo C, Mendonca L et al. Vitamin D insufficiency in Brazilian patients with SLE: prevalence, associated factors, and relationship with activity. *Lupus.* 2011;20(10):1019-26.
80. Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara A et al. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med.* 1995;181(2):817-21.
81. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90(1-5):121-5.
82. Misiorowski W. Vitamin D in type 1 and type 2 diabetes in adulthood. *Standardy Medyczne Pediatria.* 2012;9:639-44.
83. Marston B, Palanichamy A, Anolik JH. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22(3):307-15.
84. Gullick NJ, Evans HG, Church LD, Jayaraj DM et al. Linking power Doppler ultrasound to the presence of th17 cells in the rheumatoid arthritis joint. *PLoS One.* 2010;5(9).
85. Tetlow LC, Smith SJ, Mawer EB, Woolley DE. Vitamin D receptors in the rheumatoid lesion: expression by chondrocytes, macrophages, and synoviocytes. *Ann Rheum Dis.* 1999;58(2):118-21.
86. Song GG, Bae SC, Lee YH. Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2012;31(12):1733-9.
87. Haga HJ, Schmedes A, Naderi Y, Moreno AM et al. Severe deficiency of 25-hydroxyvitamin D(3) (25-OH-D(3)) is associated with high disease activity of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2013;32(5):629-33.
88. Grazio S, Naglic DB, Anic B, Grubisic F et al. Vitamin D serum level, disease activity and functional ability in different rheumatic patients. *Am J Med Sci.* 2015;349(1):46-9.

89. Jeffery LE, Raza K, Hewison M. Vitamin D in rheumatoid arthritis-towards clinical application. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(4):201-10.
90. Lisowska KA, Bryl E. The role of vitamin D in the development of autoimmune diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(1):797-810.
91. Roberson ED, Bowcock AM. Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet*. 2010;26(9):415-23.
92. Arnson Y, Amital H, Agmon-Levin N, Alon D et al. Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: a retrospective cohort study and review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2011;10(8):490-4.
93. Pandolfi F, Franza L, Mandolini C, Conti P. Immune Modulation by Vitamin D: Special Emphasis on Its Role in Prevention and Treatment of Cancer. *Clin Ther*. 2017;39(5):884-93.
94. Newton-Bishop JA, Davies JR, Latheef F, Randerson-Moor J et al. 25-Hydroxyvitamin D2 /D3 levels and factors associated with systemic inflammation and melanoma survival in the Leeds Melanoma Cohort. *Int J Cancer*. 2015;136(12):2890-9.
95. Duffy MJ, Murray A, Synnott NC, O'Donovan N et al. Vitamin D analogues: Potential use in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;112:190-7.
96. Chiang KC, Yeh TS, Chen SC, Pang JH et al. The Vitamin D Analog, MART-10, Attenuates Triple Negative Breast Cancer Cells Metastatic Potential. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4).
97. Deschasaux M, Souberbielle JC, Latino-Martel P, Sutton A et al. A prospective study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and prostate cancer risk. *Br J Nutr*. 2016;115(2):305-14.
98. Gorham ED, Mohr SB, Garland CF, Chaplin G et al. Do sunscreens increase risk of melanoma in populations residing at higher latitudes? *Ann Epidemiol*. 2007;17(12):956-63.
99. Wyatt C, Lucas RM, Hurst C, Kimlin MG. Vitamin D deficiency at melanoma diagnosis is associated with higher Breslow thickness. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126394.
100. Leporati P, Gropelli G, Zerbini F, Rotondi M et al. Etiopathogenesis of Basedow's disease. Trends and current aspects. *Nuklearmedizin*. 2015;54(5):204-10.
101. Kochman M. Zapalenia Tarczycy. In: Zgliczyński W, editor. *Endokrynologia*. 1. Warszawa: Medical Tribune; 2011. p. 280-92.

102. Rotondi M, Capelli V, Locantore P, Pontecorvi A et al. Painful Hashimoto's thyroiditis: myth or reality? *J Endocrinol Invest*. 2017.
103. Chong Xi R, Hong Qiao W, Yan L. Severe trachea compression caused by Riedel's thyroiditis: A case report and review of the literature. *Ann Med Surg (Lond)*. 2016;12:18-20.
104. Darouichi M, Constanthin PE. Riedel's thyroiditis. *Radiol Case Rep*. 2016;11(3):175-7.
105. Krupinska J, Urbanowicz W, Kaczmarczyk M, Kulig G et al. Association between genetic mutations and the development of autoimmune thyroiditis in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alpha. *Thyroid Res*. 2012;5(1):10.
106. Krupinska J, Wawrzynowicz-Syczewska M, Urbanowicz W, Poblocki J et al. The influence of interferon alpha on the induction of autoimmune thyroiditis in patients treated for chronic viral hepatitis type C. *Endokrynol Pol*. 2011;62(6):517-22.
107. Sawin CT. The heritage of Dr. Hakaru Hashimoto (1881-1934). *Endocr J*. 2002;49(4):399-403.
108. Lewiński A. Choroby tarczycy. In: Gajewski P, editor. *Interna Szczeklika*. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2012. p. 1193-6.
109. Mazokopakis EE, Tzortzinis AA, Dalieraki-Ott EI, Tsartsalis AN et al. Coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma. A retrospective study. *Hormones (Athens)*. 2010;9(4):312-7.
110. Maitra A, Kumar V. Układ dokrewny. In: Kumar V, cotran RS, Robbins SL, editors. *Robbins Patologia*. Wrocław: elsevier Urban & Partner; 2007. p. 836-8.
111. McLeod DS, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine*. 2012;42(2):252-65.
112. McLeod DS, Caturegli P, Cooper DS, Matos PG et al. Variation in rates of autoimmune thyroid disease by race/ethnicity in US military personnel. *JAMA*. 2014;311(15):1563-5.
113. Volpe R, Ezrin C, Johnston MW, Steiner JW. Genetic factors in Hashimoto's struma. *Can Med Assoc J*. 1963;88:915-9.
114. Bruserud O, Oftedal BE, Wolff AB, Husebye ES. AIRE-mutations and autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*. 2016;43:8-15.
115. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20-1.

- 116.Tomer Y, Dolan LM, Kahaly G, Divers J et al. Genome wide identification of new genes and pathways in patients with both autoimmune thyroiditis and type 1 diabetes. *J Autoimmun.* 2015;60:32-9.
- 117.Xiaoheng C, Yizhou M, Bei H, Huilong L et al. General and Specific Genetic Polymorphism of Cytokines-Related Gene in AITD. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:3916395.
- 118.Lee HJ, Li CW, Hammerstad SS, Stefan M et al. Immunogenetics of autoimmune thyroid diseases: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:82-90.
- 119.Narooie-Nejad M, Taji O, Kordi Tamandani DM, Kaykhaei MA. Association of CTLA-4 gene polymorphisms -318C/T and +49A/G and Hashimoto's thyroiditis in Zahedan, Iran. *Biomed Rep.* 2017;6(1):108-12.
- 120.Vural P, Degirmencioglu S, Dogru-Abbasoglu S, Baki M et al. Arg25Pro (c.915G>C) polymorphism of transforming growth factor beta1 gene suggests an association with increased risk for Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol.* 2015;28(1):521-4.
- 121.Ajjan RA, Weetman AP. The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding. *Horm Metab Res.* 2015;47(10):702-10.
- 122.Weetman AP. The immunopathogenesis of chronic autoimmune thyroiditis one century after hashimoto. *Eur Thyroid J.* 2013;1(4):243-50.
- 123.Duraes C, Moreira CS, Alvelos I, Mendes A et al. Polymorphisms in the TNFA and IL6 genes represent risk factors for autoimmune thyroid disease. *PLoS One.* 2014;9(8):e105492.
- 124.Weetman AP. The genetics of autoimmune thyroid disease. *Horm Metab Res.* 2009;41(6):421-5.
- 125.Wang B, Shao X, Song R, Xu D et al. The Emerging Role of Epigenetics in Autoimmune Thyroid Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:396.
- 126.Lima FA, Moreira-Filho CA, Ramos PL, Brentani H et al. Decreased AIRE expression and global thymic hypofunction in Down syndrome. *J Immunol.* 2011;187(6):3422-30.
- 127.Benvenga S, Trimarchi F. Changed presentation of Hashimoto's thyroiditis in North-Eastern Sicily and Calabria (Southern Italy) based on a 31-year experience. *Thyroid.* 2008;18(4):429-41.
- 128.Ott J, Meusel M, Schultheis A, Promberger R et al. The incidence of lymphocytic thyroid infiltration and Hashimoto's thyroiditis increased in patients operated for benign goiter over a 31-year period. *Virchows Arch.* 2011;459(3):277-81.

- 129.Kondrashova A, Viskari H, Haapala AM, Seiskari T et al. Serological evidence of thyroid autoimmunity among schoolchildren in two different socioeconomic environments. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(3):729-34.
- 130.Prummel MF, Strieder T, Wiersinga WM. The environment and autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(5):605-18.
- 131.Topliss DJ. Clinical Update in Aspects of the Management of Autoimmune Thyroid Diseases. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2016;31(4):493-9.
- 132.Effraimidis G, Strieder TG, Tijssen JG, Wiersinga WM. Natural history of the transition from euthyroidism to overt autoimmune hypo- or hyperthyroidism: a prospective study. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(1):107-13.
- 133.Wiersinga WM. Clinical Relevance of Environmental Factors in the Pathogenesis of Autoimmune Thyroid Disease. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2016;31(2):213-22.
- 134.Duntas LH. The Role of Iodine and Selenium in Autoimmune Thyroiditis. *Horm Metab Res.* 2015;47(10):721-6.
- 135.Liontiris MI, Mazokopakis EE. A concise review of Hashimoto thyroiditis (HT) and the importance of iodine, selenium, vitamin D and gluten on the autoimmunity and dietary management of HT patients.Points that need more investigation. *Hell J Nucl Med.* 2017;20(1):51-6.
- 136.McLachlan SM. The genetic basis of autoimmune thyroid disease: time to focus on chromosomal loci other than the major histocompatibility complex (HLA in man). *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(3):605A-C.
- 137.Bektas Uysal H, Ayhan M. Autoimmunity affects health-related quality of life in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Kaohsiung J Med Sci.* 2016;32(8):427-33.
- 138.Fallahi P, Ferrari SM, Ruffilli I, Elia G et al. The association of other autoimmune diseases in patients with autoimmune thyroiditis: Review of the literature and report of a large series of patients. *Autoimmun Rev.* 2016;15(12):1125-8.
- 139.Myśliwiec J. Autoimmunologiczne zespoły wielogruzołowe. In: Zgliczyński W, editor. *Endokrynologia. 2.* Warszawa: Medical Tribune; 2011. p. 749-56.
- 140.Fierabracci A. Type 1 Diabetes in Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy Syndrome (APECED): A "Rare" Manifestation in a "Rare" Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7).
- 141.Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(1):11-20.
- 142.Jędrzejczak WW. Choroby układu krwiotwórczego. *Fizjologia.* In: Gajewski P, editor. *Interna Szczeklika.* Kraków: Medycyna Praktyczna; 2016. p. 1635-8.

143. Myśliwiec J. Podstawowe wiadomości z immunologii. In: Zgliczyński W, editor. Endokrynologia. II. Warszawa: Medical Tribune; 2011. p. 733-9.
144. Zdrojewicz Z, Pachura E, Pachura P. The Thymus: A Forgotten, But Very Important Organ. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25(2):369-75.
145. Hogquist KA, Xing Y, Hsu FC, Shapiro VS. T Cell Adolescence: Maturation Events Beyond Positive Selection. *J Immunol*. 2015;195(4):1351-7.
146. Xu X, Ge Q. Maturation and migration of murine CD4 single positive thymocytes and thymic emigrants. *Comput Struct Biotechnol J*. 2014;9:e201403003.
147. Dworacki G, Urazayev O, Bekmukhambetov Y, Iskakova S et al. Thymic emigration patterns in patients with type 2 diabetes treated with metformin. *Immunology*. 2015;146(3):456-69.
148. Jamieson BD, Douek DC, Killian S, Hultin LE et al. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity*. 1999;10(5):569-75.
149. Sasson SC, Zaunders JJ, Seddiki N, Bailey M et al. Progressive activation of CD127+132- recent thymic emigrants into terminally differentiated CD127-132+ T-cells in HIV-1 infection. *PLoS One*. 2012;7(2):e31148.
150. Xu X, Zhang S, Li P, Lu J et al. Maturation and emigration of single-positive thymocytes. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:282870.
151. Armengol MP, Sabater L, Fernandez M, Ruiz M et al. Influx of recent thymic emigrants into autoimmune thyroid disease glands in humans. *Clin Exp Immunol*. 2008;153(3):338-50.
152. Silva SL, Sousa AE. Establishment and Maintenance of the Human Naive CD4(+) T-Cell Compartment. *Front Pediatr*. 2016;4:119.
153. Mackay CR. Dual personality of memory T cells. *Nature*. 1999;401(6754):659-60.
154. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.
155. CD27. PathologyOutlines.com website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd27.html>. Accessed March 16th, 2018.
156. Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. *Exp Gerontol*. 1999;34(1):79-93.
157. Grogan JL, Locksley RM. T helper cell differentiation: on again, off again. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(3):366-72.

- 158.Rincon-Arevalo H, Sanchez-Parra CC, Castano D, Yassin L et al. Regulatory B Cells and Mechanisms. *Int Rev Immunol*. 2016;35(2):156-76.
- 159.Ickrath P, Kleinsasser N, Ding X, Ginzkey C et al. Impact and Modulations of Peripheral and Edaphic B Cell Subpopulations in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyposis. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2018.
- 160.Jakóbisiak M, Lasek W. Populacje i subpopulacje limfocytów. In: Gołąb J, Jakóbiak M, Lasek W, Stokłosa T, editors. *Immunologia*. Warszawa: PWN; 2014. p. 129-47.
- 161.Gąsiorowski J, Szetela B, Knysz B. Zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS). In: Gajewski P, editor. *Interna Szczeklika*. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2017. p. 2424-37.
- 162.Monocytes. PubMed Health website.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022057. Accessed June 5th, 2018.
- 163.Neutrophils. PubMed Health website.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022058/>. Accessed June 5th, 2018.
- 164.Eosinophils. PubMed Health website.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022053/>. June 5th, 2018.
- 165.Basophils. PubMed Health website.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022054/>. Accessed June 5th, 2018.
- 166.Adib-Conquy M, Scott-Algara D, Cavaillon JM, Souza-Fonseca-Guimaraes F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(3):256-62.
- 167.Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol*. 2009;129(7):1628-42.
- 168.Van Kaer L, Wu L, Parekh VV. Natural killer T cells in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*. 2015;146(1):1-10.
- 169.Kim D. Low vitamin D status is associated with hypothyroid Hashimoto's thyroiditis. *Hormones (Athens)*. 2016;15(3):385-93.
- 170.Wang S, Wu Y, Zuo Z, Zhao Y et al. The effect of vitamin D supplementation on thyroid autoantibody levels in the treatment of autoimmune thyroiditis: a systematic review and a meta-analysis. *Endocrine*. 2018;59(3):499-505.
- 171.Ma J, Wu D, Li C, Fan C et al. Lower Serum 25-Hydroxyvitamin D Level is Associated With 3 Types of Autoimmune Thyroid Diseases. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(39):e1639.

172. Anaraki PV, Aminorroaya A, Amini M, Feizi A et al. Effects of Vitamin D deficiency treatment on metabolic markers in Hashimoto thyroiditis patients. *J Res Med Sci.* 2017;22:5.
173. Ekambaram M, Kumar B, Chowdhary N, Siddaraju N et al. Significance of eosinophils in diagnosing Hashimoto's thyroiditis on fine-needle aspiration cytology. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53(3):476-9.
174. Liu Y, You R, Yu N, Gong Y et al. Increased proportions of Tc17 cells and NK cells may be risk factors for disease progression in Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol.* 2016;40:332-8.
175. Guo H, Xu B, Yang X, Wang Y et al. A high frequency of peripheral blood NKG2D+NK and NKT cells in euthyroid patients with new onset hashimoto's thyroiditis--a pilot study. *Immunol Invest.* 2014;43(4):312-23.
176. Rizzo R, Zatelli MC, Rotola A, Cassai E et al. Increase in Peripheral CD3-CD56brightCD16- Natural Killer Cells in Hashimoto's Thyroiditis Associated with HHV-6 Infection. *Adv Exp Med Biol.* 2016;897:113-20.
177. Osinska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Cent Eur J Immunol.* 2014;39(1):109-15.
178. Wu Z, Podack ER, McKenzie JM, Olsen KJ et al. Perforin expression by thyroid-infiltrating T cells in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol.* 1994;98(3):470-7.
179. Ashouri E, Dabbaghmanesh MH, Ranjbar Omrani G. Presence of more activating KIR genes is associated with Hashimoto's thyroiditis. *Endocrine.* 2014;46(3):519-25.
180. Poli A, Michel T, Patil N, Zimmer J. Revisiting the Functional Impact of NK Cells. *Trends Immunol.* 2018;39(6):460-72.
181. Lee GY, Park CY, Cha KS, Lee SE et al. Differential effect of dietary vitamin D supplementation on natural killer cell activity in lean and obese mice. *J Nutr Biochem.* 2018;55:178-84.
182. Vondra K, Bilek R, Matucha P, Salatova M et al. Vitamin D supplementation changed relationships, not levels of metabolic-hormonal parameters in autoimmune thyroiditis. *Physiol Res.* 2017;66(Supplementum 3):S409-S17.
183. Khan FA, Al-Jameil N, Khan MF, Al-Rashid M et al. Thyroid dysfunction: an autoimmune aspect. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(5):6677-81.
184. Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Rolinski J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J Immunol Res.* 2015;2015:979167.

- 185.Kaczmarek E, Lacka K, Jarmolowska-Jurczyszyn D, Sidor A et al. Changes of B and T lymphocytes and selected apoptosis markers in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Pathol*. 2011;64(7):626-30.
- 186.Mazokopakis EE, Papadomanolaki MG, Tsekouras KC, Evangelopoulos AD et al. Is vitamin D related to pathogenesis and treatment of Hashimoto's thyroiditis? *Hell J Nucl Med*. 2015;18(3):222-7.
- 187.Krysiak R, Szkrobka W, Okopien B. The Effect of Vitamin D on Thyroid Autoimmunity in Levothyroxine-Treated Women with Hashimoto's Thyroiditis and Normal Vitamin D Status. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017;125(4):229-33.
- 188.Chaudhary S, Dutta D, Kumar M, Saha S et al. Vitamin D supplementation reduces thyroid peroxidase antibody levels in patients with autoimmune thyroid disease: An open-labeled randomized controlled trial. *Indian J Endocrinol Metab*. 2016;20(3):391-8.
- 189.Simsek Y, Cakir I, Yetmis M, Dizdar OS et al. Effects of Vitamin D treatment on thyroid autoimmunity. *J Res Med Sci*. 2016;21:85.
- 190.Ucan B, Sahin M, Sayki Arslan M, Colak Bozkurt N et al. Vitamin D Treatment in Patients with Hashimoto's Thyroiditis may Decrease the Development of Hypothyroidism. *Int J Vitam Nutr Res*. 2017;1-9.
- 191.Kivity S, Agmon-Levin N, Zisappl M, Shapira Y et al. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(3):243-7.
- 192.Bozkurt NC, Karbek B, Ucan B, Sahin M et al. The association between severity of vitamin D deficiency and Hashimoto's thyroiditis. *Endocr Pract*. 2013;19(3):479-84.
- 193.Nalbant A, Aydin A, Karacan A, Onmez A et al. Association of vitamin D insufficiency/deficiency with thyroid artery Doppler ultrasonography in patients with Hashimoto thyroiditis. *Pak J Med Sci*. 2017;33(2):295-9.
- 194.Unal AD, Tarcin O, Parildar H, Cigerli O et al. Vitamin D deficiency is related to thyroid antibodies in autoimmune thyroiditis. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39(4):493-7.
- 195.Shin DY, Kim KJ, Kim D, Hwang S et al. Low serum vitamin D is associated with anti-thyroid peroxidase antibody in autoimmune thyroiditis. *Yonsei Med J*. 2014;55(2):476-81.
- 196.Camurdan OM, Doger E, Bideci A, Celik N et al. Vitamin D status in children with Hashimoto thyroiditis. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2012;25(5-6):467-70.
- 197.Chailurkit LO, Aekplakorn W, Ongphiphadhanakul B. High vitamin D status in younger individuals is associated with low circulating thyrotropin. *Thyroid*. 2013;23(1):25-30.

- 198.Goswami R, Marwaha RK, Gupta N, Tandon N et al. Prevalence of vitamin D deficiency and its relationship with thyroid autoimmunity in Asian Indians: a community-based survey. *Br J Nutr.* 2009;102(3):382-6.
- 199.Yasmeh J, Farpour F, Rizzo V, Kheradnam S et al. Hashimoto Thyroiditis Not Associated with Vitamin D Deficiency. *Endocr Pract.* 2016;22(7):809-13.
- 200.Yildirim I, Hur E, Kokturk F. Inflammatory Markers: C-Reactive Protein, Erythrocyte Sedimentation Rate, and Leukocyte Count in Vitamin D Deficient Patients with and without Chronic Kidney Disease. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:802165.
- 201.Ethier C, Yu Y, Cameron L, Lacy P et al. Calcitriol Reduces Eosinophil Necrosis Which Leads to the Diminished Release of Cytotoxic Granules. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;171(2):119-29.
- 202.Slack MA, Ogbogu PU, Phillips G, Platts-Mills TA et al. Serum vitamin D levels in a cohort of adult and pediatric patients with eosinophilic esophagitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015;115(1):45-50.
- 203.Wu HY, Chen JX, Tian HQ, Zhang XL et al. Serum 25-hydroxyvitamin D inversely associated with blood eosinophils in patients with persistent allergic rhinitis. *Asia Pac Allergy.* 2017;7(4):213-20.
- 204.El-Gohary OA, Said MA. Effect of electromagnetic waves from mobile phone on immune status of male rats: possible protective role of vitamin D. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95(2):151-6.
- 205.Takahashi K, Nakayama Y, Horiuchi H, Ohta T et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2002;24(3):335-47.
- 206.Hirsch D, Archer FE, Joshi-Kale M, Vetrano AM et al. Decreased anti-inflammatory responses to vitamin D in neonatal neutrophils. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:598345.
- 207.Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain.* 2009;132(Pt 5):1146-60.
- 208.Ding Y, Liao W, He XJ, Xiang W. Effects of 1,25(OH)₂ D₃ and vitamin D receptor on peripheral CD4(+) /CD8(+) double-positive T lymphocytes in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Cell Mol Med.* 2017;21(5):975-85.
- 209.Khoo AL, Koenen HJ, Chai LY, Sweep FC et al. Seasonal variation in vitamin D(3) levels is paralleled by changes in the peripheral blood human T cell compartment. *PLoS One.* 2012;7(1):e29250.

210. Bhargava P, Gocke A, Calabresi PA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 impairs the differentiation of effector memory T cells in vitro in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neuroimmunol.* 2015;279:20-4.
211. Looman KIM, Jansen MAE, Voortman T, van den Heuvel D et al. The role of vitamin D on circulating memory T cells in children: The Generation R study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2017;28(6):579-87.
212. Cantorna MT, Waddell A. The vitamin D receptor turns off chronically activated T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1317:70-5.
213. Colotta F, Jansson B, Bonelli F. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *J Autoimmun.* 2017;85:78-97.
214. Rolf L, Muris AH, Hupperts R, Damoiseaux J. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1317:84-91.

X. Spis tabel

1. <i>Geny, których polimorfizmy zwiększają częstość występowania AIT.</i>	17
2. <i>Pozagenetyczne czynniki ryzyka zachorowania na AIT.</i>	18
3. <i>Charakterystyka grupy z AIT i grupy kontrolnej.</i>	31
4. <i>Wykaz zastosowanych zestawów do wykonywania badań metodą immunoenzymatyczną (ELISA).</i>	32
5. <i>Harmonogram wykonywania badań laboratoryjnych u chorych z AIT i w grupie kontrolnej.</i>	32
6. <i>Charakterystyka przeciwciał użytych do analizy cytometrycznej.</i>	33
7. <i>Charakterystyka odczynników użytych do analizy cytometrycznej.</i>	34
8. <i>Populacje badanych komórek oraz sposób ich identyfikacji.</i>	35
9. <i>Ocena istotności statystycznej zmian stężenia badanych parametrów biochemicznych w czasie badania.</i>	38
10. <i>Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów biochemicznych w poszczególnych miesiącach badania.</i>	39
11. <i>Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D i zmian badanych parametrów biochemicznych w czasie badania.</i>	40
12. <i>Analiza statystyczna zmian parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej w czasie badania.</i>	41
13. <i>Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej wrodzonej w poszczególnych miesiącach badania.</i>	48
14. <i>Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej wrodzonej w czasie badania.</i> ..	53
15. <i>Analiza statystyczna zmian stężenia CRP w czasie badania.</i>	53
16. <i>Korelacja stężenia witaminy 25(OH)D i stężenia CRP w poszczególnych miesiącach badania.</i>	54
17. <i>Korelacja zmian stężenia 25(OH)D i CRP w czasie badania.</i>	55
18. <i>Analiza statystyczna zmian parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej w czasie badania</i>	58

19. Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej nabytej w poszczególnych miesiącach badania. ...	70
20. Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej nabytej w czasie badania.	74
21. Analiza statystyczna zmian parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w czasie badania.	75
22. Korelacje stężenia witaminy 25(OH)D i badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w poszczególnych miesiącach badania. ...	79
23. Korelacje zmiany stężenia witaminy 25(OH)D oraz zmian badanych parametrów odpowiedzi immunologicznej humoralnej nabytej w czasie badania.	80
24. Wpływ witaminy D na komórki układu odpornościowego.	90

XI. Spis rycin

1. Wzory strukturalne witaminy D_2 , D_3 oraz 1α , $25(OH)_2D_3$	1
2. Fotosynteza witaminy D_3 w skórze.	2
3. Dojrzewanie limfocytów T pomocniczych.	25
4. Schemat kwalifikacji pacjentek do grupy AIT.	29
5. Schemat kwalifikacji kobiet do grupy kontrolnej.	30
6. Rozkład stężenia $25(OH)D$ w poszczególnych miesiącach badania.	37
7. Rozkład liczby leukocytów (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania.	42
8. Rozkład liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	42
9. Rozkład liczby monocytów (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania.	43
10. Rozkład liczby eozynofili (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania.	43
11. Rozkład liczby bazofili (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania.	44
12. Rozkład liczby neutrofilii (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania.	44
13. Rozkład odsetka komórek NK względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	45
14. Rozkład liczby komórek NK (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	45
15. Rozkład odsetka komórek NKT względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	46
16. Rozkład liczby komórek NKT (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	46
17. Wykres rozrzutu stężenia $25(OH)D$ i liczby leukocytów (morfologia krwi z rozmazem) pacjentek z AIT w szóstym miesiącu badania.	49
18. Wykres rozrzutu stężenia $25(OH)D$ i liczby leukocytów (morfologia krwi z rozmazem) kobiet z obu grup w szóstym miesiącu badania.	49

19. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby monocytów (morfologia krwi z rozmazem) kobiet z obu grup w szóstym miesiącu badania.	50
20. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby bazofili (morfologia krwi z rozmazem) kobiet z grupy kontrolnej w momencie włączenia do badania.	50
21. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby neutrofili (morfologia krwi z rozmazem) pacjentek z AIT w szóstym miesiącu badania.	51
22. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby neutrofili (morfologia krwi z rozmazem) kobiet z obu grup w szóstym miesiącu badania.	51
23. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i odsetka komórek NK względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) pacjentek z AIT w trzecim miesiącu badania.	52
24. Rozkład stężenia CRP na początku oraz po sześciu miesiącach badania.	55
25. Rozkład liczby limfocytów (morfologia krwi z rozmazem) w poszczególnych miesiącach badania.	59
26. Rozkład odsetka limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	59
27. Rozkład liczby limfocytów T (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	60
28. Rozkład odsetka limfocytów Th względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) poszczególnych miesiącach badania.	60
29. Rozkład liczby limfocytów Th (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	61
30. Rozkład odsetka limfocytów Tc względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	61
31. Rozkład liczby limfocytów Tc (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	62
32. Rozkład odsetka limfocytów T DP względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	62
33. Rozkład liczby limfocytów T DP (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	63
34. Rozkład odsetka RTE względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	63

35. Rozkład liczby RTE (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	64
36. Rozkład odsetka limfocytów Th0 względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	64
37. Rozkład liczby limfocytów Th0 (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	65
38. Rozkład odsetka limfocytów Th EM względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	65
39. Rozkład liczby limfocytów Th EM (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	66
40. Rozkład odsetka limfocytów Th CM względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	66
41. Rozkład liczby limfocytów Th CM (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	67
42. Rozkład odsetka limfocytów Th TD względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	67
43. Rozkład liczby limfocytów Th TD (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	68
44. Rozkład odsetka aktywowanych limfocytów T względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania. ...	68
45. Rozkład liczby aktywowanych limfocytów T (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	69
46. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i liczby wczesnych emigrantów grasicznych (cytometria przepływowa) kobiet z grupy kontrolnej w momencie rozpoczęcia badania.	72
47. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i odsetka limfocytów Th naiwnych względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) kobiet z grupy kontrolnej w momencie rozpoczęcia badania.	72
48. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i odsetka limfocytów Th pamięci centralnej względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) kobiet z grupy kontrolnej w momencie rozpoczęcia badania.	73
49. Rozkład odsetka limfocytów B względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	76

50. Rozkład liczby limfocytów B (cytometria przepływowa) w poszczególnych miesiącach badania.	76
51. Rozkład stężenia przeciwciał anti-TPO na początku oraz po sześciu miesiącach badania.	77
52. Rozkład stężenia przeciwciał anti-TG na początku oraz po sześciu miesiącach badania.	77
53. Wykres rozrzutu stężenia 25(OH)D i odsetka limfocytów B względem całkowitej liczby leukocytów (cytometria przepływowa) u kobiet z grupy kontrolnej w trzecim miesiącu badania.	80

XII. Supplement

1. Wyniki badań (średnie wraz z odchyleniami standardowymi, mediany, zakresy danych parametrów immunologicznych i biochemicznych oraz wartości p testu U Manna –Whitneya dla porównania mediany grupy z AIT oraz kontrolnej).
2. Formularz informacyjny oraz zgoda na badanie.
3. Zgoda komisji bioetycznej.

Tabela I. Wyniki badań. Część I/IV.

Badany parametr	Grupa	Miesiąc 0				Miesiąc 3				Miesiąc 6			
		Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW
ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA WRODZONA – KOMÓRKOWA													
Leukocyty* [x10 ³ /μl]	AIT	5.73 +/- 1.35	5.75	3.51 - 8.26	0.5446	6.32 +/- 1.65	6.21	3.85 - 10.08	0.9081	6.26 +/- 1.54	6.30	3.42 - 11.06	0.7843
	K	5.98 +/- 1.56	5.98	3 - 10.67		6.53 +/- 2.48	5.90	2.98 - 15.84		6.49 +/- 1.7	6.03	3.21 - 11.11	
Leukocyty CD45+ [x10 ³ /μl]	AIT	162.67 +/- 52.89	154.94	52.3 - 255.31	0.1665	200.65 +/- 58.07	203.75	102.83 - 315.21	0.8467	203.62 +/- 57.88	194.54	126.64 - 390.26	0.2733
	K	180.67 +/- 47.57	181.69	44.07 - 255.5		209.45 +/- 69.65	202.54	89.66 - 370.17		219.52 +/- 59.9	212.86	128.1 - 386.81	
Monocyty* [x10 ³ /μl]	AIT	0.52 +/- 0.17	0.50	0.25 - 0.91	0.2308	0.52 +/- 0.14	0.48	0.3 - 0.82	0.6185	0.55 +/- 0.14	0.54	0.28 - 0.89	0.7334
	K	0.59 +/- 0.22	0.56	0.32 - 1.49		0.56 +/- 0.21	0.54	0.29 - 1.26		0.54 +/- 0.14	0.52	0.3 - 1.04	
Eozynofile* [x10 ³ /μl]	AIT	0.18 +/- 0.1	0.16	0.04 - 0.48	0.5979	0.18 +/- 0.11	0.16	0.04 - 0.56	0.5981	0.17 +/- 0.09	0.16	0.03 - 0.4	0.2797
	K	0.19 +/- 0.19	0.14	0.02 - 1.11		0.19 +/- 0.15	0.14	0.04 - 0.59		0.17 +/- 0.13	0.13	0.04 - 0.57	
Bazofile* [x10 ³ /μl]	AIT	0.04 +/- 0.02	0.03	0.01 - 0.07	0.0837	0.04 +/- 0.02	0.03	0.02 - 0.08	0.8012	0.04 +/- 0.02	0.04	0.01 - 0.1	0.5675
	K	0.03 +/- 0.01	0.03	0 - 0.05		0.04 +/- 0.02	0.03	0.01 - 0.09		0.04 +/- 0.02	0.04	0.01 - 0.09	
Neutrofile* [x10 ³ /μl]	AIT	3.04 +/- 0.88	2.94	1.52 - 4.72	0.2729	3.45 +/- 1.26	3.21	1.64 - 5.85	0.4619	3.3 +/- 1.23	3.11	1.4 - 7.32	0.7337
	K	2.89 +/- 1.34	2.77	1.11 - 6.89		3.54 +/- 2.29	2.86	1.2 - 13.18		3.32 +/- 1.23	3.47	1.05 - 6.27	
Komórki NK % [%]	AIT	9.6 +/- 3.65	9.40	2.4 - 19.4	0.7559	9.72 +/- 3.89	9.45	2.9 - 19.2	0.8625	9.61 +/- 4.75	9.30	2.7 - 24.7	0.9093
	K	10.95 +/- 5.85	10.20	3 - 27.2		10.4 +/- 4.85	8.90	4.1 - 22.3		10.23 +/- 5.57	8.70	3.7 - 26.5	
Komórki NK [x10 ³ /μl]	AIT	1574.18 +/- 936.83	1429.25	456.73 - 4952.98	0.1443	1907.63 +/- 902.31	1646.76	633.99 - 3996.72	0.6010	1973.79 +/- 1239.76	1648.95	613.96 - 5619.74	0.4196
	K	1969.61 +/- 1161.22	1798.50	449.53 - 5113.09		2201.67 +/- 1375.31	1970.80	726.26 - 6211.48		2312.32 +/- 1632.84	1967.94	762.3 - 7648.96	
Komórki NKT % [%]	AIT	8.71 +/- 16.16	4.95	2.5 - 88.7	0.4666	2.79 +/- 1.84	2.30	0.2 - 7.9	0.1989	3.79 +/- 5.98	2.20	0.3 - 32.4	0.3161
	K	6.21 +/- 5.9	4.40	1.3 - 29.6		2.7 +/- 2.81	1.50	0.1 - 13.1		2.92 +/- 3.37	1.80	0.1 - 15.4	
Komórki NKT [x10 ³ /μl]	AIT	1647.67 +/- 4070.37	783.93	307.39 - 22645.82	0.7463	553.26 +/- 406.47	416.03	34.26 - 1605.14	0.3399	800.7 +/- 1354.32	395.17	41.8 - 7289.71	0.4023
	K	1140.48 +/- 1125.09	984.41	96.96 - 5173.55		526.13 +/- 506	339.22	22.71 - 2216.44		602.13 +/- 733.26	350.22	28.33 - 3556.04	
ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA WRODZONA – HUMORALNA													
CRP [mg/l]	AIT	1.36 +/- 2.41	0.50	0.1 - 11.7	0.1913	NA	NA	NA	NA	2.17 +/- 3.21	1.10	0.1 - 14.9	0.0232
	K	0.93 +/- 1.86	0.30	0.1 - 10		NA	NA	NA		1.13 +/- 1.64	0.50	0.1 - 7.9	

Tabela I. Wyniki badań. Część II/IV.

Badany parametr	Grupa	Miesiąc 0				Miesiąc 3				Miesiąc 6			
		Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW
ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA NABYTA – KOMÓRKOWA													
Limfocyty* [x10 ³ /μl]	AIT	1.95 +/- 0.55	1.92	0.7 - 2.92	0.0514	2.14 +/- 0.6	2.15	1.11 - 3.43	0.7785	2.84 +/- 3.4	2.21	1.34 - 20.3	0.8591
	K	3.28 +/- 5.23	2.28	0.45 - 30.5		2.2 +/- 0.58	2.15	1.29 - 3.73		2.3 +/- 0.71	2.15	0.25 - 4.04	
Limfocyty T % [%]	AIT	64.15 +/- 8.45	65.25	45.5 - 78.7	0.1015	66.97 +/- 7.57	67.25	49.3 - 78.1	0.8708	68.76 +/- 7.16	68.70	52.9 - 82.5	0.5640
	K	66.82 +/- 7.94	69.10	46.8 - 77.2		67.32 +/- 6.67	67.55	53 - 77.6		69.12 +/- 7.5	70.60	47.9 - 83	
Limfocyty T [x10 ³ /μl]	AIT	10502.57 +/- 3735.26	10599.25	2918.28 - 16986.13	0.0971	13563.4 +/- 4415.06	14026.60	5513.71 - 22253.83	0.7747	14058.65 +/- 4363.09	13287.11	8405.07 - 26303.52	0.3301
	K	12164.53 +/- 3602.92	12286.37	2221.23 - 18483.93		14248.89 +/- 5008.03	14057.72	6079.08 - 27874.03		15168.62 +/- 4491.47	14500.68	8006.25 - 25956.92	
Limfocyty Th % [%]	AIT	57.74 +/- 8.34	57.40	41.6 - 75.3	0.5956	58.7 +/- 8.39	57.95	38.8 - 75.2	0.9024	57.85 +/- 8.96	55.80	44.5 - 75	0.3869
	K	58.53 +/- 7.68	57.90	41.4 - 71.3		58.82 +/- 8.09	59.50	43.7 - 73.4		59.72 +/- 8.33	60.00	43.5 - 75.3	
Limfocyty Th [x10 ³ /μl]	AIT	9544.22 +/- 3789.2	9266.57	2484.2 - 17270.88	0.1964	11990.84 +/- 4668.39	11557.71	6223.85 - 21975.62	0.7043	11898.32 +/- 4437.89	10459.40	6851.06 - 27005.99	0.2178
	K	10605.51 +/- 3234.63	10447.54	2468.03 - 16888.29		12351.35 +/- 4577.62	11801.11	5745.33 - 23047.6		13271.31 +/- 4790.66	11696.36	7016.84 - 26728.36	
Limfocyty Tc % [%]	AIT	32.93 +/- 7.64	33.20	18.8 - 45.9	0.9335	32.67 +/- 7.21	32.40	21.4 - 45.1	0.9712	34.74 +/- 8.02	35.95	20.1 - 47.2	0.4755
	K	33.16 +/- 7.11	32.30	20.4 - 48.5		32.85 +/- 6.77	32.60	22 - 47.9		33.21 +/- 7.02	32.70	21.2 - 48.1	
Limfocyty Tc [x10 ³ /μl]	AIT	5252.7 +/- 1948.67	4941.20	1923.7 - 9405.74	0.1713	6385.59 +/- 1789.16	6372.06	3105.56 - 9203.82	0.7691	6964.32 +/- 2248.87	6433.92	3722.23 - 13561.08	0.5315
	K	5930.59 +/- 2007.6	5839.79	1793.73 - 11204.14		6861.02 +/- 2682.13	6386.28	2447.77 - 14288.68		7160.77 +/- 1966.47	7045.53	3940 - 10732.68	
Limfocyty T DP % [%]	AIT	4.43 +/- 3.64	3.70	1 - 19.6	0.6765	3.43 +/- 2.72	2.75	0.7 - 12.6	0.6184	2.99 +/- 1.63	2.60	1.2 - 7.9	0.8494
	K	3.58 +/- 1.82	3.70	0.9 - 7.6		3.25 +/- 2.62	2.50	1 - 14.7		2.91 +/- 1.46	2.60	0.9 - 6.3	
Limfocyty T DP [x10 ³ /μl]	AIT	697.49 +/- 568.23	485.28	135.98 - 2276.16	0.4931	682.1 +/- 594.3	473.94	143.03 - 3076.27	0.8918	587.09 +/- 305.25	485.46	242.88 - 1572.73	0.7921
	K	653.57 +/- 369.76	594.93	39.66 - 1491.13		640.69 +/- 491.42	546.16	219.36 - 2773.58		607.97 +/- 289.47	556.28	182.57 - 1454.75	
RTE % [%]	AIT	37.37 +/- 9.79	36.60	26 - 58.1	0.2506	37.54 +/- 9.02	37.90	23.4 - 55.6	0.5178	38.15 +/- 9.06	39.10	24 - 59.5	0.3816
	K	40.51 +/- 10.51	41.80	18.2 - 55.3		39.29 +/- 9.19	39.60	21.4 - 57.5		39.77 +/- 8.89	40.50	17.5 - 55.1	
RTE [x10 ³ /μl]	AIT	6419.87 +/- 2780.53	5861.52	1864.4 - 12094.97	0.4100	7914.56 +/- 3709.29	7237.51	2406.29 - 17494.15	0.8579	8079.56 +/- 3558.08	7490.28	3039.29 - 18849.56	0.4223
	K	7308.43 +/- 2698.22	7778.68	3260.83 - 13950.08		7709.09 +/- 2443.05	7771.37	2914.01 - 13401.53		8713.96 +/- 3515.97	8074.97	2594.04 - 19959.24	

Tabela I. Wyniki badań. Część III/IV.

Badany parametr	Grupa	Miesiąc 0				Miesiąc 3				Miesiąc 6			
		Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW
cd. ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA NABYTA – KOMÓRKOWA													
Limfocyty Th0 % [%]	AIT	47.86 +/- 10.69	47.70	30.5 - 67.6	0.2773	48.22 +/- 11.53	48.10	29.4 - 68	0.4317	48.56 +/- 10.3	50.75	31.8 - 66.2	0.2678
	K	51.13 +/- 11.91	53.70	26 - 67.8		50.4 +/- 10.38	50.50	25.8 - 65.5		51.46 +/- 10.95	52.30	25.6 - 68.9	
Limfocyty Th0 [x10³/µl]	AIT	8171.16 +/- 3682.85	7587.60	2147.69 - 17258.82	0.2621	10118.13 +/- 4841.75	8997.47	3023.29 - 20204.96	0.5616	10219.56 +/- 4526.26	8833.52	4535.13 - 23883.91	0.3855
	K	9180.12 +/- 3237.83	9338.45	4618.24 - 17322.63		10373.53 +/- 3532.23	9789.39	4043.76 - 18212		11509.72 +/- 4690.1	11097.86	3794.71 - 26651	
Limfocyty ThEM % [%]	AIT	7.75 +/- 3.82	7.20	2.8 - 19	0.7959	7.12 +/- 3.61	6.45	2.7 - 19	0.7075	8.06 +/- 4.64	6.30	2.3 - 24.2	0.3349
	K	7.74 +/- 4.68	5.90	43151		6.99 +/- 4.48	6.00	2.4 - 25.6		7.5 +/- 4.63	6.40	2 - 22.5	
Limfocyty ThEM [x10³/µl]	AIT	1230.56 +/- 607.51	1096.66	387.53 - 2496.75	0.8456	1344.65 +/- 590.51	1202.23	391.74 - 2927.41	0.9486	1553.19 +/- 802.93	1377.56	509.24 - 4523.32	0.8862
	K	1333.23 +/- 803.96	1090.16	490.82 - 3239.6		1477.27 +/- 979.26	1342.80	349.33 - 4036.69		1575.9 +/- 966.88	1429.94	530.17 - 5195.52	
Limfocyty ThCM % [%]	AIT	42.77 +/- 9.33	44.10	19.9 - 57	0.2031	43.64 +/- 9.76	43.35	24.5 - 60.5	0.4531	41.88 +/- 8.94	42.15	23.2 - 58.1	0.3911
	K	39.91 +/- 8.69	38.60	28 - 59.9		41.95 +/- 8.18	41.60	31.2 - 61.4		40.07 +/- 7.85	38.70	28.8 - 60.1	
Limfocyty ThCM [x10³/µl]	AIT	6898.88 +/- 2139.64	6511.57	3484.86 - 11215.84	0.7045	8376.09 +/- 1808.17	8317.48	4332.2 - 10927.03	0.9372	8241.07 +/- 1794.5	8183.63	4618.66 - 11221.52	0.4553
	K	7091.52 +/- 2126.64	6652.69	3756.06 - 11294.26		8954.72 +/- 4022.53	7900.01	3892.54 - 20827.99		8665.13 +/- 2311.38	8492.18	4381.75 - 14198.12	
Limfocyty ThTD % [%]	AIT	1.61 +/- 1.92	0.75	0.2 - 7.5	0.7091	1.02 +/- 1.11	0.65	0 - 5.4	0.4055	1.5 +/- 1.63	0.85	0.3 - 7.4	0.1808
	K	1.22 +/- 0.9	1.10	0.1 - 3.7		0.67 +/- 0.51	0.50	0 - 2.1		0.98 +/- 0.83	0.70	0 - 3.3	
Limfocyty ThTD [x10³/µl]	AIT	295.89 +/- 453.15	113.86	39.33 - 1914.81	0.4661	224.27 +/- 318.15	119.39	0 - 1660.18	0.3484	349.03 +/- 548.96	169.77	57.05 - 2887.92	0.3855
	K	227.43 +/- 209.36	191.44	21.52 - 933.72		140.8 +/- 120.95	90.32	0 - 464.81		202.88 +/- 156.59	173.18	0 - 554.19	
Aktywowane limfocyty T % [%]	AIT	4.15 +/- 1.75	3.70	1.6 - 8.9	0.1953	3.69 +/- 1.71	3.15	1.4 - 8.9	0.0282	3.55 +/- 3.33	2.65	43119	0.0607
	K	3.85 +/- 2.26	2.95	0.9 - 10.8		3.02 +/- 2.31	2.20	0.3 - 9.5		2.56 +/- 1.94	2.10	0.6 - 10.6	
Aktywowane limfocyty T [x10³/µl]	AIT	647.14 +/- 312.68	618.26	184.46 - 1361.63	0.8804	713.47 +/- 312.41	690.66	215.95 - 1259.73	0.0678	699.67 +/- 635.17	565.86	171.12 - 3551.37	0.1855
	K	704.02 +/- 474.42	515.01	158.65 - 2055.39		625.43 +/- 516.45	469.24	68.14 - 1933.54		540.69 +/- 423.25	429.29	135.72 - 2447.67	

Tabela I. Wyniki badań. Część IV/IV.

Badany parametr	Grupa	Miesiąc 0				Miesiąc 3				Miesiąc 6			
		Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW	Średnia +/- SD	Mediana	Zakres	p wartość testu UMW
ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA NABYTA – HUMORALNA													
Limfocyty B % [%]	AIT	11.32 +/- 3.69	10.80	4.7 - 18	0.6221	12.52 +/- 4.24	12.35	5.3 - 21.2	0.7338	10.72 +/- 3.14	10.25	5.4 - 20.7	0.5286
	K	12.31 +/- 4.77	10.40	5.3 - 29.7		12.02 +/- 3.23	12.45	7 - 21.3		11.18 +/- 3.42	11.40	4.7 - 19.3	
Limfocyty B [x10 ³ /μl]	AIT	1845.45 +/- 935.44	1661.31	570.06 - 4263.64	0.0881	2479.13 +/- 1055.69	2299.42	947.76 - 5356.96	0.7973	2169.34 +/- 872.25	1908.50	1139.73 - 4440.36	0.2012
	K	2160.53 +/- 883.96	2044.79	1083.67 - 4292.33		2568.48 +/- 1167.25	2253.61	983.12 - 5034.35		2442.64 +/- 957	2338.67	1085.29 - 4816.19	
Anty-TPO [IU/ml]	AIT	156.83 +/- 145.08	96.00	5 - 578	0.0000	NA	NA	NA	NA	171.86 +/- 154.02	131.00	5 - 600	NA
	K	10.03 +/- 5.53	10.00	5 - 36		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
Anty-TG [IU/ml]	AIT	406.43 +/- 750.31	240.50	18 - 4000	0.0000	NA	NA	NA	NA	403.1 +/- 702.05	212.00	14 - 3095	NA
	K	13.29 +/- 6.48	11.00	10 - 44		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PARAMETRY BIOCHEMICZNE													
25(OH)D [ng/dl]	AIT	18.4 +/- 4.71	19.00	43337	0.0810	36.63 +/- 7.73	36.50	22 - 51	0.5838	39.9 +/- 9.18	42.00	15 - 58	0.5195
	K	20.55 +/- 3.35	21.00	14 - 25		35.7 +/- 7.64	34.00	23 - 52		41.65 +/- 7.34	41.00	27 - 61	
Wapń całkowity [mg/dl]	AIT	9.49 +/- 0.36	9.50	8.88 - 10.2	0.7400	9.46 +/- 0.33	9.39	8.89 - 10.37	0.0760	9.5 +/- 0.33	9.57	8.97 - 10.29	0.3287
	K	9.51 +/- 0.31	9.54	8.9 - 10.04		9.57 +/- 0.27	9.55	9.02 - 10.17		9.59 +/- 0.23	9.63	9.11 - 10.05	
TSH [μU/ml]	AIT	1.9 +/- 0.91	1.80	0.3 - 3.31	0.1335	NA	NA	NA	NA	3.28 +/- 2.27	2.77	0.22 - 10.34	NA
	K	2.27 +/- 0.83	2.09	0.88 - 3.99		NA	NA	NA		NA	NA	NA - NA	
Legenda:													
* – metoda oznaczania: morfologia krwi z rozmazem automatycznym													
Leukocyty – CD45+													
Komórki NK – CD3- CD16/CD56+													
Komórki NKT – CD3+ CD16/CD56+													
Limfocyty T – CD3+ CD19-													
Limfocyty Th – CD3+ CD4+ CD8-													
Limfocyty Tc – CD3+ CD4- CD8+													
Limfocyty DP (podwójnie pozytywne) – CD3+ CD4+ CD8+													
RTE (wczesne emigranty grasicze) – CD3+ CD4+ CD45RA+ CD31+													
Limfocyty Th0 – CD3+ CD4+ CD45RA+ CD27+													
Limfocyty ThEM (pamięci efektorowej) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27-													
Limfocyty ThCM (pamięci centralnej) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27+													
Limfocyty ThTD (terminalnie zróżnicowane) – CD3+ CD4+ CD45RA- CD27-													
Aktywowane limfocyty T – CD3+ HLA/DR3+													
Limfocyty B – CD3- CD19+													
Anty-TPO – przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie													
Anty-TG – przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie													
NA – brak pomiaru danych													
K – grupa kontrolna													
test UMW – test U Manna - Whitneya													
kolor żółty – istotność statystyczna													

FORMULARZ INFORMACYJNY DLA PACJENTKI

Niniejszy formularz dostarcza informacji na temat badania, jego celu, a także zagrożeniach i korzyściach związanych z udziałem.

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu we współpracy z Katedrą Immunologii Klinicznej prowadzi badania wpływu podawania witaminy D₃ u osób z jej niedoborem na układ odpornościowy człowieka. W ramach tych badań planowana jest analiza morfologii krwi, parametrów biochemicznych gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz wykonanie cytometrii przepływowej.

Kierownikiem projektu jest lek. Katarzyna Piątek, a badania będą odbywały się pod nadzorem dr hab. n. med. Grzegorza Dworackiego prof. UM i dr hab. Katarzyny Ziemnickiej prof. UM. Pacjenci biorący udział w badaniu nie są poddawani żadnym dodatkowym procedurom diagnostycznym. Badania będą przeprowadzone w surowicy krwi (10,3ml) w czasie rekrutacji do badania oraz po 3. i 6. miesiącach suplementacji witaminą D₃. Osoby biorące udział w badaniu otrzymają bezpłatnie zarejestrowany w Polsce preparat witaminy D₃ w ilości wystarczającej na 6. miesięcy suplementacji po 1. kapsułce (2000 IU) dziennie.

Wszelkie uzyskane informacje będą opracowywane w warunkach pełnej poufności wyłącznie przez osoby pracujące przy tym badaniu. Udział w badaniu nie wiąże się z żadnymi dodatkowymi zagrożeniami i ryzykiem. Jeśli miałaby Pani jakiegokolwiek pytania czy wątpliwości, wszelkich informacji udzieli osoby prowadzące badanie w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UM w Poznaniu (tel. 61-85471154 – oddział D3, tel. 732 996 993 lek. Katarzyna Piątek). Wszelkie wiadomości na temat Pani wyników badań będą traktowane jako poufne. Jedynymi osobami, które będą miały wgląd do tych informacji będą pracownicy naukowci związani z projektem. Wyniki opublikowane zostaną w czasopiśmie medycznym, dzięki czemu inni lekarze będą mogli korzystać z tej wiedzy, jednak Pani informacje osobiste nie będą tam umieszczone i nie będzie mogła być Pani zidentyfikowana w żaden sposób.

Osoba zakwalifikowana ma prawo nie zgodzić się na udział w badaniu jak i odstąpić od uczestnictwa w nim na każdym jego etapie, również bez podania przyczyny, co należy zgłosić osobom prowadzącym badanie.

ZGODA NA BADANIE

Nazwisko, imię

PESEL

Wyrażam / nie wyrażam* zgodę na udział w wyżej wymienionym badaniu
(* niepotrzebne skreślić)

.....
podpis osoby badanej

.....
podpis i pieczętka lekarza

.....
data



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 989/15

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 431); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 05 listopada 2015 r.
rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: Prof. dr hab. Katarzyna Ziemnicka

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób
Wewnętrznych UM w Poznaniu**

Główny badacz: lek. med. Katarzyna Piątek

Członkowie zespołu

badawczego: dr hab. Katarzyna Ziemnicka prof. UM

dr hab. Grzegorz Dworacki prof. UM

lek. Katarzyna Piątek

Temat badań:

„Wpływ suplementacji witaminą D na immunokompetencję układu odpornościowego u chorych z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy”.

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na zmianie brzmienia tematu z „Wpływ suplementacji witaminy D3 na immunokompetencję układu odpornościowego”, na powyższy – zgodnie z Aneks nr 1 z dnia 05.11.2015r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 544/15 z dnia 11.06.2015r. Metodyka pozostaje bez zmian.

Przewodniczący Komisji

Paweł Chęciński

prof. dr hab. med. Paweł Chęciński